

DM

**Caracterização de Estirpes Autóctones
de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas
a partir de Ambientes Vitivinícolas
da Ilha da Madeira**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariangie Elisa Martinez Castillo

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

fevereiro | 2018

**Caracterização de Estirpes Autóctones
de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas
a partir de Ambientes Vitivinícolas
da Ilha da Madeira**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariangie Elisa Martinez Castillo

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADORA
Mahnaz Khadem

CO-ORIENTADOR
José de Sousa Câmara



Caracterização de Estirpes Autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* Isoladas a partir de Ambientes Vitivícolas da Ilha da Madeira

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DA MADEIRA para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Mahnaz Khadem (Banco de Germoplasma ISOplexis) e o Professor Doutor José de Sousa Câmara (Centro de Química da Madeira)

Campus Universitário da Penteada

Mariangie Elisa Martinez Castillo

Funchal – Portugal

Fevereiro 2018

Agradecimentos

Este é um dos momentos, pelo qual esperamos, para podermos expressar por palavras os sentimentos e sensações vividas ao longo da produção deste trabalho.

O sucesso deste trabalho, foi o resultado da confluência do apoio de pessoas e instituições, que de forma direta ou indireta, me proporcionaram os meios físicos e humanos para sua concretização.

Quero expressar um profundo agradecimento à minha orientadora, Prof. Doutora Mahnaz Khadem, pela oportunidade, confiança, disponibilidade e o incansável apoio, não apenas para me transmitir os seus profundos conhecimentos científicos, mas também pelos ensinamentos sempre precisos diretos e valiosos para à vida.

Ao meu Co-orientador, o Prof. Doutor José de Sousa Câmara, com quem partilho a paixão pela ciência do vinho, expresso o meu profundo agradecimento e louvor, por acolher, acreditar e pelos seus imprescindíveis ensinamentos e pertinência das suas críticas e sugestões.

Ao Banco de Germoplasma ISOPlexis, Laboratório de biologia molecular e biotecnologia, que disponibilizou as instalações para a realização da minha tese, agradeço as facilidades concedidas.

Um agradecimento especial à Empresa Vinhos Barbeito (Madeira) Lda. pelo fornecimento de amostras e material enológico. Em especial, gostaria de agradecer ao Dr. Ricardo Diogo Freitas pela oportunidade e apoio constantes, e ao Dr. Nuno Duarte pela informação técnica e disponibilidade. Não poderia deixar o meu apreço a toda a excelente equipa que ali labora.

Às colegas de laboratório, Sónia Ferraz, Cristina Oliveira, Marta Rodrigues e Inês Leite, pela troca constante de conhecimentos e experiencias e no geral, por tornar agradável o dia-a-dia. Um agradecimento especial a Teresa Santos e particularmente ao Emanuel Silva, pela amizade e pela sua “co-co-orientação” na parte prática de molecular.

Aos meus colegas do Laboratório de Química Analítica e Enologia (ACELab) e muito especialmente à Catarina Luís e Rosa Perestrelo, pela sua prestabilidade e amabilidade.

Pela disponibilidade e infinita paciência, às técnicas de laboratório Paula Andrade e Paula Sousa, especialmente ao Adriano Faria.

Aos meus colegas cientistas e amigos Joselin Vieira, Ana Olival, João Gonçalves e Paulo Marta, expresso um especial agradecimento pelos incentivos e contribuições, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Finalmente, agradeço ao Centro de Química da Madeira (CQM) e à Universidade da Madeira (UMa) que me proporcionaram os meios necessários para a realização da minha tese. De igual modo, o meu enorme apreço à Fundação para a Ciência e a Tecnologia - FCT (projeto PestOE/QUI/UI0674/2013, CQM) e à Associação Regional para o Desenvolvimento da Investigação Tecnologia e Inovação - ARDITI (projeto M1420-01-0145-FEDER-000005 - Centro de Química da Madeira - CQM+ (Madeira 14-20)) pelo seu financiamento.

Aos meus três Migueis

O combustível da minha existência

Resumo

A qualidade e tipicidade dos vinhos depende também dos compostos orgânicos voláteis (VOCs), biossintetizados por *Saccharomyces cerevisiae*. A estirpe de levedura influencia a diversidade e proporção de VOCs produzidos durante o processo fermentativo, devido à predisposição genética, produto da adaptação seletiva ao ecossistema.

O presente trabalho reporta a caracterização de estirpes de *S. cerevisiae* isoladas a partir de 100 leveduras provenientes de 10 mostos, obtidos a partir de castas autorizadas/recomendadas para vinificação na Região Demarcada da Madeira (RDM), durante a campanha vitivinícola de 2015.

Primeiramente, a espécie foi identificação através da amplificação e análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) da região 5.8S- *internal transcribed spacers* (PCR-RFLP de 5.8S-ITS) do DNA ribossomal (rDNA). Seguidamente, a identificação das estirpes foi realizada através da análise do padrão RFLP do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA).

Os isolados analisados pertencem a espécie *S. cerevisiae* e 8 estirpes foram distinguidas. A estirpe B (EB) representou 81 % dos isolados analisados, enquanto que a estirpe A (EA) 11 %. Estas estirpes foram selecionadas para caracterização do perfil volátil com recurso à microextração em fase sólida em modo de espaço de cabeça (HS-SPME), seguida da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

Foram identificados um total de 53 VOCs na EA e 60 na EB. Sendo às famílias químicas maioritárias os álcoois superiores, ésteres e ácidos gordos, representando, respetivamente 63, 16 e 9 % em EA e 54, 23 e 15 % em EB. Dos resultados obtidos pode constata-se a influência do metabolismo da estirpe na produção de VOCs, muitos dos quais, provavelmente, participam no aroma dos vinhos produzidos.

Palavras-chaves: Região Demarcada da Madeira, *Saccharomyces cerevisiae*, estirpes, identificação molecular, compostos orgânicos voláteis.

Abstract

The quality and typical characteristic of wines depend also on the volatile organic compounds (VOCs) that are biosynthesized by *Saccharomyces cerevisiae*. The strain of the yeast influences the diversity and proportions of VOCs, produced during fermentation process. While the genetic predisposition of the strains is a byproduct of selective adaptation to the ecosystem.

The present work reports the characterizations of strains of *S. cerevisiae* isolated from 100 yeasts from 10 musts obtained from grapes used in winemaking in Demarcated Region of Madeira (RDM), during 2015 campaign.

First the yeast species was identified by amplification and analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of the region 5.8 S- Internal Transcribed Spacers (PCR-RFLP of 5.8S-ITS) of ribosomal DNA (rDNA). Then the identification of the strains was performed by analyzing the RFLP pattern of mitochondrial DNA (RFLP-mtDNA).

The analyzed isolates belonged to the species *S. cerevisiae* and eight strains were distinguished. The strain B (EB) represented 81% of the isolates analyzed, while the strain A (EA) 11%. These strains were selected for the characterization of the volatile profile through of Headspace Solid-phase Microextraction (HS-SPME) followed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS).

A total of 53 VOCs in EA and 60 in EB were identified. Higher alcohols, esters and fatty acids were the majority chemical families, representing, respectively 63, 16 and 9% in EA and 54, 23 and 15% in EB. The results obtained can be found the influence of the metabolism of the strain in the production of VOCs, many of which probably participate in the aroma of the wines produced.

Keywords: Demarcated Region of Madeira, *Saccharomyces cerevisiae*, strain, molecular identification, volatile organic compounds

Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Índice.....	xiii
Índice de figuras.....	xvi
Índice de tabelas.....	xviii
Lista de abreviaturas.....	xix
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	21
1.1 Apresentação e enquadramento do tema.....	21
1.2 Objetivos.....	23
1.3 Abordagem cronológica.....	24
1.4 Região Demarcada da Madeira.....	25
1.5 Caracterização da ilha da Madeira.....	26
1.5.1 Orografia.....	26
1.5.2 Clima.....	27
1.5.3 Solos.....	27
1.6 Vinificação.....	27
1.6.1 Ecologia da fermentação alcoólica.....	29
1.6.2 Leveduras vínicas.....	29
1.6.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
1.6.4 Metabolismo.....	35
1.6.5 Aroma dos vinhos.....	39
1.7 Técnicas de identificação molecular de <i>S. cerevisiae</i>	40
1.7.1 Técnicas clássicas de biologia molecular.....	40
1.7.2 Técnicas de identificação da espécie.....	41
1.7.3 Técnicas de identificação da estirpe.....	43

1.8	Técnicas de caracterização do perfil volátil dos vinhos	44
1.8.1	HS-SPME	44
1.8.2	GC-MS	45
2	PARTE EXPERIMENTAL	46
2.1	Materiais e métodos	46
2.1.1	Amostragem	46
2.1.2	Microfermentação espontânea	47
2.1.3	Isolamento	48
2.1.4	Caracterização molecular	50
2.1.5	PCR-RFLP da região ITS-5.8S	53
2.1.6	mtDNA-RFLP	53
2.1.7	Eletroforese	54
2.2	Caracterização do perfil volátil	55
2.2.1	Curva de crescimento das estirpes	55
2.2.2	Preparação do substrato	55
2.2.3	Preparação do inóculo	56
2.2.4	Microfermentação inoculada com estirpe pura	56
2.2.5	Condições do GC-MS	57
2.2.6	Tratamento de dados	58
3	RESULTADOS	59
3.1	Microfermentação espontânea	59
3.2	Isolamento	60
3.3	Caracterização molecular	62
3.3.1	Identificação do género e espécie	62
3.3.2	Identificação da estirpe	63
3.4	Caracterização do perfil volátil	65
3.4.1	Inóculo	65

3.4.2	Mosto de uvas concentrado retificado	66
3.5	Microfermentação inoculada com estirpe pura	69
4	DISCUSSÃO	76
4.1	Microfermentação espontânea	76
4.2	Isolamento	77
4.3	Identificação molecular	78
4.3.1	Extração de DNA	78
4.3.2	Identificação do género e espécie	80
4.3.3	Identificação da estirpe	81
4.3.4	Variabilidade intraespecífica.....	83
4.4	<i>Screening</i> do perfil volátil.....	84
4.4.1	Álcoois superiores.....	85
4.4.2	Ésteres	87
4.4.3	Ácidos gordos	87
4.4.4	Compostos carbonilados	89
4.4.5	Terpenos.....	89
5	CONCLUSÕES	91
6	PERSPETIVAS FUTURAS	93
7	BIBLIOGRAFIA	94
	Anexo 1.....	105

Índice de figuras

Figura 1 – Processo de vinificação de VM, até a conclusão da fermentação. Adaptado de IVBAM [35].	28
Figura 2 – Células de <i>S. cerevisiae</i> , obtidas a partir de microscópio eletrónico de varrimento [24].	31
Figura 3 – Esquema representativo da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> ; 1- manoproteína, 2- β - 1,6-Glucano, 3- β - 1,3-Glucano, 4- Quitina, 5- bicamada fosfolipídica da membrana celular, 6- β - 1,6-Glucano sintetase, 7- Percussores, 8- Quitina sintetase, 9- Percussores. Adaptado de Fesel et al. [44].	34
Figura 4 – Via glicolítica e fermentação alcoólica. Adaptado de Ribéreau-Gayon et. al. [24].	36
Figura 5 – Esquema representativo da biossíntese de VOCs por <i>S. cerevisiae</i> durante a fermentação alcoólica. Adaptado de Pretorius et al. [36].	37
Figura 6 – Formação de álcoois superiores via mecanismo de Ehrlich. Adaptado de Hazelwood et. al. [48].	38
Figura 7 – Esquematização dos genes 5.8, 18S e 26S no rDNA e rRNA em leveduras. Adaptado de Carrascosa <i>et al.</i> [27].	42
Figura 8 – Esquema representativo da eletroforese de campo pulsado. Adaptado de Ribéreau-Gayon et. al. [24].	43
Figura 9 – Casta/local de amostragem: 1- Sercial (Seixal); 2- Tinta Negra (São Vicente); 3- Verdelho (São Vicente); 4- Malvasia de São Jorge (São Jorge); 5- Bastardo (São Jorge); 6- Verdelho (Prazeres); 7- Terrantez (Calheta); 8- Boal (Campanário); 9- Malvasia Cândida (Fajã dos Padres); 10- Sercial (Jardim da Serra).	46
Figura 10 – Esquema de montagem , microfermentação a escala laboratorial: a) Agitação magnética; b) agitação orbital.	48
Figura 11 – Cultivo fresco em Placas YPD.	51
Figura 12 – Perfil fermentativo: S1- Sercial 1 (Seixal); TN- Tinta Negra; V1- Verdelho 1 (São Vicente); MSJ- Malvasia de São Jorge; Bt- Bastardo; V2- Verdelho 2 (Prazeres); Tz- Terrantez; Bo- Boal; MC- Malvasia Cândida; S2- Sercial 2 (Jardim da Serra).	60
Figura 13 – Características macroscópicas dos isolados: a) isolados obtidos a partir da casta Boal, colónia atípica (seta vermelha); b) isolados típicos.	61

Figura 14 – Amplificado da região ITS-5.8S do rDNA; 1- M: 100 bp GeneRuler DNA Leader; 1- 14: fragmento obtido nas amostras estudadas; gel de agarose (1,4 %).	62
Figura 15 – Fragmentos de restrição RFLP-5.8S-ITS correspondente com <i>S. cerevisiae</i> , M: marcador de peso molecular 100 bp GeneRuler. a) 1,2,3,7; b) 1, 3, 5- produto da digestão com HaeIII; a) 4,5,6; b) 2,4,6- produto da digestão com HinfI, gel de agarose (3 %).	63
Figura 16 – Padrões de restrição RFLP-mtDNA. Poço 1- M: marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb; 1- estirpe A, 2- 4- estirpe B.	64
Figura 17 – Curva de crescimento: Absorvância (660 nm) em função do tempo na fase exponencial de crescimento da estirpe B.	65
Figura 18. Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HS-SPME/GC-MS do mosto concentrado retificado diluído até 12,5 %: MNC- mosto não clarificado; MC- mosto clarificado. VOCs maioritários: 1- ciclohexano; 2- etanol; 3- α -Pineno; 4- (-)- β -Pineno; 5- β -Felandreno; 6- β -Mirceno; 7- α -Terpineno; 8- Limoneno; 9- γ -Terpineno; 10- Ocimeno; 11- (+)-4-Careno; 12- α -Bergamoteno; 13- Cariofileno; 14- Neral; 15- β -Bisaboleno, 16- Nerol.	67
Figura 19 – Impacto da clarificação no mosto concentrado retificado no perfil total da fração volátil: MNC- mosto não clarificado; MC- mosto clarificado.	68
Figura 20 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HS-SPME/GC-MS a partir de: EA- estirpe A, isolada a partir de Verdelho (São Vicente); EB- estirpe B, isolada a partir de Malvasia de São Jorge (São Jorge); MC- mosto clarificado. VOCs maioritários: 1- acetato de etilo; 2- etanol; 3- 2-metil-1-propanol; 4- 2-metil-1-pentanol; 5- 3-octanona; 6- octanoato de etilo; 7- ácido acético; 8- decanoato de etilo; 9- acetato de 2-feniletilo; 10- feniletil álcool. Dados tratados utilizando o programa Enhanced Data Analysis.	71
Figura 21 – Áreas totais obtidos por HS-SPME/GC-MS. MC – mosto clarificado, EA – estirpe A; EB – estirpe B; EC – estirpe controlo, (estirpes identificadas através de RFLP-mtDNA).	72
Figura 22 – Análise de componente principais (PCA) [73]: BM- mosto concentrado retificado diluído até 12,5 % (v/v) de álcool provável (MC). EA- estirpe A, EB- estirpe B, EC- estirpe controlo.	75

Índice de tabelas

Tabela 1 – Composição química da parede celular	33
Tabela 2 – Biossínteses de álcoois superiores pela via de Ehrlich , precursores e produtos intermédios	38
Tabela 3 – Isolados/diluições obtidos para cada vinho	61
Tabela 4. Proporção (%) dos VOCs em cada família química que conformam o perfil volátil no MNC e MC	69
Tabela 5 – Proporção (%) dos VOCs em cada família química que conformam o perfil volátil de EA, EB e EC	73
Tabela 6 – Número de VOCs por família química: identificados em cada Vinho fermentado com as estirpes EA, EB e EC	73
Tabela 7 – Compostos identificados através de HS-SPME/GC-MS, obtidos a partir de vinhos inoculados com estirpes pura (RFLP-mtDNA), indicando a contribuição de cada composto na família química e no total da fração volátil do vinho, assim como o descritor olfativo.....	105

Lista de abreviaturas

A+T	Adenina e timina
G+C	Guanina e citosina
ATP	Adenosina trifosfato
BrEt	Brometo de Etídeo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos fosfatados
DO	Denominação de Origem
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano
EDTA	Tris-acetato-etilenodiaminotetracético
ETS	<i>External transcribed spacers</i>
EU	União europeia
eV	Elétrões volts
ex.	Exemplo
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa
HS-SPME	Microextração em fase sólida em modo de espaço de cabeça
IG	Indicação geográfica
ITS	<i>Internal transcribed spacers</i>
IVBAM	Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira
IVV	Instituto da Vinha e do Vinho- Portugal
KOAc	Acetato de potásio
LiOAc	Acetato de lítio
LPO	Limiar de perceção olfativa
LSA	Levedura seca ativa
MC	Mosto clarificado
MNC	Mosto não clarificado
mQ	Água ultrapura autoclavada
mtDNA	DNA mitocondrial
NA	Agar nutriente
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
nDNA	DNA nuclear

NTS	<i>Non-transcribed spacers</i>
OD	Densidade ótica
PCA	Análise de componentes principais
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
RDM	Região Demarcada da Madeira
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	Polimorfismo dos fragmentos de restrição
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TAE	Tris-acetato-etilenodiaminotetracético
TE	Tris-etilenodiaminotetracético
UA	Unidades arbitrárias
UFC	Unidades formadoras de colónias
UV	Ultravioleta
VM	Vinho Madeira
VOCs	Compostos orgânicos voláteis
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Apresentação e enquadramento do tema

A atividade vitivinícola na Ilha da Madeira iniciou-se conjuntamente com a sua colonização no século XV [1], tornando-se a principal atividade económica da região no século XVII [2,3]. Em 1913 a Ilha da Madeira concluiu o processo de regulamentação oficial, obtendo o estatuto de Região Demarcada da Madeira (RDM), representando umas das mais antigas Regiões Demarcadas de Portugal que produz o célebre Vinho Madeira (VM) [1], ou mais recentemente por legislação da União Europeia (EU), vinho com Denominação de Origem (DO) «Madeira» cujo processo de produção se encontra rigorosamente legislado. Mais recentemente, a RDM iniciou a produção de vinhos de mesa com DO «Madeirense» e vinhos com Indicação Geográfica (IG) «Terras Madeirenses» igualmente sob legislação própria, que regula desde a plantação da vinha até a comercialização do vinho com o fim de manter e incrementar a excelência, genuinidade e tipicidade dos vinhos [1,4,5].

A qualidade e tipicidade dos vinhos resulta da conjugação de uma série de fatores naturais e humanos [6,7], particularmente na RDM as condições agroedafoclimáticas específicas como a origem vulcânica, condição insular Atlântica, conjugada com uma seleção de castas nobres e práticas agronómicas específicas adaptadas à área e orografia da ilha, em estreita relação com métodos de vinificação tradicionais, conferem aos vinhos produzidos na RDM propriedades organoléticas próprias, de entre as quais, o aroma é um parâmetro importante que define a sua qualidade e tipicidade.

No geral, o aroma dos vinhos é classificado segundo a sua origem em, aromas primários ou varietais provenientes da casta, aromas pré-fermentativos derivados das operações tecnológicas praticadas durante a vindima, aromas secundários ou fermentativos provenientes da fermentação alcoólica e finalmente aromas terciários ou de envelhecimento (*bouquet*) [8].

Inúmeros trabalhos estão reportados na literatura relativamente ao perfil volátil dos vinhos com impacto no aroma [9–11] atendendo à preponderância que este parâmetro representa na qualidade e tipicidade do produto final. A maioria dos compostos que

contribuem para o perfil aromático dos vinhos advêm da fermentação alcoólica [11], realizada maioritariamente por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que metaboliza a glicose maioritariamente em etanol e dióxido de carbono (CO₂), e em menor proporção em diferentes compostos orgânicos voláteis (VOCs), semi-voláteis e não voláteis. Aos compostos voláteis estão associados uma ampla variedade de descritores aromáticos, que contribuem definitivamente para a qualidade e tipicidade do vinho [8].

A diversidade e proporção de VOCs produto do metabolismo da *S. cerevisiae* é condicionado por uma série de fatores, mais sobretudo pela estirpe que conduz o processo fermentativo, devido à predisposição genética, consequência da adaptação seletiva a determinados ecossistemas.

A população levuriana (*S. cerevisiae*) presente naturalmente no mosto de uvas provém, da microbiota residente em adega e principalmente da microbiota endémica que habita naturalmente na película cerosa da uva (pruína), cuja diversidade e quantidade são diretamente dependentes das condições agroedafoclimáticas no vinhedo [12]. O clima tem um papel preponderante na microbiota endémica, podendo influenciar o processo fermentativo e a qualidade do produto final ano após ano. Para colmatar esta situação, algumas regiões recorrem à inoculação do mosto com estirpes de *S. cerevisiae* comerciais com o intuito de auxiliar a fermentação alcoólica, influenciando, porém, a tipicidade do vinho [13].

Nos últimos anos, algumas regiões vitivinícolas têm utilizado estirpes autóctones selecionadas de *S. cerevisiae*, não só como coadjuvante da fermentação, mas também com o objetivo de manter e incrementar a complexidade e particularmente a tipicidade organolética dos vinhos [14,15], demonstrando que estirpes autóctones estão melhor adaptadas à composição química do mosto e às condições de fermentação de uma determinada Região Demarcada [16].

Neste contexto, técnicas clássicas de genética molecular constituem uma ferramenta poderosa na identificação fidedigna de leveduras ao nível do género, espécie e estirpe; bem como técnicas analíticas de extração, separação e identificação de VOCs, que permitam a seleção de estirpes autóctones com propriedades tecnológicas, enológicas, organoléticas características de uma Região Demarcada. Paralelamente, dando origem a coleções de leveduras.

1.2 Objetivos

Dada a importância histórica e económica que a vitivinicultura tem na RDM, e com o intuito de acrescentar valor ao setor, potenciar (se necessário) os processos tecnológicos na indústria e garantir a conservação de uma parte importante do património vitivinícola, surge o presente trabalho, com o objetivo de identificar e caracterizar estirpes autóctones de *S. cerevisiae* isoladas na RDM.

O trabalho foi dividido em duas fases. A primeira fase consistiu na identificação molecular ao nível do género/espécie/estirpe, com recurso à amplificação via *polymerase chain reaction* (PCR) do fragmento 5.8S- *internal transcribed spacers* (5.8S-ITS) do DNA ribossomal (rDNA), seguida da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) do fragmento amplificado (RFLP-5.8S-ITS), e finalmente o estudo de RFLP do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA). A segunda fase consistiu na caracterização dos VOCs produto do metabolismo das estirpes mais representativas, com recurso à microextração em fase sólida em modo de espaço de cabeça (HS-SPME), seguida da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).

1.3 Abordagem cronológica

Desde as civilizações mais antigas, que a importância social e comercial das leveduras, especificamente da espécie *S. cerevisiae* na produção de bebidas e alimentos fermentados, maioritariamente pão, cerveja e vinho, tem sido verificada e indiretamente documentada [17–20]. Evidências científicas foram obtidas a partir de restos encontrados no interior de uma jarra de vinho Egípcia datada do ano 3150 A.C., a partir do qual foi possível amplificar rDNA correspondente à *S. cerevisiae* [21].

Embora a transformação de mosto em vinho tenha sido uma prática habitual desde tempos remotos, as leveduras só foram observadas pela primeira vez em 1680 [19,22]. Porém, foi no final do século XVIII em que Lavoisier e Fabroni iniciaram estudos científicos independentes sobre a fermentação alcoólica. Em 1837, o físico francês Charles Cagniard de Latour, postulou que a atividade das leveduras se baseava na transformação do açúcar dos líquidos, teoria confirmada posteriormente pelo naturalista alemão Shwaan, chamando-as “fungos do açúcar” ou *Saccharomyces* (em latim), nomenclatura utilizada pela primeira vez em 1838 pelo cientista Meyen sob muita controversa e descrédito [22,23]. Foram os trabalhos de Louis Pasteur sobre o vinho em 1866 e a cerveja em 1876 que demonstraram a existência das leveduras, o seu papel fundamental na fermentação alcoólica e a produção de metabolitos secundários que influenciam as propriedades gustativas do vinho [19,22].

A *S. cerevisiae* foi o primeiro microrganismo comercial com aplicações biotecnológicas [17], o primeiro organismo eucariota cujo genoma foi totalmente sequenciado e modelo de estudo por excelência em biologia celular, biologia molecular e fisiologia [19,24]. Com o avanço da biotecnologia, a identificação e caracterização de estirpes de *S. cerevisiae* tem revelado propriedades específicas, com aplicabilidade na indústria alimentar uma vez que, conferem não só valor acrescido aos produtos tradicionalmente produzidos com recurso a este microrganismo (ex.: vinho, cerveja e pão) [17], mas também pelo desenvolvimento de produtos como, aditivos e conservantes usados em alimentos processados (ex.: biocontrole de microrganismos indesejados, probióticos, etc.) [25]. A diversificação de produtos estende-se à indústria farmacêutica [19] com a produção de antibióticos, vitaminas e enzimas [17]. Mais recentemente, com

o surgimento das energias renováveis, estirpes selecionadas de *S. cerevisiae* estão sendo utilizadas nas emergentes biorefinarias, para a produção de biocombustíveis [19,26].

Especificamente, na indústria enológica, na década de 50 do século passado, foi demonstrado que a fermentação alcoólica é um processo espontâneo, conduzido maioritariamente por leveduras endémicas da espécie *S. cerevisiae*. Uma série de variáveis condicionam a sua diversidade e concentração, com consequências nas propriedades organolépticas, sobre tudo no aroma, produzindo vinhos de qualidade heterogénea, e por vezes, fermentações lentas, incompletas ou paragem da fermentação, ocasionando perdas económicas importantes para o produtor [22,27].

Com o intuito de colmatar a situação, a partir da década de 70, uma prática normal na maioria das regiões vitivinícola, foi a inoculação dos mostos com culturas puras selecionadas chamadas levedura seca ativa (LSA) ou culturas iniciadoras (*starter*), constituídas por uma estirpe de *S. cerevisiae*, com o propósito de acelerar, conduzir e dominar o processo fermentativo, produzindo vinhos de qualidade homogénea em detrimento da tipicidade que caracteriza as Regiões Demarcadas [17]; este facto tem originado uma preocupação na indústria, num mercado cada vez mais exigente e competitivo, no qual as regiões vitivinícolas emergentes conquistam segmentos de mercado das regiões vitivinícolas tradicionais [28].

A partir da década dos 90 até à atualidade, conjuntamente com os avanços das técnicas moleculares de caracterização de microrganismos, uma poderosa estratégia tecnológica são o isolamento, a identificação e a seleção de estirpes autóctones da espécie *S. cerevisiae*, a partir do próprio ambiente vitivinícola, uma vez que estão melhor adaptadas ao ecossistema, à composição química do mosto, apresentam melhor aptidão para predominar sobre a microbiota bacteriana não desejável, além de contribuir positivamente na qualidade e tipicidade do vinho [29].

1.4 Região Demarcada da Madeira

Região Demarcada refere-se à região vitivinícola, delimitada geograficamente, subordinada à legislação própria, abrangida por direitos e obrigações contemplados em diplomas regulamentares para defesa e promoção da produção. Em Portugal, a

organização institucional do sector vitivinícola é da responsabilidade do Instituto da Vinha e do Vinho [30,31].

A ilha da Madeira e do Porto Santo conformam a RDM, produz vinhos com DO «Madeira», DO «Madeirense» e IG «Terras Madeirenses», sob a regulamentação e fiscalização do Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira (IVBAM), que disciplina desde o plantio da vinha até a comercialização, de forma a garantir a qualidade, genuinidade e a excelência [31].

De uma forma genérica, a Denominação de Origem refere ao vinho produzido exclusivamente em Região Demarcada, a partir de castas da espécie *Vitis vinífera*, autorizadas/recomendadas em estatuto próprio e cuja qualidade e características próprias resultam puramente dos fatores naturais e humanos, num meio geográfico específico [6].

Assim, a produção de vinho na RDM obedece a uma série de parâmetros específicos, nomeadamente, tipo de solo, castas autorizadas/recomendadas, práticas agronómicas, métodos de vinificação, práticas enológicas e características analíticas e organolépticas [31].

1.5 Caracterização da ilha da Madeira

A Ilha da Madeira é uma das maiores da Macaronésia, encontra-se localizada no Oceano Atlântico, a uma distância de 400 km da Gran Canária, 600 km da costa Africana e 980 km de Lisboa [32].

1.5.1 Orografia

Possui uma orografia acentuada, apresenta uma cordilheira montanhosa central com orientação este-oeste que marca uma notória diferença edafoclimática entre as vertentes norte e sul, com vales profundos e arribas altas, resultantes sobretudo da intensa erosão causada pela ação da chuva e do mar. Contudo, a encosta sul apresenta um relevo menos acentuado. Aproximadamente 47 % da área total da ilha está localizada acima dos 700 metros de altitude, ocupados maioritariamente por floresta, 66 % da ilha possui declives superiores a 25 % e 11,5 % declives inferiores a 16 %. A atividade agrícola é desenvolvida em terrenos com declives entre 16 e 25 % [2,33].

1.5.2 Clima

Relativamente ao clima, este é subtropical seco ou temperado mediterrânico, apresenta todas as características de ilha subtropical, com elementos de ilhas tropicais na costa sul e temperados na costa norte. Apresenta uma pluviosidade de aproximadamente 500 mm/ano na encosta sul e 1200 mm/ano na encosta norte. Segundo a classificação de Köppen, em geral possui um clima mesotérmico com chuvas e sem quedas regulares de neve, de verões pouco quentes, mas extenso na maior parte da ilha, a costa sul apresenta verões mais quentes [32].

Devido à marcante diferença entre a costa norte e sul da ilha, a cultura da vinha é praticada em altitudes diferentes de forma a conseguir condições homólogas, na costa sul é cultivada até aos 600 m de altitude, enquanto que na costa norte a vinha deverá desenvolver-se até aos 400 m de altitude [2].

1.5.3 Solos

Sendo uma ilha vulcânica, é composta na sua maioria de rocha eruptiva, nomeadamente basáltica que varia consoante a altitude; ao nível do mar predominam os terrenos derivados do basalto e nos pontos mais altos predominam traquites. Ao longo da costa, nos vales e nas “Fajãs” são constituídos predominantemente por rochas sedimentares [32].

Os terraços ou “poios” construídos com o objetivo de diminuir ou anular o declive, tornando os terrenos cultiváveis, aunado às práticas agrícolas como mobilizações, adubações, regas, etc., modificaram total ou parcialmente o perfil pedológico do solo, contudo, de modo geral, a Madeira possui solos férteis [2], de reação ácida ou muito ácida [33].

1.6 Vinificação

O regulamento que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola na União Europeia (EU), define o vinho como o produto obtido unicamente por fermentação alcoólica, parcial ou total, de uvas frescas inteiras ou esmagadas, ou de mostos de uvas [6]. No entanto, quimicamente o vinho é uma solução hidroalcoólica complexa,

constituída por 75-90 % v/v de água, 9-22 % v/v de etanol e uma pequena percentagem de compostos orgânicos e inorgânicos.

O vinho com DO «Madeira» ou Vinho Madeira (VM), é um vinho licoroso produzido maioritariamente a partir das castas Sercial, Verdelho, Boal, Malvasia Cândida, Malvasia de São Jorge, Bastardo, Terrantez e Tinta Negra. Apresenta um teor alcoólico entre 17-22 % (v/v) produto da fortificação com álcool neutro de origem vínica a 96 % (v/v). Classificado segundo o grau de doçura em extra seco, seco, meio seco, meio doce e doce (g/l de açúcares totais) [1].

O processo de vinificação do VM, até a conclusão da fermentação envolve uma série de etapas (Figura 1), sumariamente, vindima, transporte, desengace, esmagamento, prensagem, fermentação, fortificação e lotação [34].

Apos a obtenção do mosto, habitualmente pelo método de bica aberta por prensagem direta, decorre a fermentação alcoólica. Existem outras hipóteses como macerações peliculares antes ou após fermentação, que pode decorrer em lagares ou em tanques, seguindo-se a prensagem (curtimento). A fermentação alcoólica pode ser total ou parcial, conforme o grau de doçura pretendido que varia consoante a casta e o estilo de vinho pretendido pelas empresas. A fermentação alcoólica é interrompida pela adição de álcool vínico [34].



Figura 1 – Processo de vinificação de VM, até a conclusão da fermentação. Adaptado de IVBAM [34].

1.6.1 Ecologia da fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica do mosto de uvas, é um processo microbiológico que ocorre naturalmente (fermentação espontânea), envolve complexas interações entre fungos filamentosos, bactérias e leveduras, no entanto, em vinificação, fungos filamentosos e bactérias são suprimidos pela adição de dióxido de enxofre (SO₂) [13].

As leveduras têm um papel fundamental em vinificação, uma vez que são responsáveis pela grande maioria do processo, estes microrganismos obtém a sua energia celular através do metabolismo das hexoses [13].

A fermentação espontânea do mosto é conduzida por diferentes espécies/estirpes de leveduras, cujas cinéticas de crescimento aumentam e diminuem durante todo processo [15].

1.6.2 Leveduras vínicas

A literatura reporta a existência de 100 género de leveduras que incluem 700 espécies, contudo, unicamente 15 géneros estão associados ao processo de vinificação, nomeadamente: *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* [35–37].

Cada género de levedura biossintetiza metabolitos secundários que influenciam positivamente ou negativamente as propriedades organoléticas dos vinhos, uns, biomarcadores de um género específico, outros, metabolitos secundários comuns a diferentes géneros [37].

Assim, géneros como *Candida* spp., *Hansenula* spp. e algumas espécies de *Hanseniaspora* spp. (*Kloeckera*) produzem compostos indesejáveis como ácido acético, acetato de etilo, entre outros; no entanto, esta última também produz outros ésteres voláteis que contribuem positivamente no perfil aromático do vinho nas primeiras etapas da fermentação. Algumas espécies de *Pichia* spp. são responsáveis pela produção de aldeído e alteração na qualidade do vinho conhecida como “flor” [37,38].

A *Dekkera/Brettanomyces* spp. associada às condições sanitárias deficientes, produz ésteres, metabolitos que aumentam substancialmente a acidez volátil e particularmente 4-etil-fenol conferindo odor desagradável no vinho considerado um defeito sensorial [37].

Os géneros *Torulaspora* spp. e *Zygosaccharomyces* spp. são leveduras fermentativas, apresentam uma boa resistência à conservantes e antissépticos enológicos (SO₂, ácido sórbico, ácido benzoico, etc.) e boas propriedades enológicas, concretamente a *Zygosaccharomyces* spp. sobrevivem em pH baixos (< 2,4) e tolera teores de etanol superiores a 15 % (v/v), podem estar presentes em vinhos doces e mostos concentrados (*Z. bailii*) [37,38].

A população levuriana no mosto tem a sua origem em diversas fontes, indiretamente da microbiota residente na adega, utensílios e instrumento em contacto com as uvas e posteriormente com o mosto, diretamente por inoculação de leveduras comerciais na forma de LSA (caso seja utilizado), e principalmente da microbiota endémica na película cerosa da uva ou pruína, que favorece a aderência de microrganismos, cuja diversidade e quantidade são diretamente dependentes das condições agroedafoclimáticas do vinhedo, em concomitância com a adaptação seletiva ao ecossistema [13,22].

A microbiota residente na pruína, geralmente varia entre espécies: anaeróbias obrigatórias, aeróbias obrigatórias, anaeróbias facultativas, fermentadoras fracas, fermentativas vigorosas e intolerantes ao etanol. Em maior número se encontram as espécies *Kloeckera apiculata* e *Hanseniaspora apiculata* que representam entre 50-70 % do total da população levuriana, contrariamente, as espécies fermentadoras vigorosas como a *S. cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus* se encontram em menor número [37]. Não entanto, muitos fatores influenciam a microbiota no mosto de uvas, nomeadamente, método de vindima, transporte até a adega, condições fitossanitárias das uvas e práticas enológicas utilizadas durante a obtenção do mosto [36].

No decurso da fermentação alcoólica, a diversidade microbiológica e número de indivíduos modifica-se. O início do processo fermentativo é da responsabilidade de géneros anaeróbios como a *Candida* spp., e logicamente dos géneros em maior número (*Kloeckera* e *Hanseniaspora*); seguidamente, começa o desenvolvimento de espécies do género *Metschnikowia*, *Pichia* e *Hansenula* [15], no entanto, a população de todos estes géneros levurianos diminuem significativamente devido à intolerância ao etanol.

O género *Saccharomyces*, presente em menor número, começa o seu crescimento após 20 horas desde o início da fermentação alcoólica, dominando a partir do terceiro ou quarto dia até o final do processo fermentativo, devido ao vigor fermentativo, à tolerância a elevadas concentrações de etanol (12-25 %, v/v) [19] e altas temperaturas de fermentação (≤ 38 °C) [13,22].

O papel principal das leveduras na fermentação alcoólica do mosto de uvas, sobretudo *S. cerevisiae*, basicamente é a transformação de pentoses (glicose e frutose) em etanol e CO₂, mas tem-se demonstrado a biossíntese de diferentes compostos de baixo peso molecular que contribuem positiva ou negativamente na qualidade sensorial do vinho [13]. A complexa via metabólica responsável pela degradação da glicose em etanol e CO₂ consta de mais de 30 reações bioquímicas, catalisadas enzimaticamente, que, em conjunto com ativação de outras vias metabólicas, produzem VOCs que definem em grande medida as propriedades organoléticas do produto final [39].

1.6.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Taxonomicamente pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subfilo Saccharomycotina, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, Género *Saccharomyces*, Espécie *S. cerevisiae* [22]. São eucariotas unicelulares de morfologia elipsoide globulosa (Figura 2), medem aproximadamente 5 µm, em condições normais (ex. vinificação) [22] reproduzem assexuadamente por gemulação multilateral [19], e em condições nutricionais adversas reproduzem sexuadamente através da formação de ascósporos (dependente da estirpe) [22,37].

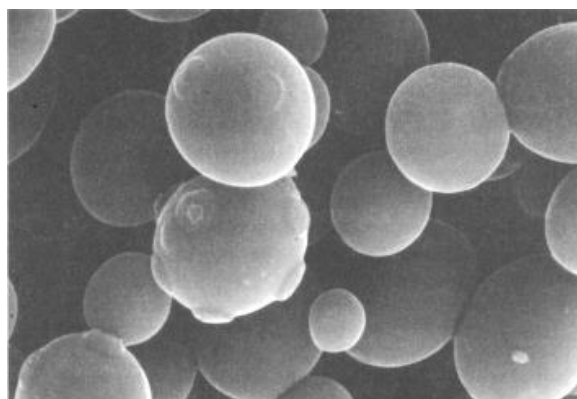


Figura 2 – Células de *S. cerevisiae*, obtidas a partir de microscópio eletrônico de varrimento [22].

Macroscopicamente as colónias apresentam uma forma circular, aparência butirosa, superfície convexa, bordos lisos, no geral de coloração branca, podendo eventualmente apresentar colónias creme [23]. Anaeróbia facultativa [40], relativamente à fonte de carbono, *S. cerevisiae* metaboliza preferencialmente D-glucose, contudo, utiliza D-galactose, maltose e sacarose (entre outros) como fontes alternativa de carbono, sob diversas condições [13,41].

Saccharomyces cerevisiae integra os eucariotas mais simples, cuja célula é constituída basicamente por citoplasma, núcleo, membrana celular e parede celular [22]. A parede celular tem um papel preponderante na fisiologia com impacto na fermentação alcoólica, confere certas propriedades ao produto final e representa a primeira condicionante na caracterização genética.

1.6.3.1 Parede celular

Dependendo das condições e fase de crescimento, a parede celular representa entre 15-25 % do peso seco da célula, organelo semirrígido, fornece suporte, proteção, responsável pela manutenção da forma, fundamental na regulação da pressão osmótica, organelo dinâmico consoante o estado fisiológico e/ou em respostas a fatores abióticos. Na parede celular também se localizam uma série de enzimas e participa em algumas interações intercelulares [22,42].

Referente à estrutura molecular da parede celular de *S. cerevisiae*, é constituída principalmente por três polissacáridos, em maior percentagem glucanos, seguido de manoses covalentemente ligada à péptidos formando manoproteínas, e em menor percentagem por quitina, estes polímeros se encontram na parede celular em diferentes percentagem, cuja organização deriva da sua estrutura polimérica, tipo de ligações, extensão da ramificação e grau de polimerização como mostra a Tabela 1 [22,42–44].

Tabela 1 – Composição química da parede celular

Polissacárido	Monômero	% ^b	Est. ^{a,*}	Ligação ^a	Ram	GP
Glucanos ^a	β - 1,3-Glucano	30-45	F	β - 1,6-Glucosídica	1	1500
	β - 1,3-Glucano		A	β - 1,6-Glucosídica	1	1500
	β - 1,6-Glucano	5-10	A	β - 1,3-Glucosídica	4	140
Manoproteínas	Manose	30-50	A	O-Glicosídica	5	150-250
				N-Glicosídica		
Quitina ^b	N-Acetilglucosamina	1,5-6	F	β - 1,4	0	120 ^b

Adaptado de: a - Ribereau-Gayon *et al.* [22], b- Klis *et al.* [42]. % - % da massa da parede celular, * - observado em microscópio eletrônico, Est.- estrutura polimérica: F- fibra, A- amorfa; Ram- ramificação polimérica, 0- não ramificada, 1- muito pouco ramificada, 4- ramificação extensiva, 5- ramificação mui extensiva, GP- grau de polimerização (número médio de monómeros).

Enquanto à organização, a parede celular se encontra estruturada em duas camadas: a camada interior constituída por quitina e glucanos, e a camada exterior por manoproteínas (Figura 3) [22,44,45]. A camada interior, perto à membrana plasmática se estendem fibras de quitina [22,44], a esta ligam-se os glucanos, dispostos numa rede tridimensional constituída por β -1,3-glucano [42] que asseguram a rigidez e forma da parede celular, enquanto que a estrutura amorfa β -1,3-glucano fornece elasticidade e funciona como reserva de substâncias e âncora à camada exterior de manoproteínas [22,42]. O polímero de β -1,6-glucano, atuando como uma espécie de “cola” ligando todos os diferentes constituintes da parede celular [22], enquanto que a quitina também se encontra na cicatriz de gemulação, possivelmente com o objetivo de manter a integridade da parede celular [22]. A constituição da parede celular da *S. cerevisiae* tem propriedades químicas e físicas que fazem com que a remoção artificial da parede celular para a obtenção de esferoblastos ou protoplastos [22] seja uma tarefa árdua.

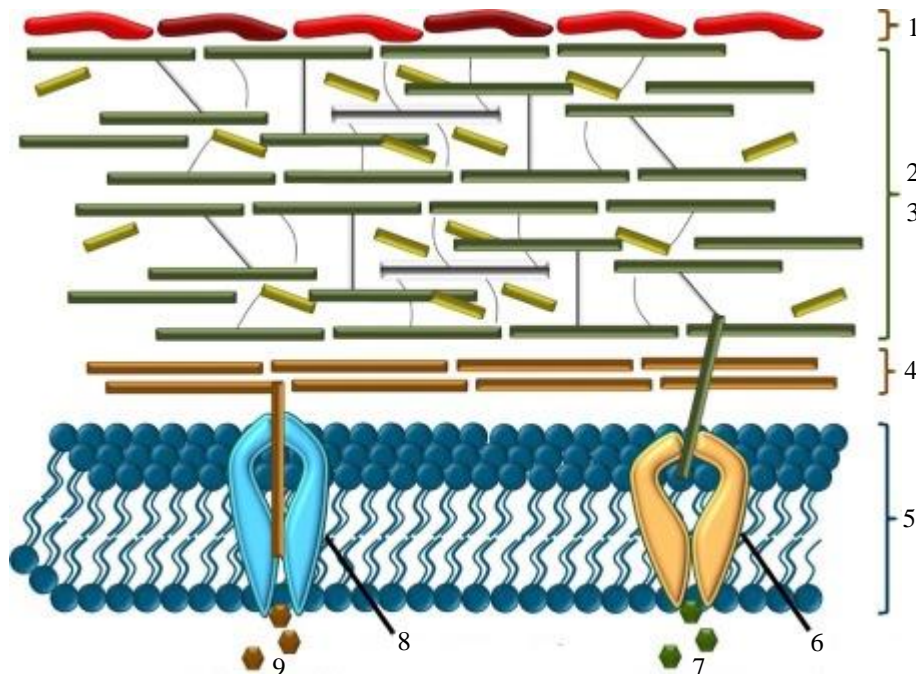


Figura 3 – Esquema representativo da parede celular de *S. cerevisiae*; 1- manoproteína, 2- β - 1,6-Glucano, 3- β - 1,3-Glucano, 4- Quitina, 5- bicamada fosfolipídica da membrana celular, 6- β - 1,6-Glucano sintetase, 7- Percussores, 8- Quitina sintetase, 9- Percussores. Adaptado de Fesel *et al.* [44].

1.6.3.2 Mitocôndria

As mitocôndrias se encontram distribuídas na periferia do citosol, de forma alargada, constituída por duas membranas lipoprotéica, organizadas em bicamada fosfolipídica; a membrana exterior apresenta-se lisa enquanto que a interior apresenta dobras acentuadas formando cristas, esta organização das membranas divide o espaço intramitocondrial em dois compartimentos, nomeadamente, em espaço intermembranar e matriz mitocondrial, onde estão presentes enzimas, ribossomas e mtDNA [22].

A função essencial da mitocôndria (mt) é a produção de energia através da respiração celular, verificando-se em *S. cerevisiae* tanto a diminuição do número de mitocôndrias em anaerobioses como também a diminuição da superfície da membrana interior e o desaparecimento das cristas [22].

1.6.3.3 DNA mitocondrial

O mtDNA de *S. cerevisiae* apresenta um tamanho de 85,8 kb, circular, se encontra num elevado número de cópias [40,46], comparativamente com o DNA nuclear (nDNA), possui uma elevada taxa de mutação, a replicação não depende do ciclo celular,

caracteriza-se por uma extensa variabilidade intraespecífica e na reprodução assexuada não sofre alteração [40].

O mtDNA codifica as subunidades I, II e III da enzima citocromo c oxidase, apocitocromo b, as subunidades 6, 8 e 9 do complexo *ATP* sintetase, e a uma proteína associada ao ribossoma, estes genes se encontram separados por um grande número de intrões e por longas sequências intergênicas de adenina e timina (A+T) que representam 62 % do genoma, intercaladas por sequências de guanina e citosina (G+C) que representam cerca de 18% do genoma [40,46].

1.6.4 Metabolismo

São o conjunto de reações bioquímicas que ocorrem na célula para a obtenção de energia, governam a síntese (anabolismo) e degradação (catabolismo) de nutrientes, organizadas em vias metabólicas, catalisadas por enzimas específicas. Pode diferenciarse o metabolismo primário, responsável pela síntese de metabolitos necessários ao crescimento, desenvolvimento e reprodução da célula, do metabolismo secundário, o qual, não é necessário à vida, contudo mostra na maioria das vezes uma função ecológica.

1.6.4.1 Glicólise e fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*

O metabolismo primário da *S. cerevisiae* centra-se na degradação anaeróbia da glicose em etanol e CO₂ [13].

No citosol a glicose é rapidamente metabolizada, inicialmente através da via glicolítica, produzindo por cada molécula de hexose duas moléculas de piruvato, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e duas de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), seguidamente, durante a fermentação alcoólica o piruvato é metabolizado em etanol, CO₂ e são oxidadas novamente as duas moléculas de NADH produzidas durante a glicólise (Figura 4) [13,22,47].

A glicose é catalisada enzimaticamente em frutose 1,6-difosfato, com consumo de duas moléculas de ATP, seguidamente forma-se o gliceraldeído-3-fosfato o qual é fosforilado e oxidado formando o 3-fosfoglicerato e regenerando uma molécula de adenosina difosfato (ADP) em ATP. Finalmente, a partir do 3-fosfoglicerato é formado o piruvato em três etapas reacionais catalisadas pelas enzimas mutase, enolase e kinase, e regenerando uma molécula de ATP. Seguidamente, inicia a fermentação alcoólica que

consta de dois passos reacionais catalisados enzimaticamente, o primeiro consiste na descarboxilação do piruvato produzindo acetaldeído, seguida da redução mediada por NADH, do acetaldeído em etanol (Figura 4) [13,22]. Do ponto de vista energético, estas vias metabólicas proporcionam à *S. cerevisiae* duas moléculas de ATP por molécula de glucose metabolizada. Em condições de vinificação, as altas concentrações de glucose e frutose presentes no mosto (> 140 g/l) inibem a respiração celular mesmo em aerobiose, ocorrendo apenas a via fermentativa. Este fenómeno é conhecido como repressão catabólica pela glucose ou efeito de Crabtree, o qual ocorre em substratos com pelo menos 9 g/l de glucose [22,47].

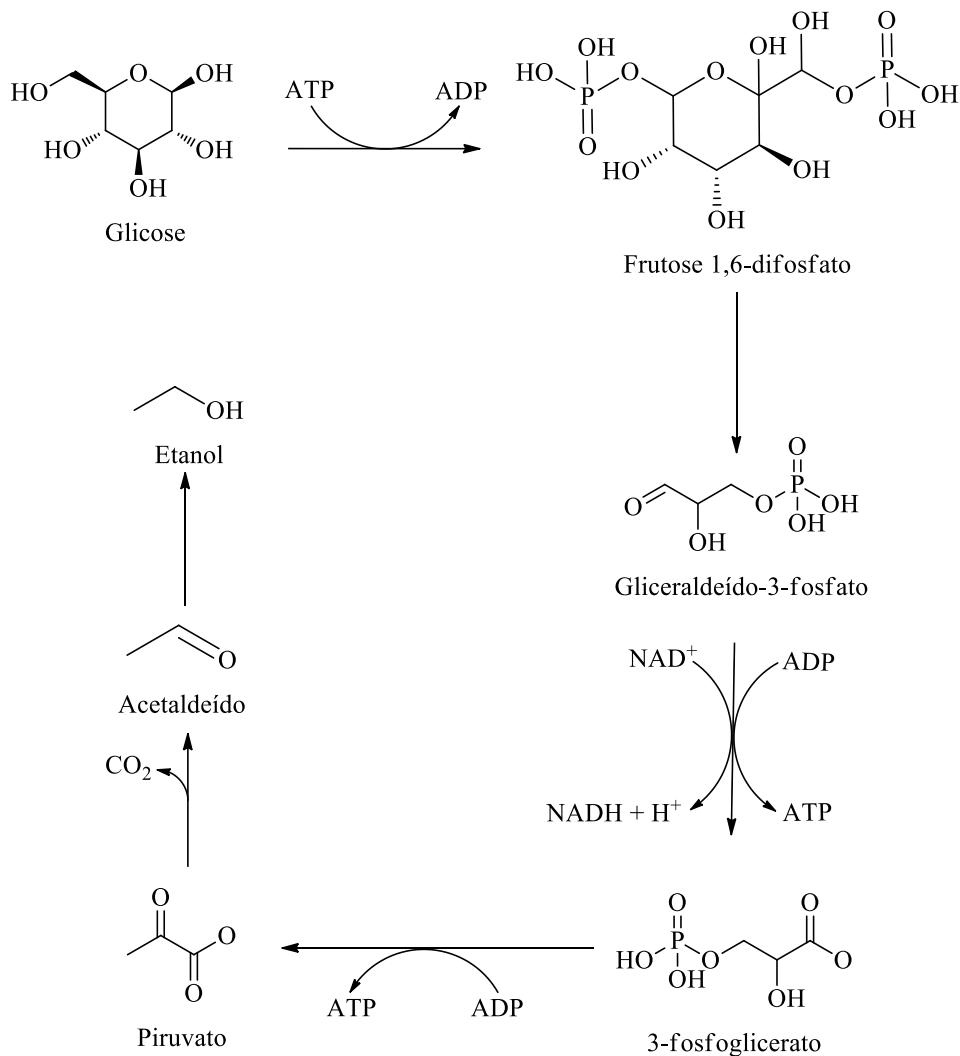


Figura 4 – Via glicolítica e fermentação alcoólica. Adaptado de Ribéreau-Gayon *et. al.* [22].

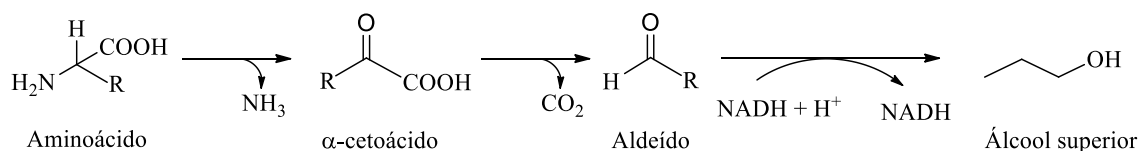


Figura 6 – Formação de álcoois superiores via mecanismo de Ehrlich. Adaptado de Hazelwood *et. al.* [48].

Tanto os álcoois superiores que são biossintetizados por esta via, como os produtos intermédios (Tabela 2) podem ser transportado para o exterior da célula [48].

Tabela 2 – Biossínteses de álcoois superiores pela via de Ehrlich, precursores e produtos intermédios

Aa	α-cetoácido	Aldeído	Álcool superior
Leu	4-Metil-2-oxopentanoato	3-Metilbutanal	3-Metilbutanol
Val	3-Metil-2-oxobutanoato	2-Metilpropanal	2-Metilpropanol
Iso	3-Metil-2-oxopentanoato	2-Metilbutanal	2-Metilbutanol
Fe	3-Fenil-2-oxopropanoato	2-Feniletanal	2-Feniletanol
Tir	3-(4-Hidroxifenil)-2-oxopropanoato	2-(4-Hidroxifeniletanal)	2-(4-Hidroxifeniletanol)
Trp	3-(Indol-3-il)-2-oxopropanoato	2-(Indol-3-il)-etanal	2-(Indol-3-il)-etanol
Met	4-Metiltio-2-oxobutanoato	3-(Metiltio)propanal	3-(Metiltio)propanol

Aa- aminoácido, Leu- leucina, Val- valina, Iso- isoleucina, Fe- fenilalanina, Tir- tirosina, Trp- Triptofano, Met- metionina. Adaptado de Hazelwood *et al.* [48].

A formação de álcoois superiores por via anabólica, é realizada a partir da biossíntese do respetivo aminoácido, a partir de precursores proveniente do metabolismo da glicose [22,36], seguido pela descarboxilação e redução do α-cetoácido precursor, convergindo com o mecanismo de Ehrlich [22,36]. Os α-cetoácido são moléculas formadas a partir do piruvato produzido pelo metabolismo dos açúcares [22]. Álcoois como 1-propanol e 1-butanol são biossintetizados pela via anabólica, uma vez que não existe relação com um aminoácido precursor [36].

1.6.4.4 Ácidos gordos voláteis

A biossínteses de ácidos gordos inicia com a descarboxilação oxidativa do ácido pirúvico formando acetil-CoA, seguida de carboxilação mediada por acetil-CoA carboxilase produzindo malonil-CoA. Seguidamente, o complexo ácido gordo sintetase condensa repetitivamente ambas moléculas dando origem a ácidos gordos com número par de átomos de carbonos [12,36]. O ácido acético é o mais representativo desta família química, precursor de acetil-CoA [22].

1.6.4.5 Ésteres

São produto de reações de esterificação enzimática durante a fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* [22], fortemente influenciada pela disponibilidade de acetil-CoA [36].

A família química dos ésteres é subdividida consoante as moléculas precursoras, nomeadamente em: acetatos de álcoois superiores e ésteres etílicos de ácidos gordos [13] [27]. Os acetatos são biossintetizados a partir da reação entre um álcool e acetil-CoA. Enquanto que, ésteres etílicos de ácidos gordos provém do metabolismo dos ácidos gordos, no qual Acil-CoA é produzida enzimaticamente através da acilação de CoASH, finalmente, o ácido gordo proveniente desta reação pode esterificar [36].

Em menor extensão os ésteres podem também formar-se pela reação de compostos derivados da Acil-CoA ou ácido acético com etanol, e entre ácidos e álcoois [36].

Os esteres são possivelmente biossintetizados para exportar ao exterior da célula, os ácidos gordos de cadeia intermédia e longa, que são tóxicos no meio intracelular [36].

1.6.4.6 Compostos carbonilados

No geral, são constituídos maioritariamente por aldeídos e cetonas, biossintetizados normalmente em proporções inferiores ao limiar de perceção olfativa (LPO). O mais representativo destes VOCs é o acetaldeído (90 %) produto intermédio na biossíntese do etanol durante a fermentação alcoólica. Os aldeídos, são compostos intermédios na formação dos álcoois superiores (Tabela 2), cuja produção é inversamente proporcional [13,36].

1.6.5 Aroma dos vinhos

Das propriedades organoléticas dos vinhos, o aroma define a sua qualidade e tipicidade (carácter). É constituído por várias centenas (mais de 800) VOCs [49] em concentrações variáveis [50], com diferentes polaridades e volatilidades [8], resultantes de uma complexa via biológica, bioquímica e de intervenções tecnológicas [51,52]. Contudo, só algumas dezenas contribuem para o perfil aromático.

O aroma dos vinhos é classificado de acordo com a origem em, aromas *primários ou varietais*, aromas *pré-fermentativos*, aromas *secundários ou fermentativos* e aromas de *envelhecimento ou terciários (bouquet)*. Os *primários ou varietais* são aromas que

provêm da uva e dependem das condições edafoclimáticas, das técnicas agronômicas adotadas, da idade da vinha e do grau de maturação das uvas, sendo essencialmente aromas vegetais, florais, frutados e por vezes minerais, são na sua essência monoterpênicos, norisoprenóides e sesquiterpenóides. Os aromas *pré-fermentativos*, onde se incluem os aldeídos e álcoois em C6, advêm das operações tecnológicas adotadas durante a vindima e transporte das uvas. Os aromas *secundários* resultam da fermentação alcoólica, sendo constituídos por álcoois, aldeídos, ácidos e ésteres. Os aromas *terciários* advêm do envelhecimento do vinho (casco ou garrafa), sendo aromas mais complexos com notas características a mel, a caramelo, a frutos secos, amadeirados e a especiarias, incluem-se nesta categoria os compostos furânicos, o sotolon, eugenol e as lactonas [8].

1.7 Técnicas de identificação molecular de *S. cerevisiae*

As técnicas de identificação e caracterização molecular fundamentam-se no estudo de ácidos nucleicos, e visam o estabelecimento de características que permitam a classificação taxonômica do indivíduo em estudo, com recurso a técnicas clássicas de biologia molecular como, a amplificação de DNA via PCR, corte utilizando endonucleases de restrição e finalmente separação e observação do DNA com recurso a eletroforese [12,53]. A *S. cerevisiae* possui XVI cromossomas, contabilizando cerca de 600 genes [4].

1.7.1 Técnicas clássicas de biologia molecular

1.7.1.1 PCR

A técnica permite obter várias cópias (amplificação) do DNA objeto de estudo, utilizando uma mistura de desoxirribonucleótidos fosfatados (dNTPs), *Taq* DNA polimerase, cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e sequências de oligonucleótidos ou *primers* complementares com a região alvo de amplificação. A mistura de reagentes e amostra de DNA purificado é inserida no termociclador e incubada a temperaturas específicas durante tempos exatos, divididos em três fases: desnaturação, *annealing* e alongamento. A desnaturação de DNA permite a separação da cadeia dupla por ação da temperatura; *annealing*, é a fase em que os *primers* posicionam-se na sequência alvo; e extensão, corresponde ao posicionamento da *Taq* DNA polimerase junto aos *primers* e utilizando Mg^{2+} como cofator, adiciona nucleótidos complementares à cadeia molde, formando uma

nova molécula de DNA. O processo é repetido entre 30-40 ciclos até obter uma grande quantidade de DNA (amplificado) [54].

1.7.1.2 Endonucleases de restrição

Endonucleases ou enzimas de restrição, apresentam atividade catalítica sobre pequenas sequências específicas de DNA (4-6 pb), cortando e gerando fragmento (s) de diferentes tamanhos, permitindo estabelecer semelhanças e diferenças de sequências no DNA estudado [54].

1.7.1.3 Eletroforese em gel de agarose

É uma técnica de separação, visualização e semiquantificação de DNA, utiliza como fase estacionária o gel de agarose, cuja disposição em forma de malha varia de tamanho em função da concentração. Por outro lado, o DNA possui carga negativa, migrando ao polo positivo no gel quando se aplica uma diferença de potencial, os fragmentos de DNA de menor tamanho migram mais rapidamente. O movimento do DNA no gel é monitorizado com recurso a um agente corante (tampão de corrida), e a banda ou padrão de bandas de DNA são observados sob luz UV pela ação de um agente intercalante, geralmente brometo de etídio (BrEt), que emite radiação a um comprimento de onda determinado (254 nm). O tamanho das bandas é determinado por comparação com um padrão conhecido ou marcador de peso molecular [54].

No caso particular da *S. cerevisiae*, tem surgido numerosas técnicas de identificação ao nível do género, espécie e estirpe representando uma eficiente ferramenta comparativamente aos métodos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos [12,53].

1.7.2 Técnicas de identificação da espécie

As técnicas mais amplamente utilizadas na identificação do género e espécie da *S. cerevisiae* baseiam-se no estudo do rDNA [13,53]. Os ribossomas são organelos celulares que asseguram a sínteses proteica na tradução génica, estes complexos macromoleculares são constituídos por duas subunidades (maior e menor) de natureza proteica e nucleotídica (rRNA). A subunidade maior formada por três moléculas, nomeadamente, 5S, 5.8S e 26S e a subunidade menor apenas por uma única molécula (18S).

Estruturalmente, os genes ribossomais 5.8S, 18S e 26S, estão agrupados numa unidade de transcrição que se repete consecutivamente entre 100 a 200 vezes ao longo do genoma (Figura 7). Cada unidade de transcrição contém duas regiões transcritas mais não processadas: ITS e *external transcribed spacers* (ETS). Ainda, cada unidade de transcrição é separada por regiões *non-transcribed spacers* (NTS). O gene 5S não faz parte desta unidade de transcrição, contudo, se encontra adjacente [13,25].

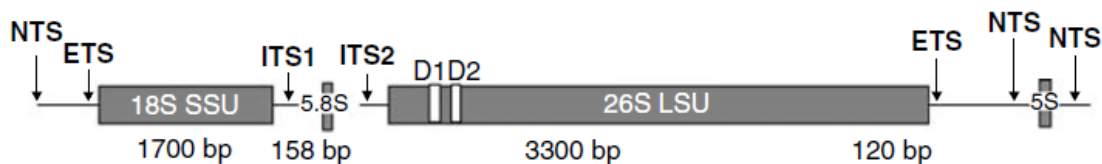


Figura 7 – Esquemática dos genes 5.8, 18S e 26S no rDNA e rRNA em leveduras. Adaptado de Carrascosa *et al.* [25].

Os genes 5.8S, 18S e 26S possuem sequências altamente conservadas, enquanto que os ITSs, ETSs e NTSs sequências não conservadas, com uma elevada variabilidade interespecífica. Fundamentada nesta informação, existem técnicas de identificação ao nível do género e espécie, nomeadamente, sequenciação do rDNA, amplificação e restrição do fragmento 5.8S-ITS (PCR-RFLP de 5.8S-ITS) [25].

1.7.2.1 Sequenciação do rDNA

Estuda sequências nucleotídicas, maioritariamente da região delta (D1/D2) da extremidade 5' do gene que codifica a subestrutura 26S, esta região está amplamente caracterizada e conta com bases de dados [13,25], contudo, outros fragmentos do rDNA também podem ser sequenciados e comparados com bases de dados [55].

A técnica inicia com a amplificação via PCR da região em estudo, seguida de uma segunda amplificação que emprega uma mistura de nucleótidos, cada um funcionalizado com um grupo cromóforo diferente, o DNA recém-formado é separado através de um tipo de cromatografia capilar ou sequenciador, no qual, uma vez excitados, cada grupo cromóforo emite um sinal a um comprimento de onda específico conforme o nucleótido ao qual está ligado. Os resultados são processados por software específicos, em que cada sinal gera um pico e cada cor corresponde a um nucleótido em particular. Este método

permite sequenciar aproximadamente 600 nucleótidos num período de entre 2-3 horas, segundo o modelo de sequenciador [25,56]

1.7.2.2 PCR-RFLP da região 5.8S-ITS

Utiliza as três técnicas clássicas de biologia molecular, inicia com amplificação via PCR do rDNA, concretamente do fragmento ITS1-5.8S-ITS2 cujo tamanho é maioritariamente específico para cada espécie, no caso particular de leveduras, o tamanho do amplificado é característico do grupo *Saccharomyces sensu stricto* que inclui a *S. cerevisiae*. O fragmento obtido via PCR é submetido a digestão com endonucleases de restrição específicas, o polimorfismo dos fragmentos de restrição mostra em gel de agarose um padrão de bandas definido para cada espécie [13,25,57,58].

1.7.3 Técnicas de identificação da estirpe

1.7.3.1 Cariotipagem

O cariotipo estuda o conteúdo cromossómico, revela adição ou eliminação de longos fragmentos de DNA, verificando um grande polimorfismo ao longo do genoma. Utiliza a eletroforese em campo pulsado (PFGE), a qual aplica pulsos alternados de dois campos elétricos no gel (Figura 8), em intervalos de tempo determinado obrigando aos cromossomas a mudar constantemente de direção ao longo da migração no gel. Sob o mesmo princípio da eletroforese clássica, os cromossomas separam consoante o tamanho, que variam com o grau de polimorfismo. O DNA não requiere extração e purificação previa, uma vez que as leveduras são diretamente inoculadas nos poços do gel, onde ocorre a lise celular. A resolução do gel é dependente da concentração de agarose, e sobretudo da intensidade e do ângulo do campo elétrico [13,22,25].

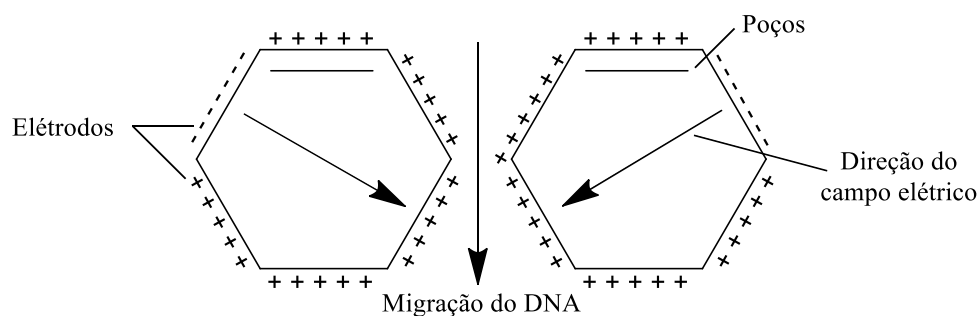


Figura 8 – Esquema representativo da eletroforese de campo pulsado. Adaptado de Ribéreau-Gayon *et. al.* [22].

1.7.3.2 RFLP-mtDNA

A característica fundamental do mtDNA é o elevado grau de variabilidade interespecífica e sobretudo intraespecífica. A técnica RFLP permite analisar este elevado grau de polimorfismos, através da visualização dos fragmentos de restrição do mtDNA com recurso à sobredigestão com endonucleases de restrição.

A técnica se fundamenta na diferença de concentração nucleotídica entre o nDNA e o mtDNA, em que, o nDNA é mais concentrado em G+C, enquanto que o mtDNA em A+T. A sobredigestão do DNA total (nuclear e mitocondrial) com recurso à endonucleases de restrição, cuja sequência alvo G+C tem muitos locais de reconhecimento no nDNA, contrariamente, poucos locais de reconhecimento no mtDNA, assim, gera um conjunto de fragmentos extremadamente curtos de nDNA que não são detetados no gel de agarose e apenas são observando os fragmentos de maior comprimento que provêm do mtDNA. [13,22,25,59,60].

1.8 Técnicas de caracterização do perfil volátil dos vinhos

Numerosas publicações têm surgido relativamente à identificação de VOCs com impacto no perfil aromático dos vinhos. Em termos genéricos, a metodologia analítica mais usada na caracterização de VOCs recorre à HS-SPME, seguida da separação e identificação dos VOCs através da GC-MS [9,11,61–63].

1.8.1 HS-SPME

Esta técnica permite a extração e pré-concentração de VOCs presentes em amostras aquosas. Consiste numa fibra de sílica fundida com diâmetro externo na ordem dos μm , revestida por uma fase estacionária polimérica com propriedades físico-químicas que permitem a adsorção/absorção seletiva de analitos. A fibra SPME é recoberta com uma agulha de aço-inox que fornece proteção e estabilidade e encontra-se inserida num sistema retráctil [63–65].

Na análise de VOCs, a extração dos mesmos em modo de HS é o método mais apropriado, uma vez que prioriza a seletividade [64].

A técnica HS-SPME fundamenta-se no equilíbrio entre o analito e a fase polimérica. O procedimento consiste na volatilização dos VOCs, num sistema fechado, com agitação

constante e uma temperatura superior à temperatura ambiente, de modo a facilitar a difusão da amostra para o *headspace* onde são absorvidos/adsorvidos pela fibra SPME. A temperatura, tempos de extração, força iônica e pH afetam a eficiência de extração, pelo que são parâmetros que devem ser otimizados de modo a maximizar a eficiência da extração [64,65].

Existem comercialmente disponíveis fibras SPME com diferentes fases poliméricas, sendo selecionadas de acordo com a natureza dos analitos presentes na amostra. Em amostras complexas como os mostos e vinhos, recorre-se à fibra tripla revestida com divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), que devido à sua constituição, tem demonstrado elevada eficiência na extração de compostos polares como álcoois superiores, ésteres e compostos carbonilados e outros de menor polaridade [63–65]

É uma técnica robusta, de elevada reprodutibilidade, usa pequenos volumes de amostra e não necessita de solventes orgânicos.

1.8.2 GC-MS

A cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), é uma técnica analítica de separação, identificação e quantificação/semi-quantificação de VOCs.

O princípio da técnica fundamenta-se na afinidade dos analitos com a fase estacionária, em função da polaridade dos analitos e da sua volatilidade. Inicia com a injeção da amostra gasosa ou líquida, a qual é vaporizada e imediatamente arrastada através da coluna onde ocorre a separação dos analitos conforme o peso, polaridade e volatilidade da molécula [66].

O analito é identificado com recurso a MS. O composto em estado gasoso é ionizado (ionização) e os fragmentos iónicos são separados num analisador de massas de acordo com a razão massa/carga (m/z), os quais são contabilizados no detetor de iões conforme a sua abundância relativa e registada sob a forma de espectro (software); a análise decorre em alto vácuo a fim de evitar a colisão dos iões. A identificação das moléculas é realizada por comparação dos espectros de massa com os disponíveis na base de dados.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e métodos

O plano experimental englobou duas fases, a primeira fase compreendeu a amostragem, a microfermentação, o isolamento, a identificação ao nível do género, espécie e estirpe de levedura *S. cerevisiae*, com recurso a técnicas de biologia molecular.

A segunda fase consistiu na seleção de estirpes para caracterização do perfil volátil com recurso à técnica extrativa (HS-SPME) e analítica (GC-MS) de alta performance e resolução.

2.1.1 Amostragem

A amostragem foi realizada na campanha vitivinícola de 2015, entre 15 de setembro e 05 de outubro. Foram selecionadas 10 amostras de mostos, processados a partir de castas autorizadas/recomendadas para vinificação na RDM. As amostras foram cedidas pela Empresa Vinhos Barbeito (Madeira) Lda. cuja Adega certificada para a produção de Vinho DO «Madeira» acolhida à RDM está sediada no Parque Empresarial de Câmara de Lobos, lote 8.



Figura 9 – Casta (local de amostragem): 1- Sercial (Seixal); 2- Tinta Negra (São Vicente); 3- Verdelho (São Vicente); 4- Malvasia de São Jorge (São Jorge); 5- Bastardo (São Jorge); 6- Verdelho (Prazeres); 7- Terrantez (Calheta); 8- Boal (Campanário); 9- Malvasia Cândida (Fajã dos Padres); 10- Sercial (Jardim da Serra).

Foram selecionados mostos a partir das castas Sercial, Tinta Negra, Verdelho, Malvasia de São Jorge, Bastardo, Terrantez, Boal e Malvasia Cândida, provenientes de diferentes pontos da Ilha da Madeira (Figura 9), produzidos a partir de uvas selecionadas cumprindo com os parâmetros de qualidade fitossanitários e enológicos, estipulados na regulamentação aplicável e na normativa interna de qualidade da Empresa.

As uvas foram previamente adquiridas pela Empresa a produtores independentes, proprietários/exploradores de vinhedos de pequena e média dimensão, igualmente acolhidos à RDM.

Após o controlo de maturação das uvas e marcação da vindima, foi realizada manualmente em caixas de entre 25-35 kg e transportadas no mesmo dia até a adega. À receção das uvas na Adega, é determinado o teor em álcool provável com recurso ao refratómetro (Hanna-HI-96813), na mesma operação são avaliados parâmetros físicos de qualidade. As uvas são imediatamente desengaçadas e os mostos foram obtidos com recurso à prensa pneumática, altura na qual cada mosto foi respetivamente coletado em frascos Schott de 1000 ml previamente autoclavados, transportados a frio e processados imediatamente em laboratório. O intervalo entre a prensagem e o processamento em laboratório não foi superior a 8 horas, período no qual os mostos foram conservados em condições de refrigeração.

2.1.2 Microfermentação espontânea

Os mostos foram submetidos a microfermentação espontânea a escala laboratorial de acordo com Schuller *et al.* [67] com algumas modificações. Em condições de assepsia, os mostos foram transferidos (500 ml) para erlenmeyers, imediatamente rolhados e inserido um tubo de fermentação em cada erlenmeyer de modo a permitir a saída de gases; seguidamente, foram colocados sob agitação magnética ou orbital constante (160 rpm) como mostra a figura 10. A microfermentação espontânea decorreu a temperatura ambiente ($27,9 \pm 1$ °C).

O progresso da microfermentação espontânea foi monitorizado diariamente através da determinação da diminuição da massa do fermentado, até estabilizar, neste momento os mostos são considerados vinhos. Os perfis fermentativos foram traçados.

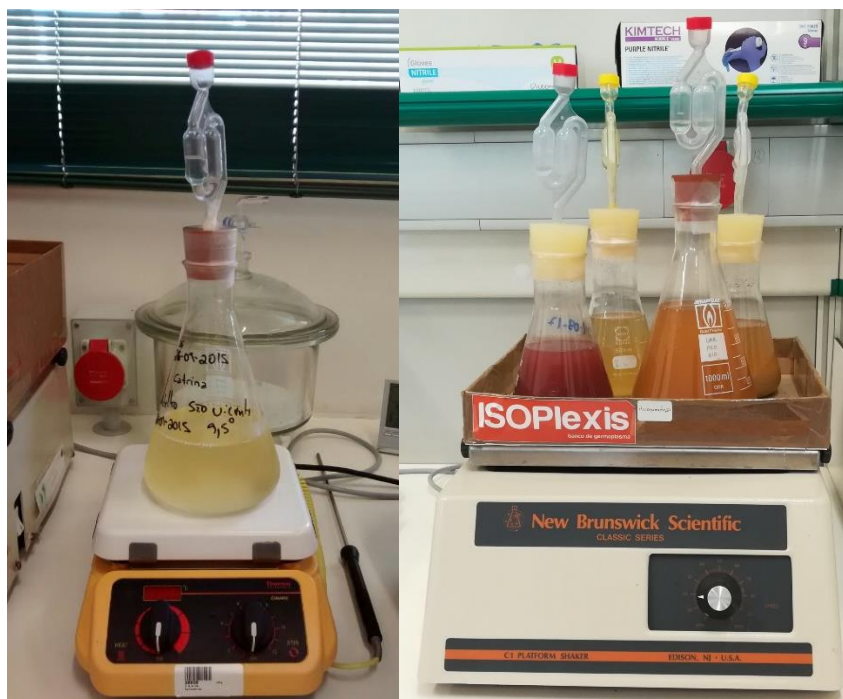


Figura 10 – Esquema de montagem, microfermentação a escala laboratorial: a) Agitação magnética; b) agitação orbital.

2.1.3 Isolamento

Com o intuito de isolar leveduras (isolados), foram realizadas diluições seriadas de cada vinho (entre 10^{-2} e 10^{-8}) e semeadas por espalhamento à superfície de placas contendo meio de cultura. Após o crescimento, foram determinados as unidades formadoras de colónias (UFC) por ml de vinho (UFC/ml), conforme a equação 1, em que N representa o numero de isolados quantificados na placa e F o fator de diluição. Seguidamente, foram selecionados isolados cujas características macroscópicas correspondem com a espécie *S. cerevisiae*, e aleatoriamente 12 isolados foram armazenados a -42°C até posterior análises. O presente estudo inclui a identificação molecular ao nível do género, espécie e estirpe de 100 isolados provenientes de 10 mostos.

$$UFC = \frac{N}{F} \quad (1)$$

2.1.3.1 Meios de cultura

As leveduras foram isoladas e mantidas em meio de cultura *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) caldo e agar (Sigma-Aldrich), com a seguinte composição: glucose 2 % (p/v), extrato de levedura 1 % (p/v) e peptona 1 % (p/v) correspondente ao meio líquido, ou caldo (YPD Broth). O meio sólido ou agar (YPD Agar) de igual composição acrescenta agar 1,5 % (p/v). Adicionalmente, foram utilizados para controlo microbiológico Agar Nutriente (AN) e *Potato Dextrose* Agar (PDA).

Os meios de cultivo foram preparados individualmente, dissolvidos 65 g/L de YPD Agar; 50 g/l de YPD Broth, 28 g/l de AN e 39 g/l de PDA Agar em água, seguidamente foram autoclavados a 1,2 atm, 121 °C durante 15 min. Após a autoclavagem, os meios Agar foram distribuído em placas de Petri em câmara de fluxo laminar, uma vez culminado este procedimento as caixas foram incubadas a 30 °C durante 24 h para excluir possíveis contaminações. Finalmente, os meios foram armazenados a 4 °C até a sua utilização, por um período inferior a 2 meses.

2.1.3.2 Obtenção de isolados

Para cada vinho obtido, foram realizadas diluições decimais seriadas que variaram entre 10^{-2} e 10^{-8} . Foram selecionadas as duas últimas diluições e 100 µl foram semeados por espalhamento à superfície das placas de Petri contendo YPD Agar, seguidamente foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Após incubação, procedeu-se à contagem do número de colónias (isolados) e à caracterização macroscópica das colónias. Posteriormente, foram selecionadas aleatoriamente 10 colónias cujas características macroscópicas correspondem à espécie *S. cerevisiae* para um total de 100 isolados. Cada colónia selecionada foi isolada em cultura pura e armazenada a -42 °C em meio YPD Broth contendo 30 % de glicerina (v/v).

2.1.3.3 Coleção de leveduras

Foi iniciada a coleção de leveduras isoladas a partir de ambientes vitivinícolas da RDM, atualmente a coleção conta com 232 isolados, dos quais 100 foram submetidos a identificação molecular no presente trabalho.

2.1.4 Caracterização molecular

A fim de identificar ao nível do género, espécie e estirpe, foram utilizadas diferentes técnicas de biologia molecular. Inicialmente foi realizada a amplificação via PCR da região ITS-5.8S que permite determinar o género; o produto de PCR foi submetido a cortes utilizando endonucleases de restrição (PCR-RFLP) a fim de identificar a espécie de levedura. A identificação da estirpe foi realizada através da análise do padrão de restrição com recurso à técnica mtDNA-RFLP.

O procedimento consistiu no cultivo fresco de levedura, extração de DNA, amplificação via PCR, digestão com recurso a endonucleases de restrição. O DNA foi separado com recurso a eletroforese em gel de agarose e observado sob luz ultravioleta (UV) após tingimento com brometo de etídio (BrEt), finalmente, as imagens foram adquiridas.

2.1.4.1 Preparação de cultivo de levedura

Na identificação do género/espécie foram utilizados cultivos em placas YPD Agar, enquanto que na identificação da estirpe, foi necessário o crescimento em meio YPD Broth a partir de um crescimento fresco em placa. Ambos procedimentos se explicam a continuação.

Cultivo em placa YPD Agar

Foi necessária a obtenção de uma quantidade maior de biomassa, neste sentido, as placas contendo meio YPD Agar foram divididas em 8 secções, com auxílio de um palito estéril foi removida um pouco da cultura pura armazenada, seguidamente, foi inoculada e espalhada à superfície de cada seção e finalmente incubada a 30 °C durante 48 h (Figura 11).



Figura 11 – Cultivo fresco em Placas YPD.

Cultivo em YPD Broth

Na identificação da estirpe, as placas YPD Agar foram divididas em 12 secções; à superfície de cada seção foi semeada uma cultura pura, seguidamente a placa foi incubada a 30 °C durante 48 h, findo este tempo, foram individualmente transferidas a um tubo de 1,5 ml contendo 1 ml de meio YPD Broth, fortemente vortexada, a tampa do tubo foi perfurada e o tubo foi colocado sob agitação orbital (250 rpm) a 30 °C durante a noite.

2.1.4.2 Extração de DNA

O DNA total (DNA) foi isolado com recurso a dois métodos conforme a técnica molecular empregue. Na amplificação via PCR, necessária para a identificação do género/espécie, a extração e purificação do DNA foi realizada com recurso ao método químico de acordo com Løoke *et al.* [68] com algumas modificações, nomeadamente a temperatura de incubação e o volume de dissolução foram otimizados num trabalho anterior [69].

No estudo do RFLP-mtDNA, técnica utilizada para a identificação da estirpe, a extração e purificação do DNA total foi realizada através do método enzimático segundo Querol *et al.* [59].

2.1.4.2.1 Método químico

Utiliza na lise celular de leveduras uma solução de acetato de lítio (LiOAc) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich).

O cultivo fresco em Placas YPD foi resuspendido em 100 µl de tampão de extração (200 mM de LiOAc e 1 % de SDS), e incubado a 70 °C durante 20 min. O DNA foi precipitado pela adição de 300 µl de etanol (99 %), brevemente vortexado e seguidamente centrifugado a 12500 rpm durante 3 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado utilizando 500 µl de etanol (70 %). Finalmente, o DNA foi seco a pressão reduzida e dissolvido em 25 µl de água ultrapura autoclavada (mQ). Posteriormente, a concentração de DNA foi determinada com recurso ao NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e ajustada a entre 700- 1000 ng/µl.

2.1.4.2.2 Método enzimático

As células frescas crescidas em meio líquido, foram centrifugadas a 13000 rpm durante 3 min., o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi lavado com mQ. O pellet foi resuspendido em 100 µl de solução I (sorbitol (1 M) e EDTA (100 mM) a pH 7,5) e 4 µl da enzima liticase (2,5 mg/ml) foram adicionados. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 60 min. e centrifugadas a 10000 rpm durante 1 min. Foram adicionados 50 µl de solução II (tris-HCl (50 mM) e EDTA (20 mM) a pH 7,4) e 3 µl de SDS a 10 % (p/v). As amostras foram novamente incubadas a 65 °C durante 30 min., imediatamente, foram adicionados 40 µl de acetato de potássio (KOAc) a 5 M, homogeneizados por inversão vigorosa e incubados em banho de gelo durante 30 min. Com recurso à uma centrifuga refrigerada, as amostras foram centrifugadas a 4 °C e 15000 rpm durante 15 min. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para tubos novos e foi adicionado igual volume de isopropanol, imediatamente, foi homogeneizado por inversão e incubado a temperatura ambiente durante 5 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min., o sobrenadante descartado e o DNA foi lavado com etanol (70 %). Finalmente, o DNA foi seco a pressão reduzida e dissolvido em 25 µl de Tris-EDTA (TE). A concentração de DNA foi determinada com recurso ao NanoDrop 2000 e diluído entre 55- 60 µg/µl aproximadamente.

2.1.5 PCR-RFLP da região ITS-5.8S

Com o intuito de identificar o género de levedura e posteriormente a espécie após a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição, foi amplificado o fragmento ITS-5.8S do rDNA e o produto de PCR submetido a restrição, de acordo com Esteve-Zarzoso *et al.* [53], recorrendo aos os *primers* ITS1 e ITS4 descritos por White *et al.*[70]. Como controlo positivo foi utilizada a estirpe comercial de *S. cerevisiae* QA23 (Lalvin) e como controlo negativo mQ.

2.1.5.1 Amplificação via PCR

A reação de amplificação foi realizada no termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). A reação de PCR foi realizada num volume final de 25 µl contendo: 18,25 µl de mQ (Braun); 2,5 µl (1X) de tampão de PCR (Thermo Scientific); 2 µl (50 µM) de mistura de dNTPs; 0,5 µl (0,5 µM) de cada *primer* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTTATTGATATGC-3') (Eurogentec); 0,25 µl (0,5 U) de DyNAzyme II DNA Polimerase (Thermo Scientific), 1 µl de DNA extraído com recurso ao método químico.

As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min., seguidos de 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 55,5 °C durante 2 min. e 72 °C durante 2 min., e uma extensão final a 72 °C durante 10 min. O produto de PCR foi analisado com recurso à eletroforese em gel de agarose.

2.1.5.2 Restrição RFLP

O produto de PCR foi submetido a corte com as endonucleases de restrição *HaeIII* (BsuRI) (5'-GG[^]CC-3') e *HinfI* (5'-G[^]ANTC-3') (Thermo Scientific) separadamente. O protocolo utilizado para a digestão foi o recomendado pelo fabricante, nomeadamente, 10 µl de produto de PCR, 18 µl de mQ, 2 µl (10X) de tampão R (Thermo Scientific) e 1 µl da endonucleases de restrição *HaeIII* ou *HinfI*. A mistura de reação foi vortexada brevemente e incubada a 37 °C durante 15 horas. Os fragmentos obtidos na reação foram separados e observados com recurso à eletroforese em gel de agarose.

2.1.6 mtDNA-RFLP

O DNA extraído através do método enzimático foi submetido a corte com recurso à endonuclease de restrição *HinfI* (5'-G[^]ANTC-3') (Thermo Scientific). A mistura foi

preparada da seguinte forma: 17 µl de DNA total (extraído na secção 2.4.1.3), 0,5 µl (10 U/µl) de endonuclease de restrição *HinfI*, 2 µl (10X) de tampão R (Thermo Scientific) e 0,5 µl (10 mg/ml) de RNase (Macherey Nagel Bioanalysis) para um volume final de 20 µl. A mistura de reação foi brevemente vortexada e incubada a 37 °C *overnight*. O padrão de restrição do mtDNA foi observado com recurso à eletroforese em gel de agarose.

2.1.7 Eletroforese

O produto de PCR, os fragmentos de restrição PCR-RFLP e o padrão de restrição do mtDNA (mtDNA-RFLP) foram analisados com recurso à eletroforese em gel de agarose (Fisher) em sistema de eletroforese horizontal (Horizon 58 e Scie-plas HU6 mini). Foi utilizada como tampão uma solução de Tris-Acetato-Etilenodiaminotetracético (Tris-Acetato-EDTA), pH 8, (TAE 1X). As amostras foram ressuspensas em tampão de corrida azul de bromofenol (1 % de azul de bromofenol, 70 % de glicerol e mQ).

O fragmento 5.8S-ITS amplificado via PCR foi detetado e observado utilizando um gel de agarose de 1,4 % (p/v). Foi injetado 4 µl de produto de PCR no gel e correu-se a 110V durante 60 min. O GeneRuller 100bp (ThermoFisher) foi utilizado como marcador de peso molecular.

Os fragmentos de restrição PCR-RFLP foram separados e observados em gel de agarose de 3 % (p/v); 5 µl do produto da digestão foram injetados no gel e correu-se a 100V durante 70 min. Igualmente, o GeneRuller 100bp foi utilizado como marcador de peso molecular.

O padrão de restrição do mtDNA foi determinado utilizando um gel de 1,5 % (p/v); foi injetado 10 µl do produto de restrição e correu-se a 92V durante 155 min. Foi utilizado como marcador de peso molecular o GeneRuller 1kb (ThermoFisher).

Finalmente, os géis de agarose foram tingidos em BrEt numa tina contendo 250 ml de solução tampão TAE 1X e 65 µl de BrEt (0,5 µg/ml) durante 60 min., imediatamente observados sob luz UV utilizando um transiluminador (Sygene) e fotografados com recurso a uma câmara digital (Kodak 290C).

2.2 Caracterização do perfil volátil

A caracterização dos VOCs biossintetizados por uma única estirpe, foi realizado com recurso às técnicas HS-SPME/GC-MS. A metodologia compreendeu o crescimento das estirpes selecionadas, determinação da densidade celular para o qual foi traçada a curva de crescimento, preparação do inóculo, seguida da microfermentação inoculada com estirpe pura em mosto concentrado retificado (substrato genérico). O procedimento consistiu na extração, separação, identificação e análise da proporção relativa dos VOCs. Para esta análise, foram selecionadas as estirpes mais representativas.

2.2.1 Curva de crescimento das estirpes

Com o objetivo de determinar a densidade celular no inóculo, foi traçada a curva de crescimento com recurso a métodos espectrofotométricos. O ensaio foi realizado em fase exponencial de crescimento (em triplicado) nas estirpes mais representativas.

Cada estirpe, foi riscada por esgotamento à superfície da placa YPD, incubada a 30 °C durante 48h, a partir de esta, uma colónia foi ressuspensa em 20 ml de YPD Caldo e incubada a 30 °C sob agitação magnética. Foi medida a absorvância aos 660 nm ao tempo 0 e a cada duas horas (aproximadamente) durante 12 horas, traçada a curva de crescimento e determinado o R^2 calculado. O número de células por ml foi determinado por espectrofotometria, de acordo com o valor tabelado [71].

2.2.2 Preparação do substrato

Com o intuito de fornecer não só condições ideais ao crescimento das leveduras, mas também condições homólogas à biossíntese de VOCs com impacto no perfil volátil e aromático do vinho, foi utilizado como substrato genérico o mosto de uvas concentrado retificado, diluído em mQ até aproximadamente 12,5 % (v/v) de álcool provável, determinado com recurso ao refratómetro. Posteriormente, o mosto concentrado retificado foi submetido a clarificação a frio (4 °C) durante 10 dias, findo este período foi decantado e diluído nas mesmas condições.

Antes de cada microfermentação, o mosto foi preparado a fresco e uma alíquota foi semeada por espalhamento (para controlo microbiológico) em placas contendo YPD Agar, AN e PDA Agar. Todas as placas foram incubadas nas condições habituais, em triplicado e observadas após 48 e 72 h de incubação.

2.2.3 Preparação do inóculo

As estirpes selecionadas, foram individualmente semeadas a partir da cultura pura armazenada em glicerol, à superfície de placas YPD Agar dividida em seções, incubadas durante 48 h nas condições habituais (secção 2.1.4.1). Seguidamente, uma seção (Figura 11) correspondente a uma cultura pura, foi ressuspensa em 5 ml de meio YPD Caldo e incubada a 30 °C sobre agitação magnética (160 rpm) até atingir a densidade celular pretendida.

2.2.4 Microfermentação inoculada com estirpe pura

Foram selecionadas para a presente análise as estirpes de *S. cerevisiae*, cujo padrão de restrição RFLP-mtDNA corresponde com o mais representativo; como controlo positivo foi selecionada a estirpe comercial QA23 (EC).

A microfermentação inoculada com estirpe pura consistiu, na inoculação de entre 10^5 e 10^6 células/ml da estirpe estudada em mosto concentrado retificado, clarificado e diluído até aproximadamente 12,5 % (v/v) de álcool provável. A determinação da densidade celular inoculadas foi realizada com recurso a métodos espectrofotométricos (secção 2.2.1)

2.2.4.1 Extração por HS-SPME

A extração dos VOCs foi realizada por recurso à técnica HS-SPME. A técnica inclui uma série de variáveis sequenciais que alteram a eficiência de extração de VOCs na matriz, concretamente o volume de amostra, força iónica, tempo de extração, intensidade da agitação e tempo de desorção foram previamente otimizadas na sequência de estudos realizados por Perestrelo *et al.* [72]. A temperatura de extração e programa de temperaturas para a separação de VOCs foram realizadas de acordo com a metodologia interna desenvolvida pelo Laboratório *Analytical Chemistry and Enology Lab* (ACELab).

Foi utilizada uma fibra SPME revestida com Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) StableFex (Supelco). A fibra foi condicionada durante 1 hora a 270 °C no injetor do GC antes da primeira utilização, conforme as recomendações do fabricante.

A preparação da amostra consistiu na adição de 10 ml de vinho fermentado por uma única estirpe num vial âmbar, de 25 ml, ao qual, foi adicionado 20 % de cloreto de sódio (NaCl) e 10 µl de 3-octanol, diluído 1:1, v/v (padrão interno); o vial foi selado com um septo de silicone, tampa de rosca plástica, e colocado em banho de água a 40 ± 1 °C durante 40 min mantendo a amostra sob agitação magnética (900 rpm). Após a extração, a fibra foi recolhida para o interior da agulha. A desorção dos compostos foi realizada expondo a fibra no interior do injetor do GC durante 6 min a 240 °C. Com o propósito de estudar unicamente os VOCs biosintetizados pela estirpe estudada, foram analisando de forma homóloga o mosto e o sistema de extração (branco ou controlo negativo). Todos os utensílios em contacto com o vinho foram previamente esterilizados.

A cada 6 extrações foi realizado um branco da extração e um branco da fibra de modo a avaliar o desempenho e possíveis interferentes.

2.2.5 Condições do GC-MS

A separação dos VOCs foi realizada utilizando o cromatógrafo em fase gasosa (GC) Agilent Technologies 6890N (Palo Alto, California, EUA) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida BP20 (SGE, Dortmund, Alemanha) de 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. Foi utilizado como gás de arraste o hélio num fluxo de 1 ml/min.

O gradiente de temperatura usado foi o seguinte: 45 °C durante 1 minuto, aumentando 2 °C/min até os 100 °C mantendo esta temperatura durante 3 min, seguido de um aumento de 5 °C/min até os 130 °C e ficando durante 5min, subindo de novo 20 °C/min até atingir 220 °C ficando durante 15 min, sendo no total a corrida de 72 min.

A deteção dos VOCs realizou-se com o auxílio do espectrómetro de massa quadrupolar simples (MS) Agilent Technologies 5973N em modo de impacto eletrónico (EI) utilizando 70 eV de energia de ionização e gama de massa do espectro entre 30- 300 m/z. A temperatura utilizada na fonte de iões, linha de transferência e quadrupolo foram 220 °C, 250 °C e 150 °C respetivamente.

2.2.5.1 Identificação de compostos

Os cromatogramas foram analisados com recurso ao software *Enhanced Data Analysis*. A identificação dos VOCs foi realizada por comparação do espectro de massa (MS) com os espectros da biblioteca NIST05A1, considerando unicamente os VOCs com uma percentagem de similaridade >75 %. Adicionalmente, alguns compostos foram identificados através do índice de retenção de Kovats (KI) por comparação com os encontrados na literatura. Os KI foram calculados recorrendo à equação 2, onde n é o número de átomos de carbono presentes no alcano com i átomos de carbono (i), N , o número de átomos de carbono referentes ao alcano $i+1$, $t'_r(n)$ o tempo de retenção ajustado do alcano menor, e $t'_r(N)$ é o tempo de retenção ajustado do alcano maior. Os tempos de retenção utilizados na equação corresponde aos tempos obtidos resultantes da injeção direta da mistura de alcanos.

$$KI = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log t'_r(\text{desconhecido}) - \log t'_r(n)}{\log t'_r(N) - \log t'_r(n)} \right] \quad (2)$$

2.2.6 Tratamento de dados

A abundância relativa dos VOCs identificado foi determinada pela razão entre a área absoluta do composto pela área total cujo valor foi expresso em unidades arbitrárias. Os VOCs identificados foram agrupados em famílias químicas. A área total da fração volátil foi calculada pelo somatório das áreas de cada composto identificado (Equação 3). A contribuição de cada composto para o perfil volátil foi estabelecida de acordo a equação 4, em que A é a área do pico, e At_f é a área total da família química a qual pertence ou área total da fração volátil. A reprodutibilidade dos resultados foi expressa em desvio padrão relativo (RSD). Finalmente, foi realizada a análise de componentes principais (PCA), com recurso ao software online *MetaboAnalyst* [73].

$$\sum At = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n \quad (3)$$

$$\% = \frac{A}{At_f} \times 100 \quad (4)$$

3 RESULTADOS

No presente trabalho foram identificadas estirpes autóctones de *S. cerevisiae* isoladas na RDM, assim como, foram também identificados metabolitos secundários biossintetizados pelas estirpes mais representativas, com possível impacto no perfil volátil/aromático do vinho. A metodologia incluiu técnicas de microbiologia, biologia molecular e química analítica. A fase experimental compreendeu o isolamento de leveduras presentes em vinhos, a identificação molecular ao nível do género, espécie e estirpe; finalmente, foi realizado o *screening* dos VOCs. Os resultados obtidos são apresentados na secção 3.1.

3.1 Microfermentação espontânea

Os mostos foram submetidos a microfermentação espontânea nas condições referidas na secção 2.2.4 As microfermentações tiveram uma duração entre 6 a 12 dias com perdas de massa entre 31,25 e 80,50 g/l. A figura 12 mostra os perfis fermentativos obtidos.

Maioritariamente, existem três tipos de perfis fermentativos. No primeiro foi verificado um arranque da fermentação após o 3º ou 4º dia (fermentação de início lento), seguido de perdas importantes de massa. Este perfil foi observado nas castas Malvasia Cândida, Verdelho 1 (Prazeres) e Verdelho 2 (São Vicente). No segundo perfil foi verificada a situação contrária, perdas importantes de massa desde o início da fermentação (fermentação de início rápido) até estabilizar o peso; este perfil foi observado nas restantes castas, exceto a Malvasia de São Jorge a qual mostrou perdas regulares de massa em todo o processo fermentativo (fermentação regular) até estabilizar (Figura 12).

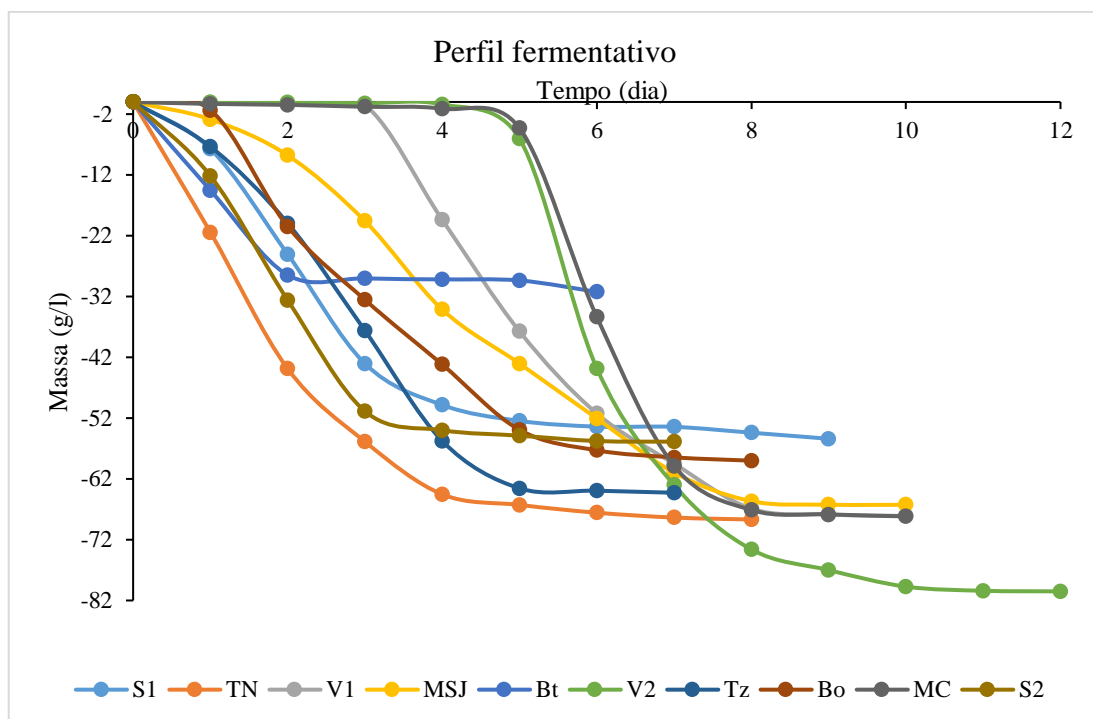


Figura 12 – Perfil fermentativo: S1- Sercial 1 (Seixal); TN- Tinta Negra; V1- Verdelho 1 (São Vicente); MSJ- Malvasia de São Jorge; Bt- Bastardo; V2- Verdelho 2 (Prazeres); Tz- Terrantez; Bo- Boal; MC- Malvasia Cãndida; S2- Sercial 2 (Jardim da Serra).

3.2 Isolamento

Após a fermentação, para cada vinho, foi retirada uma alíquota a partir da qual foram realizadas diluições seriadas, semeadas em placas YPD Agar conforme a secção 2.1.3. Foram selecionadas para quantificação as placas contendo entre 30 e 300 isolados, determinadas o número de UFC/ml (equação 1) presentes em cada vinho na fase final de fermentação (Tabela 3).

Os isolados foram obtidos a partir das diluições 10^{-4} e 10^{-7} (exceto o Boal) nas quais foram contabilizados entre 42 e 155 isolados. Foram observadas colónias com características morfomacrosscópicas correspondente à espécie *S. cerevisiae*, nomeadamente, colónias de morfologia circulares, bordas lisas e superfície plana, de cor branca/creme e de aparência butirosa, à exceção da casta Boal na qual foram observadas 18 colónias com as mesmas características morfomacrosscópicas, mas de cor transparente (Figura 13a) as quais não foram contempladas no presente estudo. A Figura 13b mostra o isolado típico.

Tabela 3 – Isolados/diluições obtidos para cada vinho

Nº	Casta	Local (*)	Id.	Diluição	Nº de col.	UFC/ml
1	Sercial	Seixal	S1	1,0E-05	42	4,20E+06
2	Tinta Negra	São Vicente	TN	1,0E-05	120	1,20E+07
3	Verdelho	São Vicente	V1	1,0E-04	53	5,30E+05
4	Malvasia SJ	São Jorge	MSJ	1,0E-05	155	1,55E+07
5	Bastardo	São Jorge	Bt	1,0E-07	126	1,26E+09
6	Verdelho	Prazeres	V2	1,0E-07	97	9,70E+08
7	Terrantez	Calheta	Tz	1,0E-06	137	1,37E+08
8	Boal	Campanário	Bo	1,0E-01	47	4,70E+02
9	Malvasia Cândida	Fajã dos Padres	MC	1,0E-04	77	7,70E+05
10	Sercial	Jardim da Serra	S2	1,0E-05	47	4,70E+06

(*)- Localização do vinhedo; **Id.**- identificação da amostra, **Nº de col.**- número de colónias quantificadas em cada placa, **UFC**- Unidades formadora de colónias.

A menor concentração de leveduras por ml foi obtida no vinho realizado a partir da casta Boal, na qual foram quantificadas 470 UFC/ml, seguido de Verdelho 1 (530.000 UFC/ml) e Malvasia Cândida (770.000 UFC/ml). Nos restantes vinhos foram quantificadas leveduras numa ordem de grandeza na casa dos milhões de UFC/ml; Sercial 1, Sercial 2, Tinta Negra e Malvasia de São Jorge foram quantificadas 4,2, 4,7, 12 e 15,5 milhões de UFC/ml, respetivamente.

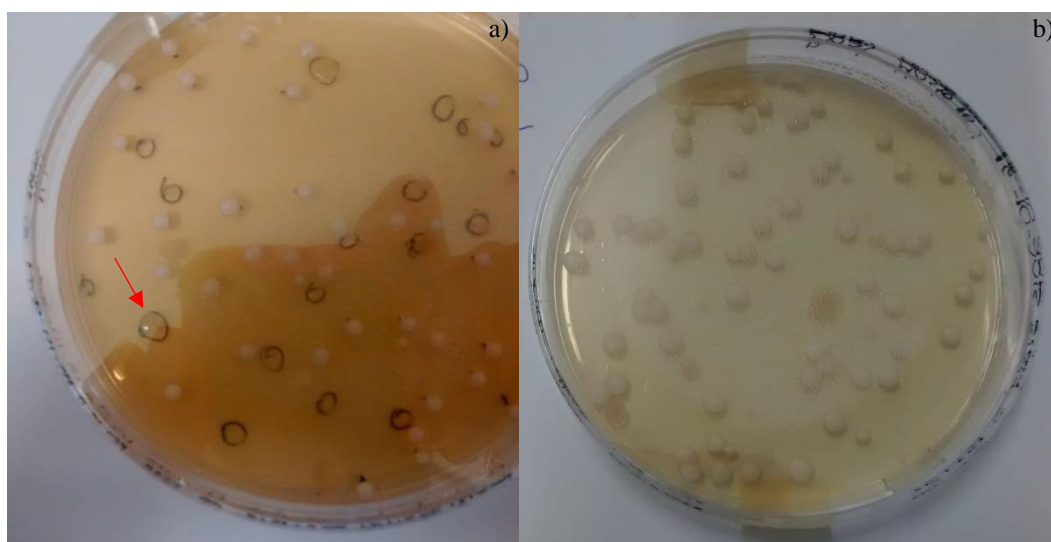


Figura 13 – Características macroscópicas dos isolados: a) isolados obtidos a partir da casta Boal, colónia atípica (seta vermelha); b) isolados típicos.

No entanto, a maior concentração de leveduras foi encontrada no o Bastardo 1.260 milhões de UFC/ml seguida do Terrantez e Verdelho 2 nos quais foram quantificados 137 e 970 milhões de UFC/ml.

Para cada vinho, foram selecionadas 10 colónias, isoladas em cultura pura e criopreservadas em meio YPD Caldo (30% de glicerol, v/v) a -42 °C para posterior identificação molecular. Adicionalmente, foi iniciada a coleção informal de leveduras a partir de amostras certificadas não incluídas no presente trabalho.

3.3 Caracterização molecular

Foram analisados 100 isolados cujas características macromorfológicas correspondem com a descrição para *S. cerevisiae*. A concentração de DNA e a pureza foi determinada analiticamente com recurso ao espectrofotómetro NanoDrop 2000c. Na identificação do género foi utilizada a extração química, na qual foi obtida uma concentração entre 700-100 ng/µl e uma média de grau de pureza de 1,9 (d_s 0,05). Na identificação da estirpe foi utilizado o método de extração enzimática, no qual o DNA foi diluído até uma concentração entre 5500-6000 ng/µl e grau de pureza com média de 2,0 (d_s 0,10).

3.3.1 Identificação do género e espécie

A identificação do género foi alcançada através da amplificação da região 5.8S-ITS do rDNA, o amplificado foi obtido a partir do DNA total extraído através do método químico. Após a visualização no gel de agarose (1,4 %) foi obtido em todos os isolados analisados um fragmento com peso molecular entre 850-880 pb (Figura14).

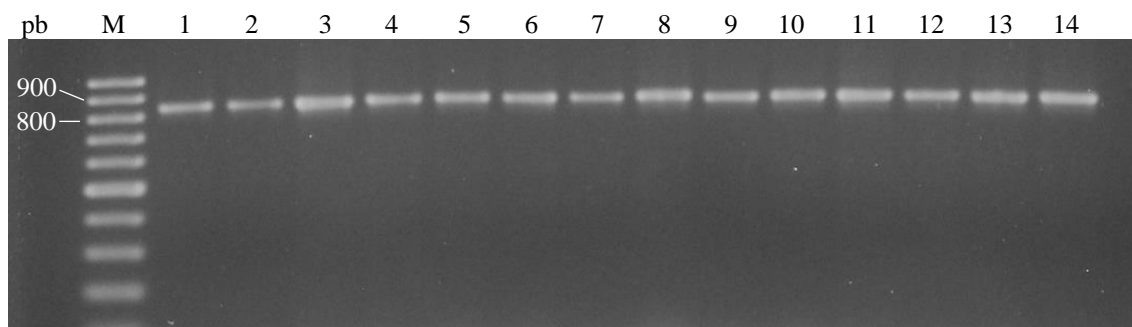


Figura 14 – Amplificado da região ITS-5.8S do rDNA; 1- M: 100 bp GeneRuler DNA Leader; 1- 14: fragmento obtido nas amostras estudadas; gel de agarose (1,4 %).

Seguidamente, com o intuito de identificar a espécie, o amplificado foi submetido a digestão com as enzimas de restrição *HaeIII* e *HinfI* (Figura 15 a, b), sendo obtidos os padrões de restrição com fragmentos de aproximadamente 320, 230, 180 e 150 pb para a enzima *HaeIII*, e 365 e 155 pb para a enzima *HinfI*, no entanto, excepcionalmente foram obtidos 4 fragmentos além da banda 365 e 155 pb de muito baixa resolução. (Figura 15b).

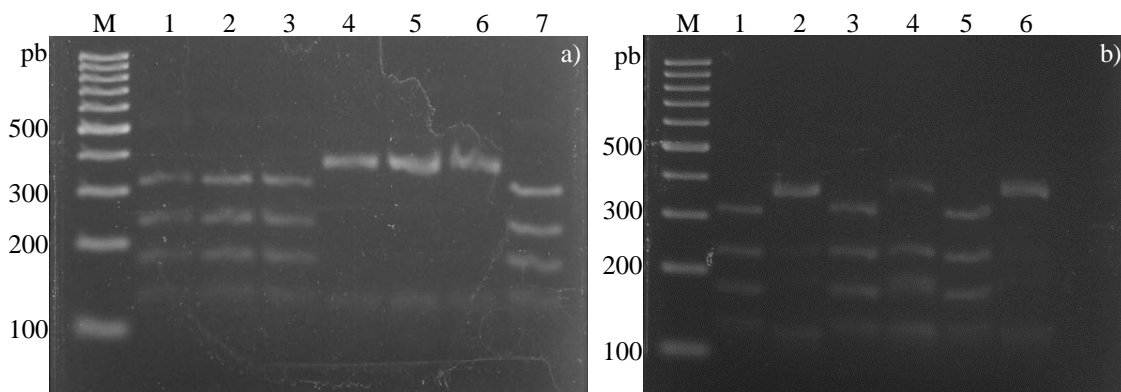


Figura 15 – Fragmentos de restrição RFLP-5.8S-ITS correspondente com *S. cerevisiae*, M: marcador de peso molecular 100 bp GeneRuler. a) 1,2,3,7; b) 1, 3, 5- produto da digestão com *HaeIII*; a) 4,5,6; b) 2,4,6- produto da digestão com *HinfI*, gel de agarose (3 %).

Finalmente, com o objetivo de garantir a robustez do método, foram selecionados aleatoriamente 5 isolados previamente identificados como *S. cerevisiae* através da amplificação do fragmento 5.8S-ITS do rDNA e submetidos a sequenciação. Com recurso à ferramenta BLAST [55], por comparação da sequência obtida com a sequência na base de dados, foi obtida 99,9 % de homologia com a espécie *S. cerevisiae*.

3.3.2 Identificação da estirpe

A identificação da estirpe foi realizada com recurso à técnica RFLP-mtDNA [74], através da qual foram obtidos 8 padrões de restrição, designados com as letras A, B, C, K, L, M, N e O, em que, cada padrão de restrição é considerado uma estirpe. A figura 16 mostra os padrões de restrição RFLP-mtDNA mais representativos.

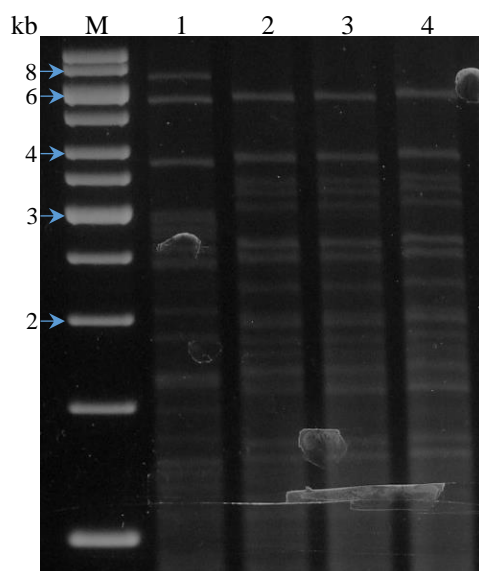


Figura 16 – Padrões de restrição RFLP-mtDNA. Poço 1- M: marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb; 1- estirpe A, 2- 4- estirpe B.

O padrão de restrição RFLP-mtDNA predominante pertence à estirpe B, identificada em 81 % dos isolados analisados, seguidamente a estirpe A identificada em 11 % dos isolados; as estirpes C e L representam cada uma 2 % dos isolados analisados; e finalmente as estirpes K, M, N e O representam individualmente 1 % dos isolados analisados.

Na maioria dos vinhos foram identificadas 2 estirpes: no vinho Malvasia de São Jorge foram identificadas as estirpes B e O, no Tinta Negra foram identificadas as estirpes B e A, e no Verdelho (Prazeres) as estirpes B e K, em todos os casos numa proporção de 9:1, respetivamente. No vinho Malvasia Cândida foram igualmente identificadas 2 estirpes, nomeadamente as estirpes B e C, numa proporção de 8:2, respetivamente; e no Sercial (Jardim da Serra) as estirpes B e A numa proporção de 6:4.

Em 2 amostras de vinho, foram identificadas 3 estirpes: no Sercial (Seixal) foram identificadas as estirpes B, A e L numa proporção de 7:2:1 respetivamente; e no Verdelho (São Vicente) as estirpes B, A e M na proporção de 6:3:1.

No Boal e no Bastardo foi apenas identificada a estirpe B, e no Terrantez foram identificadas as estirpes B, A, L e N na proporção de 7:1:1:1 respetivamente.

Do ponto de vista geográfico, a estirpe A foi encontrada em Seixal, São Vicente, Calheta e Jardim da Serra, a estirpe B foi encontrada em todas as amostras analisadas e a

estirpe C foi encontrada unicamente em Fajã dos Padres. A estirpe K foi encontrada em Prazeres, a estirpe L em Seixal e Calheta, e as estirpes M, N e O foram encontradas em São Vicente, Calheta e São Jorge, respetivamente.

3.4 Caracterização do perfil volátil

Para o estabelecimento do perfil volátil, foram selecionadas as estirpes mais representativas, nomeadamente as estirpes A e B, visto que, a estirpe A foi identificada em 50 % nos mostos analisados: Sercial 1, Tinta Negra, Verdelho 1, Terrantez e Sercial 2, representando 11 % dos isolados estudados. A estirpe B foi identificada em todos os mostos analisados, representando 81 % dos isolados estudados. Neste sentido, foram selecionadas aleatoriamente os isolados E7 (estirpe B) e E81 (estirpe A) para crescimento e inoculação em mosto concentrado retificado diluído até 12,5 % v/v de álcool provável, decorrendo a microfermentação em condições controladas.

3.4.1 Inóculo

Com o objetivo de inocular entre 10^5 e 10^6 células/ml, foi determinada a densidade celular com recurso ao método espectrofotométrico, tendo-se para o efeito traçar a curva de crescimento das estirpes selecionadas (Figura17).

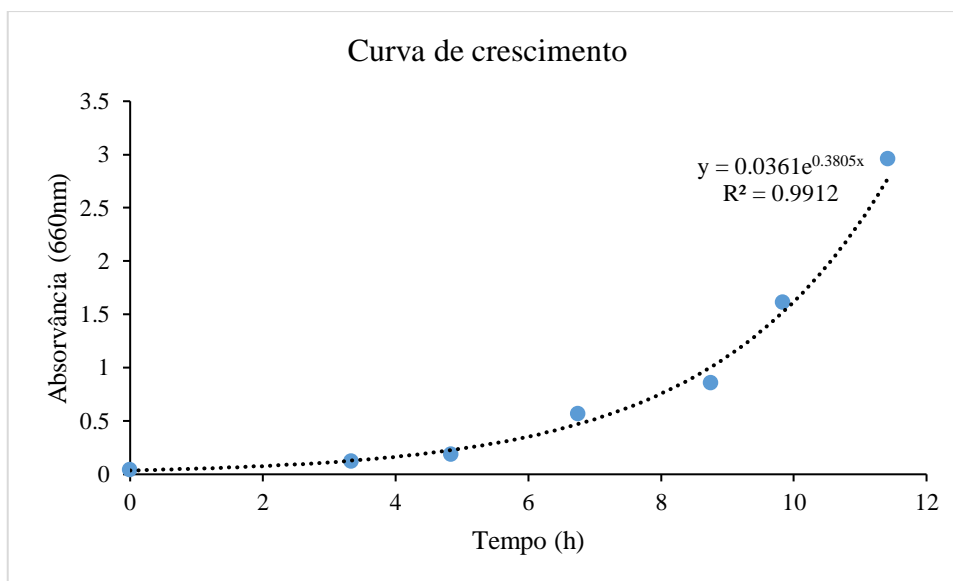


Figura 17 – Curva de crescimento: Absorvância (660 nm) em função do tempo na fase exponencial de crescimento da estirpe B.

Foi observado um incremento exponencial na absorvância em função do tempo. A densidade celular foi determinada por comparação com os dados tabelados em que a absorvância de 1,0 aos 660 nm correspondem aproximadamente $1,9 \times 10^7$ células/ml em *S. cerevisiae*. Algumas placas YPD foram inoculadas, verificando-se a correspondência com a ordem de grandeza.

3.4.2 Mosto de uvas concentrado retificado

A fim de fornecer condições homólogas de fermentação, foi utilizado mosto concentrado retificado diluído em mQ até 12,5 % de álcool provável o qual foi submetido a controlo microbiológico em placas YPD, PDA e AN. A primeira leitura das placas foi realizada após 48 h de incubação, a segunda leitura após 72 h, ao fim das quais não foram observados crescimentos.

Uma vez que se pretende estudar os metabolitos secundários biossintetizados pela estirpe analisada, foi realizado o branco do substrato, extraindo os VOCs presentes no mosto diluído, utilizando à técnica HS-SPME/GC-MS, nas condições analíticas descritas.

Posteriormente, visto a dificuldade no arranque da fermentação e no vigor fermentativo, o mosto concentrado retificado foi submetido a clarificação ao frio (4 °C) durante 10 dias, ao fim dos quais foi decantado até 3/4 do seu volume total. Foi verificada a formação de um precipitado branco, maioritariamente de aspeto cristalino. Visto que o processo de clarificação modificou a composição do mosto concentrado retificado, foi realizado novo branco.

Na análise e tratamento dos resultados, o etanol foi excluído da fração volátil e análise dos cromatogramas foi realizada com recurso ao software *Enhanced Data Analysis*. Os VOCs identificados foram agrupados por famílias químicas: ésteres, álcoois superiores, compostos carbonilados (aldeídos e cetonas), ácidos gordos, terpenos e miscelâneos (Tabela 4).

A Figura 18 mostra a sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir dos VOCs extraídos do mosto não clarificado (MNC) e do mosto clarificado (MC). É evidente o impacto do processo de clarificação uma vez que no MNC, foram observados uma maior quantidade e intensidade dos picos, do que no MC.

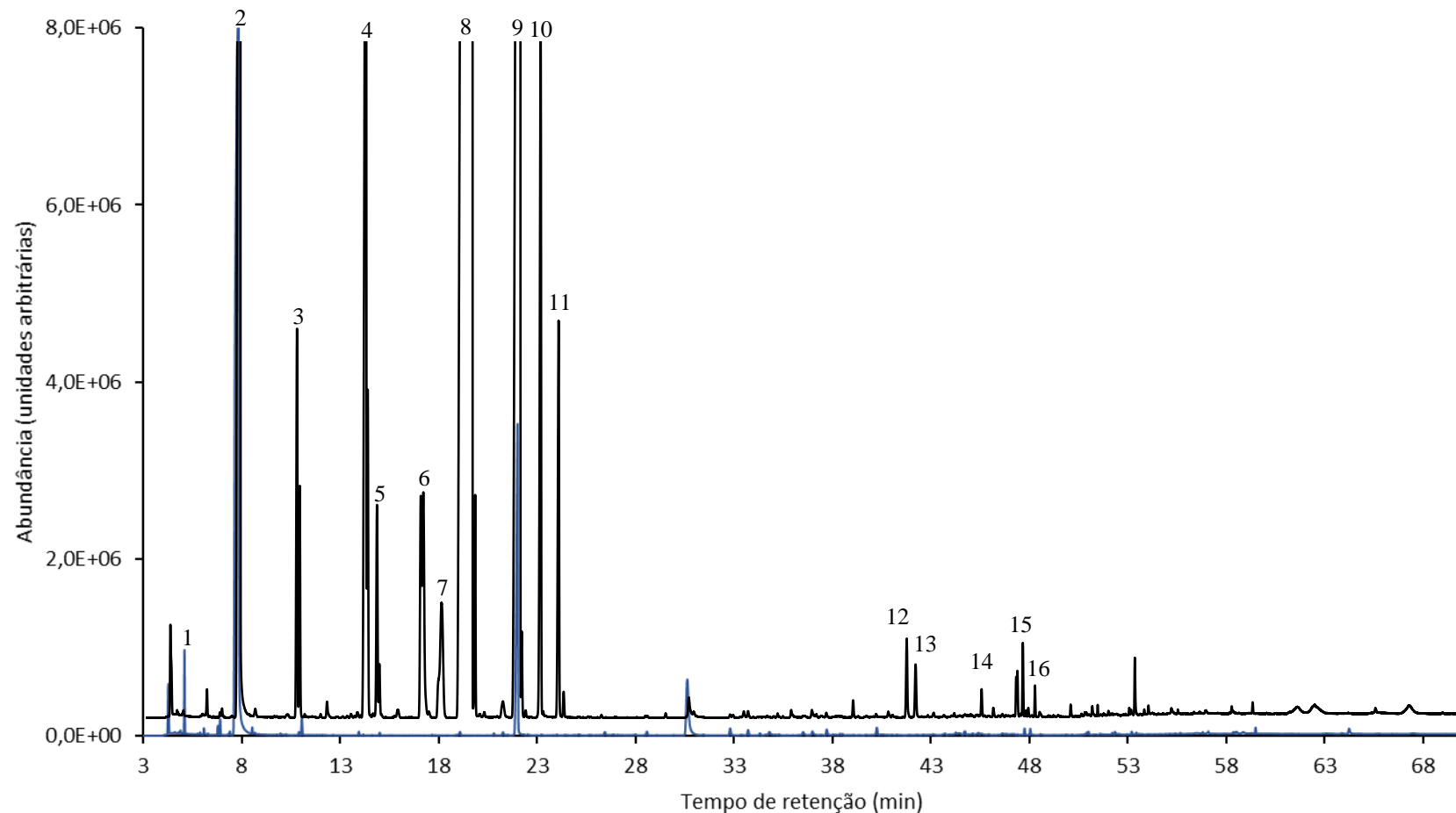


Figura 18 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HS-SPME/GC-MS do mosto concentrado retificado diluído até 12,5 %: MNC - mosto não clarificado (linha preta); MC - mosto clarificado (linha azul). **VOCs maioritários:** 1- ciclohexano; 2- etanol; 3- α -Pineno; 4- (-)- β -Pineno; 5- β -Felandreno; 6- β -Mirceno; 7- α -Terpineno; 8- Limoneno; 9- γ -Terpineno; 10- Ocimeno; 11- (+)-4-Careno; 12- α -Bergamoteno; 13- Cariofileno; 14- Neral; 15- β -Bisaboleno, 16- Nerol.

A Figura 18 mostra a área total dos VOCs identificados no MNC e no MC, calculados segundo a equação 3. Foi obtida uma área total de $1,17 \times 10^{10}$ unidades arbitrárias (UA) no MNC e $2,28 \times 10^8$ UA no MC. Verifica-se uma diminuição na área total após o tratamento de clarificação de cerca de 98 %.

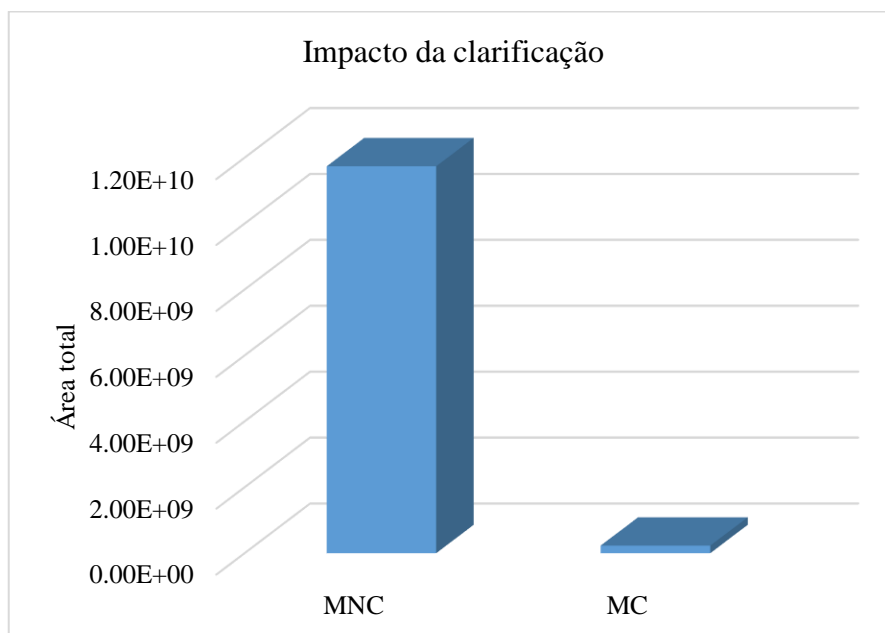


Figura 19 – Impacto da clarificação no mosto concentrado retificado no perfil total da fração volátil: MNC- mosto não clarificado; MC- mosto clarificado.

Relativamente ao número de VOCs e a sua distribuição por família química, foram identificados um total de 76 VOCs no MNC, dos quais 53 VOCs pertencentes à família química dos terpenos, maioritariamente monoterpénos (33 VOCs), seguido de sesquiterpenos (10 VOCs) e em menor quantidade sesquiterpenóides (10 VOCs), 11 compostos carbonilados, 4 ésteres, 3 ácidos gordos, 3 miscelâneos e 2 álcoois superiores.

Após clarificação a frio, foram identificados 33 VOCs, 11 dos quais pertence à família química dos compostos carbonilados, 8 ésteres, 6 terpenos, 2 álcoois superiores, 4 miscelâneos e 1 ácido gordo.

No que diz respeito à contribuição de cada família química no perfil volátil total (Tabela 4), no MNC, em maior representação estão os terpenos com 98,24 % dos quais cerca de 78 % corresponde a duas moléculas, em maior percentagem o limoneno

(isômeros) representando 57,39 % seguido do γ -terpineno (20,55 %). O (-)- β -pineno foi o terceiro composto volátil mais abundante representando 6,42 % do total da fração volátil. As restantes famílias químicas encontram-se em muito baixa proporção (< 1 %).

Tabela 4. Proporção (%) dos VOCs em cada família química que conformam o perfil volátil no MNC e MC

	%					
	Ésteres	Álcoois S.	CC	Ácidos G.	Terpenos	Miscelâneos
MNC	0,06	0,05	0,15	0,76	98,25	0,73
MC	3,84	1,06	79,53	0,65	2,90	12,02

Álcoois S. – álcoois superiores; CC – Compostos carbonilados; Ácidos G – ácidos gordos

Após clarificação (MC), a fração volátil total alterou substancialmente. Os resultados mostram que os compostos carbonilados são a família química maioritária, representando 79,53 %, seguido miscelâneos que representam 12,02 % e dos ésteres (3,84 %). Os terpenos representam aproximadamente 3 %, os miscelâneos e os álcoois superiores representam 1,92 e 1,11 %, respetivamente. Finalmente, em menor proporção os ácidos gordos (0,78 %). O VOC mais abundante é a 3-octanona (75,10 %), seguido de ciclohexano representando 9,86 % da fração volátil total. Entre 1 e 2 % encontram-se o benzaldeído, o 1,1-dietoxi-etano e 4-etilresorcinol. Os restantes compostos representam menos do que 1 % cada.

Verifica-se após o tratamento de clarificação ao frio uma diminuição na quantidade e na proporção de VOCs. No MC foram identificados menos 43 VOCs correspondendo a uma diminuição de 98,06 % da fração volátil total comparativamente ao MNC. Relativamente às famílias químicas, os terpenos diminuíram em cerca de 95%.

3.5 Microfermentação inoculada com estirpe pura

Foram selecionadas para microfermentação em MC as estirpes com o padrão de restrição RFLP-mtDNA A e B. Foram inoculadas entre 10^5 e 10^6 células, e as microfermentações foram conduzidas em condições análogas.

A figura 20 mostra a sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir das estirpes A e B (EA e EB, respetivamente). Para melhor visualização dos VOCs biossintetizados por

cada estirpe foi incluído o cromatograma referente ao MC. Como era teoricamente previsto e esperado, foram observados um maior número de picos após a fermentação.

Verifica-se uma maior quantidade e intensidade de picos na estirpe EB, seguido da estirpe controlo (dados não apresentados) que apresentou o mesmo número de picos, mas, de menor intensidade, e a estirpe EA, que apresentou menor números de picos e de menor intensidade (Figura 20).

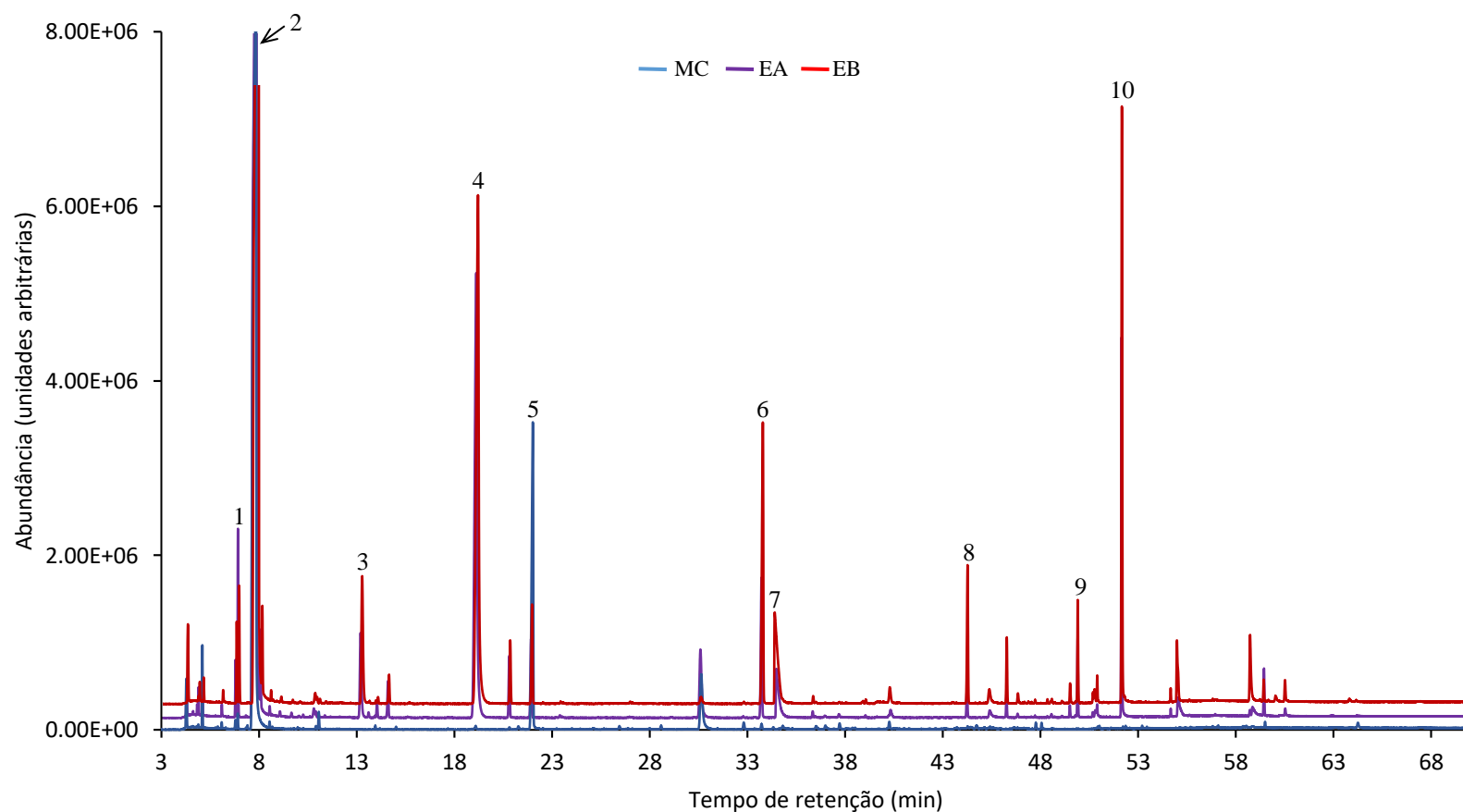


Figura 20 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HS-SPME/GC-MS a partir de: EA- estirpe A, isolada a partir de Verdelho (São Vicente); EB- estirpe B, isolada a partir de Malvasia de São Jorge (São Jorge); MC- mosto clarificado. **VOCs maioritários:** 1- acetato de etilo; 2- etanol; 3- 2-metil-1-propanol; 4- 2-metil-1-pentanol; 5- 3-octanona; 6- octanoato de etilo; 7- ácido acético; 8- decanoato de etilo; 9- acetato de 2-feniletilo; 10- feniletil álcool. Dados tratados utilizando o programa *Enhanced Data Analysis*.

Foram calculadas as áreas totais com recurso à equação 3. Os resultados obtidos, expressos em UA foram: $2,28 \times 10^8$ no MC; $8,53 \times 10^8$ para a estirpe EA; $1,72 \times 10^9$ para a estirpe EB e $1,23 \times 10^9$ na estirpe controlo (EC). A Figura 13 mostra as áreas totais dos VOCs identificados em cada estirpe, na estirpe controlo e no branco (MC).

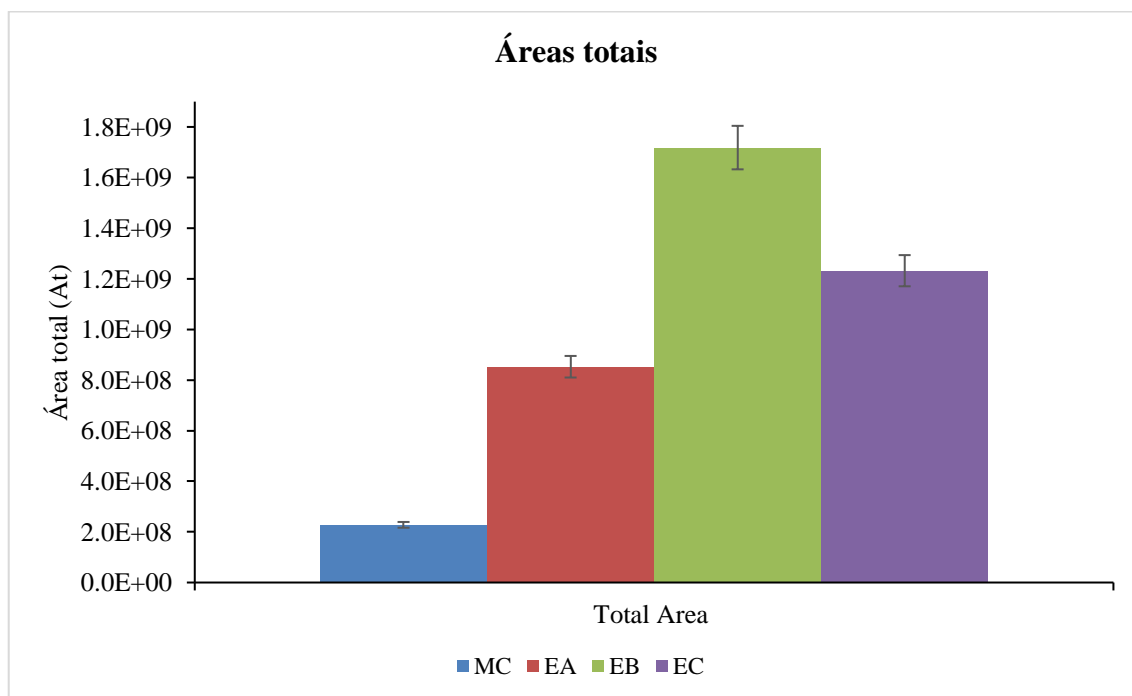


Figura 21 – Áreas totais obtidos por HS-SPME/GC-MS. MC – mosto clarificado, EA – estirpe A; EB – estirpe B; EC – estirpe controlo, (estirpes identificadas através de RFLP-mtDNA).

Verifica-se um incremento significativo de VOCs após fermentação. As frações voláteis aumentaram em cerca de 374, 540 e 754% (EA, EC e EB respetivamente) comparativamente à fração volátil do MC. A maior produção de metabolitos secundários voláteis observa-se na estirpe EB, cuja fração supera em cerca de 100 % à fração volátil de EA e em aproximadamente 27 % à da estirpe controlo EC. A estirpe que apresentou menor área total foi a EA, e a EC apresentou um resultado intermédio.

Os VOCs identificados foram agrupados em famílias químicas: ésteres, álcoois superiores, compostos carbonilados, ácidos gordos, terpenos e miscelâneos. A tabela 5, mostra a contribuição de cada família química no perfil volátil total.

Tabela 5 – Proporção (%) dos VOCs em cada família química que conformam o perfil volátil de EA, EB e EC

Estirpe	Fração volátil total (%)					
	Ésteres	Álcoois S.	CC	Ácidos G.	Terpenos	Miscelâneos
EA	15,854	61,630	4,220	9,244	0,770	7,906
EB	23,134	51,821	3,373	15,030	1,237	5,115
EC	23,769	57,097	2,142	10,480	0,953	8,268

Álcoois S. – álcoois superiores; CC – Compostos carbonilados; Ácidos G – ácidos gordos

Nas estirpes analisadas, verifica-se que entre 77 e 79 % dos VOCs identificados, pertencem a duas famílias químicas, nomeadamente álcoois superiores e ésteres. Os álcoois superiores encontram-se em maior percentagem, sobretudo na estirpe EA, representando 63,20 %, enquanto que nas EB e EC encontram-se em proporção similar (54 % aproximadamente). Relativamente aos ésteres, as estirpes EB e EC apresentam a maior proporção (cerca de 23 %), enquanto que a EA cerca de 16 %.

As famílias químicas minoritárias representam entre 20 e 23% dos VOCs identificados. Desta fração, os ácidos gordos são os VOCs mais abundantes, representado aproximadamente 15,0, 10,5 e 9,2 nas estirpes EB, EC e EA respetivamente. Os miscelâneos, em EC e EA representam respetivamente 8,1 e 7,9 % e na estirpe EB representam 5,1 %. Os compostos carbonilados mostram resultados mais heterogéneos, representando 4,2, 3,3 e 2,1 % em EA, EB e EC respetivamente. Os terpenos, são a família química minoritária com menor percentagem (< 1,2 %) em todas as amostras.

Relativamente ao número de VOCs, foram identificados 77 no total, nomeadamente 18 ésteres, 16 compostos carbonilados, 14 miscelâneos, 11 álcoois superiores, 11 terpenos e 7 ácidos gordos . (Tabela 7). Em cada vinho fermentado por estirpe pura, foram identificados um total de 50 VOCs no EA, e 59 no EB e EC. A tabela 6 discrimina o número de VOCs identificados distribuídos por família química.

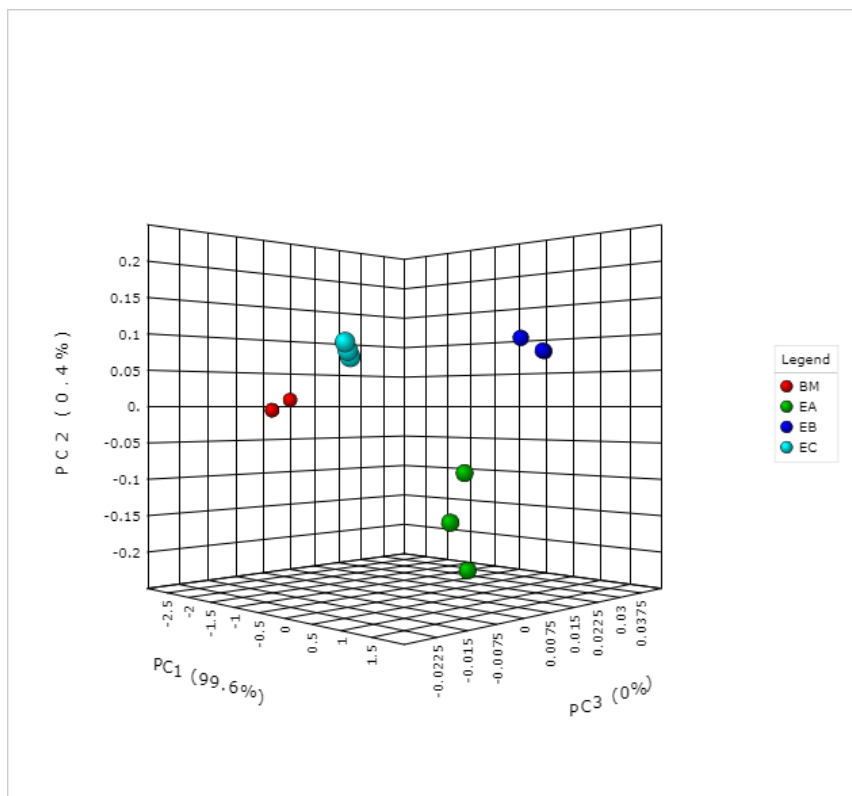
Tabela 6 – Número de VOCs por família química: identificados em cada Vinho fermentado com as estirpes EA, EB e EC

Estirpe	Ésteres	Álcoois S.	CC	Ácidos G.	Terpenos	Miscelâneos
EA	14	9	9	5	6	7
EB	16	11	8	7	6	11
EC	17	10	9	6	7	10

Álcoois S. – álcoois superiores; CC – Compostos carbonilados; Ácidos G. – ácidos gordos

Verifica-se que o perfil volátil estudado está constituído por 3 VOCs, representando aproximadamente 57 % da fração volátil total em EB e 61 % em EA e EC. Sendo que a família química com maior contribuição são os álcoois superiores, representando 55,7 % da fração volátil total de EA, aproximadamente 47 % de EB e 50,8 % de EC. O 3-metil-1-butanol foi o composto maioritário, sobretudo em EA (44 %) e em menor percentagem em EB e EC (entre 34 e 37 %). O segundo VOC maioritário foi o feniletanol, o qual representa cerca de 12; 13 e 16 % da fração volátil total de EA, EB e EC respetivamente. O terceiro VOC maioritário foi o octanoato de etilo contribuindo com aproximadamente 10-11% para o perfil volátil total de EB e EC, no entanto, em EA está presente em menor percentagem (5,3 %). O quarto VOC mais abundante foi o ácido acético, contribuindo com 8 % da fração volátil total do EB e aproximadamente 5,8 % de EA e EC.

Constata-se que, em EA foram identificados um número menor de VOCs. Nos vinhos EB e EC foram identificados o mesmo número de VOCs, contudo, a proporção dos mesmos varia. Nesse sentido, devido ao elevado número e dispersão dos dados, optou-se pela análise de componentes principais. A matriz de dados consistiu em 77 variáveis (VOCs) distribuídos em linha, contendo os valores obtidos para as estirpes EA, EB e EC e no MC. A esta matriz aplicou-se uma análise de componentes principais [75], previa normalização (MC). Os resultados obtidos são apresentados na figura 22, através da qual é possível estabelecer a diferença entre o perfil volátil obtidos nas 3 estirpes estudadas.



4 DISCUSSÃO

A caracterização de estirpes endémicas de *S. cerevisiae* garante a preservação de uma parte muito importante do património vitivinícola das Regiões Demarcadas, podendo potenciar os processos tecnológicos na indústria, conseqüentemente aumentando a competitividade nos mercados.

O interesse pela identificação de estirpes de leveduras *S. cerevisiae* autóctones de um determinado ecossistema, inserido numa Região Demarcada ou região vitivinícola tem-se incrementado desde o início da década de 90 [74], conjuntamente com o surgimento das técnicas moleculares [70], período no qual também surgiu o uso de estirpes de *S. cerevisiae* na forma de LSA [39] com propriedades tecnológicas comprovadas. Contudo, verificou-se a falta de adaptação ao substrato e as condições de fermentação próprias de cada região para além de produzir vinhos padronizados. Um exemplo notório da importância de um estudo desta natureza, foi dado na região vitivinícola de Alicante (Espanha), em que os processos tradicionais de vinificação são caracterizados por fermentações conduzidas em temperaturas elevadas e mostos com elevado teor de açúcar inicial, condições nas quais, LSA comerciais não tiveram um bom desempenho [59], surgindo a necessidade de isolar, caracterizar e selecionar estirpes a partir do próprio ecossistema, adaptadas as condições de fermentação, com propriedades tecnológicas desejadas e propriedades sensoriais que descrevam a tipicidade dos vinhos da Região [29].

Diversas Regiões Demarcadas de referência a nível mundial como Portugal, Espanha e Itália [14,29,67] e regiões vitivinícolas emergentes [76] como Chile e Austrália, têm caracterizado, molecular e tecnologicamente, estirpes endémicas de *S. cerevisiae*, e em alguns casos, após ensaios piloto a escala semi-industrial, têm surgido patentes com o intuito de salvaguardar o património vitivinícola, otimizar o processo industrial, manter e melhorar a qualidade e competitividade do produto final.

4.1 Microfermentação espontânea

Verificou-se que independentemente da casta, todas as microfermentações foram realizadas pela espécie *S. cerevisiae*, no entanto, é possível observar 3 perfis

fermentativos. As fermentações de início lento e de início regular estenderam-se durante mais dias (10 e 12 dias), sendo o mosto Verdelho 1 (Prazeres) o que fermentou durante mais tempo, registou maior perda de massa (cerca de 70 g/l) e contabilizou o segundo mais alto UFC, sendo identificada no fim da fermentação maioritariamente a estirpe B. As restantes fermentações de início lento, registaram resultados similares, relativamente às perdas de massa de aproximadamente 62 g/l, 10^5 UFC e estirpe dominante (B), contudo, foram identificadas estirpes diferentes em cada amostra.

As fermentações de início rápido mostram resultados mais heterogéneos, reportando fermentações que se estendem durante 6, 7, 8 e 9 dias, perdas de massa entre 32 e 62 g/l (aproximadamente), UFC numa ordem de grandeza entre 10^2 e 10^9 coincidindo, apenas na estirpe dominante (B).

Uma vez que os mostos foram fermentados em condições análogas, infere-se que, os diferentes perfis fermentativos podem dever-se à composição do mosto e/ou à consociação de estirpes durante a fermentação.

4.2 Isolamento

Observa-se que as características macroscópicas e morfológicas das colónias obtidas, correspondem com as características da *S. cerevisiae* [37].

Nesta primeira abordagem, infere-se que as UFC presentes na fase final de fermentação, variam consoante a localização geográfica, uma vez que entre o V1 e V2 existe uma diferença de cerca de 10^3 UFC. Existem diferentes fatores agroedafoclimáticos que provavelmente podem estar diretamente relacionados com esta diferença de UFC. Por outro lado, é fundamental quantificar as UFC da espécie *S. cerevisiae* na fase inicial da fermentação, no entanto, segundo alguns autores [49] a concentração inicial da espécie *S. cerevisiae* no mosto encontra-se entre 10^4 e 10^6 UFC.

Pode existir a possibilidade de uma condução da fermentação por uma estirpe dominante residente na adega ou nas caixas de vindima, no entanto, visto que a concentração de células viáveis/ml de mosto varia em todas as variedades estudadas, pode a fermentação estar afetada não só pelo substrato, neste caso na variedade de uva, mas também pela flora endémica na superfície da uva, na simbiose, variedade/ecossistema.

4.3 Identificação molecular

A identificação de *S. cerevisiae* ao nível do género e espécie foi até final da década dos 90 conseguida com base em aproximadamente 100 testes macromorfológicos, fisiológicos e bioquímicos [53]. A partir do desenvolvimento nas áreas da genética e biologia molecular, aunado à sequenciação do genoma da *S. cerevisiae* [24], em especial o estudo do rDNA [70] permitiram o desenvolvimento de técnicas de identificação [53,60].

4.3.1 Extração de DNA

O método enzimático de extração de DNA, é o procedimento mais habitualmente utilizado na identificação de *S. cerevisiae* (género/espécie/estirpe). Enquanto que o LiOAc é eficientemente utilizado em biotecnologia na transformação genética de *S. cerevisiae*.

Em transformação genética, o mecanismo no qual ocorre a penetração do DNA exógeno no interior da célula não está totalmente elucidado, contudo, mudanças na superfície da célula são observadas após o tratamento com Li^+ . Imagens obtidas a partir do microscópio de força atómica (AFM), revelaram rugosidades na superfície das células incubadas em solução de Li^+ . Baseado neste resultado, e uma vez que a superfície da parede celular é maioritariamente constituída por manoproteínas, extensivamente glicosiladas (*N*- e *O*-), contendo resíduos de manosilfosfato que conferem carga negativa [77]. Zimkus *et al.* [78] inferem, que o Li^+ torna a parede celular da *S. cerevisiae* mais porosa, facilitando a entrada de DNA exógeno, sugerindo estudos adicionais que permitam entender todo o processo [45].

Para a extração de DNA, foi utilizada uma concentração superior de Li^+ comparativamente à concentração utilizada em transformação. Inferindo-se que, o aumento desta concentração poderá ter propiciado o aumento da porosidade da parede celular, aunado à ação detergente do SDS, permitindo a libertação do DNA total ao meio.

Por outro lado, estudos *in silico* mostram que, o Li^+ pode ligar-se ao oxigénio do grupo fosfato do DNA, podendo afetar a sua estrutura, uma vez que possui carga negativa [78].

Na identificação do género/espécie, a extração com Li mostrou ser eficiente, rápida, reprodutível, económica e segura para o operador, no entanto, na identificação da estirpe, inicialmente não foram conseguidas concentrações necessárias de DNA, obtendo géis de baixa resolução (dados não apresentados). Posteriormente, foi otimizado o método a fim de conseguir a concentração necessária de DNA, neste caso, após digestão, obtiveram-se géis de baixa resolução e digestões parciais (dados não apresentados). Por tanto, visto as evidências, infere-se que a estrutura do DNA poderia ter sido alterada pelo excesso de iões de Li^+ em solução, consequentemente, comprometendo a atividade catalítica da enzima de restrição *HinfI* utilizada na identificação da estirpe, pelo que foi necessário recorrer a outro método de lise da parede celular para este objetivo.

Na identificação de estirpes de *S. cerevisiae*, a extração do DNA é amplamente conseguida através da extração desenvolvida por Querol *et al.* [74] com recurso à enzima zimoliase [59,67,79–83].

A enzima liticase e zimoliase são extraídas a partir de *Arthrobacter luteus*. A liticase possui uma forte atividade enzimática na parede celular da levedura, principalmente atividade β -1,3-glucanase [22], a qual hidrolisa as ligações β -1,3-glicosídicas do polímero β -1,6-glucano, cuja função principal é ligar os diferentes constituintes da parede celular (secção 1.6.3.1) [22], libertando laminaripentaose como principal produto, permitindo a formação de esferoblastos.

Na identificação de estirpes, a literatura consultada fornece poucas alternativas à enzima zimoliase, verificou-se um único estudo o qual emprega com sucesso a enzima β -glucuronidase [84].

A enzima liticase degrada a parede celular enquanto que o SDS combinado à temperatura elevada (65 °C) provoca a lise celular e a libertação em solução dos compostos celulares. Foi utilizada com sucesso a enzima liticase na identificação de estirpes de *S. cerevisiae*. Obtendo concentrações e graus de pureza suficientes à caracterização.

4.3.2 Identificação do gênero e espécie

A identificação do gênero foi realizada com recurso à amplificação da região 5.8S-ITS do rDNA e posterior identificação da espécie com recurso à digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP de 5.8S-ITS).

A unidade de transcrição 5.8S, 18S e 26S, de expressão constitutiva, tem representado uma valiosa ferramenta na identificação de espécies de leveduras, sobretudo, através do estudo da região ITS1-5.8S-ITS2 [53,58,83,85–87], cujas sequências não codificantes (ITSs), com elevada taxa de variabilidade interespecífica, encontram-se inseridas entre regiões altamente conservadas, concretamente entre os genes 18S e 26S [13].

Sob este fundamento, para estudos de filogenia em fungos, White *et al.* [70] desenvolveram *primers* universais, complementares com as sequências (conservadas) na extremidade interior dos genes 18S e 26S, permitindo a amplificação via PCR das regiões polimórficas (ITSs) e do gene 5.8S, que possibilita identificar *Saccharomyces* de indivíduos de outras espécies, no entanto, o fragmento obtido através desta técnica é característico para o grupo *Saccharomyces sensu strictum*, sendo necessária a análise dos fragmentos de restrição PCR-RFLP da região ITS1-5.8S-ITS2, cujo padrão de bandas é característico para cada espécie [13,25].

A literatura consultada reporta um tamanho do amplicon que varia entre 840 [83], 850 [58,86] e 880 pb [53,85]. Quatro bandas quando digerido com a endonuclease *Hae*III de tamanhos aproximados de 320, 230, 180, 150 pb [53,58,83,85,86]. Relativamente à digestão com a enzima *Hinf*I, são reportados 2 e 3 bandas: aproximadamente 365 e 155 pb [53,83,85] e aproximadamente 360, 350 e 120 pb [58,86].

No presente estudo, foi obtido um fragmento de entre 850-880 pb (Figura 14) em todos os isolados analisados, correspondendo ao fragmento característico de *Saccharomyces sensu stricto* que engloba as espécies *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus* [1,2]. Seguidamente, quatro bandas após digestão com a endonuclease *Hae*III correspondendo às espécies *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* [53,58,86]. Finalmente, dois fragmentos após digestão com endonuclease *Hinf*I correspondendo com a espécie *S. cerevisiae* [53]. Excepcionalmente, foram observadas duas bandas entre os fragmentos 365 e 155 pb, de muito baixa resolução. Adicionalmente, a sequenciação

aleatória mostrou 99.9% de homologia com as sequências de *S. cerevisiae* disponíveis na base de dados [87]

Infere-se que o isolamento de apenas *S. cerevisiae* tenha sido influenciado em grande medida por: o isolamento no fim de fermentação e a seleção para caracterização molecular dos isolados (colônias) cumprindo com as características macroscópicas típicas da espécie.

4.3.3 Identificação da estirpe

Em *S. cerevisiae*, o mtDNA possui um elevado número de cópias, de aproximadamente 85 kb, caracterizado uma baixa densidade gênica e um grau elevado de polimorfismo intraespécie [40,46]. No entanto, 160 estirpes mostram tamanhos de mtDNA entre aproximadamente 73- 95 kb, e apenas duas estirpes com tamanhos de 22 e 45 kb respectivamente. Cerca de 50 % das sequências registadas apresentam um tamanho entre 84,5 e 85,5 kb. Relativamente à percentagem em G+C, varia entre aproximadamente 14 e 43 % [88], com numerosas regiões polimórficas [40].

Os genes, são constituídos em cerca de 70 % por A+T, e os espaços intergênicos são quase exclusivamente constituídos por longas sequências de várias centenas de A+T, intercaladas por pequenas sequências de G+C de entre 10 e 80 pb [89]. Com base nesta informação, a identificação da estirpe foi realizada com recurso à técnica RFLP-mtDNA. A enzima de restrição *HinfI* cuja sequência alvo 5'G[^]ANTC-3' reconhece um elevado número de sequências no gDNA, ricas em G+C, contrariamente no mtDNA possui um baixo número estes de locais de reconhecimento [59]. Por tanto, o DNA total, quando submetidos a sobredigestão com a enzima *HinfI*, gera um conjunto de fragmentos extremamente curtos de gDNA, os quais não são detetados em gel de agarose, mas sim são observados os fragmentos de maior comprimento que provêm do mtDNA [59,74].

No presente estudo verificou-se que concentrações elevadas de DNA (> 90 µg/µl) geravam géis com excessivo arrastamento, proveniente provavelmente da hiperfragmentação do DNA nuclear, produto da digestão enzimática com *HinfI*, enquanto que concentrações moderadas para a técnica utilizada (65-85 µg/µl) verificou-se um arrastamento mais intenso no espaço correspondente às bandas 3000 e 250 bp do leader, no qual só foi possível detetar as bandas de pesos moleculares mais elevados, já para

concentrações muito baixas de entre 25 e 35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ não foram observadas bandas, ou bandas de muito de baixa resolução.

Após otimização, verificou-se que aproximadamente 55 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ é a concentração necessária com a qual obteve-se um padrão de bandas de boa resolução, porém, foram considerados para a análise os padrões de restrição cujos fragmentos encontram-se entre 1,5 e 10 kb uma vez que o arrastamento no gel não permite a identificação de bandas abaixo das 1,5 kb; ainda, estudos documentados mostram que as análises dos resultados foram realizadas a partir das bandas com pesos moleculares entre 1 e 2 kb [67,81].

RFLP-mtDNA é uma técnica amplamente utilizada na identificação de estirpes de *S. cerevisiae* com interesses enológico, tanto estirpes comerciais como endógenas de diferentes Regiões Demarcadas [67,74,79,80,87,90], devido ao seu eficiente poder discriminatório.

Schuller *et al.* [81] analisaram 23 estirpes comerciais de *S. cerevisiae* de interesse enológico, isoladas em 6 países diferentes, amplamente identificadas e diferenciadas através de técnicas mais complexas e robustas, comparou 4 técnicas de identificação de estirpes suscetíveis de serem utilizadas a escala industrial. Padrões de restrição RFLP-mtDNA permitiu a identificação de 21 estirpes. No mesmo estudo, o método que detetou maior variabilidade genética intraespecífica (22 estirpes) foi o cariotipagem, o qual separa os cromossomas utilizando um sistema de eletroforeses de campo pulsado.

A técnica RFLP-mtDNA oferece um elevado poder de discriminação ao nível da estirpe (> 90 %), sendo recomendada, sobretudo na identificação de estirpes provenientes do mesmo ecossistemas, uma vez que outras técnicas possuem um baixo poder discriminatório nestas condições, devido à proximidade genética [81]. Também, mostrou robustez e reprodutibilidade uma vez apurada e validada a metodologia.

Os padrões de restrição RFLP-mtDNA obtidos no presente trabalho, não coincidem com os padrões RFLP-mtDNA da bibliografia consultada, uma vez que, até a data da entrega do presente trabalho. Ainda, verificou-se a inexistência de bases de dados a este respeito.

4.3.4 Variabilidade intraespecífica

O presente estudo, realizado na campanha de 2015, a partir de 10 microfermentações foram obtidos e analisados 100 isolados (10 isolados por microfermentação), foi obtido um sucesso de microfermentações espontâneas de 100 % e uma taxa de variabilidade intraespecífica de 8 %.

Um estudo realizado na Região Demarcada dos Vinhos Verdes por Schuller *et al.* [67], durante as campanha de 2001- 2003, no qual, o mosto era obtido no laboratório, a partir de uvas colhidas segundo um plano de amostragem. Realizaram 90 microfermentações obtendo 54 microfermentações espontâneas, isto é, apenas, um sucesso de 60 %. Posteriormente, analisaram 1620 isolados, em média 30 isolados por microfermentação, e identificaram 297 estirpes representando uma variabilidade intraespecífica de aproximadamente 18,3 %.

Já Cappello *et al.* [83] num estudo realizado na região vitícola de Apulia (Italia) seguindo a mesma metodologia [67], obteve um sucesso de microfermentação espontânea de 100% e uma variabilidade intraespecífica de 2,2%.

Estudos da diversidade genética de estirpes de *S. cerevisiae* na região vitivinícola do Ribeiro na Galiza [79], a partir de fermentações espontâneas em cubas de 200 lts, obtiveram 446 isolados, cultivados em meio suplementado com clorafenicol e identificadas 19 estirpes, representando uma taxa de variabilidade de 4,3%, possivelmente, devido intolerância de certas estirpes a antibióticos.

No presente estudo, os isolados foram obtidos na fase final de fermentação com o intuito de isolar apenas *S. cerevisiae*, uma vez que é a espécie dominante, contudo, possivelmente esta prática influenciou a variabilidade intraespecífica obtida, não traduzindo a real. Querol *et al.* [91] mostrou que, na ecologia da fermentação podem coexistir algumas estirpes de *S. cerevisiae*, verificando a substituição sequencial em diferentes fases do processo fermentativo, consoante o teor de açúcar. Existe a possibilidade de que, algumas das estirpes isoladas sejam: a estirpe dominante ou a estirpe em fase final do processo fermentativo.

Por outro lado, as adegas maioritariamente contam com uma microbiota própria, é possível que alguma das estirpes isoladas provenham da microbiota da adega, devido ao

contacto com equipamentos e vasilhames, mesmo que os mostos tenham sido colhidos à chama, imediatamente após a prensagem.

Após a revisão da literatura, verifica-se que embora a variabilidade intraespecífica de leveduras *S. cerevisiae* endêmicas em ambiente de adega seja menor, o sucesso fermentativo é na maioria dos casos estudados de um 100%. Observou-se esta tendência no presente estudo, sugerindo que, possivelmente, algumas estirpes endêmicas sejam suscetíveis ou pouco tolerantes à sulfitação, fazendo uma primeira seleção num parâmetro tecnológico importante.

4.4 Screening do perfil volátil

O perfil volátil dos vinhos é muito complexo, sendo constituído por mais de 800 compostos, contudo, só alguns contribuem para o aroma [49], fazendo parte fundamental da qualidade e tipicidade dos vinhos. Dadas as diferenças na composição química de vinhos fermentados por diferentes estirpes de leveduras [36], tem surgido desde há pelo menos uma década, o interesse em caracterizar os VOCs biossintetizados por estirpes de *S. cerevisiae* isoladas a partir de ambientes vitivinícolas, com o intuito de analisar esta heterogeneidade em favor das Regiões Demarcadas [49,92,93]. No presente estudo, em ensaios de microfermentações inoculadas com estirpes puras de *S. cerevisiae* isoladas na RDM, realizadas em condições análogas, foram obtidos perfis voláteis diferentes em cada estirpe estudada, confirmando esta hipótese.

No total, foram identificados 46 VOCs biossintetizados pelas leveduras, maioritariamente álcoois superiores e ésteres, e em menor proporção ácidos gordos, miscelâneos e alguns compostos carbonilados. Adicionalmente, 8 ésteres presentes no mosto em baixa percentagem, foram obtidos nos vinhos em percentagem maiores, pelo que se infere que o excedente foi produto da biossíntese por parte da respetiva levedura. Ainda, 3 VOCs utilizados possivelmente como precursores em diferentes vias metabólicas, uma vez que se encontravam em elevada percentagem no mosto, diminuindo drasticamente após fermentação como é o caso da 3-octanona. No caso particular dos terpenos, infere-se que possivelmente foram objeto de modificações, provavelmente metabólicas, uma vez que se encontram presentes no mosto e ausentes no vinho.

4.4.1 Álcoois superiores

Após fermentação, a fração volátil correspondente aos álcoois superiores é predominantemente a mais representativa [49,94]. Este resultado coincide com os obtidos no presente estudo (Tabela 7). Os álcoois superiores são biossintetizados pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, através de duas vias, nomeadamente pela via do catabolismo dos aminoácidos ou mecanismo de Ehrlich [22,36,48], e através da via anabólica a partir dos α -cetoácidos [22,36].

Neste sentido, existem discrepâncias relativamente à influência do teor de azoto assimilável no mosto e a sua relação com a quantidade de álcoois superiores formados durante a fermentação alcoólica. Pretorius *et al.* [36] afirma que tanto a estirpe de levedura, como o teor de azoto assimilável pelas leveduras, presente no mosto na forma de aminoácidos, influenciam a formação de álcoois superiores no vinho; sem embargo, Gayon *et al.* [22] afirma que a composição do mosto não é tão relevante mais sim a estirpe de levedura que conduz o processo fermentativo.

No presente estudo, verificou-se que a produção de álcoois superiores tanto em termos quantitativos como em diversidade de VOCs, está fortemente condicionada pela estirpe de *S. cerevisiae* que realizou o processo fermentativo, uma vez que, em substratos idênticos e condições de fermentação análogas, obtiveram-se perfis diferentes, tanto na contribuição dos álcoois para a fração volátil total (cerca de 52 e 57 % em EB e EC, e cerca de 62 % em EA), como no número de álcoois superiores biossintetizados por cada estirpe (9, 11 e 10 em EA, EB e EC respetivamente), e ainda na proporção individual de cada álcool dentro da própria família química, e no perfil volátil total (Tabela 7).

Geralmente, o 3-metil-1-butanol, o principal álcool alifático, representa entre 40-72 % da fração volátil álcoois superiores. No presente estudo representou entre 65- 71 % desta fração, verificando-se que os resultados obtidos coincidem com o intervalo percentual descrito na literatura [36,94]. O 3-metil-1-butanol mimetiza o cheiro a amargo, balsâmico e adstringente. Forma-se a partir do catabolismo da leucina [95].

VM em processo de fabrico (mais jovens não comercializáveis), foi igualmente encontrado como VOC maioritário, extraído e identificado a partir da mesma técnica utilizada no presente estudo [9].

O segundo VOC em maior percentagem é o feniletanol, este álcool fenólico é biossintetizado a partir da fenilalanina (Tabela 2), de grande interesse enológico visto que está associado a descritores aromáticos que mimetizam o cheiro a rosas [9,36], evoluindo a mel contribuindo para o *bouquet* de alguns vinhos envelhecidos [36].

Relativamente ao *screening* do perfil volátil proveniente de VM da casta Malvasia [11] verificou-se através do respetivo cromatograma, que o pico referente ao 3-metil-1-butanol + 2-Metil-1-butanol é o sétimo pico mais intenso em vinhos envelhecidos durante 20 anos (1988), e o quinto pico mais intenso em vinhos envelhecidos durante 2 anos (2006). Adicionalmente, é ainda o segundo pico mais intenso pertencente à família química dos álcoois superiores. No mesmo estudo, o feniletanol é o terceiro pico mais intenso em vinhos envelhecidos durante 20 anos, e o pico mais intenso em vinhos envelhecidos durante 2 anos, sendo o mais representativo dos álcoois superiores. Neste sentido, inferiu-se que a sua biossíntese possivelmente ocorre desde a fase inicial da fermentação alcoólica, uma vez que, o VM Malvasia pertence ao tipo de vinho doce [11]. Também a literatura reporta que o processo de estufagem característicos em VM não modifica substancialmente a percentagem desta família química [10].

Os álcoois superiores, são também importantes nas reações de esterificação com ácidos carboxílicos, precursores responsáveis pela formação de ésteres odorantes, com impacto positivo no aroma do vinho [36,48], sobretudo no *bouquet*.

Assim, nesta primeira abordagem, constata-se a persistência dos VOCs maioritários (extraídos e identificados através de HS-SPME/GC-MS), que provêm da fermentação alcoólica, em VM envelhecidos, e uma vez que a espécie dominante durante o processo fermentativo nos mostos de diferentes castas foi a *S. cerevisiae*, verifica-se a importância da identificação e seleção da estirpe visto o seu relevante impacto durante a fermentação alcoólica e nos processos de vinificação seguintes. Também, as condições de fermentação influenciam o teor/percentagem de álcoois superiores, nomeadamente as, elevadas temperaturas, pH e ambiente oxidativo, que contribuem para o aumento da cinética da sua biossínteses [22].

4.4.2 Ésteres

São uma família química com descritores aromáticos positivos, que mimetizam odores a frutas e flores, por vezes encontram-se em pequenas percentagens na uva. A sua abundância no vinho resulta maioritariamente do metabolismo secundário da *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica [36].

No presente estudo, os ésteres etílicos de ácidos gordos são os VOCs em maior número. O octanoato de etilo, que confere odor frutado e a anis [95], é o éster maioritário nas 3 estirpes analisadas, representando aproximadamente 10 % da fração volátil total nos vinhos produzidos pelas estirpes EB e EC, no entanto, no vinho produzido com EA representa pouco mais de 5 %, confirmando-se a influência da estirpe na biossíntese deste VOC de interesse enológico. O decanoato de etilo foi o segundo éster em maior percentagem em EB e EC (cerca de 3,2 %), contudo, EA representou < 1 %. Já o hexanoato de etilo representou cerca de 2,3 % em EA e EC, diminuindo a sua síntese no EB.

O acetato de etilo, acetato de isoamilo e acetato de 2-feniletilo foram os únicos VOCs identificados, pertencentes ao grupo dos acetatos de álcoois superiores, apresentando EC as maiores percentagens destes VOCs (5,1 %). Resulta da reação de esterificação enzimática entre o ácido acético e o álcool superior correspondente.

O papel fisiológico dos ésteres de ácidos gordos em *S. cerevisiae* não está totalmente elucidado, possivelmente resulte de uma via de remoção de ácidos gordos C₈-C₁₄ do interior da célula, devido às propriedades antimicrobianas que estes possuem [36], sendo o ácido octanóico o mais bioativo, utilizado na terapêutica de doenças dermatológicas. Já a biossíntese de acetatos de álcoois provavelmente têm a função de regenerar coenzima A. Verifica-se também a influência da estirpe na biossíntese destes compostos [49].

4.4.3 Ácidos gordos

Os ácidos gordos apresentam uma função biológica conhecida e definida, são constituintes da membrana celular da *S. cerevisiae*, assistem o transporte transmembranaral e confere tolerância em meio etanólico. Na sua biossíntese, são inicialmente produzidos os ácidos gordos de cadeia curta [36]. Em geral, a estirpe EA apresenta a percentagem

mais baixa de ácidos gordos e a estirpe EB mostra a maior percentagem e maior número destes VOCs (Tabela 7).

O ácido acético é o maior ácido gordo volátil nos vinhos, representando cerca de 90 % desta família química [36]. Contudo, no presente estudo apenas cerca de 54% da fração de ácidos gordos foi identificada nas estirpes EB e EC. O mesmo foi verificado por Jiang *et al.* [94] que obteve entre 45 e 60 % deste composto, diferindo ligeiramente com os resultados obtidos em EA (63 %). Mauriello *et al.* [49], analisaram 36 estirpes de *S. cerevisiae*, no qual o ácido acético representou entre 10 e 100 % da família química dos ácidos gordos, e noutros casos não foi identificado, existindo uma relação entre a zona geográfica a partir da qual foram isoladas e a produção de ácido acético. A contribuição do ácido acético para o perfil volátil total é de aproximadamente 5,8 % em EA e EC; e no EB regista uma percentagem de cerca de 8 %.

Em ambientes de adega, as condições que providenciam a maior biossíntese deste composto é reportada em vinhos cujos mostos foram clarificados e fermentados em condições de anaerobiose [36]. Segundo Gayon *et al.* [22] e Garden-Cedal *et al.* [92], a *S. cerevisiae* biossintetiza baixas percentagens de ácido acético em mostos produzidos a partir de uvas em boas condições fitossanitárias e teores moderados de açúcar inicial (< 13 % v/v de álcool provável), dependendo sempre da estirpe. Mostos com teores elevados de açúcares induzem na *S. cerevisiae* uma maior biossíntese de ácido acético como mecanismo de adaptação ao meio.

O ácido acético é um produto intermédio na biossíntese de ácidos gordos saturados de cadeias médias e longas, formado pela hidrólise de acetil-CoA ou pela oxidação de acetaldeído. O teor em ácido acético é considerado um dos parâmetros analíticos que define a qualidade do vinho (acidez volátil) [96] cujos teores elevados está mais associado à deterioração bacteriana [22], contudo, teores moderados conferem sensação de frescura nos vinhos.

O ácido octanóico é o segundo ácido gordo em termos percentuais, registado nas três estirpes estudadas, enquanto que, o ácido decanóico foi biossintetizado em maior percentagem nas estirpes EB e EC. Relativamente ao ácido hexanóico, este foi biossintetizado em maior percentagem pela EB. Estes ácidos gordos saturados têm um efeito tóxico para a *S. cerevisiae* inibindo o seu crescimento. A sua presença no vinho

deve-se à biossíntese pelas leveduras através da via do acetil-CoA, ou pelo catabolismo dos ácidos gordos de cadeia longa [22], os descritores aromáticos associados a este grupo de compostos mimetizam aromas negativos como ranço, acre e gordura, no entanto, a sua concentração nos vinhos encontra-se abaixo do LPO.

4.4.4 Compostos carbonilados

Constituídos maioritariamente por aldeídos e cetonas, a 3-octanona é o VOC maioritário no MC e o VOC mais representativo desta família química identificado nos vinhos em estudo. A 3-octanona mimetiza o aroma a cogumelos e aromas herbáceos [97], apenas reportada em castas neutras (nas películas) com baixas percentagens de terpenos e avançado estado de maturação [98].

No presente estudo, a 3-octanona não foi detetada no MNC. Através da análise do cromatograma, verificou-se que, a elevada concentração de γ -terpineno e a similaridade nos tempos de retenção, mascarou o pico da 3-octanona, o qual, com a redução da fração volátil total em aproximadamente 98 % após o tratamento de clarificação, resultou num pico mais intenso.

Assim, a 3-octanona presente nos vinhos provavelmente resulte do substrato e não de reações bioquímicas ou químicas.

Considerando os compostos carbonilados produto do metabolismo da *S. cerevisiae*, encontram-se em baixa percentagem, representando cerca de 4,2, 3,4 e 2,1 % da fração volátil total de EA, EB e EC (respetivamente), sendo o acetaldeído o VOC maioritário, seguido do benzaldeído. O acetaldeído é formado a partir do piruvato e é um produto intermediário na biossíntese do etanol (Figura 4), em ambiente redutores, como no caso do presente estudo [36]. No geral, os compostos carbonilados mimetizam descritores aromáticos positivos tais como fruta e frescura [99].

4.4.5 Terpenos

Os terpenos com poder odorante presentes no mosto provêm da uva, constituindo o aroma varietal ou primário, associados a descritores aromáticos positivos, na maioria aromas florais [27].

No presente estudo, o MNC apresentou elevadas percentagens de terpenos (> 98 %), maioritariamente os monoterpenos limoneno e γ -terpineno. No geral estes compostos bioativos, possuem uma função ecológica em plantas (maioritariamente), utilizados pelo homem devido às propriedades antimicrobianas (entre outras), inferindo-se que a dificuldade no arranque e no vigor fermentativo neste substrato possivelmente esteja relacionada com esta bioatividade.

Após clarificação do mosto concentrado, verificou-se uma diminuição significativa de terpenos, inferindo-se que a diminuição prolongada da temperatura (10 dias) poderia ter influenciado a formação ou ativação de moléculas ou agentes sequestrantes ou quelantes favorecendo a precipitação.

A exceção do linalol identificado unicamente em EC, observa-se que os terpenos identificados no MC não foram encontrados nos vinhos. Neste sentido infere-se em primeiro lugar que estes VOCs tenham sofrido rearranjos, produto de reações químicas devido às condições de fermentação (pH, teor de etanol, etc.) [27]; por outro lado evidências mostram a biotransformação e biossínteses de terpenos específicos por *S. cerevisiae* em condições de vinificação[100–102].

No presente estudo, o aumento do linalol e a deteção dos isómeros citronelol, geraniol, nerolidol e farnesol (Tabela 7) após fermentação pode dever-se: à hidrólise enzimática de terpenos glicosilados [101], à biotransformação de terpenos precursores [100], ou podem ser produto da biossíntese, em todas as hipóteses por parte das estirpes de *S. cerevisiae* estudadas [100,102].

Assim, a capacidade de biossínteses de terpenos está, no só associada à estirpe de *S. cerevisiae*, mas também influenciada pelo teor de azoto assimilável no mosto e pelas condições redox em que é conduzida a fermentação [101].

5 CONCLUSÕES

Estirpes de *S. cerevisiae* têm um papel fundamental na qualidade e tipicidade dos vinhos produzidos em Regiões Demarcadas, sobretudo, na produção de VOCs com impacto no aroma, biossintetizados durante a fermentação alcoólica, cuja diversidade e proporção está estreitamente dependente da estirpe que conduz o processo fermentativo.

Estirpes residentes em ambientes vitivinícolas (uvas e adegas) possuem uma variabilidade genética adaptada às especificidades do ecossistema, que se refletem no produto final. Assim, com o intuito de produzir vinhos de elevada qualidade, enaltecendo as características típicas, têm surgido trabalhos de caracterização molecular e tecnológica, de estirpes autóctones de *S. cerevisiae* provenientes de Regiões Demarcadas, contudo, até à data, não existem estudos científicos publicados a este respeito, relativamente à RDM.

Neste sentido, no presente trabalho de dissertação de Mestrado, foram identificadas e caracterizadas estirpes de *S. cerevisiae*, isoladas durante a campanha vitivinícola de 2015, a partir de mostos de castas nobres, provenientes de diferentes vinhedos acolhidos à RDM.

A microbiota endémica da RDM possui elevado poder fermentativo, uma vez que a taxa de sucesso de microfermentação a escala laboratorial foi de 100 %. Foi apenas identificada a espécie *S. cerevisiae* na fase final de fermentação, através da análise de PCR-RFLP da região ITS1-5.8S-ITS2 e posterior sequenciação de alguns isolados. Nesta fase, foi utilizado com sucesso o método de extração químico LiOAc-SDS de DNA.

Foram identificadas 8 estirpes de *S. cerevisiae* através da análise de 100 padrões de restrição RFLP-mtDNA. Por comparação dos obtidos com os publicados em trabalhos científicos, é possível inferir que as estirpes identificadas no presente trabalho são autóctones da RDM.

Foi verificada a predominância da estirpe EB, seguida da estirpe EA, selecionadas para caracterização do perfil volátil. Foi possível constatar, em ensaios de microfermentação inoculadas com estirpe pura, que os VOCs que compõem o perfil volátil com possível incidência no aroma do vinho, são maioritariamente biossintetizados pela *S. cerevisiae* cujo perfil é diferenciado para cada estirpe. Os álcoois superiores, ésteres e ácidos gordos, são as famílias químicas maioritárias, podendo ser utilizadas como parâmetro

diferenciador da estirpe, assim, os VOCs biossintetizados durante a fermentação são “a matéria prima do *bouquet*” e “o *fingerprint* do vinho”.

6 PERSPETIVAS FUTURAS

O estudo de estirpes autóctones de *S. cerevisiae* é uma tarefa certamente árdua e permanente. Paralelamente ao presente estudo, foram obtidos isolados a partir de mostos cedidos pela Empresa Vinhos Barbeito (Madeira) Lda., uvas *in natura* proveniente dos campos experimentais do IVBAM e uvas *in natura* provenientes de produtores independentes, ditos isolados, atualmente se encontram armazenados e fazem parte de uma pequena coleção informal.

Com vista a garantir a conservação de uma parte importante do património vitivinícola da RDM, uma proposta será criar uma coleção oficial de microrganismos, caracterizar molecular e analiticamente, através da implementação da metodologia desenvolvida no presente trabalho, podendo ser alargada à caracterização das propriedades tecnológicas.

Adicionalmente, considerando os métodos de vinificação do VM, especificamente para os tipos doce e meio doce, ampliar a coleção aos géneros não-*Saccharomyces*, cujos VOCs são biossintetizados em fase inicial de fermentação.

Finalmente, a biossíntese de VOCs é multifatorial, depende da sinergia entre a estirpe, mosto, e condições de fermentação, assim, caracterizar fermentações inoculadas com estirpe pura, considerando estas variáveis.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Secretaria Regional do Ambiente e Recursos Naturais. Jornal Oficial. Portaria n.º 39/2015 Região Autónoma da Madeira.; p. I Série, Número 28.
2. Brazão J. A Vitivinicultura na Região Autónoma da Madeira . Sua evolução e situação actual. Em: Jornadas Técnicas Vitivinícolas das Canárias. Canarias; 1998. p. 152–168.
3. Instituto da Vinha e do Vinho. IVV // Madeira [Internet]. [citado 8 de Outubro de 2017]. Disponível em: <http://www.ivv.gov.pt/np4/279/>.
4. Secretaria Regional do Ambiente e Recursos Naturais. Jornal Oficial. Portaria n.º 38/2015 Região Autónoma da Madeira; p. I Série, Número 28.
5. Secretaria Regional do Ambiente e Recursos Naturais. Jornal Oficial. Portaria n.º 40/2015 Região Autónoma da Madeira; p. I Série, Número 28.
6. Conselho da União Europeia. Jornal Oficial da União Europeia. Regulamento (CE) n.º 491/2009 Portugal; p. L 154.
7. Magalhães N. Tratado de Viticultura, A Videira- A Vinha e O «Terroir». 1.^a ed. Chaves Ferreira Publicações, editor. Lisboa; 2008. 605 p.
8. Câmara JS. Caracterização Aromática de Castas Produtoras de Vinho Madeira. Dissertação apresentada na Universidade da Madeira para obtenção do grau de Doutor; 2004.
9. Perestrelo R, Fernandes A, Albuquerque FF, Marques JC, Câmara JS. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Anal Chim Acta*. 2006;563(1–2 SPEC. ISS.):154–164.
10. Pereira V, Cacho J, Marques JC. Volatile profile of Madeira wines submitted to traditional accelerated ageing. *Food Chem*. 2014;162:122–134.
11. Pereira AC, Reis MS, Saraiva PM, Marques JC. *Analytica Chimica Acta* Analysis and assessment of Madeira wine ageing over an extended time period through GC

- MS and chemometric analysis. 2010;660:8–21.
12. Carrascosa V, Alfonso, Muñoz Rosario GR. *Molecular Wine Microbiology*. 1.^a ed. Elsevier, editor. United States of America; 2011. 362 p.
 13. Santiago AC, Munoz R, Garcia RG. *Molecular Wine Microbiology*. *Molecular Wine Microbiology*. 2011.
 14. Tristezza M, Fantastico L, Vetrano C, Bleve G, Corallo D, Mita G, et al. Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy. *Int J Microbiol*. 2014;2014.
 15. Fernández González M. Caraterización genética y estudios de actividades enzimáticas de levaduras vnicas, mejora de una cepa de *S. cerevisiae* con el gen PGU1. Dissertação apresentada na Universidade de Castilla-La Mancha para obtenção do grau de Doutor; 2003.
 16. Tofalo R, Perpetuini G, Schirone M, Fasoli G, Aguzzi I, Corsetti A, et al. Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *Front Microbiol*. 2013;4(6):1–13.
 17. Schuller D. Genetic diversity and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from winemaking environments [Internet]. Dissertação apresentada na Universidade do Minho para obtenção do grau de Doutor; 2004. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/2581>.
 18. Bauer EF, Pretorius LS. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency : How to Survive the Making of Wine - A Review. *S Afr J Enol Vitic*. 2000;21(Special Issue):27–51.
 19. Suh SO, Blackwell M, Kurtzman CP, Lachance M-A. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*. 2006;98(6):1006–1017.
 20. Querol A, Fleet HG. *Yeast in Food and Beverages*. 1.^a ed. Berlin: Springer; 2006. 453 p.
 21. Cavalieri D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R, Polsinelli M. Evidence for *S.*

- cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. *J Mol Evol.* 2003;57(1):226–232.
22. Don B. Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications. 2. ^a ed. Vol. 1. West Sussex: John Wiley & Sons; 2006. 470 p.
 23. Kurtzman CP. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhynchus*. *FEMS Yeast Res.* 2003;4(3):233–245.
 24. Engel SR, Dietrich FS, Fisk DG, Binkley G, Balakrishnan R, Costanzo MC, *et al.* The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae* : Then and Now. *G3.* 2014;4(3):389–398.
 25. Querol, Amparo GF. Yeast in food and beverages. 1. ^a ed. Berlin: Springer; 2006. 453 p.
 26. Basso L, Basso T and Rocha S. Ethanol Production in Brazil : The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. Em: *Biofuel Production - Recent Developments and Prospects* (5). Croatia: InTech; 2011. 85–100.
 27. Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Handbook of Enology. The Chemistry of Wine. 2. ^a ed. Vol. 2. West Sussex: John Wiley & Sons. 2006. 441 p.
 28. McGuire DR. Seleção e caracterização de leveduras «starter» a partir de populações autóctones de mosto [Internet]. Dissertação apresentada na Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Mestre; 2010. Disponível em: <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/2572>
 29. Querol A, Huerta T, Barrio E, Ramon D. Dry Yeast Strain For Use in Fermentation of Alicante Wines: Selection and DNA Patterns. *J Food Sci.* 1992;57(1):183–185.
 30. Instituto da Vinha e do Vinho. IVV // Home [Internet]. [citado 10 de Agosto de 2017]. Disponível em: <http://www.ivv.gov.pt/np4/home.html>
 31. Assembleia Legislativa da Madeira. Jornal Oficial. Decreto Legislativo Regional n.º 1-A/2015/M Região Autónoma da Madeira; 2015 p. I Série, Número 28.

32. Direcção Regional de Agricultura. Carta dos solos da Ilha da Madeira. Lisboa; 1992. 162 p.
33. Freitas BKO. A Região Demarcada da Madeira – Características e património vitícola [Internet]. [citado 14 de Novembro de 2017]. Disponível em: https://vitiviniculturaatlantica.picowines.net/comunicacoes/karina_freitas.pdf
34. Instituto do Vinho do Bordado e do Artesanato da Madeira. Processo de vinificação [Internet]. [citado 8 de Dezembro de 2017]. Disponível em: <http://www.vinhomadeira.pt/vinificação-22.aspx>
35. Fleet GH. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res. 2008;8(7):979–995.
36. Lambrechts MG, Pretorius IS. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. S Afr J Enol Vitic. 2000;21(Special Issue):97–129.
37. Fugelsang KC, Edwards CG. Wine microbiology: Practical applications and procedures. 2.^a ed. New York: Springer; 2007. 393 p.
38. Regodon JA. Obtención y Caracterización de Cepas Autóctonas de Levaduras. Dissertação apresentada na Universidad de Extremadura para obtenção do grau de Doutor; 2007.
39. Schuller D, Cardoso F, Sousa S, Gomes P, Gomes A *et al.* Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions. Plos One. 2012;7(2):1–13.
40. Wolters JF, Chiu K, Fiumera HL. Population structure of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Gen. 2015;16(1):451.
41. Lomba TM. Caracterização bioenergética de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação vinária. Dissertação apresentada na Universidade Técnica de Lisboa para obtenção do grau de Mestre; 2009.
42. Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Vol. 23, Yeast. 2006. p. 185–202.
43. Magnelli P, Cipollo JF, Abeijon C. A Refined Method for the Determination of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Composition and β -1,6-Glucan Fine

- Structure. *Anal Biochem.* 2002;301(1):136–150.
44. Fesel PH, Zuccaro A. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet Biol.* 2016;90:53–60.
 45. Hiroyuki M, Kazuya H, Aki S, Yuki T, Akihiko MU, Hiroshi TT and MA. Cell wall structure suitable for surface display of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Online Libr.* 2014;4(31):67–76.
 46. Langkjær RB, Casaregola S, Ussery DW, Gaillardin C, Piškur J. Sequence analysis of three mitochondrial DNA molecules reveals interesting differences among *Saccharomyces* yeasts. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(12):3081–3091.
 47. Rosa, Carlos A. GP. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeast.* Germany: Springer; 2005. 579 p.
 48. Hazelwood LA, Daran JM, Van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson JR. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(12):3920.
 49. Mauriello G, Capece A, D’Auria M, Garde-Cerdan T, Romano P. SPME-GC method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiol.* 2009;26(3):246–252.
 50. Alves RF, Nascimento AMD, Nogueira JMF. Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Anal Chim Acta.* 2005;546(1):11–21.
 51. Lugo M. Caracterización del perfil de aromas de vinos jóvenes y su relación con la calidad sensorial del producto. Dissertação apresentada na Universidad Simón Bolívar para obtenção do grau de Mestre; 2012.
 52. Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M, Capece A. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol.* 2003;86(1–2):169–180.
 53. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49(1):329–337.

54. Lima LM De. Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular 1. Embrapa. Campina Grande; 2008. 1-28 p.
55. National Center for Biotechnology Information. Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query [Internet]. [citado 13 de Outubro de 2017]. Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BLASTSearch&LINK_LOC=blasthome
56. Zanol GC, Baleiras-Couto MM, Duarte FL. Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. *Cienc e Tec Vitivinic.* 2010;25(2):75–85.
57. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1999;49(1):329–37. Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-49-1-329>
58. Fernández-Espinar MT, Esteve-Zarzoso B, Querol a, Barrio E. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Ant V Lew.* 2000;78(1):87–97.
59. Querol et al. Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Appl Envir Microbiol* [Internet]. 1992;58(9):2948–53. Disponível em: <http://aem.asm.org/cgi/content/long/58/9/2948>
60. Querol A, Barrio E, Ramón D. A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Syst Appl Microbiol.* 1992;15(3):439–446.
61. Castro R, Natera R, Benitez P, Barroso CG. Comparative analysis of volatile compounds of «fino» sherry wine by rotatory and continuous liquid-liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chi Acta.* 2004.
62. Perestrelo R, Caldeira M, Rodrigues F, Câmara JS. Volatile flavour constituent

- patterns of Terras Madeirenses red wines extracted by dynamic headspace solid-phase microextraction. *J Sep Sci*. 2008;31(10):1841–1850.
63. Mendes B, Gonçalves J, Câmara JS. Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent- and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines - A comparative study. *Talanta*. 2012;88:79–94.
 64. Pereira J, Silva CL, Perestrelo R, Gonçalves J, Alves V, Câmara JS. Re-exploring the high-throughput potential of microextraction techniques, SPME and MEPS, as powerful strategies for medical diagnostic purposes. Innovative approaches, recent applications and future trends Microextraction Techniques. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(8):2101–2122.
 65. De Fátima AM. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis Review. *J Chromatogr*. 2000;889:3–14.
 66. Blumberg LM. Theory of Gas Chromatography [Internet]. *Gas Chromatography*. Elsevier Inc.; 2012. 19-78 p. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00002-X>
 67. Schuller D, Alves H, Dequin S, Casal M. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005;51(2):167–177.
 68. Lööke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of Genomic Dna From Yeasts for Pcr- Based Applications. *Biotechniques*. 2011;50(5):325–328.
 69. Castillo M. M. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from winery environment in Madeira Island. 2015.
 70. White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 1990. p. 315–322.
 71. Pangloss Protocols [Internet]. [citado 25 de Fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/ODvsCells.html>

72. Perestrelo R, Barros AS, Rocha SM, Câmara JS. Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties. *Talanta*. 2011;85(3):1483–1493.
73. MetaboAnalyst. MetaboAnalyst 4.0 [Internet]. [citado 9 de Fevereiro de 2018]. Disponível em: <http://www.metaboanalyst.ca/faces/Secure/analysis/PCAView.xhtml>
74. Querol A, Barrio E, Ramón D. A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Syst Appl Microbiol*. 1992;15(3):439–446.
75. MetaboAnalyst. Metabolomic Data Analysis [Internet]. 2018 [citado 9 de Fevereiro de 2018]. Disponível em: http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/resources/users/guest3632583880771959797tmp/Analysis_Report.pdf
76. Formeto J, Ercoli E, Diaz-Peral E. Aislamiento, selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas, de las regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza. *Resv Enol*. 2007;2(4):1–7.
77. Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate single-stranded carrier DNA polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*. 2002;350(2001):87–96.
78. Zimkus A, Misiūnas A, Chaustova L. Li⁺ effect on the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as probed by FT-IR spectroscopy. *Open Life Sci*. 2013;8(8):724–729.
79. Blanco P, Ramilo A, Cerdeira M, Orriols I. Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2006;89(3–4):351–357.
80. Clavijo A, Calderón IL, Paneque P. Effect of the use of commercial *Saccharomyces* strains in a newly established winery in Ronda (Málaga, Spain). *Int J Gen Mol Microbiol*. 2011;99(3):727–731.

81. Schuller D, Valero E, Dequin S, Casal M. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;231(1):19–26.
82. Marinangeli P, Angelozzi D, Ciani M, Clementi F, Mannazzu I. Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: A new way towards wine strain characterisation. *FEMS Yeast Res.* 2004;4(4–5):427–435.
83. Cappello MS, Bleve G, Grieco F, Dellaglio F, Zacheo G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J Appl Microbiol.* 2004;97(6):1274–1280.
84. Osorio-cadavid E, Ramírez M, López WA, Mambuscay LA. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Rev Colomb Biotecnol* [Internet]. 2009;11(1):125–131. Disponible em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77612900013>.
85. Guillamón JM, Sabat J, Barrio E, Cano J, Querol A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. 1998;169:387–392.
86. Granchi L, Bosco M, Messini A, Vincenzini M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J Appl Microbiol.* 1999;87(6):949–956.
87. Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol Res.* 2002;157(4):267–274.
88. National Center for Biotechnology Information. Organelles - Genome - NCBI [Internet]. [citado 1 de Outubro de 2018]. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/organelles/15>.
89. Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1998;440(3):325–331.
90. Skelin A, Sikora S, Orlic S, Durakovic L, Redžepovic S. Genetic diversity of indigenous *Saccharomyces sensu stricto* yeasts isolated from Southern Croatia.

- Agric Conspec Sci. 2008;73(2):89–94.
91. Querol A, Barrio E, Ramón D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int J Food Microbiol.* 1994;21(4):315–323.
 92. Garde-Cerdán T, Ancín-Azpilicueta C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. *Eur Food Res Technol.* 2006;126(1-2):15–25.
 93. Torrea D, Fraile P, Garde T, Ancen C. Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control.* 2003;14(8):565–571.
 94. Jiang B, Zhang Z. Volatile compounds of young wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischt and Chardonnay varieties grown in the loess plateau region of China. *Molecules.* 2010;15(12):9184–9196.
 95. Pherobase. The Pherobase: Floral Compounds - Sorted by CAS Number [Internet]. [citado 10 de Julho de 2017]. Disponível em: <http://www.pherobase.com/database/floral-compounds/floral-taxa-compounds-casenum.php>.
 96. Instituto da Vinha e do Vinho. Parâmetros Analíticos- Portugal [Internet]. [citado 14 de Outubro de 2018]. Disponível em: <http://www.ivv.gov.pt/np4/89/>.
 97. The Good Scents Company [Internet]. [citado 14 de Julho de 2017]. Disponível em: <http://www.thegoodscentscopy.com/>.
 98. Canuti V, Conversano M, Li M, Heymann H, Matthews MA, Ebeler SE. Headspace solid-phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines. 2009;1216:3012–322.
 99. Flavornet. Flavornet and human odor space [Internet]. [citado 7 de Junho de 2017]. Disponível em: <http://www.flavornet.org/>.
 100. Carrau FM, Medina K, Boido E, Farina L, Gaggero C, Dellacassa E, et al. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS*

- Microbiol Lett. 2005;243(1):107–115.
101. Zoecklein BW, Marcy JE, Williams JM, Jasinski Y. Effect of native yeasts and selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* on glycosyl glucose, potential volatile terpenes, and selected aglycones of white riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *J Food Compos Anal.* 1997;10(1):55–65.
 102. Hock R, Benda I, Schreier P. Formation of terpenes by yeasts during alcoholic fermentation. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1984;179(6):450–462.

Anexo 1

Tabela 7 – Compostos identificados através de HS-SPME/GC-MS, obtidos a partir de vinhos inoculados com estirpes pura (RFLP-mtDNA), indicando a contribuição de cada composto na família química e no total da fração volátil do vinho, assim como o descritor olfativo.

Nº	Tr	KI	Famílias de composto	Id	Fração volátil total (%)								Descritores aromáticos		
					MC		EA		EB		EC				
					PRF	PRT	PRF	PRT	PRF	PRT	PRF	PRT			
			ÉSTERES												
1	6.793	1113	Acetato de etilo	MS	25.589	0.983	8.591	1.362	6.881	1.592	5.716	1.359	Frutado, amanteigado	b	
2	10.913	1216	Butanoato de etilo	MS	10.295	0.395	1.008	0.160	0.563	0.130	0.677	0.161	Maçã	a	
3	14.627	1290	Acetato de isoamilo	MS	2.958	0.114	9.035	1.432	3.458	0.800	4.663	1.108	Fresco, banana, pêra	b	
4	20.831	1396	Hexanoato de etilo	MS	9.468	0.364	14.743	2.337	7.640	1.768	10.070	2.393	Frutado, morango, anís	b	
5	23.413	1442	5-Hexanoato de etilo	MS	-	-	0.610	0.097	0.286	0.066	0.163	0.039	-	-	
6	26.982	1500	Heptanoato de etilo	MS	-	-	0.259	0.041	0.228	0.053	0.101	0.024	Fruta	a	
7	33.725	1612	Octanoato de etilo	MS	24.993	0.960	33.605	5.328	43.386	10.037	45.557	10.828	Floral, mentol, anis	b	
8	36.369	1659	7-Octanoato de etilo	MS	-	-	1.282	0.203	0.885	0.205	0.566	0.135	-	-	
9	38.914	1702	Nonoato de etilo	MS	-	-	-	-	0.261	0.060	0.261	0.062	-	-	
10	39.661	1717	Etil-3-(metilsulfanil)propanoato	MS	-	-	-	-	0.112	0.026	-	-	Cebola, sulfuroso, ananás	c	
11	44.266	1800	Decanoato de etilo	MS	10.757	0.413	6.030	0.956	15.957	3.691	13.388	3.182	Fruta, uva	b	
12	45.212	1819	Octanoato de 3-metilbutilo	MS	-	-	-	-	-	-	0.077	0.018	Doce, fruta	c	
13	45.421	1823	Butanodioato de dietilo	MS	14.708	0.565	3.719	0.590	3.284	0.760	3.478	0.827	Vinho, fruta	c	
14	46.057	1835	Hexadecanoato de etilo	MS	-	-	-	-	-	-	0.193	0.046	-	-	
15	46.300	1840	Decanoato de etilo	MS	-	-	3.942	0.625	6.223	1.440	2.212	0.526	Fruta, gordura		
16	49.130	1892	Benzenoacetato de etilo	MS	-	-	0.415	0.066	0.312	0.072	0.311	0.074	Doce, canela, ceroso	b	
17	49.947	1908	Acetato de 2-feniletilo	MS	-	-	14.633	2.320	8.957	2.072	9.217	2.191	Rosa, mel, tabaco	-	
18	50.945	1927	Dodecanoato de etilo	MS	1.234	0.047	2.129	0.338	1.567	0.362	3.349	0.796	Folha, manga	b	


ÁLCOIS														
19	10.809	1214	1-Propanol	MS	-	-	0.692	0.426	0.541	0.280	0.729	0.416	Fruta, plástico, penetrante	b
20	13.204	1264	2-Metil-1-propanol	MS	-	-	8.398	5.176	8.147	4.222	4.772	2.724	Alho-porro, cola, licor	b
21	15.257	1301	1-Butanol	MS	-	-	-	-	0.107	0.056	0.087	0.050	Medicamentos, fruta	a
22	19.131	1370	3-Metil-1-butanol	MS	-	-	71.005	43.761	65.329	33.854	65.293	37.280	Balsâmico, adstringente	b
23	29.132	1537	3-Etoxi-1-propanol	MS	-	-	0.061	0.038	0.042	0.022	0.293	0.168	Fruta	c
24	36.525	1662	2-Etilhexanol	MS	74.718	0.792	0.096	0.059	0.087	0.045	-	-	Suave, oleoso, floral	b
25	42.597	1771	2-(2-Etoxi)etanol	MS	-	-	0.104	0.064	0.062	0.032	0.082	0.047	ligeiramente etéreo	c
26	44.909	1813	1-Nonanol	MS	-	-	-	-	0.072	0.038	0.054	0.031	Fresco, limpo	c
27	46.874	1851	Metionol	MS	-	-	0.214	0.132	0.444	0.230	0.378	0.216	Doce, batata	a
28	47.211	1857	2-Undecanol	MS	-	-	0.023	0.014	0.042	0.022	0.127	0.072	Fresco, gordura	c
29	52.219	1952	Feniletanol	MS	25.282	0.268	19.406	11.960	25.128	13.022	28.185	16.093	Mel, floral, rosas	a
COMPOSTOS CARBONILADOS														
30	4.900	1071	Acetaldeído	MS	0.358	0.285	12.413	0.524	8.499	0.287	27.120	0.581	Fresco, frutado	b
31	5.766	1089	Butanal	MS	-	-	0.517	0.022	0.547	0.018	0.532	0.011	Chocolate	c
32	7.409	1131	3-Metilbutanal	MS	0.631	0.502	-	-	-	-	0.847	0.018	Caramelo, crema, ananás	b
33	15.013	1296	4-Metil-3-penten-2-ona	MS	0.559	0.444	-	-	-	-	-	-	Flores	a
34	17.676	1346	2-Heptanona	MS	0.212	0.168	-	-	-	-	-	-	-	-
35	19.107	1369	4-Metil-2-heptanona	MS	0.256	0.204	-	-	-	-	-	-	Amêndoa, açúcar torrado	b
36	21.278	1403	4,6-dimetil-2-heptanona	MS	0.798	0.635	-	-	-	-	-	-	-	-
37	22.007	1417	3-Octanona	MS	94.423	75.091	74.797	3.158	80.984	2.732	54.653	1.171	Cogumelos, herbáceo	a
38	23.546	1444	3-Hidroxi-2-butanona	MS	-	-	1.261	0.053	1.410	0.048	6.140	0.132	Gordura, leite	c
39	24.029	1452	Octanal	MS	0.185	0.147	-	-	-	-	-	-	-	-
40	30.304	1557	2-Nonanona	MS	-	-	0.610	0.026	0.686	0.023	2.952	0.063	Fruta, fresco	c
41	36.990	1670	Decanal	MS	0.850	0.676	1.656	0.070	1.455	0.049	2.417	0.052	Maçã, rosa, mel	b
42	37.719	1682	Benzaldeído	MS	1.555	1.236	4.330	0.183	4.831	0.163	1.152	0.025	-	-
43	41.930	1759	2-Undecanona	MS	-	-	-	-	-	-	4.188	0.090	Fruta, gordura	c
44	49.827	1905	3,5-Dimetilbenzaldeído	MS	-	-	2.312	0.098	1.587	0.054	-	-	-	-

45	50.858	1926	2,4,6-Trimetil acetofenona	MS	0.173	0.138	2.106	0.089	-	-	-	-	-	-
ÁCIDOS														
46	34.506	1626	Ácido acético	MS	-	-	63.237	5.846	53.430	8.030	54.558	5.718	Azedo	a
47	40.355	1730	Ácido 2-metil propanóico	MS	-	-	5.992	0.554	4.228	0.635	2.730	0.286	Azedo, queijo	c
48	43.524	1788	Ácido butanóico	MS	-	-	-	-	0.342	0.051	0.618	0.065	Acético, queijo	c
49	50.847	1925	Ácido hexanóico	MS	100.000	0.654	2.340	0.216	12.798	1.923	5.384	0.564	Doce	a
50	55.032	2104	Ácido octanóico	MS	-	-	18.874	1.745	13.519	2.032	19.896	2.085	Doce, queijo	a
51	58.788	2182	Ácido decanóico	MS	-	-	9.555	0.883	13.033	1.959	16.813	1.762	Ranço, gordura	a
52	67.582	2362	Ácido hexadecanóico	MS	-	-	-	-	2.650	0.398	-	-	Oleoso	a
TERPENOS														
53	14.213	1283	Óxido de Geranil	MS	5.657	0.164	-	-	-	-	-	-	-	-
54	18.931	1366	D-Limonene	MS	0.642	0.019	-	-	-	-	-	-	Citrinos, limão	a
55	39.068	1705	Linalol	MS	2.456	0.071	10.124	0.078	8.629	0.107	3.534	0.034	Citrinos, floral	
56	40.259	1728	4-Etilresorcinol	MS	49.511	1.435	-	-	-	-	5.176	0.049	-	-
57	48.052	1873	Dehidro-ar-ioneno	MS	26.521	0.769	-	-	-	-	-	-	Licoroso	c
58	48.391	1879	Nerol	MS	-	-	4.481	0.035	6.769	0.084	3.669	0.035	Floral, doce	c
59	48.606	1883	R-Citronelol	MS	-	-	16.249	0.125	8.396	0.104	45.597	0.434	-	-
60	50.717	1923	cis-Geraniol	MS	-	-	15.477	0.119	16.274	0.201	4.880	0.046	Floral, doce	c
61	51.015	1929	Geranil acetona	MS	15.213	0.441	-	-	-	-	-	-	-	-
62	54.716	1998	E-Nerolidol	MS	-	-	20.593	0.159	13.315	0.165	14.828	0.141	Citrino, madeira	c
63	60.577	2220	Farnesol	MS	-	-	33.076	0.255	46.617	0.577	22.315	0.213	Fresco, doce	a
MISCELÂNEOS														
64	4.623	1065	Etoxietano	MS	-	-	0.703	0.056	-	-	0.630	0.052	-	-
65	4.828	1069	Etoxietano	MS	-	-	1.634	0.129	1.343	0.069	2.394	0.198	-	-
66	5.100	1075	Ciclohexano	MS	82.049	9.861	5.055	0.400	6.183	0.316	1.715	0.142	Fruta, crema	a
67	5.897	1091	Hidrogenoxalato de etilo	MS	-	-	0.920	0.073	0.283	0.014	-	-	-	-
68	6.914	1117	1,1-Dietoxi-etano	MS	14.321	1.721	64.828	5.125	41.600	2.128	76.575	6.331	Éter, nozes	
69	11.057	1220	Tolueno	MS	-	-	-	-	1.390	0.071	0.654	0.054	Tinta	a

70	14.045	1280	1-(1,-etoxietoxi)-pentano	MS	-	-	6.979	0.552	3.458	0.177	10.157	0.840	-	-
71	33.334	1604	1,3-bis(1,1-dimetiletil)-benzeno	MS	-	-	-	-	1.194	0.061	0.436	0.036	-	-
72	43.005	1778	Butirolactona-dihidro-2(3H)-furanona	MS	-	-	-	-	0.394	0.020	0.368	0.030	-	-
73	43.613	1789	Hexadecano	MS	-	-	-	-	0.743	0.038	-	-	-	-
74	45.113	1817	2,6-Dimetil,2,6-octadieno	MS	-	-	-	-	-	-	1.000	0.083	-	-
75	48.548	1882	Ciclodecano	MS	1.908	0.229	-	-	0.664	0.034	-	-	Doce, fresco	b
76	56.808	2142	2,6-Diisopropilnaftaleno	MS	1.722	0.207	-	-	-	-	-	-	-	-
77	59.492	2197	2,4-bis(dimetiletilfenol)	MS	-	-	19.881	1.572	42.748	2.187	6.071	0.502	Fenólico	c


Tr- Tempo de retenção (min), KI- Índice de Kovats, Id- método de identificação de compostos, MS- espectrometria de massa, MC- mosto concentrado retificado diluído a 12 % (v/v de álcool provável), EA- estirpe A, EB- estirpe B, EC- estirpe control, PRF- percentagem do composto relativamente à família; PRT- percentagem do composto relativamente ao perfil total, a- [99], b- [95], c- [97].

Castillo M. M., da Silva E., Perestrelo R., Câmara J. S., Khadem M.; Molecular identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Madeira Region winery environment; In *Vino Analytical Scientia*, 10th Symposium. Salamanca, Espanha; 17- 20 de Julho; 2017.



CQM
CENTRO DE QUÍMICA DA MADEIRA

Molecular identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Madeira Region winery environment



ISOplexis

Mariangé M. Castillo¹, Emanuel M. da Silva², Rosa Perestrelo¹, José S. Câmara^{1,3}, Mahnaz Khadem^{2,7}

¹ CQM - Madeira Chemistry Research Centre, ² ISOplexis Genebank, ³ Exact Sciences and Engineering Competence Centre; Madeira University
Campus Universitário da Penteada, 9020-105 Funchal, Madeira, PORTUGAL; *email: mkhadem@staff.uma.pt

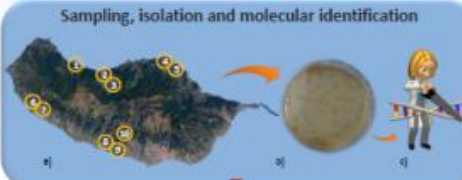
INTRODUCTION

The biosynthesis of volatile organic compounds (VOCs) with oenological interest depends on the *Saccharomyces cerevisiae* strains that determine their variety and proportions. The strains have acquired this capacity through an interaction between their genetic makeup and selective adaptation to specific ecosystems. The AIMS of the present study are:

- 1- Identification of the yeast specie by PCR amplification of 5.8S-Internal Transcribed Spacer (5.8S-ITS) region followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP-5.8S-ITS).
- 2- Identification of *S. cerevisiae* strain in 10 grape varieties by restriction pattern of total DNA mitochondrial (RFLP-mtDNA).
- 3- Determination of VOCs from representative strain by Solid Phase Microextraction in headspace mode followed by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (HS-SPME/GC-MS).

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Sampling, isolation and molecular identification



HS-SPME VOCs strain extraction

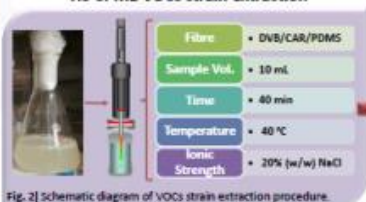


Fig. 2) Schematic diagram of VOC strain extraction procedure.

GC-MS conditions

Column: BP-20 fused silica (30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 µm film thickness)
 Injection: Splitless mode (5 min) at 250 °C
 Oven program: 45 °C (1 min) ramped at 2 °C/min to 100 °C (3 min), followed 5 °C/min to 130 °C (5min). Then to 220 °C at 20 °C/min, held for 15 min
 Transfer line temperature: 250 °C
 Ionisation mode: EI (70 eV)
 Mass range: 30-300 m/z

Fig. 1) a) Sample grapes: 1- Sercial¹; 2- Tinta Negra; 3- Verdelho²; 4- Malvasia de São Jorge; 5- Bastardo; 6- Verdelho²; 7- Terrantez; 8- Boal; 9- Malvasia Cândida and 10- Sercial¹. b) isolates in Yeast (1%) Peptone (2%) Dextrose (2%) plates. c) Species and strain identification (100 isolates) were performed by RFLP-5.8S-ITS and RFLP-mtDNA.

RESULTS and DISCUSSION

Molecular identification

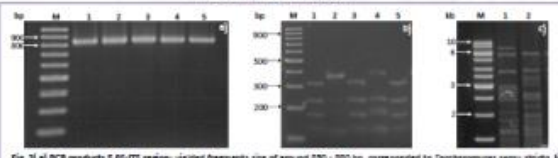


Fig. 3) a) PCR products 5.8S-ITS region - yielded fragments size of around 230 - 300 bp, corresponded to *Saccharomyces cerevisiae* strains. line 1- Mt-100 bp ladder, line 2 to 6- examples from isolates. (approx. 1.5%) (n/v). b) RFLP-5.8S-ITS- The restriction patterns corresponded to *S. cerevisiae* yeast; line 1- Mt-100 bp ladder, line 2, 4 and 6- digested with *Hinf* enzyme; line 3 and 5- digested with *Hinf* enzyme. (approx. 5%) (n/v). c) RFLP-mtDNA pattern- corresponded to representative strain, line 1- Mt-100 ladder, line 2- strain E81 isolate from Sercial¹; line 3- strain E7 isolate from Malvasia São Jorge (approx. 1.4%) (n/v).

GC-MS chromatograms from strain

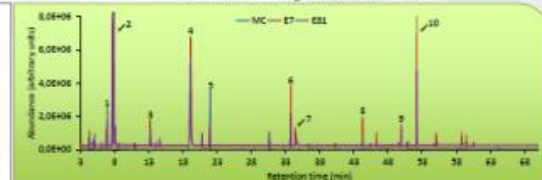


Fig. 4) GC-MS overlay chromatograms from - MC-concrete must (blue), E7-strain isolated from Malvasia de São Jorge (red), E81-strain isolate from Sercial¹. Major peaks: 1- Ethyl acetate; 2- Ethanol; 3- 2-Methyl-1-propanol; 4- 2-Methyl-2-propanol; 5- 3-Octanone; 6- Ethyl acetate; 7- Acetic acid; 8- Ethyl acetate; 9- 2-Phenylethyl acetate; 10- Phenylethyl alcohol.

VOCs analysis

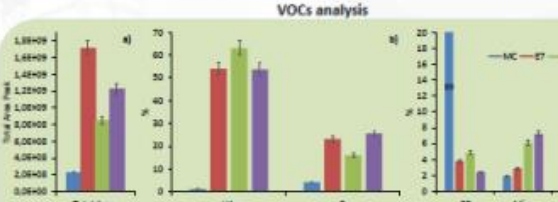



Fig. 5) VOC analysis from: MC- concrete must (blue), E7- strain isolated from Malvasia São Jorge; E81- strain isolate from Sercial¹; E8- strain control. a) variation of the total area peaks in the samples; b) Major chemical families: HA- Higher Alcohols; E- Esters; c) Minor chemical families: CC- Carboxylated compounds; Misc- Miscellaneous; Terp- Terpenes; Ac- Organic acids.

CONCLUSIONS

- ✓ A total of 100 isolates were identified as *S. cerevisiae* species;
- ✓ Eight distinct RFLP-mtDNA patterns were obtained, representing different strains;
- ✓ Sixty and 52 VOCs were identified in E7 (isolated from Malvasia São Jorge) and E81 (isolated from Sercial¹) strains, respectively;
- ✓ The major metabolites metabolized by E7 and E81 were 3-methyl-1-butanol and phenylethyl alcohol;
- ✓ The E7 strain produce more >30% metabolites than E81 strain;
- ✓ This preliminary study reveals that endogenous *S. cerevisiae* strain selections can determine the quality and typicity of wine.

References:
 1- Esteve-Zaroso S, Bellach C, Uruburu F, Queriá A. Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol*. 1999; 49: 329-337.
 2- Queriá A, Barrio S, Ramón D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Appl Environ Microbiol*. 1992a; 15: 439-446.
 3- Perestrelo R, Barros A, Rocha S, Câmara J. Establishment of the varietal profile of vitis vinifera L. grape varieties from different geographical regions based on HG-SPME/GC-MS combined with chemometric tools. *Misrochem J*. 2014; 124: 107-117.
 4-velho, 1- Sercial, 2- Tinta Negra, 3- Verdelho, 4- Malvasia de São Jorge



PORTO
MARE

<http://cqm.uma.pt>

In Vino 2017, 17-20 July, Salamanca, Spain



Cofinanciado por:

