



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2008

**Marisa Susete**

**Reverendo Simões**

**Dinâmica populacional de leveduras na fermentação  
de mostos vínicos.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Manuel António da Silva Santos, Professor Associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

Presidente

**Prof. Dr. Maria de Lourdes Pereira**

professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Manuel António da Silva Santos**

professor associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Catarina Gomes**

Investigadora auxiliar – Unidade de Genómica do Biocant

**Doutora Laura Cristina Carreto**

Investigadora auxiliar – Unidade de Genómica do Biocant

**Prof. Dr. Dorit Elisabeth Schuller**

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade do Minho

## **agradecimentos**

Ao Professor Manuel Santos pela excelente oportunidade que me concedeu, e pela confiança com que me recebeu como orientador.

À Catarina Gomes, por tudo o que me ensinou, e pela paciência que sempre demonstrou mesmo em alturas complicadas.

Às colegas Marta, Estefânia, Sofia e Susana pela grande ajuda, pela boa disposição e ânimo, o laboratório não teria sido o mesmo!

A todas as pessoas do Biocant que fizeram parte do meu dia-a-dia, pela simpatia e boa disposição.

Por fim aos meus Pais e Mano, ao Ricardo, aos Amigos, que apesar de tudo nunca me deixaram desistir.

E assim passou um ano complicado, mas excelente!

Obrigada

**palavras-chave**

Leveduras, ITS, *MET2*, inter- $\delta$ , *Saccharomyces cerevisiae*.

## resumo

Em ecossistemas microbianos complexos, com diferentes espécies e estirpes, há interações intra- e interespecíficas que influenciam a estrutura das comunidades. Este é o cenário que se pode encontrar na fermentação de mostos de uva, que são um nicho ecológico complexo onde existem leveduras, fungos filamentosos e bactérias. De facto, a fermentação de mostos víquicos é um processo bioquímico complexo, onde a fermentação alcoólica, levada a cabo pelas leveduras, é a reacção mais importante.

Este trabalho teve como objectivo a identificação das leveduras selvagens da região da Bairrada, e a monitorização das leveduras presentes ao longo do processo de fermentação. Pretendeu-se, ainda, caracterizar as leveduras associadas às diversas castas, especialmente à casta Baga. Procedeu-se ao isolamento de leveduras, de mosto inicial, do início da fermentação e do final de fermentação, de mostos de uvas de várias castas, nomeadamente Maria Gomes, Bical, Tinta Roriz, Touriga Nacional, Baga, e também de lagares. Posteriormente identificaram-se os isolados com técnicas de PCR por amplificação específica das regiões ITS, por RFLP do gene *MET2*, e análise das regiões inter- $\delta$ .

As espécies que predominaram no mosto inicial e início de fermentação foram *H. uvarum*, *I. terricola* e *M. pulcherrima*. Relativamente ao final da fermentação, a grande maioria dos isolados foram identificados como sendo *S. cerevisiae* e *H. uvarum*. Quanto à análise dos perfis de bandas inter- $\delta$  foram obtidos 182 perfis diferentes em fermentações espontâneas e 150 em fermentações de lagares, sugerindo a existência de elevada variabilidade natural de *S. cerevisiae*.

**keywords**

Yeasts, ITS, *MET2*, Inter- $\delta$  regions, *Saccharomyces cerevisiae*.

## abstract

In complex microbial ecosystems there is intra- and interspecific interactions which influence the structure of the microbial community. This complexity is found in wine must fermentations where yeasts, filamentous fungi and bacteria are present. Indeed, the fermentation of wine musts is a complex biochemical process where the alcoholic fermentation, carried out by yeasts, is the most important reaction.

The aims of this study were to identify and characterize the wild wine yeasts of the Bairrada region, to monitor the yeasts present throughout the fermentation process in both laboratorial and cellar fermentations, and to characterize the yeasts associated with the grapes Maria Gomes, Bical, Touriga Nacional, Tinta Roriz and especially Baga. For this, yeasts were isolated from several fermentation stages, namely from initial must, from the beginning of fermentation and from fermentation end points. The isolated yeasts were characterized by PCR through amplification of the ITS region, by RFLP of the *MET2* gene, and by amplification of inter- $\delta$  regions.

The dominant species in the initial must and beginning of fermentation were *H. uvarum*, *I. terricola* e *M. pulcherrima*, while *S.cerevisiae* dominated at the end of fermentation. As for the analysis of the inter- $\delta$  profiles, 182 different profiles were obtained in spontaneous fermentations and 150 in cellar fermentations, thus indicating significant natural diversity of *S. cerevisiae* strains.









Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2008

**Marisa Susete**

**Reverendo Simões**

**Dinâmica populacional de leveduras na fermentação  
de mostos vínicos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Manuel António da Silva Santos, Professor Associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

Presidente

**Prof. Dr. Maria de Lourdes Pereira**  
professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Manuel António da Silva Santos**  
professor associado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Dorit Elisabeth Schuller**  
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade do Minho

**Doutora Ana Catarina Gomes**  
Investigadora auxiliar – Unidade de Genómica do Biocant

**Doutora Laura Cristina Carreto**  
Investigadora auxiliar – Unidade de Genómica do Biocant

## **agradecimentos**

Ao Professor Manuel Santos pela excelente oportunidade que me concedeu, e pela confiança com que me recebeu como orientador.

À Catarina Gomes, por tudo o que me ensinou, e pela paciência que sempre demonstrou mesmo em alturas complicadas.

Às colegas Marta, Estefânia, Sofia e Susana pela grande ajuda, pela boa disposição e ânimo, o laboratório não teria sido o mesmo!

A todas as pessoas do Biocant que fizeram parte do meu dia-a-dia, pela simpatia e boa disposição.

Por fim aos meus Pais e Mano, ao Ricardo, aos Amigos, que apesar de tudo nunca me deixaram desistir.

E assim passou um ano complicado, mas excelente!

Obrigada

**palavras-chave**

Leveduras, ITS, *MET2*, inter- $\delta$ , *Saccharomyces cerevisiae*.

## resumo

Em ecossistemas microbianos complexos, com diferentes espécies e estirpes, há interações intra- e interespecíficas que influenciam a estrutura das comunidades. Este é o cenário que se pode encontrar na fermentação de mostos de uva, que são um nicho ecológico complexo onde existem leveduras, fungos filamentosos e bactérias. De facto, a fermentação de mostos víquicos é um processo bioquímico complexo, onde a fermentação alcoólica, levada a cabo pelas leveduras, é a reacção mais importante.

Este trabalho teve como objectivo a identificação das leveduras selvagens da região da Bairrada, e a monitorização das leveduras presentes ao longo do processo de fermentação. Pretendeu-se, ainda, caracterizar as leveduras associadas às diversas castas, especialmente à casta Baga. Procedeu-se ao isolamento de leveduras, de mosto inicial, do início da fermentação e do final de fermentação, de mostos de uvas de várias castas, nomeadamente Maria Gomes, Bical, Tinta Roriz, Touriga Nacional, Baga, e também de lagares. Posteriormente identificaram-se os isolados com técnicas de PCR por amplificação específica das regiões ITS, por RFLP do gene *MET2*, e análise das regiões inter- $\delta$ .

As espécies que predominaram no mosto inicial e início de fermentação foram *H. uvarum*, *I. terricola* e *M. pulcherrima*. Relativamente ao final da fermentação, a grande maioria dos isolados foram identificados como sendo *S. cerevisiae* e *H. uvarum*. Quanto à análise dos perfis de bandas inter- $\delta$  foram obtidos 182 perfis diferentes em fermentações espontâneas e 150 em fermentações de lagares, sugerindo a existência de elevada variabilidade natural de *S. cerevisiae*.

**keywords**

Yeasts, ITS, *MET2*, Inter- $\delta$  regions, *Saccharomyces cerevisiae*.

## abstract

In complex microbial ecosystems there is intra- and interspecific interactions which influence the structure of the microbial community. This complexity is found in wine must fermentations where yeasts, filamentous fungi and bacteria are present. Indeed, the fermentation of wine musts is a complex biochemical process where the alcoholic fermentation, carried out by yeasts, is the most important reaction.

The aims of this study were to identify and characterize the wild wine yeasts of the Bairrada region, to monitor the yeasts present throughout the fermentation process in both laboratorial and cellar fermentations, and to characterize the yeasts associated with the grapes Maria Gomes, Bical, Touriga Nacional, Tinta Roriz and especially Baga. For this, yeasts were isolated from several fermentation stages, namely from initial must, from the beginning of fermentation and from fermentation end points. The isolated yeasts were characterized by PCR through amplification of the ITS region, by RFLP of the *MET2* gene, and by amplification of inter- $\delta$  regions.

The dominant species in the initial must and beginning of fermentation were *H. uvarum*, *I. terricola* e *M. pulcherrima*, while *S.cerevisiae* dominated at the end of fermentation. As for the analysis of the inter- $\delta$  profiles, 182 different profiles were obtained in spontaneous fermentations and 150 in cellar fermentations, thus indicating significant natural diversity of *S. cerevisiae* strains.





## Índice

Introdução .....	2
1. Metodologias moleculares .....	2
2. Microflora víquica .....	5
3. Objectivos: .....	7
Materiais e Métodos .....	10
1. Leveduras Víquicas .....	10
1.1. -Colheita de amostras .....	10
1.2.-Isolamento de Leveduras .....	10
2. Métodos Moleculares de Identificação de Leveduras Víquicas .....	13
2.1. Extracção de DNA genómico .....	13
2.2. Região ITS do rDNA de leveduras víquicas .....	13
2.3. Diferenciação entre espécies do género <i>Saccharomyces</i> - <i>MET2</i> -RFLP .....	16
2.5. Região Inter- $\delta$ de <i>S. cerevisiae</i> .....	17
Resultados .....	20
1. Validação de resultados .....	20
2. Fermentação Laboratorial .....	26
2.1. Vinhas Monocasta .....	26
2.2. Vinha Mista .....	27
2.3. Análise Geral .....	28
3. Variação interespecífica de acordo com a casta e com o momento da fermentação. ....	30
3.1. Fermentações espontâneas .....	30
3.1.1. <i>Vinhas Monocasta</i> .....	30
3.1.2. <i>Vinha Mista</i> .....	33
3.1.3. <i>Casta Baga</i> .....	36
3.1.4. <i>2006 vs 2007 – Estudo durante dois anos</i> .....	38
3.1.4.1. <i>Vinhas Monocasta 2006</i> .....	38
3.1.4.2. <i>Vinha Mista 2006</i> .....	40
3.1.4.3. <i>Análise Geral</i> .....	41
3.2. Fermentações em Lagares .....	43
3.2.1. <i>Início e final de fermentação</i> .....	43
3.2.2. <i>Fermentações 2005 vs 2006 vs 2007 – Estudo durante três anos</i> .....	45
4. Variabilidade intraespecífica de <i>S. cerevisiae</i> .....	48
4.1. Perfis inter- $\delta$ de <i>S. cerevisiae</i> associados a Castas / Vinhas – análise de 2007 .....	48
4.2. Perfis inter- $\delta$ de <i>S. cerevisiae</i> associados a Castas / Vinhas – análise de 2006 .....	52
4.3. Análise Geral .....	53
4.4. Perfis inter- $\delta$ de <i>S. cerevisiae</i> associados a Lagares – estudo durante três anos .....	55
Discussão Geral e Conclusão .....	60
Referências .....	66
Anexos .....	71
Anexo I - Perfis inter- $\delta$ de <i>S. cerevisiae</i> das vinhas em 2007 .....	72
Anexo II - Perfis inter- $\delta$ de <i>S. cerevisiae</i> dos lagares em 2007. ....	76
Anexo III - Perfis inter- $\delta$ de <i>S. cerevisiae</i> das vinhas em 2007 – distribuição casta/vinha. ....	78
Anexo IV - Perfis inter- $\delta$ de <i>S. cerevisiae</i> das vinhas em 2006 – distribuição casta/vinha. ....	84
Índice de figuras .....	87
Índice de tabelas .....	91





## Introdução

### 1. Metodologias moleculares

As metodologias clássicas de microbiologia utilizadas na identificação de microrganismos incluem o cultivo em meios selectivos, observação ao microscópio, testes fenotípicos relativos a taxas de fermentação e assimilação, entre outras. Estas têm permitido classificar e identificar as várias espécies de leveduras (Querol *et al*, 2003; Renouf *et al*, 2007), contudo existem limitações relacionadas com as condições óptimas de crescimento para a maioria das espécies, que dificultam o desenvolvimento de meios de cultivo universais (Millet V. & Lonvand-Funel, 1999; Renouf *et al*, 2007). Tais limitações, e a morosidade dos testes microbianos clássicos, têm promovido o desenvolvimento de métodos moleculares para identificação dos géneros e espécies e genotipagem de estirpes da mesma espécie (Kolbert P.C. & Persing, D. H., 1999; Querol *et al*, 2003).

A classificação genotípica é baseada em alvos moleculares estáveis e uniformes, sendo uma ferramenta de excelência na identificação e classificação de espécies (Kolbert P.C. & Persing, D. H., 1999; Querol *et al*, 2003). Os alvos de estudo mais frequentes são os genes ribossomais. (Renouf *et al*, 2007), pois existem diversas vantagens associadas à sua utilização em estudos taxonómicos. O DNA é uma biomolécula de fácil isolamento e alta estabilidade e os genes que codificam o rRNA possuem regiões altamente conservadas e regiões variáveis, com taxas de evoluções ligeiramente diferentes entre si. Regiões nucleotídicas altamente conservadas permitem o desenho de sondas universais enquanto que as regiões variáveis possibilitam desenvolver sondas específicas para determinado grupo de organismos (Kolbert P.C. & Persing, D. H., 1999).

As leveduras são fungos unicelulares e foram classificadas por Barnett e colaboradores (1990) em 83 géneros e 590 espécies. Contudo, novas espécies têm sido descobertas, e as alterações nas metodologias da taxonomia de leveduras, têm alterado ligeiramente estes números. A identificação baseada em abordagens fenotípicas e morfológicas continua a ser o principal critério de identificação, no entanto critérios moleculares são frequentemente usados. Alguns destes métodos baseiam-se na análise de sequências, nomeadamente da região D1/D2 do 26S do rDNA, na região 18S e também nas

regiões 5,8S e ITS (Querol *et al*, 2003). Estes critérios moleculares também têm introduzido alterações na classificação de alguns grupos.

As relações filogenéticas entre leveduras têm também sido estudadas por comparação de sequências de rDNA. A principal vantagem deste método é o facto dos ribossomas de todos os organismos serem altamente conservados, essenciais à vida e partilharem uma origem comum, permitindo comparação entre espécies (Barros Lopes *et al*, 1998). Em diversas leveduras, como por exemplo *S. cerevisiae*, os genes rDNA localizam-se numa região composta por repetições em *tandem* de um fragmento de 9kb localizados no cromossoma XII. Estes fragmentos possuem duas unidades transcricionais, a saber um grupo de genes que codificam os rRNA's 18S, 5.8S e 26S e duas regiões *internal transcribed spacers* chamadas ITS1 e ITS2. As regiões variáveis não codificantes ITS e o gene 5.8S codificante e conservado são ferramentas valiosas no estudo de relações genealógicas, pois exibem um nível de diferenças interespecíficas superior ao encontrado nas regiões 18S e 26S (Esteve-Zarzoso *et al*, 1998; Montrocher *et al*, 1998).

Esteve-Zarzoso e colaboradores (1999) aplicaram com sucesso a análise de restrição à região 5.8S-ITS do rDNA, que é altamente conservada ao nível das espécies. A região ITS contém o gene que codifica o 5.8S rRNA e as duas regiões vizinhas não codificantes e variáveis ITS1 e ITS2. Esta região apresenta uma elevada variabilidade interespecífica no tamanho, mas reduzido polimorfismo intraespecífico, o que permite a sua utilização na identificação de espécies (Fernández-Espinar *et al*, 2000; Guillamón *et al*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al*, 1999; Montrocher *et al*, 1998). A amplificação da região ITS com os *primers* descritos por White e colaboradores (1990), ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G (19pb)); e ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC (20pb)) permite seleccionar leveduras que tenham apenas uma banda amplificada, pré classificando-as ao nível da espécie, de acordo com o tamanho do amplicão (Granchi *et al*, 1999).

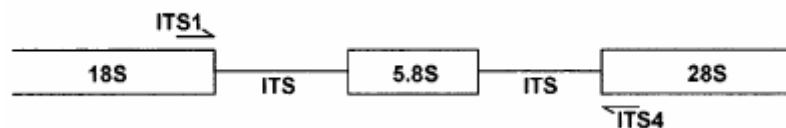


Figura 1 - Região amplificada pelos primers ITS1 e ITS4 (Guillamón *et al* 1998).

A classificação do género *Saccharomyces* ao nível da espécie tem-se revelado problemática e tem sofrido inúmeras alterações taxonómicas ao longo dos anos. Presentemente consideram-se três grupos estabelecidos por Van de Walt (1970),

nomeadamente o grupo *Saccharomyces sensu strictu* formado pelas espécies *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus* e *S. pastorianus*. As espécies *S. barnettii*, *S. castellii*, *S. dairenensis*, *S. exiguus*, *S. kunashirensis*, *S. martiniae*, *S. rosinii*, *S. servazzi*, *S. spencerorum*, *S. transvaalensis* e *S. unisporus* constituem o grupo *Saccharomyces sensu lato*. Por fim, a espécie *S. kluyveri* constitui o terceiro grupo (Fernandéz-Espinar *et al*, 2000; Rainieri *et al*, 2003). A distinção entre espécies *sensu strictu* de *Saccharomyces* é muito difícil devido à sua proximidade genética, mas pode ser resolvida usando RFLP do gene *MET2*. (Antunovics *et al*, 2005).

A amplificação do gene *MET2* com os *primers*, descritos em 1996 por Masneuf e colaboradores, *MET2\_F* (CGA AAA CGC TCC AAG AGC TGG (21pb)) e *MET2\_R* (GAC CAC GAT ATG CAC CAG GCA (21pb)), e posterior digestão enzimática com *PstI* e *EcoRI* permite distinguir entre as espécies *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. bayanus*. A endonuclease *PstI* corta o gene *MET2* de *S. bayanus* produzindo dois fragmentos de 365 e 211 pb, *EcoRI* corta o gene *MET2* de *S. cerevisiae* originando dois fragmentos de 369 e 211pb e nenhuma destas cliva o gene *MET2* de *S. paradoxus* (Demuyter *et al*, 2004; Antunovics *et al*, 2005).

*S. cerevisiae* possui um genoma relativamente pequeno com elevado número de cromossomas, com 12 - 13 Mb de DNA nuclear organizado em 16 cromossomas, pouco DNA repetitivo e poucos intrões. O conteúdo GC do genoma é cerca de 40%, muito mais compacto que o de outras células eucarióticas (Pretorius 2000). O genoma de *S. cerevisiae* pode sofrer alterações no tamanho dos cromossomas, causadas por recombinação induzida pelos elementos Ty ou sequências subteloméricas repetidas (Querol *et al*, 2003). Existem aproximadamente 35-55 cópias de pelo menos 5 retrotransposições Ty1-Ty5. Estes são móveis no genoma e são capazes de migrar de um local para outro, usando transcriptases reversas (Pretorius I. S., 2000; Jiang, Y. W., 2001). As sequências  $\delta$  são algumas das regiões de DNA repetitivo presentes no genoma de *S. cerevisiae*, e são conhecidas 299 sequências (Legras *et al*, 2003; Schuller *et al*, 2004; Nishida *et al*, 2007). Podem encontrar-se dispersas no genoma denominando-se delta solo ou integrar LTRs de ~350bp que flanqueiam os retrotransposições Ty1 e Ty2. (Legras *et al*, 2003; Schuller *et al*, 2004). A variação no número e localização ocorre ao nível intraespecífico, o que as torna ferramentas importantes na distinção de estirpes de *S. cerevisiae*. (Schuller, 2004).

Ness e colaboradores (1993) propuseram o uso de um protocolo rápido de genotipagem de *S. cerevisiae* baseado em amplificação por PCR de regiões inter- $\delta$ . O

poder de discriminação deste método depende do par de *primers* utilizado, mas a mais recente otimização ( $\delta 12$  - 5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3' e  $\delta 2$  - 5'-GTGGATTTTTATTCCAAC-3') dos primers propostos por Ness e colaboradores denominados  $\delta 1$ - $\delta 2$ , (Legras *et al*, 2003), permitiu duplicar o número de padrões inter- $\delta$  (Schuller *et al*, 2004) originais. Para além deste método de genotipagem, têm também sido usados o RFPL de mtDNA, análise de microssatélites, e análise do cariótipo. A análise otimizada das regiões inter- $\delta$  demonstrou ter poder discriminatório semelhante, com a vantagem de ser um método que não requer grande investimento em equipamento e ser de fácil execução (Schuller *et al*, 2004).

## 2. Microflora vínica

Em ecossistemas microbianos complexos, com diferentes espécies e estirpes, há interações intra e interespecíficas, que influenciam a estrutura da comunidade. Tal cenário encontra-se na fermentação de mostos víquicos onde há interações entre leveduras, fungos filamentosos e bactérias. A composição do mosto e o processo de fermentação são os factores mais importantes para a ecologia microbiana da produção de vinho (Fleet, 2003). As leveduras víquicas catalizam rapidamente e com elevado grau de eficiência o açúcar presente nas uvas, em particular as hexoxes, em etanol, dióxido de carbono e outros metabolitos (Cappello *et al*, 2004; Fleet H., Heard, G.M., 1993). Durante a primeira fase da fermentação as leveduras não-*Saccharomyces* produzem elevadas concentrações de ésteres, álcoois de cadeia longa, aldeídos e gliceróis que são importantes para as características organolépticas do vinho (Esteve-Zarzoso *et al*, 1998).

As leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica podem ter três origens: a superfície das uvas, a superfície do equipamento e instalações vinícolas, e ainda inóculos comerciais (Fleet H., Heard, G.M., 1993). No entanto, considera-se que a origem principal das leveduras é a casca das uvas, e durante o amadurecimento destas há alterações nas comunidades microbianas. No início de maturação das uvas podem encontrar-se *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Candida* e ainda o fungo *Aerobasidium pullulans*. Com o amadurecimento da uva, os níveis de açúcar aumentam levando ao desenvolvimento das populações microbianas. Em uvas maduras encontram-se as espécies do início da



maturação, mas predominam outras, nomeadamente *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*. Em uvas danificadas, nas quais existe maior disponibilidade de nutrientes, predominam as *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* e *Candida*, podendo encontrar-se também *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. A *S. cerevisiae*, que é a principal levedura da fermentação não se encontra com frequência nas uvas ( $10^{-100}$  cfu/g) (Fleet, 2003).

As leveduras mais frequentes no mosto inicial das uvas pertencem aos géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora* que constituem 50-70% da população. Podem também ser encontrados os géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Hansenula* (Fleet, 1993).

A superfície do equipamento das adegas e lagares, que entram em contacto com o sumo de uva e vinho, desenvolve uma flora associada particular, dominada por *S. cerevisiae*, mas podem também ser encontradas leveduras dos géneros *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* e *Brettanomyces* (Fleet H., Heard, G.M., 1993).

As fermentações espontâneas iniciam-se com várias espécies de *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e *Candida* e em menor proporção com *Hansenula* e *Pichia*. O crescimento destas espécies diminui geralmente ao fim do segundo ou terceiro dia de fermentação, e com o passar do tempo estas acabam por desaparecer. Nesta fase, a fermentação é conduzida por espécies de *Saccharomyces* mais resistentes ao etanol e com maior capacidade fermentativa (Fleet H., Heard, G.M., 1993; Cappello *et al*, 2004). A segunda espécie mais comum nesta fase é *S. bayanus* que também possui boa capacidade fermentativa e elevado crescimento a temperaturas mais baixas e a elevadas concentrações de açúcar (Querol *et al*, 2003; Antunovics *et al*, 2007).

A qualidade do vinho depende em parte da flora microbiana que se desenvolve durante a fermentação. Assim, é de grande importância conhecer a flora fermentativa autóctone e as suas características representativas de cada região enológica. As leveduras indígenas estão presentes na superfície das uvas e a fermentação depende de diversos factores físicos, químicos e bióticos. (Valero *et al*, 2005; Capello *et al*, 2004; Querol *et al*, 1992), pelo que a caracterização da microflora indígena deve ter tais factores em consideração.

A utilização de estirpes comerciais na fermentação de mostos víquicos tornou-se uma prática comum, pois assegura maior estabilidade nas fermentações e previne fermentações “amuadas”, ou mesmo o desenvolvimento de leveduras contaminantes que deterioram o vinho (Schuller *et al*, 2004; Torija *et al*, 2003). São usadas como fermentos

comerciais estirpes de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, sendo que *S. bayanus* \u00e9 usada preferencialmente em mostos brancos doces a baixas temperaturas e tamb\u00e9m em fermenta\u00e7\u00f5es “amuadas”. (Antunovics *et al*, 2005). A maioria das estirpes comerciais foi seleccionada a partir de estirpes selvagens com caracter\u00edsticas enol\u00f3gicas favor\u00e1veis, nomeadamente a toler\u00e2ncia ao etanol, o desempenho fermentativo e a produ\u00e7\u00e3o de metabolitos desej\u00e1veis (Valero *et al*, 2005). No entanto, o uso de fermentos comerciais substitui microflora ind\u00edgena e altera as caracter\u00edsticas t\u00edpicas da fermenta\u00e7\u00e3o espont\u00e2nea (Capello *et al*, 2004). Tal deve-se a diferen\u00e7as na produ\u00e7\u00e3o de metabolitos secund\u00e1rios de relev\u00e2ncia organol\u00e9tica que varia entre as esp\u00e9cies e entre as estirpes da mesma esp\u00e9cie (Fleet, 2003). Apesar disto, a inocula\u00e7\u00e3o de mostos com leveduras seleccionadas por minimizar o *spoilage* do vinho, que ocorre pela produ\u00e7\u00e3o de sulf\u00edtos de hidrog\u00e9nio e outros compostos sulfurosos vol\u00e1teis, \u00e1cido ac\u00e9tico, diversos \u00e9steres e fen\u00f3is vol\u00e1teis. As esp\u00e9cies que podem ter comportamento de *spoilage* s\u00e3o *Candida* e *Pichia*, podendo formar uma pel\u00edcula superficial em vinhos expostos ao ar, e ainda *Zygosaccharomyces*, *Dekkera*, *Saccharomyces* e *Saccharomycodes* (Fleet, 2003).

### **3. Objectivos:**

O conhecimento da microflora e da evolu\u00e7\u00e3o desta ao longo do processo fermentativo permite seleccionar estirpes ind\u00edgenas e potencia a produ\u00e7\u00e3o de vinhos diversificados. Neste estudo, pretendeu-se criar uma colec\u00e7\u00e3o de leveduras v\u00ednicas ind\u00edgenas da regi\u00e3o vitivin\u00edcola da Bairrada e conhecer a din\u00e2mica populacional microbiana do processo fermentativo. Para tal, desenvolveu-se uma abordagem molecular para identifica\u00e7\u00e3o das leveduras presentes nas diversas fases de fermenta\u00e7\u00e3o de mostos da Bairrada. Deste modo, foram isoladas das vinhas e lagares leveduras selvagens associadas \u00e0s castas Maria Gomes, Bical, Tinta Roriz, Touriga Nacional e Baga. Procedeu-se \u00e0 sua identifica\u00e7\u00e3o em diversas fases do processo de fermenta\u00e7\u00e3o, nomeadamente em mosto inicial, in\u00edcio de fermenta\u00e7\u00e3o e final de fermenta\u00e7\u00e3o. Para as amostras de mosto inicial, in\u00edcio e final de fermenta\u00e7\u00e3o caracterizou-se a microflora por amplifica\u00e7\u00e3o da regi\u00e3o ITS do genoma das leveduras (Granchi *et al*, 1999) e posterior identifica\u00e7\u00e3o dos isolados com sondas espec\u00edficas. As esp\u00e9cies n\u00e3o-*Saccharomyces*, *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *S.*

*paradoxus* foram caracterizadas por amplificação e análise de RFLP do gene *MET2* (Demuyter *et al*, 2004; Antunovics *et al*, 2005). Posteriormente as estirpes de *S. cerevisiae* foram genotipadas e agrupadas com base em perfis inter- $\delta$  (Ness *et al*, 1993; Legras *et al*, 2003).

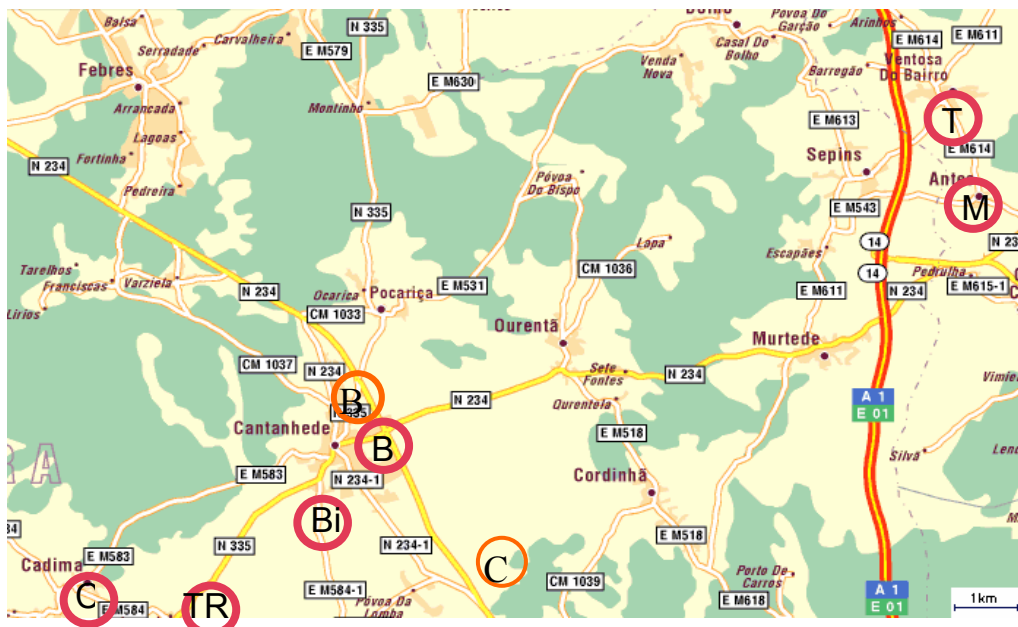
## **Materiais e M\u00e9todos**

## Materiais e Métodos

### 1. Leveduras Víquicas

#### 1.1. -Colheita de amostras

As uvas usadas nas fermentações espontâneas efectuadas em laboratório foram colhidas durante o mês de Setembro na região vitivinícola da Bairrada. Colheram-se uvas de cinco castas, nomeadamente da Baga, Touriga Nacional, Tinta Roriz, Maria Gomes e Bical. Seleccionaram-se uvas em vinhas monocasta e em vinhas mistas cuja localização está indicada no mapa da figura 2. As amostras foram colhidas assepticamente, para sacos esterilizados, 6 amostras com cerca de 4kg de cada casta nas vinhas isoladas e também nas vinhas mistas. Seleccionaram-se uvas em adiantado estado de amadurecimento (ligeiramente danificadas). As colheitas foram realizadas em dois anos consecutivos 2006 e 2007. Todos os resultados apresentados relativos a 2006 foram obtidos por colegas do laboratório e foram usados para que fosse possível realizar um estudo mais alargado.



**Figura 2 - Localização das vinhas onde se efectuaram colheitas de amostras de uvas em Setembro de 2007. C- Vinha mista, TR- Tinta Roriz, Bi- Bical, B- Baga, M- Maria Gomes, T-Touriga Nacional. As vinhas assinaladas a laranja foram amostradas apenas em 2007.**

### 1.2.1. Fermentações Laboratoriais.

Para as fermentações espontâneas assépticas, conduzidas no laboratório, as amostras foram esmagadas manualmente dentro de sacos de plástico estéreis. Após a obtenção do mosto recolheram-se 6 réplicas de 500ml para *erlenmeyers* estéreis. Das seis réplicas iniciais de 500ml, transferiram-se assepticamente 100ml de cada uma, para outro *erlenmeyer* para formar uma amostra complexa. Pretende-se com a mostra complexa obter uma amostra mais representativa.

Recolheram-se amostras de mosto no momento do esmagamento das uvas ou seja do mosto inicial, no início de fermentação, quando o mosto apresentou formação de espuma, libertação de bolhas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e perda de 2g/L, e no final de fermentação, quando o mosto apresentou uma perda de peso de 70g/L. O processo de fermentação no laboratório foi monitorizado pela pesagem diária dos mostos, quando estes apresentaram uma perda de 70g/L considerou-se que as fermentações tinham chegado ao fim. As fermentações foram conduzidas à temperatura ambiente do laboratório, que oscilou entre os 15°C e 20°C.

Dos mostos inicial e início de fermentação, retiraram-se da amostra complexa 200µl de mosto que foi posteriormente diluído de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>. Estas amostras foram semeadas em meio Yeast Extract Peptone Dextrose YEPD (extracto de levedura 1% w/v, peptona 1% w/v, glucose 2% w/v, agar 2% w/v) com bifenil (150mg/L) para prevenir o crescimento de fungos filamentosos, em paralelo semearam-se as amostras em meio WL (MERCK) com bifenil (150mg/L). Após incubação a 30°C durante 48h foram isoladas aleatoriamente 30 colónias de placas de agar com 30 a 300 UFC's, que foram semeadas novamente em meio YEPD e incubadas a 30°C durante 48h. Posteriormente foram criopreservadas em YEPD líquido com glicerol a 40% v/v a -80°C. As amostras do final de fermentação tiveram um tratamento semelhante, contudo as réplicas também foram semeadas a partir de diluições de 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>.

### 1.2.2. Fermentações em Lagares

As amostras de mosto foram obtidas directamente do lagar no início e final da fermentação. Usaram-se tubos *falcon* esterilizados e fizeram-se amostragens de 6 lagares diferentes (figura 3). Esta experiência foi repetida em três anos consecutivos 2005, 2006 e 2007. Todos os resultados apresentados relativos a 2005 e 2006 foram obtidos por colegas do laboratório e foram usados para que fosse possível realizar um estudo mais alargado.

As amostras do início da fermentação, nas diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , foram distribuídas em meio YEPD com bifenil para evitar o crescimento de fungos filamentosos, já as amostras do final de fermentação foram semeadas em YEPD. Após incubação isolaram-se 30 colónias no início e 30 colónias no final da fermentação de cada mosto. As colónias de leveduras foram isoladas aleatoriamente, espalhadas em YEPD e após incubação criopreservadas em YEPD líquido com glicerol a 40% v/v a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

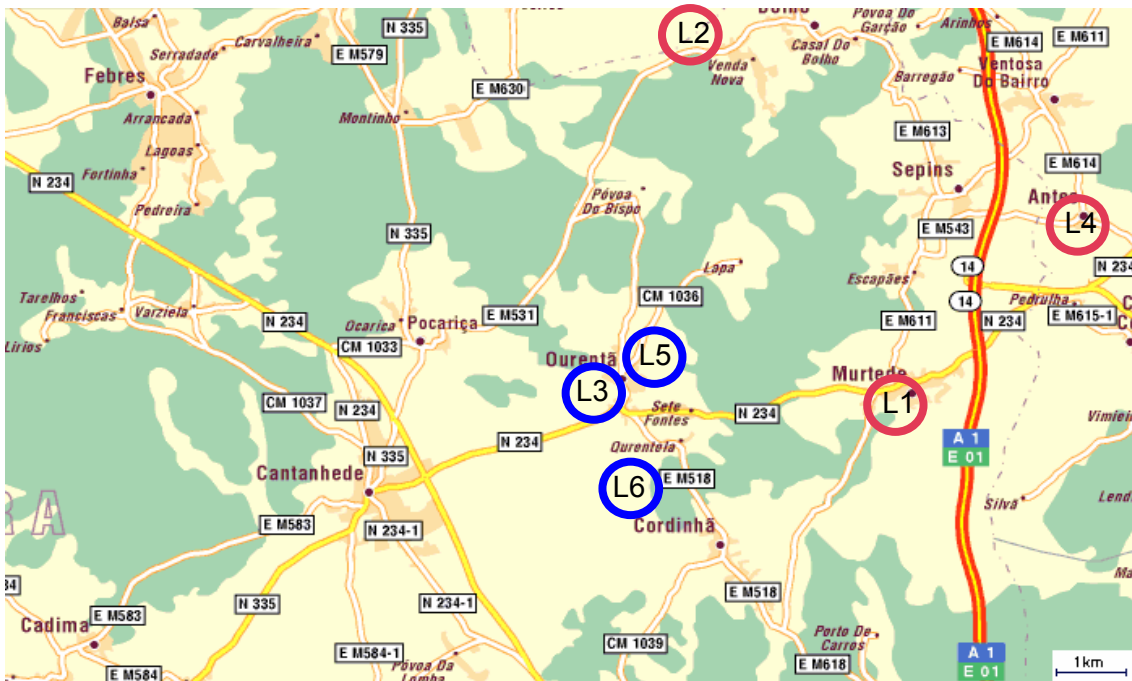


Figura 3 - Localização dos 6 lagares onde foram colhidas amostras de mosto em Setembro de 2007. Lagar 1 a Lagar 6.

## 2. Métodos Moleculares de Identificação de Leveduras Vínicas

### 2.1. *Extracção de DNA genómico*

A extracção de DNA genómico foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Lopez e colaboradores (2001) com algumas alterações. Culturas de 1 ml em YEPD foram recolhidas por centrifugação e posteriormente lavadas duas vezes em água ultra pura. Em seguida, as células precipitadas foram ressuspensas em 100 µl de tampão de lise (1 M sorbitol, 0,1M EDTA-Na<sub>2</sub>, pH a 7,5). As células foram lisadas com 5 µl liticase (5U/µl, Sigma) durante 45min a 37°C. Foi utilizado também dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% w/v para a emulsão dos lípidos, que potenciou a lise celular a 65°C durante 5 minutos. O DNA foi precipitado com acetato de potássio 5M e um volume de isopropanol. A solução foi misturada e deixou-se repousar 5 minutos à temperatura ambiente. Recolheu-se o DNA por centrifugação e foi posteriormente lavado com etanol a 70% e deixado secar ao ar. Posteriormente ressuspensado e conservado em tampão TE a -20°C. O DNA foi quantificado num Nanodrop ND-1000, que permitiu também avaliar a sua qualidade. As amostras foram posteriormente diluídas para obter soluções a 100 ng DNA/µl que foram usadas em reacções de PCR.

### 2.2. *Região ITS do rDNA de leveduras vínicas*

As reacções de amplificação da região ITS foram realizadas usando os *primers* ITS1 e ITS 4 descritos por White e colaboradores (1990). Fizeram-se reacções de 25 µL, com a seguinte composição: 1x PCR Buffer incomplete BIORON, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP's, 0,4µM de cada *primer*, 1U de Taq Polimerase Bioron e 100ng do respectivo DNA. O ciclo de PCR utilizado encontra-se esquematizado na tabela 1.

**Tabela 1 - Ciclo de amplificação das regiões ITS**

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
95	5	1
94	0,4	35
53	0,4	
72	1	
72	5	1



Os produtos de PCR foram analisados num Labchip. Os tamanhos dos amplicões foram comparados com os obtidos por Granchi e colaboradores (tabela 2) o que permitiu agrupar e diferenciar os isolados deste estudo. As amostras foram posteriormente testadas com *primers* específicos para as espécies mais prováveis de acordo com o tamanho do amplicão (tabela 2). Os *primers* utilizados foram desenvolvidos no nosso laboratório no âmbito de outros projectos, e foram obtidos usando o software BioEdit, utilizando sequências fasta disponíveis no GenBank do NCBI (ver tabela 3).

**Tabela 2 - Espécie e tamanho do amplicão esperado usando os primers ITS1 e ITS4 (adaptado de Granchi *et al*, 1999).**

<b>Espécie</b>	<b>Tamanho do Amplicão(pb)</b>	<b>Espécie</b>	<b>Tamanho do Amplicão(pb)</b>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	970	<i>Candida famata</i>	656
<i>Saccharomyces bayanus</i>	850	<i>Pichia anomala</i>	615
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	850	<i>Cryptococcus albidus</i>	613
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	850	<i>Pichia guilliermondii</i>	605
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	850	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	585
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	803	<i>Rhodotorula minuta</i>	582
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	785	<i>Dekkera anomala</i>	514
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	760	<i>Issatchenkia orientalis</i>	494
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	758	<i>Pichia membranifaciens</i>	475
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	745	<i>Candida valida</i>	475
<i>Kloeckera apiculata</i>	745	<i>Candida stellata</i>	468
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	740	<i>Dekkera bruxellensis</i>	459
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	735	<i>Pichia fermentans</i>	449
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	682	<i>Issatchenkia terricola</i>	416
<i>Debaryomyces hansenii</i>	656	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	380

**Tabela 3 – Regiões do genoma das leveduras usadas na sua identificação.**

Espécie	Região alvo
<i>Candida cantarelli</i>	
<i>Candida stellata</i>	
<i>Candida vanderwaltii</i>	
<i>Candida vini</i>	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	
<i>Issatchenkia terricola</i>	
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	<b>18S</b>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
<i>Pichia anómala</i>	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	
<i>Dekkera anomala</i>	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	
<i>Dekkera hanseni</i>	
<i>Pichia guilliermondi</i>	
<i>Pichia membranifaciens</i>	
<i>Pichia mexicana</i>	
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	<b>26S</b>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	
<i>L. elongisporus</i>	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<b>IGS</b>
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	

A reacção de PCR com *primers* específicos realizou-se num volume final de 25µL com a seguinte composição: 1xTampão Fermentas, 1,7mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM de dNTP's, 0,1µM de cada *primer*, 1U Taq Polimerase Fermentas e 100ng do respectivo DNA. O ciclo de PCR utilizado encontra-se esquematizado na tabela 4.

**Tabela 4 - Ciclo de PCR com *primers* específicos.**

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
95	5	1
94	0,4	35
52	0,4	
72	1	
72	5	1

### 2.3. Diferenciação entre espécies do género *Saccharomyces* - *MET2-RFLP*

O PCR/RFLP do gene *MET2* pode ser usado para diferenciação das espécies de *Saccharomyces sensu strictu* conforme documentado por Masneuf e colaboradores (1999), esta técnica demonstrou produzir resultados de acordo com os produzidos por análises genéticas clássicas. O gene *MET2* foi amplificado com os *primers* MET2\_F e MET2\_R descritos por Masneuf e colaboradores (1996). A amplificação do gene *MET2* foi realizada num volume de 50µL com a seguinte composição: 1x PCR Buffer incomplete BIORON, 1,7mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP's, 0,2 µM de cada *primer*, 1U de Taq Polimerase Bioron e 100ng do respectivo DNA.

**Tabela 5 – Ciclo de PCR *MET2***

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclo
94	3	1
94	1	35
60	0,4	
72	0,4	
72	5	1

O DNA amplificado foi digerido com as enzimas *PstI* e *EcoRI* de acordo com as instruções do fornecedor (New England Biolabs) durante 3horas a 37°C. A enzima foi inactivada a 80°C durante 20min e os produtos de PCR foram analisados num LabChip.

#### 2.4. Região Inter- $\delta$ de *S. cerevisiae*

As estirpes de *S. cerevisiae* isoladas no final de fermentação, tanto das fermentações em laboratório como dos lagares, foram genotipadas e agrupadas com base no perfil de amplificação das regiões inter- $\delta$ . A reacção de (50 $\mu$ L) tinha a seguinte composição: 1x PCR Buffer complete BIORON (com 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>), 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4mM de dNTP's, 1,7  $\mu$ M de cada primer  $\delta$ 12- $\delta$ 2, 0,8U de Taq Polimerase Bioron e 100ng do respectivo DNA. Os produtos de PCR foram analisados num LabChip.

**Tabela 6 - Ciclo de PCR da região Inter- $\delta$ .**

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclo
95	2	1
95	0,5	35
42,3	1	
72	1	
72	10	1

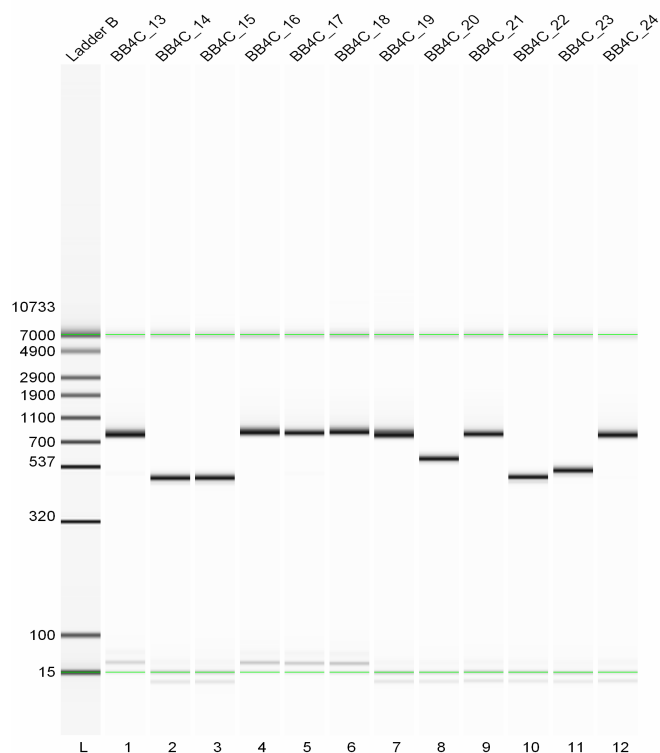


## **Resultados**

## Resultados

### 1. Identificação de leveduras

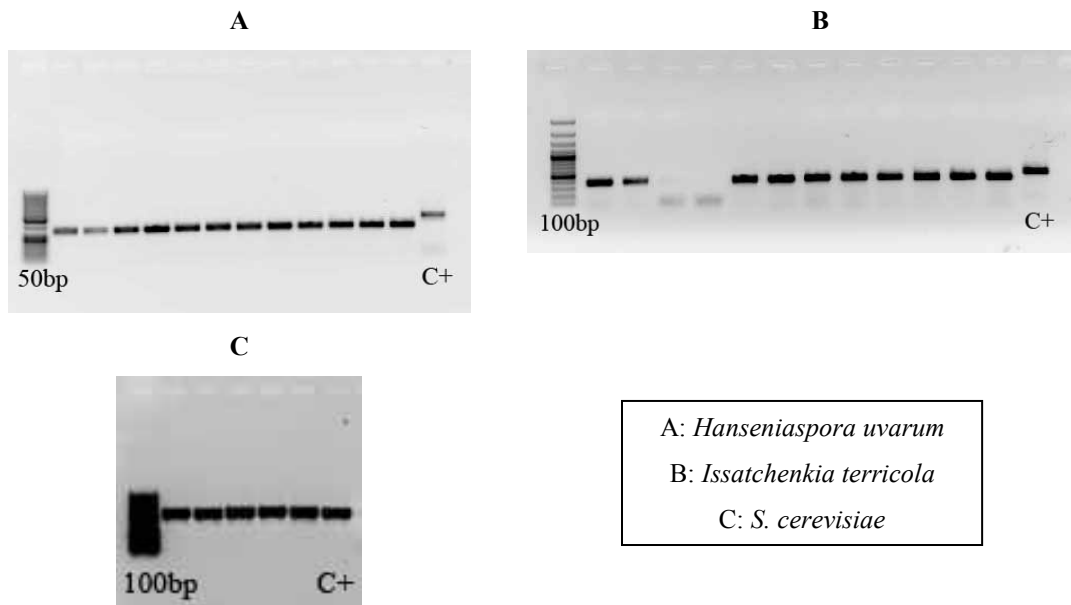
O estudo das leveduras presentes no mosto inicial, início e final de fermentação foi realizado através da amplificação da região ITS. Os tamanhos dos amplicões foram usados para identificar as espécies. Desta forma a análise desta região permitiu agrupar os isolados de acordo com o tamanho do amplicão resultante (figura 4). Assim foi possível realizar uma identificação preliminar das amostras.



**Figura 4 - Produtos de amplificação de DNA por PCR da região ITS, separados num Labchip.** As diferenças no tamanho dos amplicões sugerem a presença de várias espécies nas amostras analisadas.

Granchi e colaboradores (1999) e Pramateftaki e colaboradores (2000) aplicaram com sucesso PCR-RFLP de rDNA ITS à identificação de leveduras vînicas. O método usado neste trabalho foi adaptado de Granchi *et al* (1999). Foi feita amplificação da região ITS e posterior reacção de amplificação com *primers* específicos para determinada espécie de acordo com o tamanho do amplicão. Foram utilizados *primers* desenvolvidos no laboratório no âmbito de outros projectos. O PCR-RFLP da região ITS demonstrou ser uma técnica eficaz na identificação e monitorização de comunidades de leveduras vînicas. No entanto, a utilização de *primers* específicos para as diferentes espécies é uma

abordagem que permite obter resultados de forma mais rápida e objectiva. O que confere a esta ferramenta elevado potencial de análise, pelo que se utilizou neste estudo (figura 5).

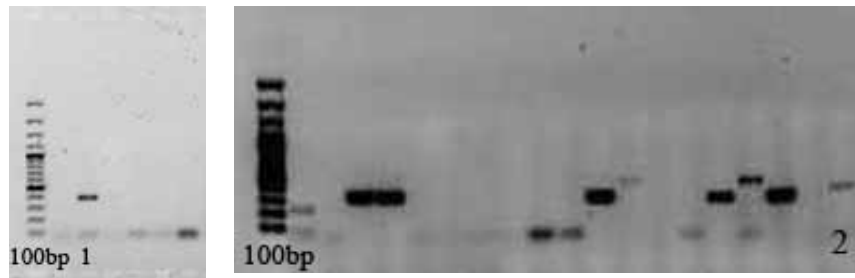


**Figura 5 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com *primers* específicos, separados em gel de agarose a 2%. A – amostras amplificadas com primer específico de *H. uvarum*. B - Amostras amplificadas com primer *I. terricola*. C- Amostras amplificadas com primer *S. cerevisiae*. Os marcadores de peso molecular usados foram o GeneRuler 100bp DNA Lader Plus (#SM053) e GeneRuler 50 bp DNA Lader (#SM033) da Fermentas.**

Após a identificação preliminar das espécies com *primers* específicos foram seleccionadas amostras correspondentes a todas as espécies identificadas e foi feita sequenciação da região 26S para validação de resultados. Os resultados da sequenciação, no formato fasta, foram analisados através de *blast* na base de dados GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A utilização dos *primers* específicos permitiu identificar as seguintes espécies: *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *I. terricola*, *I. orientalis*, *D. bruxellensis*, *D. hanseni*, *M.pulcherrima*, e *S. ludwigii*, mas a sequenciação permitiu fazer algumas correcções. A identificação das espécies *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *I. terricola* e *I. orientalis* foi suportada pelos resultados de sequenciação.

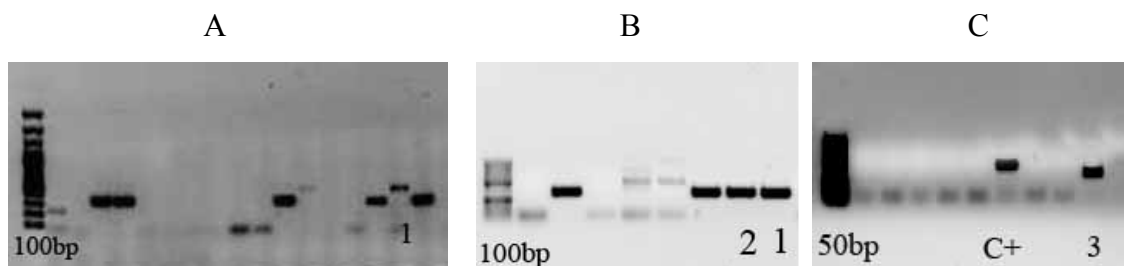
As amostras identificadas como *D. hanseni*, BTR2C\_20 (1) e BT3C\_33 (2) (figura 6), foram identificadas por sequenciação como *Zygoascus meyreae/hellenicus* e *C. railenensis* respectivamente. O que significa que este par de *primers* terá que ser optimizado para eliminar a hibridação não específica.





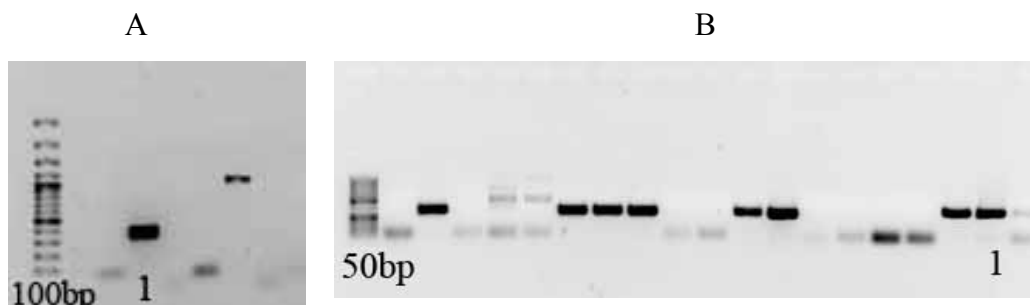
**Figura 6 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com *primers* específicos, separados em gel de agarose a 2%. 1 - Amostra BTR2C\_20 amplificada com *primers* específico de *D. hanseni*. 2 - BT3C\_33 amplificada com *primer D. hanseni*. O marcador de peso molecular usado foi o GeneRuler 100bp DNA Lader Plus (#SM053) da Fermentas.**

A amostra BB3C\_57 (1) foi identificada como *S. ludwigii*, no entanto os resultados de sequenciação identificaram-na como sendo *H. uvarum*. Assim outras três amostras identificadas inicialmente como *S. ludwigii*, BB3C\_54 (2) e BBi1C\_44 (3), foram também testadas com o par de *primers de H. uvarum*. Foi possível observar diferenças na amplificação com os dois pares de *primers* acima referidos (figura 7), sendo que o *primer H. uvarum* produz bandas com melhor definição.



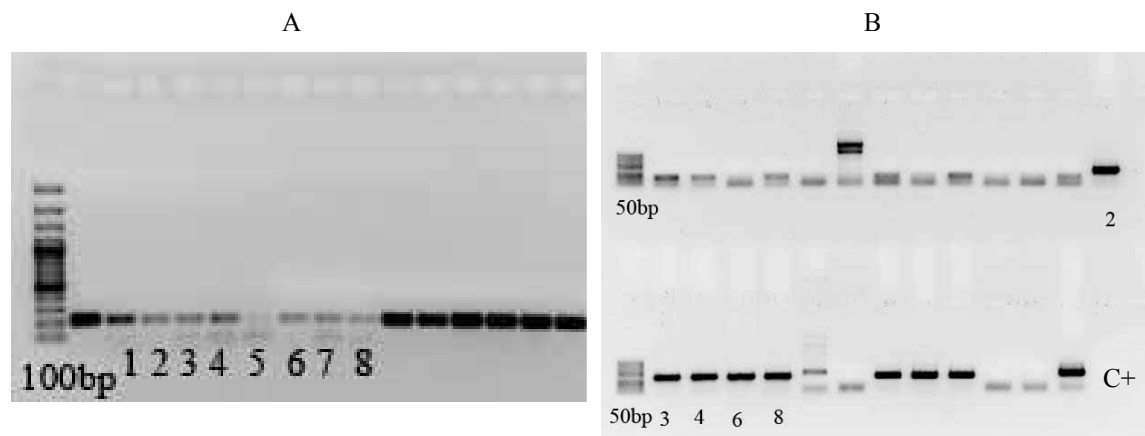
**Figura 7 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com *primers* específicos, separados em gel de agarose a 2%. A - BB3C\_57 (1) amplificada com *primers* específicos para *S. ludwigii*. B e C- Amostras BB3C\_57 (1), BB3C\_54 (2) e BBi1C\_44 (3), amplificadas com *primers* específicos para *H. uvarum*. É possível verificar que houve amplificação com os dois pares de *primers*, no entanto os resultados da amplificação com *primers* específicos de *H. uvarum* apresentaram melhor definição no gel de agarose. Os marcadores de peso molecular usados foram o GeneRuler 100bp DNA Lader Plus (#SM053) e GeneRuler 50 bp DNA Lader (#SM033) da Fermentas.**

A amostra BT2C\_01 foi identificada como *D. bruxellensis* através da utilização de *primers* específicos, no entanto sequenciação do rDNA mostrou que se tratava de *I. terricola*. A amplificação com o primeiro par de *primers* para *D. bruxellensis* forneceu bons resultados, o que sugere que este par de *primers* precisa de ser ajustado, uma vez que amplificou e produziu bandas com boa definição com DNA de outra espécie (figura 8), no caso *I. terricola*.



**Figura 8 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com *primers* específicos, separados em gel de agarose a 2%.** A - BT2C\_01 amplificada com *primers* específicos para *D. bruxellensis*. B - Amostra BT2C\_01 amplificada com *primers* específicos para *I. terricola*. É possível verificar que a amostra foi amplificada com sucesso pelos dois tipos de *primers*. Os marcadores de peso molecular usados foram o GeneRuler 100bp DNA Lader Plus (#SM053) e GeneRuler 50 bp DNA Lader (#SM033) da Fermentas.

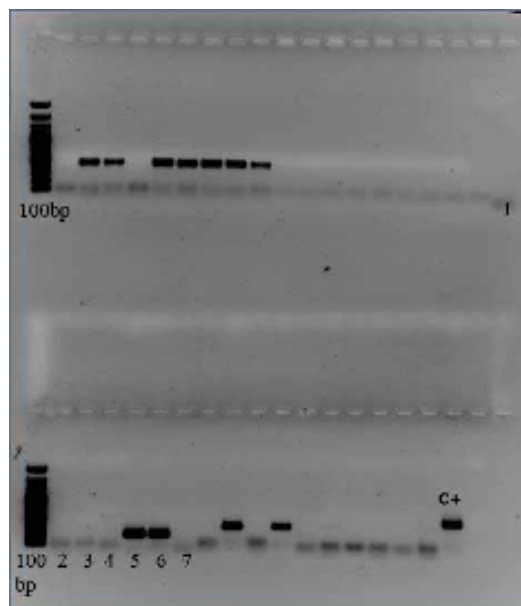
No que diz respeito às amostras identificadas como *M. pulcherrima*, algumas apresentaram uma banda no gel muito mais tênue que as restantes, BB2C\_05, BB2C\_06, BB2C\_13, BB2C\_14, BB2C\_16, BB2C\_17, BB2C\_19 e BB2C\_20 (1-8) (figura 9). As amostras 1, 5 e 7 foram sequenciadas e identificadas como *I. terricola*. As restantes foram posteriormente amplificadas com o par de *primers* *I. terricola* e analisadas em gel de agarose.



**Figura 9 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com *primers* específicos, separados em gel de agarose a 2%.** A - Amostras BB2C\_05 (1), BB2C\_06 (2), BB2C\_13 (3), BB2C\_14 (4), BB2C\_16 (5), BB2C\_17 (6), BB2C\_19 (7) e BB2C\_20 (9) amplificadas com *primers* específicos *M. pulcherrima*. É possível verificar que as amplificações com o segundo par de *primers* apresentaram maior qualidade, qualidade visível no gel B. Os marcadores de peso molecular usados foram o GeneRuler 100bp DNA Lader Plus (#SM053) e GeneRuler 50 bp DNA Lader (#SM033) da Fermentas.

Para algumas amostras não foi possível discriminar os isolados ao nível de espécie. Para os isolados BT2C\_23, BB2C\_04, BT1C\_13 e BT2C\_25 não foi possível identificá-los através do grupo de *primers* específicos existente no laboratório, pelo que foi feita amplificação e sequenciação da região 26S. Os resultados de sequenciação só permitiram identificar BT2C\_23 como *Candida spp.*, e BB2C\_04, BT1C\_13 e BT2C\_25 como

*Metschnikovia spp.* Ainda assim, estas amostras foram testadas com os *primers* existentes para estes géneros. Na figura 10 os poços 1, 2, 3, e 4 correspondem ao isolado BT2C\_23 amplificado com *primers* de *C. cantarelli*, *C. vini*, *C. stellata* e *C. vanderwaltii* respectivamente. Houve amplificação da amostra do poço 4, pelo que este isolado deverá ser uma espécie próxima de *C. vanderwaltii* (figura10). Relativamente aos outros isolados foram testados com o par de *primers* de *M. pulcherrima* (poços 5, 6 e 7 - ver figura 10). BT2C\_25 e BT1C\_13 amplificaram com sucesso pelo que devem ser espécies muito próximas de *M. pulcherrima*, a amostra BB2C\_04 não amplificou.



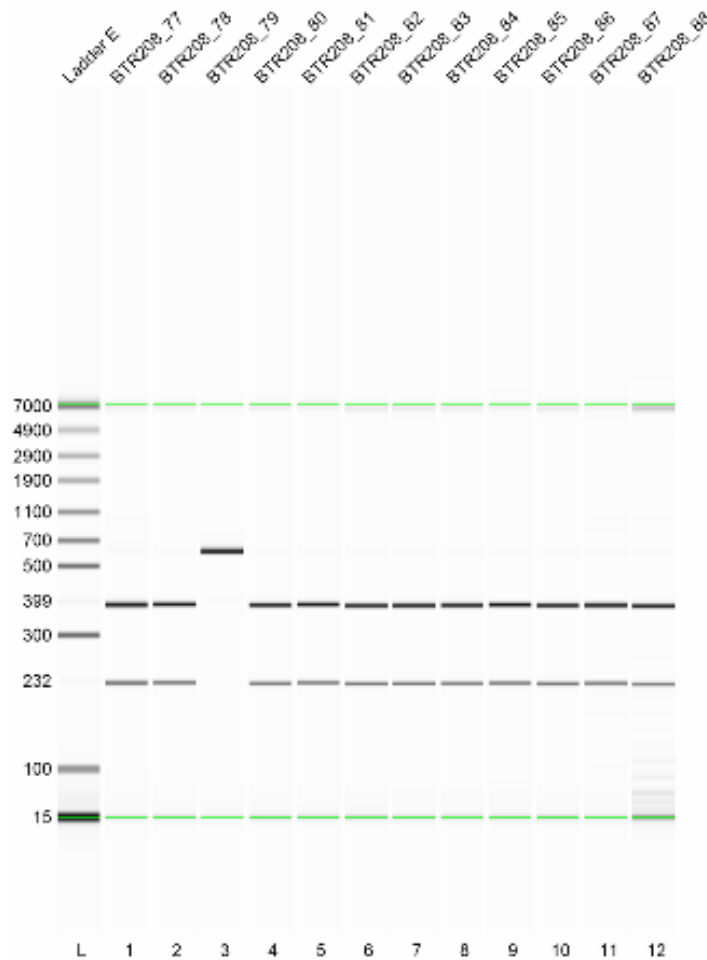
**Figura 10 – Produtos de amplificação de DNA por PCR com *primers* específicos, separados em gel de agarose a 2 %.** Amostra BT2C\_23 amplificada com *primers* *C. cantarelli* (1), *C. vini* (2), *C. stellata* (3) e *C. vanderwaltii* (4), é possível observar uma banda muito tênue correspondente à amplificação com *primers* para *C. vanderwaltii*. Amostras BB2C\_04, BT1C\_13 e BT2C\_25 amplificadas com *primer* específico para *M. pulcherrima* (5-7), foi possível verificar amplificação para as primeiras duas. O marcador de peso molecular usado foi o GeneRuler 100bp Lader Plus (#SM053) da Fermentas.

A identificação de alguns isolados não foi possível, usando os *primers* específicos, pelo que foi efectuada sequenciação da região 26S. Deste modo foi possível efectuar a identificação das espécies *C. glabrata*, *C. californica*, *C. railenensis*, *H. osmophila*, *Z. bailii* e *P. membranaefaciens*.

Verificou-se no decorrer do estudo que alguns dos *primers* disponíveis tem de ser optimizados para eliminar hibridação inespecífica. No entanto, a utilização de *primers* específicos para cada espécie revelou-se uma abordagem positiva, na medida em que reduziu o tempo de análise por amostra, e permitiu conjugar os resultados com os do estudo da região ITS. Tal garantiu identificações rápidas e precisas.

*S. cerevisiae*

De acordo com Antunovics e colaboradores (2005) a análise de RFLP do gene *MET2* permite distinguir as espécies *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. bayanus*. A endonuclease *PstI* cliva o gene *MET2* de *S. bayanus*, *EcoRI* cliva o gene *MET2* de *S. cerevisiae* e nenhuma destas corta o gene *MET2* de *S. paradoxus*. A figura 11 mostra resultados da digestão com *EcoRI*. Este método foi aplicado a todas as amostras do final de fermentação, uma vez que se esperava uma elevada percentagem de *Saccharomyces*. As amostras negativas neste método são não-*Saccharomyces* e foram estudadas através da análise da região ITS.



**Figura 11 - Exemplo de perfil de bandas de DNA amplificado de uma região do gene *MET2* após digestão com a enzima de restrição *EcoRI*.** As amostras que apresentaram duas bandas foram identificados como *S. cerevisiae*. A amostra que neste caso tem apenas uma banda pertence ao grupo *sensu strictu* mas não é *S. cerevisiae* uma vez que o produto da amplificação do gene *MET2* não é clivado pela enzima de restrição *EcoRI*.

## 2. Fermentação Laboratorial

### 2.1. Vinhas Monocasta

Nas vinhas monocasta todas as réplicas de Touriga Nacional atingiram o final de fermentação, no caso da Baga todas as réplicas atingiram o final de fermentação, nas réplicas da Baga uma delas não completou o processo. Quatro das sete réplicas de Maria Gomes e Bical e três das sete réplicas de Tinta Roriz atingiram o final de fermentação.

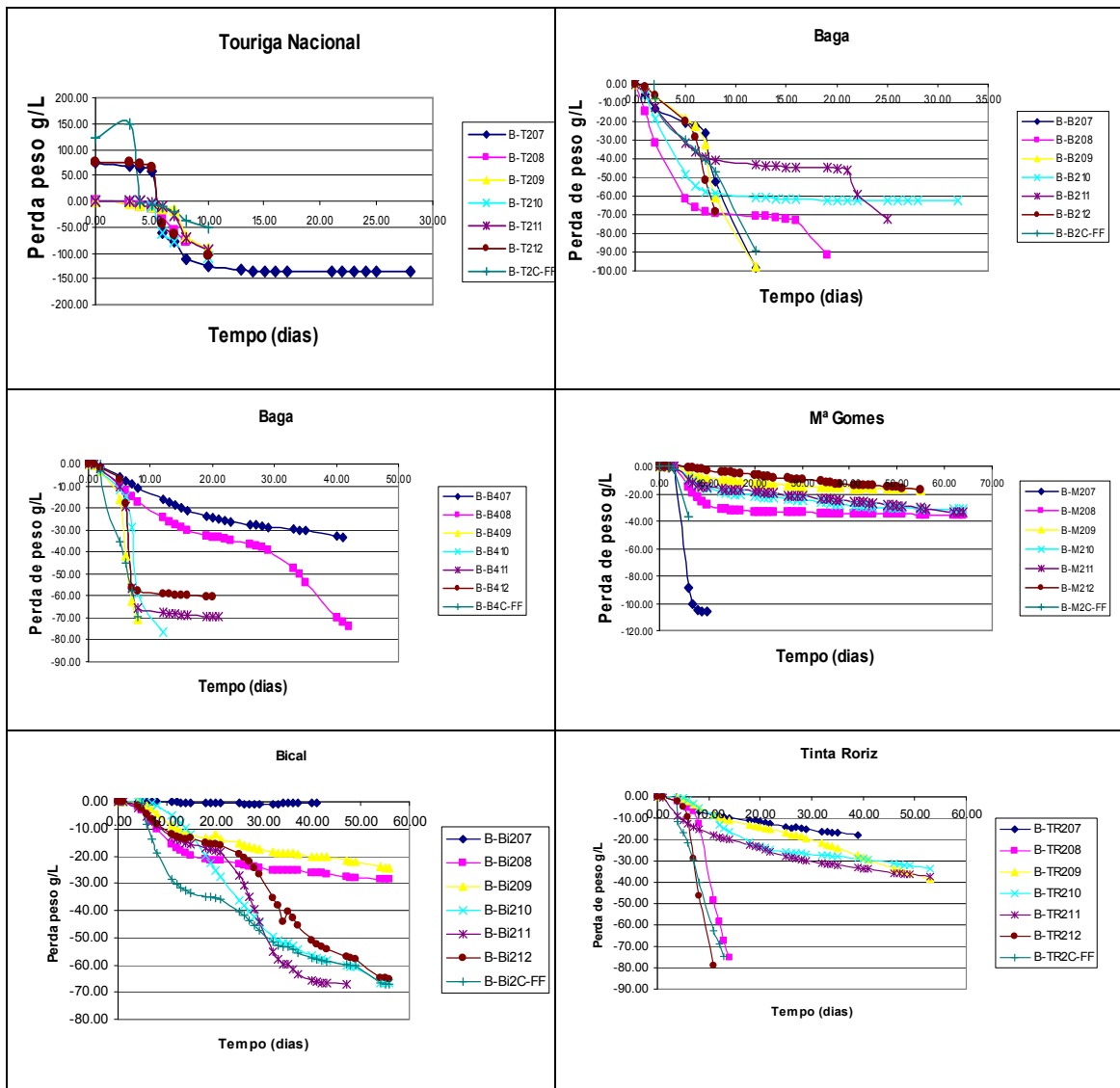
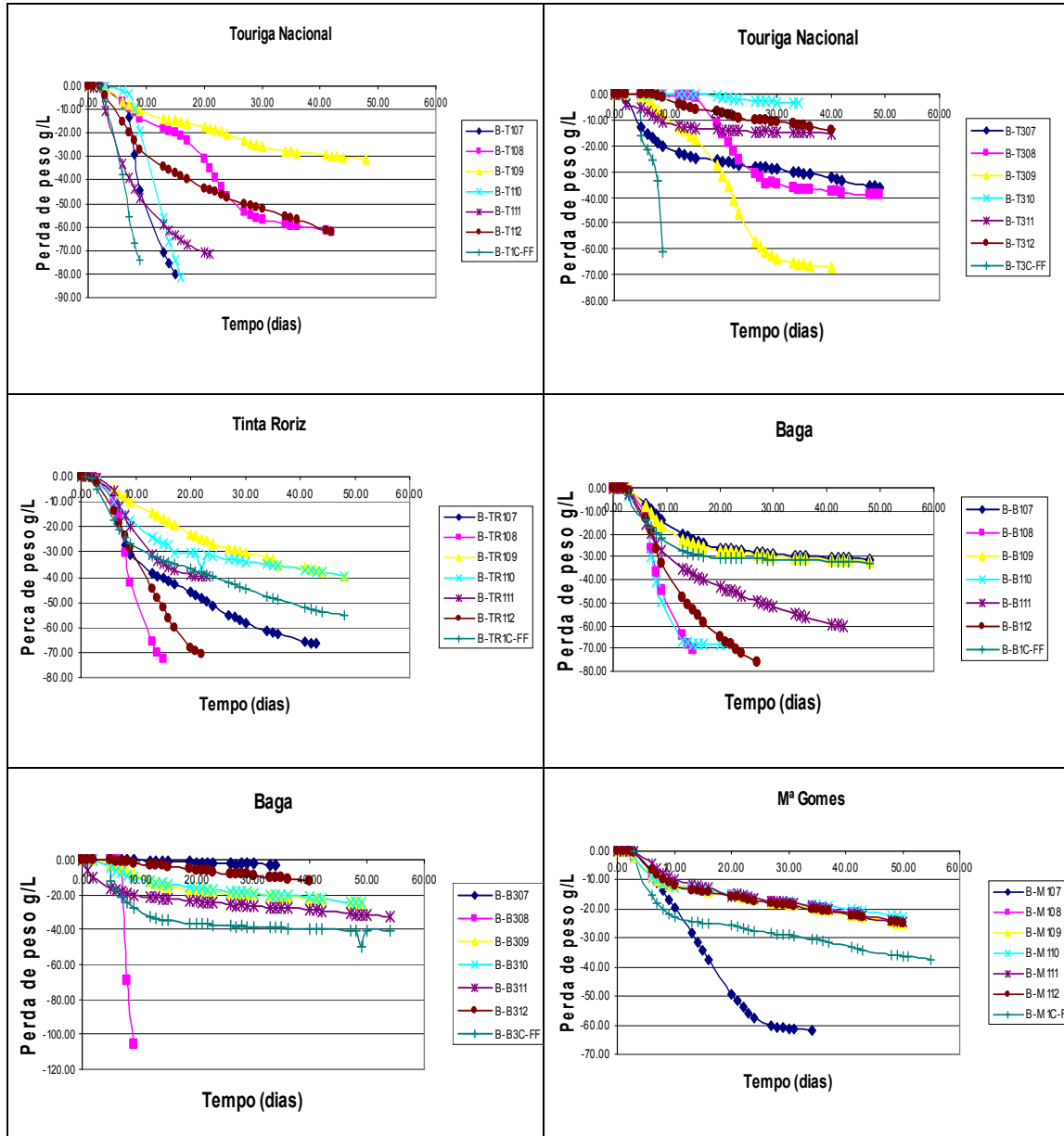
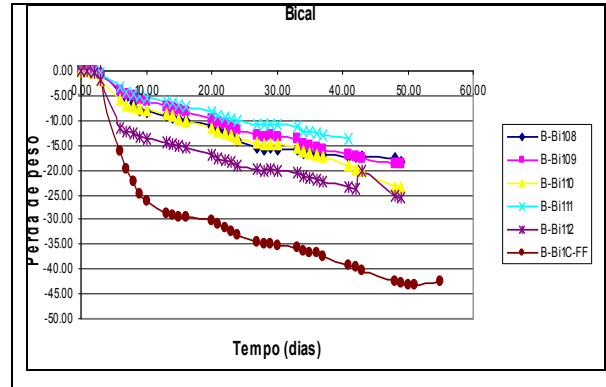


Figura 12 - Perda de peso dos mostos ao longo da fermentação, referentes às castas de vinhas monocasta. Algumas réplicas terminaram o processo fermentativo ao passo que outras não foram capazes de o fazer. As réplicas não tiveram um tempo de fermentação uniforme, tendo variado entre 10 até aproximadamente 50 dias.

## 2.2. Vinha Mista

Na vinha mista, Touriga Nacional atingiu o final de fermentação com seis de sete réplicas, e na vinha-3 fermentaram quatro de sete réplicas. Também fermentaram quatro de sete réplicas de Tinta Roriz e Baga da vinha-1. Da vinha-3 de Baga apenas duas réplicas fermentaram. E por fim, de Maria Gomes e Bical apenas uma réplica terminou o processo de fermentação.

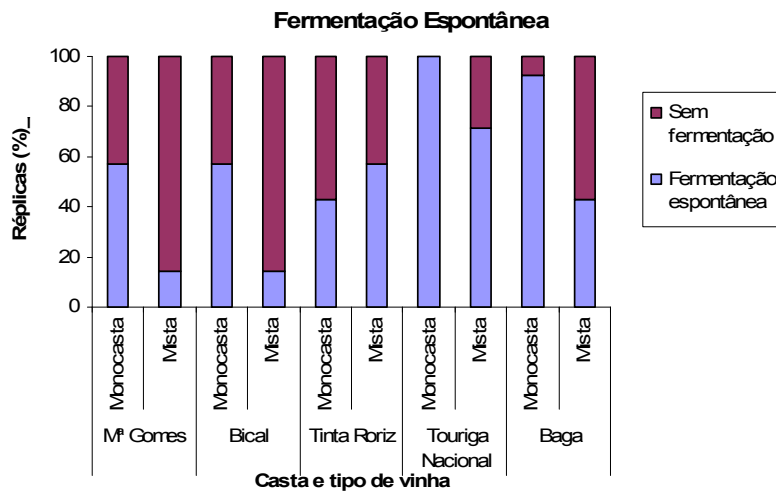




**Figura 13 - Perda de peso dos mostos ao longo da fermentação, referentes às castas da vinha mista.** Algumas réplicas terminaram o processo fermentativo ao passo que outras não foram capazes de o fazer. O tempo de fermentação entre as réplicas não foi uniforme, tendo este variado entre 10 e 50 dias.

### 2.3. Análise Geral

Todas as réplicas da casta Tinta Roriz das vinhas monocasta fermentaram. À excepção de Touriga Nacional, da vinha isolada obtiveram-se maior número de réplicas que fermentaram. De um modo geral, os mostos das castas tintas fermentaram com mais frequência do que os mostos das castas brancas. E a fermentação decorreu, de um modo geral, mais rapidamente nas vinhas monocasta que na vinha mista.



**Figura 14 - Resumo das réplicas que concluíram a fermentação.** Existiu uma diferença entre as vinhas monocasta e a vinha mista; nas primeiras verificou-se que maior número de réplicas fermentou. Nas castas brancas, menor número de réplicas terminou a fermentação

A incapacidade de completar a fermentação dos mostos, ou fermentação lenta dos mesmos, (mais de 10 dias), resulta numa diminuição do consumo de açúcar por *S. cerevisiae*, e conseqüentemente numa menor produção de etanol. Esta diminuição do consumo de açúcar pode ser multifactorial, desde desequilíbrios nutricionais, pH extremo,

fraca toler\u00e2ncia ao \u00e1lcool e inibidores naturais, e ainda a presen\u00e7a de factores *killer*, que s\u00e3o toxinas produzidas por leveduras como *Hansenula* e *Kluyveromyces* (Fleet, 2003).



### **3. Variação interespecífica de acordo com a casta e com o momento da fermentação.**

#### ***3.1. Fermentações espontâneas***

##### *3.1.1. Vinhas Monocasta*

As estirpes isoladas das vinhas monocasta, para todas as amostras de mosto inicial, foram identificadas como *H. uvarum* (73%), *I. terricola* (18%), *M. pulcherrima* (5%), foram também identificados dois isolados de *Candida spp*, dois isolados como *Metschnikowia spp* e um de *Zygoascus meyeriae/hellenicus*. Em início de fermentação foram identificados *H. uvarum* (93%), *I. terricola* (6%), *M. pulcherrima* (1%). No final de fermentação identificaram-se em 84% dos casos *S. cerevisiae*, 10% *C. glabrata* e 6% das amostras não foram identificadas (figura 15).

*H. uvarum* esteve presente no mosto inicial de todas as castas correspondendo a 100% em Bical e em Touriga Nacional, 86% em Maria Gomes, 92% em Tinta Roriz e 81% em Baga. A predominância desta levedura aumentou no início de fermentação atingindo 100% em Bical e Touriga Nacional, 93% e 92% em Maria Gomes e Tinta Roriz respectivamente, e por fim 81% em Baga. Contudo, no final de fermentação não foi identificada em nenhuma das castas. A presença desta espécie de acordo com o momento de fermentação, está de acordo com os resultados esperados pois é uma das espécies frequentes nas fases iniciais da fermentação (Baleiras Couto *et al*, 2005; Fleet, 2003).

*I. terricola* esteve presente no mosto inicial de 43% de Baga, 29% de Touriga Nacional, 14% de Maria Gomes e 4% de Tinta Roriz. No início de fermentação manteve-se com 19 % em Baga, 7% em Maria Gomes e 4% em Tinta Roriz, contudo, no final de fermentação não foi identificada em nenhuma das castas. A identificação desta levedura está de acordo com o esperado, visto que é uma das espécies frequentes nas fases iniciais da fermentação (Baleiras Couto *et al*, 2005; Fleet, 2003).

*M. pulcherrima* esteve presente no mosto inicial de apenas duas castas Touriga Nacional e Baga com 21% e 4% respectivamente; em início de fermentação surgiu apenas numa casta onde não tinha sido detectada previamente, surgiu com 4% em Tinta Roriz. No final de fermentação não foi identificada em nenhuma das castas.

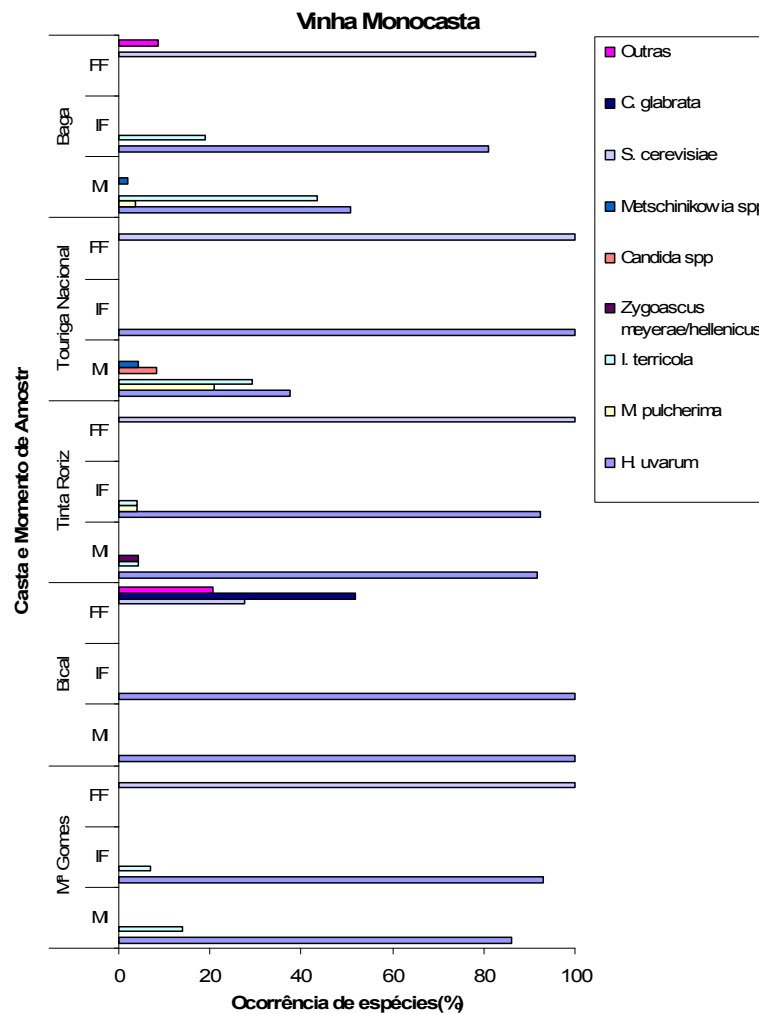
*C. glabrata* correspondeu a 52% dos isolados de final de fermentação da casta Bical.

*S. cerevisiae* representou 100% dos isolados no final de fermentação nas castas Maria Gomes, Tinta Roriz e Touriga Nacional. Nas restantes castas esta espécie também foi identificada, sendo que 91% dos isolados de Baga, e 28% de Bical foram identificados como pertencentes a esta espécie.

*Candida spp*, *Zygoascus meyeriae/hellenicus* e *Metschnikowia spp* surgiram apenas no mosto inicial de Touriga Nacional, Tinta Roriz e Baga respectivamente, com presença igual ou inferior a 1%. *Z. meyeriae* é uma espécie que está descrita na literatura como fazendo parte da microflora do início de fermentação (Baleiras Couto *et al*, 2005)

*H. uvarum* foi a única espécie que foi identificada em todas as castas no mosto inicial e início de fermentação, seguida por *I. terricola* que só não foi isolada a partir de Bical e início de fermentação de Touriga Nacional. No final de fermentação, *S. cerevisiae* também esteve presente em todas as castas, tendo sido a única espécie identificada neste fase. Excepto na casta Bical, onde coexistia com outra espécie, *C. glabrata*, tendo esta sido dominante. As castas tintas (Tinta Roriz, Touriga Nacional, Baga) apresentaram maior diversidade microbiana do que as castas brancas (Maria Gomes, Bical)

À medida que o processo de fermentação progrediu houve diminuição da diversidade microbiana e um domínio claro de *S. cerevisiae*. Em conclusão, de acordo com o esperado, as espécies *não-Saccharomyces* demonstraram ser predominantes no mosto e no início de fermentação e *S. cerevisiae* foi dominante no final de fermentação.



**Figura 15 - Espécies identificadas nas vinhas monocasta nas castas Maria Gomes, Bical, Tinta Roriz, Touriga Nacional e Baga, no Mosto inicial e Início e Final de Fermentação.** M.I.-Mosto inicial, I.F.- Início de Fermentação, FF – Final de Fermentação. Foram encontradas as espécies *H. uvarum*, *I. terricola*, *M. pulcherrima*, *Candida spp*, *Metschnikowia spp*, *Zygoascus meyeriae/hellenicus*, *S. cerevisiae* e *C. glabrata*. Verificou-se uma diminuição na diversidade ao longo das fases da fermentação.

### 3.1.2. Vinha Mista

Na vinha mista a globalidade das amostras de mosto inicial foram identificadas como *H. uvarum* (58%), *I. terricola* (19%) e *M. pulcherrima* (13%), foram ainda identificadas três amostras como *Metschnikowia spp.* Em início de fermentação foram identificadas *H. uvarum* (89%), *I. terricola* (6%), *I. orientalis* (4%), dois isolados de *C. railenensis*, e um de *C. californica*. No final de fermentação 37% dos isolados foram identificados como *S. cerevisiae*, 5% como *P. membranifaciens* e 4% como *Z. bailii*. Foram ainda identificados três isolados como *H. osmophila*, dois como *Saccharomyces spp* e dois de *C. californica* (ver figura 16). Para 39% das amostras não foi possível identificar as espécies com os primers específicos disponíveis e por limitações de tempo os dados de sequenciação não foram incluídos pois serão realizados numa fase posterior.

*H. uvarum* esteve presente no mosto inicial de todas as castas correspondendo a 72% em Touriga Nacional, 66% em Baga, 57% em Bical, 52% em Maria Gomes e 50% em Tinta Roriz. Esta espécie continuou a ser predominante no início da fermentação, atingindo 100% em Maria Gomes, 97% em Bical, 93% em Tinta Roriz, 87% em Baga e 79% em Touriga Nacional. No final de fermentação identificou-se apenas uma estirpe de *H. uvarum* em mosto de Touriga Nacional, o que está de acordo com o descrito na literatura nas fases iniciais da fermentação (Baleiras Couto *et al*, 2005; Fleet, 2003).

*M. pulcherrima* esteve presente em todas as castas excepto Baga, contribuindo com 48%, 13%, 9% e 4% dos isolados de mosto inicial de Maria Gomes, Bical, Tinta Roriz e Touriga Nacional respectivamente, conforme documentado (Baleiras Couto *et al*, 2005; Fleet, 2003). No início e final de fermentação, esta espécie, não foi identificada em nenhuma das castas.

*I. terricola* esteve presente no mosto inicial de Baga, Bical, Touriga Nacional e Tinta Roriz, correspondendo a 34%, 30%, 19% e 14% respectivamente. A sua presença diminuiu no início de fermentação, estando ausente em Bical, e mantendo-se com 13%, 14% e 4% respectivamente. No final de fermentação, esta espécie não foi identificada em nenhuma das castas. A identificação desta levedura está de acordo com o esperado, visto que é uma das espécies frequentes nas fases iniciais da fermentação (Baleiras Couto *et al*, 2005; Fleet, 2003).

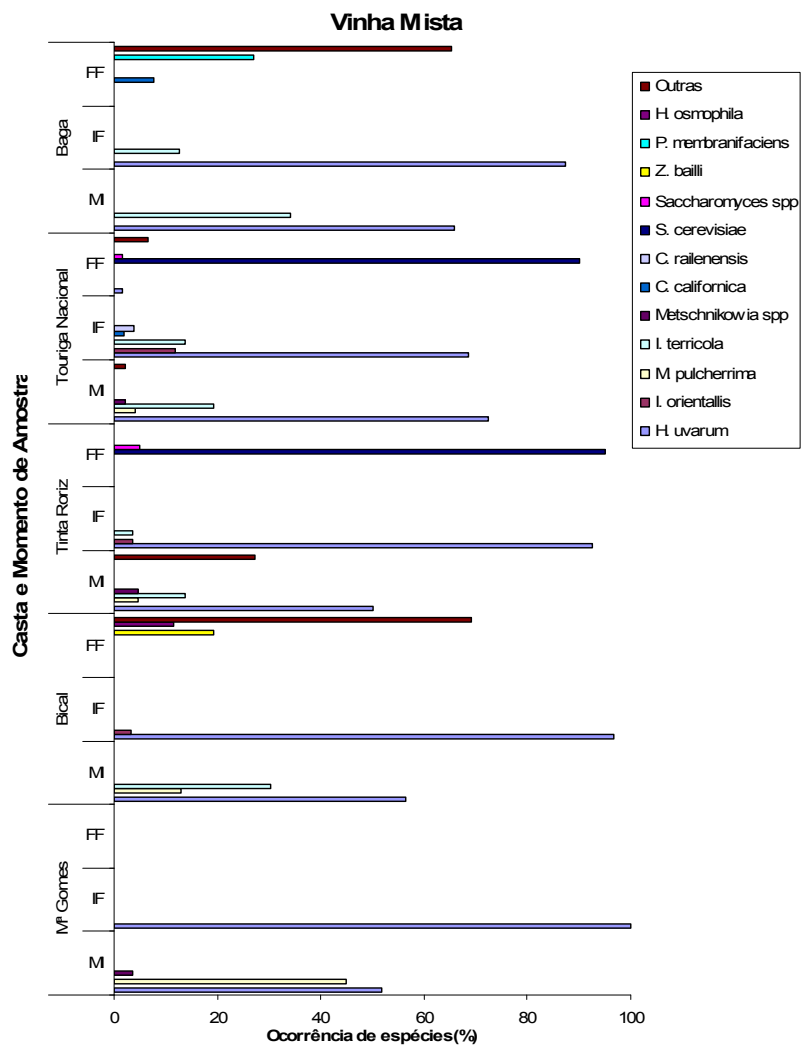
*I. orientalis* esteve presente apenas no início de fermentação de Bical e Tinta Roriz, correspondendo a 3% e 4% dos isolados. *C. railenensis*, *C. stellata* e *Metschnikowia spp*

surgiram apenas em isolados de mosto inicial, com presença igual ou inferior a 5%. *C. californica* esteve presente no início de fermentação de Touriga Nacional e no final de fermentação de Baga.

*S. cerevisiae* só foi identificada em duas castas e representou 95% e 91% dos isolados no final de fermentação nas castas Tinta Roriz e Touriga Nacional, respectivamente. No final de fermentação foram identificadas outras espécies que não surgiram nos outros momentos de amostragem, nomeadamente *Z. bailii* e *H. osmophila* em Bical, e também de *P. membranifaciens* em Baga.

*H. uvarum* foi a única espécie que esteve presente em todas as castas no mosto inicial e início de fermentação, a seguida por *I. terricola* que só não foi isolada de Maria Gomes, e início de fermentação de Bical.

A casta Touriga Nacional apresentou maior diversidade microbiana no mosto inicial e início de fermentação, seguida de Tinta Roriz. Nos mostos de casta Bical foram identificadas *H. uvarum*, *M. pulcherrima* e *I. terricola*, no mosto inicial e *H. uvarum* e *I. orientalis* no início de fermentação. Em Maria Gomes foram detectadas *H. uvarum*, *M. pulcherrima* e *I. orientalis* no mosto inicial e apenas *H. uvarum* no início de fermentação e por fim em Baga identificaram-se *H. uvarum* e *I. terricola* nos dois momentos de amostragem. Na vinha mista houve diminuição da diversidade microbiana na transição do mosto inicial para o início de fermentação, por outro lado, verificou-se uma grande variação nas espécies presentes ao longo das várias fases de fermentação. As espécies encontradas no início da fermentação não estiveram presentes no final de fermentação. Nesta fase foram identificadas *S. cerevisiae*, *Saccharomyces spp.*, *H. osmophila*, *P. membranifaciens*, *C. glabrata*, *C. californica* e *Z. bailii*.



**Figura 16 - Espécies identificadas na vinha mista nas castas Maria Gomes, Bical, Tinta Roriz, Touriga Nacional e Baga, no Mosto inicial e Início e Final de Fermentação.** M.I.-Mosto inicial, I.F.- Início de Fermentação, FF – Final de Fermentação. Foram encontradas as espécies *H. uvarum*, *I. orientalis*, *M. pulcherrima*, *I. terricola*, *Metschnikowia spp*, *C. railenensis*, *C. californica*, *S. cerevisiae*, *Saccharomyces spp*, *Z. bailii*, *P. membranifaciens* e *H. osmophila*. Verificou-se uma diminuição na diversidade ao longo das fases da fermentação.

### 3.1.3. Casta Baga



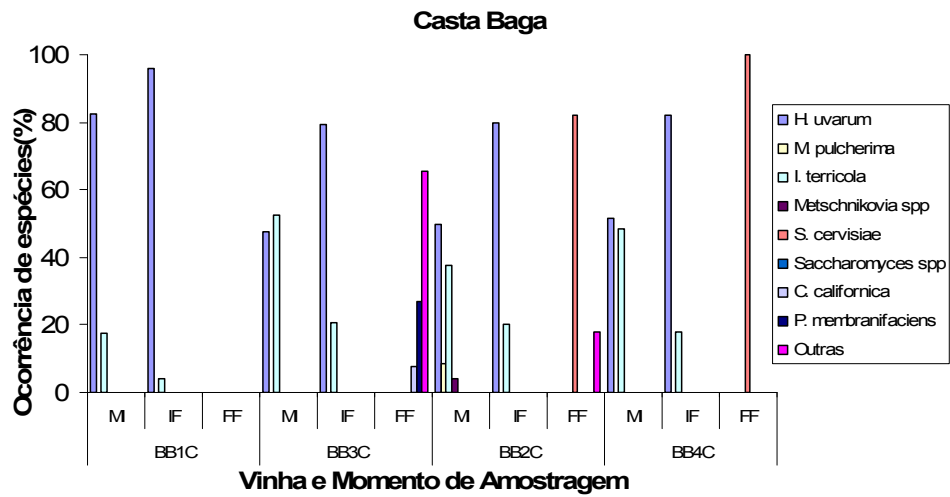
Figura 17 - Folha e cacho de uvas da casta Baga.

A casta Baga é um cultivar de *Vitis vinifera* característico da região vitivinícola da Bairrada (Instituto da Vinha e do Vinho - <http://www.ivv.min-agricultura.pt/vinhos/index.html>). A baga é uma uva pequena de película grossa, que amadurece tarde e tem acidez elevada. Pode não amadurecer

completamente e apodrecer com as primeiras chuvas de Setembro. Representa cerca de 90% de todos os vinhos da região (Domine A., 2006). Por estas razões, foram feitas amostragens em duplicado de Baga na vinha mista e duas amostragens em vinha monocasta.

*H. uvarum* e *I. terricola* estiveram presentes em todos os locais de colheita no mosto inicial e início de fermentação (figura 18). *H. uvarum* foi a espécie mais representativa e dominante da fase de início de fermentação. A vinha isolada 2 foi a exceção, pois tinha no mosto inicial as duas espécies referidas anteriormente e ainda *M. pulcherrima* e *Metschnikowia spp.* No final de fermentação *S. cerevisiae* esteve presente em BB4C e BB2C, sendo dominante.

De um modo geral a vinha mista apresentou maior diversidade microbiana, e foi possível identificar *S. cerevisiae* no final de fermentação. Nas vinhas monocasta, BB1C não atingiu o final de fermentação. BB3C atingiu o final de fermentação mas a espécie identificada não foi *S. cerevisiae*, mas sim *C. californica* e com maior predominância *P. membranifaciens*, no entanto para grande parte dos isolados não foi possível identificá-los com os *primers* específicos de espécies disponíveis. E por limitações de tempo os dados de sequenciação não foram incluídos pois serão realizados numa fase posterior.



**Figura 18 - Espécies encontradas nas várias vinhas de Baga.** Os resultados são relativos aos três momentos de amostragem, Mosto inicial e Início e Final de Fermentação. M.I.-Mosto inicial, I.F.- Início de Fermentação, FF – Final de Fermentação. BB1C e BB3C vinha mista, BB2C e BB4C vinhas monocasta. Foram encontradas as espécies *H. uvarum*, *M. pulcherima*, *I. terricola*, *Metschnikovia spp*, *S. cerevisiae*, *Saccharomyces spp*, *C. californica* e *P. membranifaciens*.



### 3.1.4. 2006 vs 2007 – Estudo durante dois anos

Em 2006 foi realizado um estudo idêntico ao descrito nesta dissertação. Os locais de amostragem e as castas estudadas foram os mesmos, pelo que foi possível comparar os resultados dos dois estudos. Esta comparação é descrita abaixo.

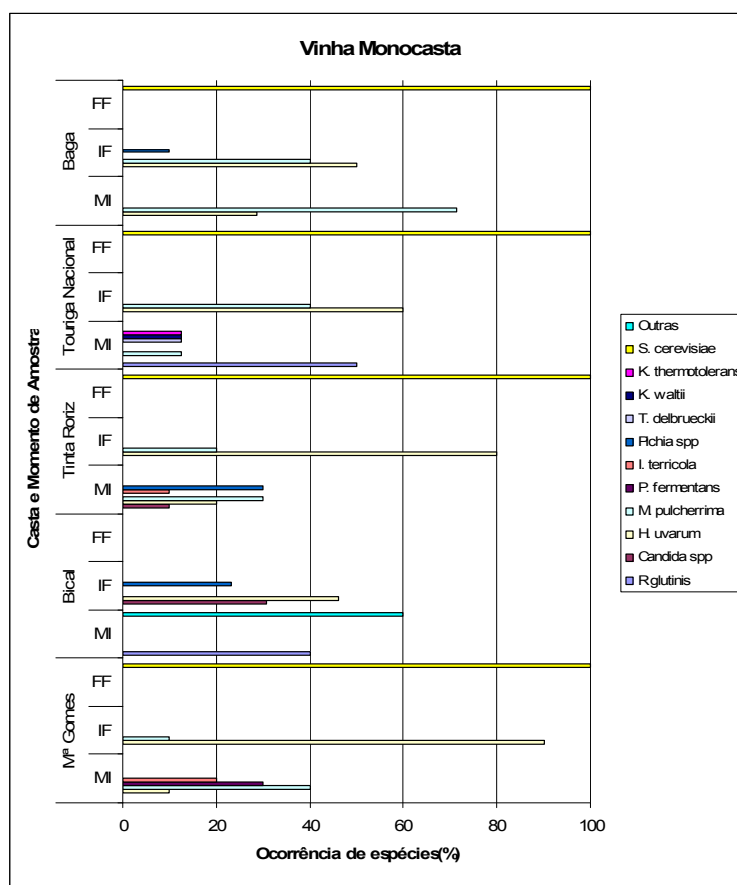
#### 3.1.4.1. Vinhas Monocasta 2006

Nos mostos das vinhas monocasta Maria Gomes, Tinta Roriz e Baga encontrou-se *H. uvarum* no mosto inicial com representatividades de 10%, 20% e 20% dos isolados obtidos por casta, respectivamente. Esta espécie tornou-se predominante no início de fermentação e encontrou-se em todas as castas, constituindo 90% dos isolados obtidos em Maria Gomes, 60% em Bical, 80% em Tinta Roriz, 60% em Touriga Nacional e 50% em Baga (ver figura 19).

*M. pulcherrima* também revelou elevada frequência nas várias castas excepto em Bical, encontrando-se tanto no mosto inicial como no início de fermentação. Em Maria gomes esta levedura representou 40% das leveduras isoladas no mosto inicial e 10% no início da fermentação, em Tinta Roriz constituiu 30% no mosto inicial e 20% no início de fermentação. Na Baga representou 50% no mosto inicial e 40% no início de fermentação e em Touriga Nacional foi a única espécie que aumentou de frequência de *M. pulcherrima* contrariando a tendência demonstrada pelas restantes castas, constituindo esta levedura 12,5% dos isolados do mosto inicial e 40% das leveduras do início de fermentação.

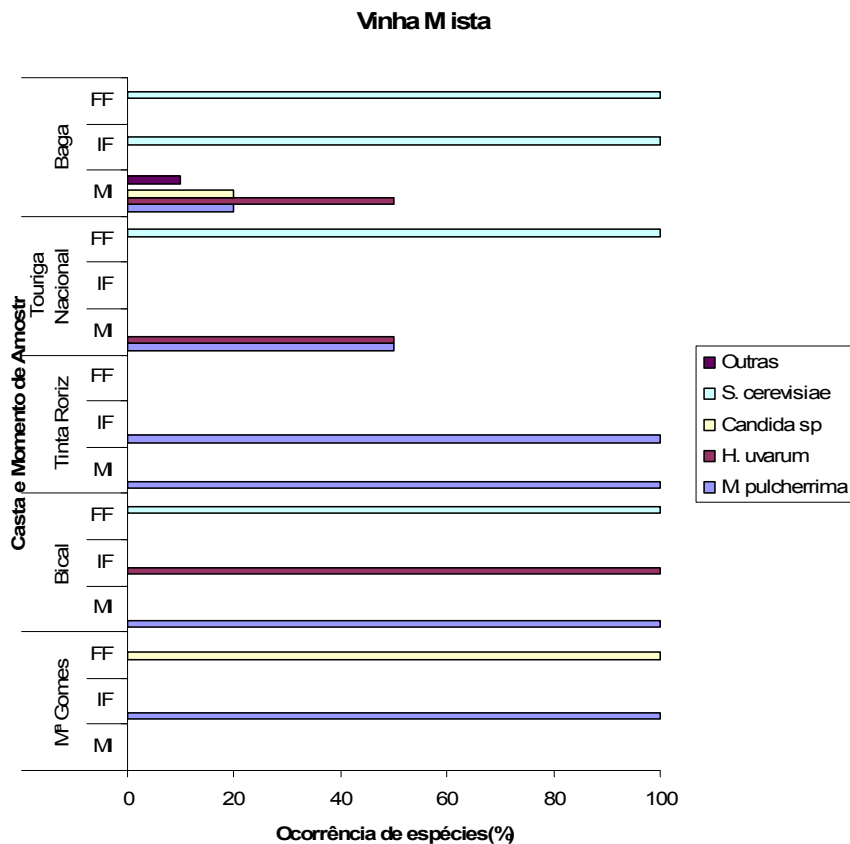
Relativamente às outras espécies, com menor representatividade, Maria Gomes apresentou 20% de *I. terricola* e 30% de *Pichia* no mosto inicial. Em Bical a diversidade no mosto inicial foi constituída em 40% por *R. glutinis* e 60% por fungos filamentosos, tendo 40% de *Candida* no início de fermentação. Quanto a Tinta Roriz o mosto inicial apresenta 10% de *I. terricola*, 30% de *Pichia* e 10% de *Candida*. Relativamente a Touriga Nacional a sua diversidade no mosto inicial foi constituída por 12,5% de *K. thermotolerans*, 12,5% de *K. waltii*, 50% de *R. glutinis* e 12,5% de *T. delbrueckii*. Finalmente, 30% dos isolados de mosto inicial de Baga pertenceram a *Pichia*, mas apenas 10% no início de fermentação.

O início de fermentação apresentou menor diversidade que o mosto inicial e *H. uvarum* foi a espécie dominante no início de fermentação, seguida por *M. pulcherrima* que também esteve presente em todas as castas, excepto Bical. Esta também foi a única casta que não atingiu o final de fermentação, tendo sido identificada *S. cerevisiae* em 100% dos isolados. Em termos da dinâmica populacional, observou-se uma diminuição da diversidade microbiana ao longo da fermentação e um aumento de *S. cerevisiae* com a evolução da fermentação.



**Figura 19 - Espécies encontradas nas vinhas monocasta, no Mosto inicial e Início e Final de Fermentação.** M.I.-Mosto inicial, I.F.- Início de Fermentação, F.F:- Final de fermentação. Foram encontradas as espécies *S. cerevisiae*, *K. thermotolerans*, *K. waltii*, *T. delbrueckii*, *Pichia spp*, *I. terricola*, *P. fermentans*, *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, *Candida spp* e *R. glutinis*. Dados referentes a 2006.

## 3.1.4.2. Vinha Mista 2006



**Figura 20 - Espécies encontradas na vinha mista no Mosto inicial e Início e Final de Fermentação.** M.I.-Mosto inicial, I.F.- Início de Fermentação, F.F.- Final de Fermentação. Dados referentes a 2006.

De mostos Maria Gomes foram isoladas apenas estirpes de *M. pulcherrima* no início da fermentação. Relativamente a Bical, 100% das leveduras identificadas no mosto inicial eram *M. pulcherrima*, e 100% das leveduras do início da fermentação pertenceram à espécie *H. uvarum*. A casta Tinta Roriz não mostrou alterações na predominância de espécies entre o mosto inicial e o início da fermentação, sendo 100% das leveduras *M. pulcherrima*. Mostos iniciais de Touriga Nacional continham 50% *H. uvarum* e 50% *M. pulcherrima*. Mostos de Baga tinham no início da fermentação 50% de *H. uvarum*, 20% de *M. pulcherrima*, 20% de *Candida* e 10% que não foi possível identificar (ver figura 20).

*S. cerevisiae* também foi isolada na casta Baga onde correspondeu a 100% dos isolados de início e final de fermentação, Foi também identificada nos finais de fermentação em mostos de Touriga Nacional e Bical. Na casta Maria Gomes a situação foi

diferente, pois 100% dos isolados eram de *Candida spp.* Os mostos da casta Tinta Roriz não terminaram a fermentação.

A fraca variabilidade e diversidade nas castas e entre as castas da vinha mista, poderá dever-se ao local de recolha ser o mesmo ou a tratamento químico das vinhas (Fugelsang and Edwards, 2007).

#### 3.1.4.3. Análise Geral

*H. uvarum* foi detectada em todas as castas nos mostos iniciais e de início de fermentação, independentemente do tipo de vinha. *I. terricola* foi também detectada com elevada frequência na fase inicial do processo fermentativo, foi isolada maioritariamente em mostos tintos de vinhas monocasta e mistas.. Relativamente ao final de fermentação, *S. cerevisiae* foi dominante especialmente nas vinhas monocasta onde esteve associada a todas as castas, excepto na casta Bical onde coexistiu com *C. glabrata*, tendo sido esta última dominante. *S. cerevisiae* só foi identificada em duas castas da vinha mista e representou 95% e 91% dos isolados no final de fermentação de mostos de Tinta Roriz e Touriga Nacional, respectivamente. Nos mostos de vinhas mistas, no final de fermentação, foram identificadas outras espécies que não surgiram nos outros momentos de amostragem. Foi o caso de *Z. bailii* e *H. osmophila* presentes em Bical, e também de *P. membranifaciens* presente em Baga.

No que diz respeito a *Candida spp.*, *Zygoascus meyerae/hellenicus* e *Metschnikowia spp* surgiram apenas no mosto inicial de Touriga Nacional, Tinta Roriz e Baga, respectivamente na vinha monocasta (<1%). Apesar de ter aparecido em baixo número, *Z. meyerae/hellenicus* está descrita na literatura como uma espécie das fases iniciais de fermentação (Baleiras Couto *et al*, 2005).

Foi possível observar uma diminuição da diversidade microbiana ao longo da fermentação, tendo mesmo ocorrido substituição das espécies. Observando os isolados identificados é possível verificar que as espécies encontradas no início já não estão presentes no final de fermentação. Nesta fase foram identificadas *S. cerevisiae*, *Saccharomyces spp.*, *H. osmophila*, *P. membranifaciens*, *C. glabrata*, *C. californica* e *Z. bailii*.

A análise comparativa dos resultados de 2006 e 2007 confirmou que as amostras de mosto inicial apresentaram menor diversidade em 2006 relativamente a este ano, e que, em 2006, apesar de *H. uvarum* ter sido isolada do mosto inicial só se tornou dominante no início de fermentação. Em 2006 foram identificadas espécies que não apareceram na amostragem de 2007, nomeadamente *K. thermotolerans*, *K. waltii*, *R. glutinis* e *T. delbrueckii*. Relativamente aos isolados de mosto inicial de 2006, *M. pulcherrima* foi uma das espécies predominantes juntamente com *H. uvarum*, mas em menor grau.

*S. cerevisiae* foi identificada no final de fermentação em todas as vinhas isoladas onde o processo fermentativo foi completado. Os mostos das vinhas mistas das castas Baga, Touriga Nacional e Bical foram fermentados exclusivamente por *S. cerevisiae*, no entanto Maria gomes foi fermentada por *Candida spp.*

Observou-se uma diminuição da diversidade microbiana ao longo do processo fermentativo e dominância de *S. cerevisiae* no final da fermentação. Ou seja, as espécies não-*Saccharomyces* demonstraram ser predominantes no mosto e no início de fermentação e *S. cerevisiae* foi detectada com grande predominância no final de fermentação.

### 3.2. Fermentações em Lagares

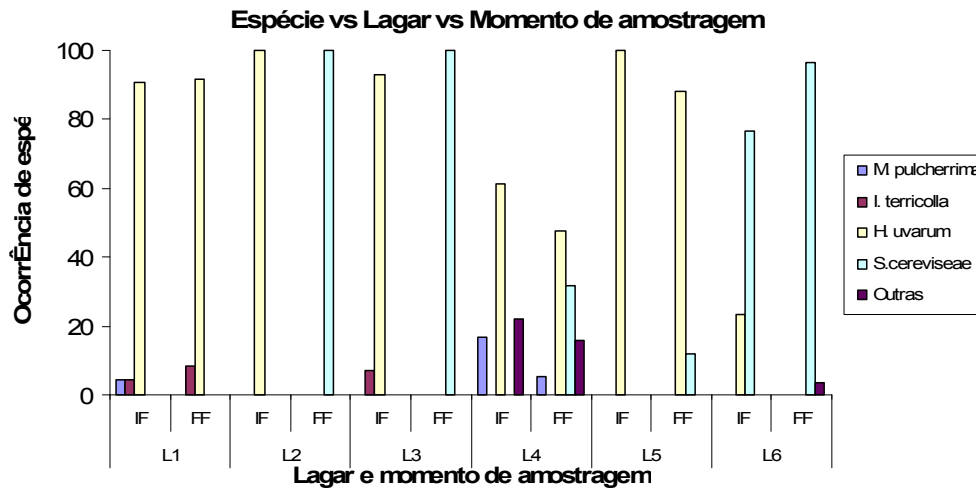
No caso dos lagares, este trabalho completou outros estudos realizados em lagares em 2005 e 2006. O estudo realizado em 2007 incidiu sobre os 6 lagares estudados anteriormente. É importante destacar que não foram inoculadas leveduras comerciais nos lagares estudados.

#### 3.2.1. Início e final de fermentação

No início de fermentação *H. uvarum* esteve presente em 100% dos lagares sendo a espécie predominante, excepto no lagar 6 onde *S. cerevisiae* foi dominante (ver figura 21). Tal poderá dever-se a elevada concentração desta levedura na casca das uvas (Fugelsang and Edwards, 2007) e à sua maior resistência ao etanol. Este resultado confirma resultados da literatura que mostram que é uma levedura frequente nas fases iniciais da fermentação (Fleet & Heard 1993; Jemec *et al*, 2001; Beltran *et al*, 2002; Di Maro, E. *et al*, 2007). As espécies *M. pulcherrima* e *I. terricola* também foram encontradas, mas em baixo número, nos lagares 1, 3 e 4, de acordo com o descrito na literatura (Torija *et al* 2001).

No final de fermentação *H. uvarum* foi a espécie dominante no lagar 1, 4 e 5, mas *S. cerevisiae* foi detectada nos lagares 2 e 3, sendo dominante no lagar 6. Foi ainda identificada nos lagares 4 e 5 como a segunda mais frequente. *M. pulcherrima* representou 5% dos isolados no lagar 4, *I. terricola* também foi detectada em baixo número e representou 8% dos isolados do lagar 1. Observaram-se alterações na estrutura da comunidade microbiana ao longo da fermentação e *S. cerevisiae* foi dominante no final de fermentação. No lagar 1 não se detectou *S. cerevisiae* no final da fermentação e no lagar 4 as espécies detectadas no início de fermentação foram também detectadas no final, tendo *S. cerevisiae* aparecido também. Isto poderá indicar que a amostragem foi efectuada prematuramente, numa altura em que a população de *S. cerevisiae* estaria a iniciar a sua expansão. A predominância de *S. cerevisiae* no final fermentação confirma resultados anteriores doutros autores (Torija *et al* 2001). No entanto, foi surpreendente que *S. cerevisiae* não tenha sido dominante nalguns pois esta espécie faz parte da microflora residente nas adegas e lagares (Fleet, 1993). A microflora pode ser influenciada por vários factores, como por exemplo o efeito *killer*, do qual dependem as relações de leveduras

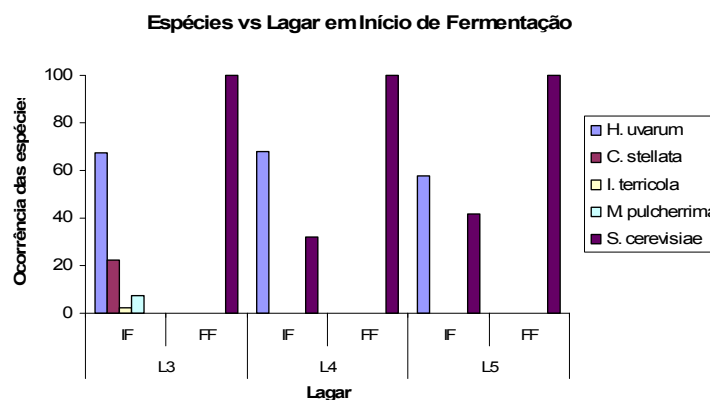
*killer* e leveduras sensíveis (Heard and Fleet, 1985) e este tipo de variáveis poderá explicar a predominância de espécies não-*Saccharomyces* nalguns lagares.



**Figura 21 - Espécies encontradas nos Lagares 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Amostragem realizada no Início e Final de Fermentação. No final de fermentação *S. cerevisiae* esteve presente em todos os lagares à excepção do lagar 1. Dados referentes a 2007.**

## 3.2.2. Estudo comparativo 2005, 2006 e 2007.

Em 2005, a espécie dominante no início de fermentação foi *H. uvarum* em 100% dos lagares. *S. cerevisiae* esteve presente nos lagares 5 e 6, confirmando estudos anteriores efectuados noutras regiões do mundo (Fleet & Heard, 1993) (ver figura 22). A presença de *S. cerevisiae* revelou que estas amostras já não foram recolhidas no início da fermentação mas numa fase posterior, em que devido ao aumento do teor em etanol o crescimento desta levedura foi favorecido em relação aos outros. No lagar 3 foram identificadas além de *H. uvarum*, *C. stellata* (23%), *M. pulcherrima* (8%) e *I. terricola* (3%), o que está de acordo com o descrito na literatura (Jemec *et al*, 2001; Torija *et al*, 2001). No que diz respeito às amostras de final de fermentação, estas foram todas identificadas como *S. cerevisiae*.



**Figura 22 - Espécies encontradas nos Lagares 3, 5 e 6 no Início de Fermentação.** No final de fermentação *S. cerevisiae* esteve presente em todos os lagares, e foi identificada também no início de fermentação. Dados referentes a 2005.

Na amostragem de 2006 verificou-se a presença de *M. pulcherrima* em 13%, 7%, 37%, 7%, 3% e 3% nos lagares 1, 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente, no início de fermentação (ver figura 23), confirmando resultados de outros autores sobre microflora vínica no início da fermentação (Jemec *et al*, 2001, Torija *et al* 2001).

*H. uvarum* foi uma das leveduras predominantes no início da fermentação, tendo a sua frequência variado entre 67%, 30%, 90%, 97% e 87% nos lagares 1, 2, 4, 5 e 6, respectivamente.

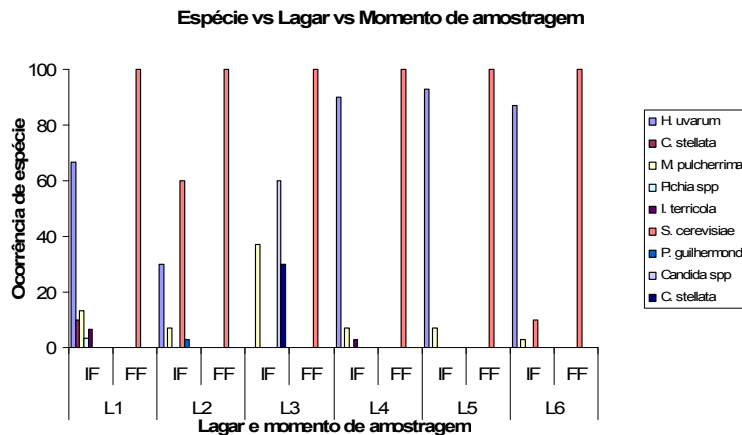
As leveduras pertencentes ao género *Candida* foram isoladas no lagar 1, em que *C. stellata* foi responsável por 10% dos isolados. No lagar 3, 3% dos isolados foram *C. stellata* e outros 60% foram do género *Candida*. De acordo com Jemec e colaboradores



(2001) e Torija e colaboradores (2001), estas leveduras estão frequentemente presentes nas fases iniciais da fermentação.

As leveduras que apresentaram menor predominância nos vários lagares foram: *I. terricola* que constituiu 7% da diversidade do lagar 1 e 3% da diversidade do lagar 3; *Pichia* que constituiu 3% da diversidade do lagar 1 e *P. guilliermondii* responsável por 3% da diversidade do lagar 2.

*S. cerevisiae* constituiu 60% das leveduras do lagar 2, e 10% no lagar 6. Revelando que possivelmente estas amostragens foram feitas numa fase tardia do início de fermentação, em que devido ao aumento do teor em etanol o crescimento desta levedura foi favorecido em relação aos outros.



**Figura 23 - Espécies identificadas nos Lagares 1, 2, 3, 4, 5 e 6 no Início e Final de Fermentação.** No final de fermentação *S. cerevisiae* estava presente em todos os lagares, Dados referentes a 2006.

Em 2006, os lagares 3, 5 e 6 tiveram maior diversidade microbiana do que 2005. Tal diferença de diversidade poderá estar relacionada com a utilização de diferentes castas de ano para ano, da amostragem em diferentes fases da fermentação, ou ainda a variações laboratoriais na amostragem e sequenciação de DNA. Nos lagares 5 e 6 detectou-se *H. uvarum*, *M. pulcherrima* que não foram detectadas em 2005. No lagar 3 foram identificadas em 2005 *H. uvarum*, *C. stellata*, *M. pulcherrima* e *I. terricola*, contudo, em 2006, detectaram-se apenas *M. pulcherrima*, *C. stellata* e *Candida spp*.

No lagar 1 houve perda de diversidade microbiana em 2006, no início de fermentação, onde não foram detectadas *Pichia spp* e *C. stellata*, mantendo-se os valores semelhantes aspara as outras espécies. No final de fermentação, também houve alterações,

nomeadamente *S. cerevisiae* representou 100 dos isolados em 2006, mas na colheita deste ano detectaram-se *H. uvarum* e *I. terricola*. Esta alteração pode ter origem no momento da amostragem do final de fermentação, que poderá não ter correspondido exactamente ao final de fermentação. No lagar 2 também houve perda de diversidade no início de fermentação, pois não foram detectadas *C. stellata* e *P. guilliermondii*, no entanto, observou-se *H. uvarum* no início de fermentação e 100% de *S. cerevisiae* no final.

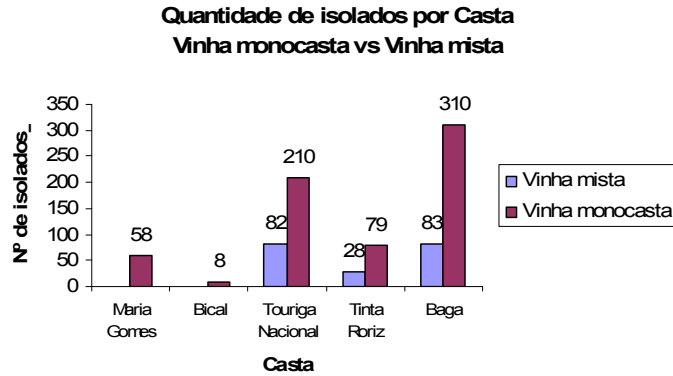
No lagar 3 foram observadas grandes diferenças. Em 2006, o início de fermentação foi constituído por *Candida spp*, *C. stellata* e *M. pulcherrima*, e em 2007 foi detectada *H. uvarum* que tinha sido detectada também em 2005, o final de fermentação foi igualmente dominado por *S. cerevisiae*.

No lagar 4, no início de fermentação, as espécies detectadas em 2006 mantiveram-se presentes na amostragem deste ano. No que diz respeito ao final fermentação foi detectada *S. cerevisiae* em ambas as alturas. Nos lagares 5 e 6 a situação foi semelhante, ambos tiveram em 2006 *H. uvarum* e *M. pulcherrima* no início de fermentação e em 2007 apenas se detectou *H. uvarum*. Os finais de fermentação foram sempre realizados por *S. cerevisiae*.

Em conclusão, houve alteração na comunidade microbiana entre 2006 e 2007. Algumas espécies presentes em 2006 não foram detectadas em 2007, nomeadamente *Candida spp*, *C. stellata*, *P. guilliermondii* e *Pichia spp*. Relativamente às espécies mais representativas *H. uvarum* foi sempre a espécie mais frequente no início de fermentação, excepto nas situações em que foi substituído por *S. cerevisiae*. No que diz respeito ao final de fermentação, *S. cerevisiae* foi sempre predominante em 2006, no entanto esta situação não se manteve nos lagares 1, 4 e 5 em 2007.

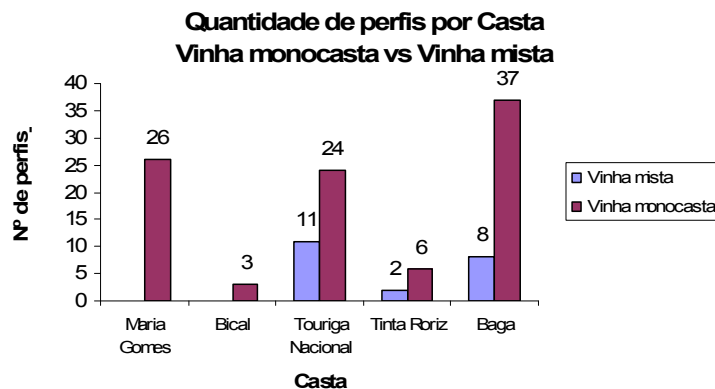
#### 4. Variabilidade intraespecífica de *S. cerevisiae*

##### 4.1. Perfis inter- $\delta$ de *S. cerevisiae* associados a Castas / Vinhas – análise de 2007



**Figura 24 - Total de isolados obtidos no final da fermentação em Vinha Mista e Vinha Monocasta.** Foram obtidos 858 isolados de *S. cerevisiae*. O número de isolados foi superior nas vinhas monocasta pois estas tiveram maior número de réplicas a terminar a fermentação. Dados relativos a 2007.

O número de isolados de *S. cerevisiae* foi maior quando os mostos foram preparados com uvas de vinhas monocasta (Figura 24), do que em mostos de uvas de vinhas mistas. Tal explica-se pelo maior número de fermentações completas de mostos de vinhas monocasta. A variabilidade genética das estirpes de *S. cerevisiae* foi avaliada por genotipagem por análise de perfis de PCR das regiões inter- $\delta$ .



**Figura 25 - Quantidade de perfis obtidos referentes às várias castas em vinha monocasta e vinha mista.** Foram encontrados 110 perfis diferentes distribuídos pelas diferentes castas. Em Maria Gomes, apesar de esta ter apresentado menor número de isolados, foram encontrados 26 perfis diferentes, o que sugere grande diversidade de *S. cerevisiae* nesta casta. Dados relativos a 2007.

Obteve-se maior número de perfis inter- $\delta$  nos isolados de vinhas monocasta do que das vinhas mistas. Tal, deve-se ao facto de se terem isolado maior número de estirpes de *S. cerevisiae* das vinhas monocasta do que da vinha mista. Isolaram-se ao todo 110 perfis diferentes, em que 58 apareceram apenas uma vez. A casta Maria Gomes apresentou maior diversidade genética de *S. cerevisiae*, pois foi possível encontrar nos 58 isolados 26 perfis diferentes. Ao passo que castas como Touriga Nacional e Baga, que apresentaram um número bastante superior de isolados, foram isolados apenas 24 e 37 perfis diferentes respectivamente.

**Tabela 7 – Resumo dos perfis inter- $\delta$  encontrados nas amostras de 2007.** Encontram-se representadas todas as castas, sendo na casta Maria Gomes, na réplica BM207, que se encontra a maior diversidade; 17 perfis diferentes para a diversidade global. Os perfis encontrados forma no geral exclusivos da casta/vinha. Foram encontrados perfis iguais em diferentes réplicas. As amostras assinaladas com \*1, \*2, \*3, \*4 e \*6 foram perfis que se encontraram em réplicas diferentes da mesma vinha. Os perfis assinalados com \*5 foram encontrados na vinha monocasta de Baga e na vinha mista. Já o perfil assinalado com \*7 foi encontrado nas duas amostragens de vinha mista em Baga.

Casta	Tipo de Vinha	Perfil	Nº de isolados	Casta	Tipo de Vinha	Perfil	Nº de isolados
Maria Gomes	Vinha Monocasta	BM207_62	6	Touriga Nacional	Vinha monocasta	BT207_61	26
		BM207_72	1			BT207_70	1
		BM207_68	3 (*1)			BT207_79	1
		BM207_84	1			BT207_82	1
		BM207_73	1			BT207_88	1
		BM207_83	2			BT208_61	26
		BM207_78	1			BT208_77	2
		BM207_63	1			BT208_72	1
		BM207_75	2			BT208_81	1
		BM207_61	3			BT209_65	3
		BM207_88	1			BT210_61	19
		BM207_65	1			BT210_63	11
		BM207_70	1			BT211_61	1
		BM207_80	1			BT211_62	26
		BM207_71	1			BT211_71	1
		BM207_74	1			BT211_74	1
		BM207_87	1			BT211_75	1
		BM2C_78	4			BT212_62	7
		BM2C_61	9			BT212_64	20
		BM2C_83	1			BT212_73	1
		BM2C_68	3			BT212_77	1
		BM2C_64	4			BT212_88	1
		BM2C_62	3			BT2C_61	27
		BM2C_65	3	BT2C_64	3		
BM2C_76	2 (*1)	Baga	Vinha mista	BB110_61	18		
BM2C_69	1			BB110_62	11		

Dinâmica populacional de leveduras na fermentação de mostos vînicos

<b>Bical</b>	<b>Vinha monocasta</b>	BBi2C_82	6			BB111_61	4
		BBi2C_81	1			BB111_63	13
		BBi2C_74	1			BB111_75	3
<b>Touriga Nacional</b>	<b>Vinha Mista</b>	BT1C_68	30			BB111_78	2 (*5)
		BT107_61	2			BB111_87	2
		BT107_89	2			BB112_61	30
		BT107_69	2			BB207_61	28
		BT107_65	10			BB207_75	2
		BT107_68	3			BB208_61	25
		BT107_70	9			BB208_65	4 (*5)
		BT110_90	2			BB208_82	1
		BT110_89	5			BB209_61	30 (*7)
		BT110_84	9			BB211_61	23
	B T110_70	8		BB211_72	7		
<b>Touriga Nacional</b>	<b>Vinha monocasta</b>	BT207_61	26 (*3)	<b>Baga</b>	<b>Vinha monocasta</b>	BB212_62	17 (*6)
		BT207_70	1			BB212_71	4
		BT207_79	1			BB212_67	3
		BT207_82	1			BB212_61	1
		BT207_88	1			BB212_78	1
		BT208_61	26			BB212_82	1
		BT208_77	2 (*2)			BB212_83	2
		BT208_72	1			BB2C_63	19 (*6)
		BT208_81	1			BB2C_62	3
		BT209_65	3			BB2C_80	1
		BT210_61	19			BB408_61	5
		BT210_63	11			BB408_66	4
		BT211_61	1			BB408_67	7
		BT211_62	26			BB408_83	5
		BT211_71	1			BB408_69	2
		BT211_74	1			BB408_63	1
		BT211_75	1			BB408_89	1
		BT212_62	7			BB408_90	1
		BT212_64	20			BB409_61	29
		BT212_73	1			BB409_67	2
		BT212_77	1			BB409_90	1
		BT212_88	1			BB410_61	25
		BT2C_61	27 (*2)			BB411_61	23
BT2C_64	3 (*3)	BB411_73	1				
<b>Tinta Roriz</b>	<b>Vinha mista</b>	BTR108_64	2			BB411_77	1
		BTR108_74	26			BB411_89	1
<b>Tinta Roriz</b>	<b>Vinha Monocasta</b>	BTR208_61	27			BB4C_61	28 (*7)
		BTR208_77	1			BB4C_76	1
		BTR212_61	19 (*4)				
		BTR212_68	1				
		BTR212_69	1				
	BTR2C_61	30 (*4)					

A análise da tabela 7 permite verificar que existiram réplicas onde a fermentação foi levada a cabo por uma população bastante diversa e heterogénea, ao passo que em outras existiu uma estirpe que foi claramente dominante e que representou a maior fatia de isolados identificados. Os gráficos relativos à distribuição dos perfis por casta/vinha podem ser consultados no Anexo III. As amostras assinaladas na tabela com os símbolos \*1, \*2, \*3, \*4 e \*6 identificam perfis que foram comuns a determinada réplica e à amostra composta, onde fermentaram mostos de todas as réplicas misturados. O facto destes isolados em particular estarem presentes numa das réplicas, e geralmente em grande número, e a capacidade que tiveram de se desenvolver na amostra composta onde todas as estirpes estavam misturadas demonstra, que são estirpes possivelmente bastante resistentes e com uma boa capacidade fermentativa.

Pela análise anteriormente feita podemos referir que geralmente existem vários perfis dentro da mesma casta, a explicação pela partilha das mesmas estirpes em diferentes réplicas é a proveniência das réplicas ser a mesma, ou ainda que esta levedura em particular tenha um perfil que lhe tenha permitido impor-se às restantes leveduras.

4.2. Perfis inter- $\delta$  de *S. cerevisiae* associados a Castas / Vinhas – análise de 2006

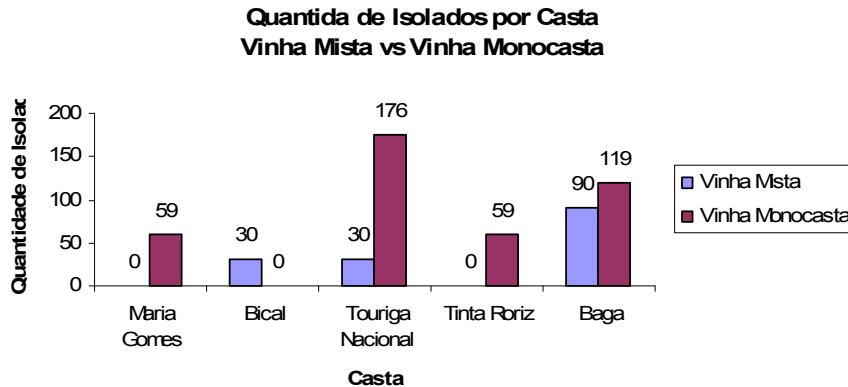


Figura 26 – Total de isolados obtidos no final da fermentação em Vinha Mista e Vinhas Monocasta. Foram obtidos no total 563 isolados de *S. cerevisiae*. O número de isolados foi superior nas vinhas monocasta pois estas tiveram maior número de réplicas a terminar a fermentação, dados relativos a 2006.

Em geral, obteve-se maior número de isolados de *S. cerevisiae* de réplicas de vinhas monocasta do que de réplicas de vinhas mistas. Tal deveu-se ao maior número de fermentações completas dos mostos de vinhas monocasta do que de vinhas mistas. A excepção foi a Casta Bical em que não se obtiveram isolados na vinha monocasta apesar de numa réplica ter-se atingido o final da fermentação.

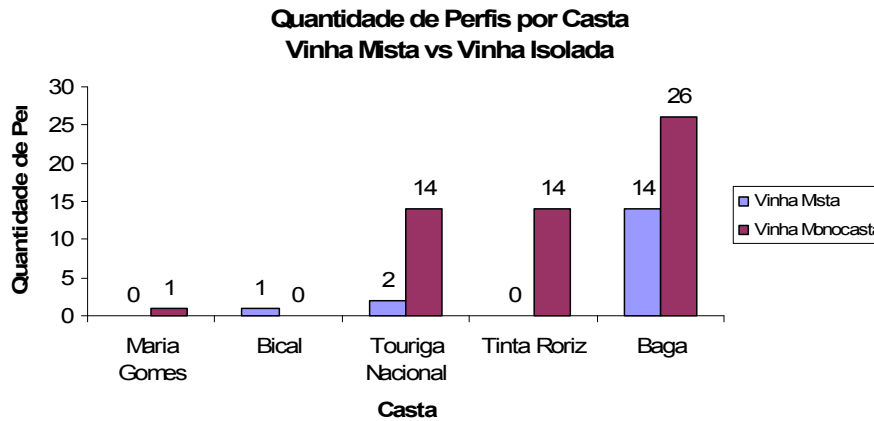


Figura 27 - Quantidade de perfis obtidos nas várias castas em vinha monocasta e vinha mista. As vinhas tintas monocasta foram as que forneceram maior número de perfis. Nas castas brancas a diversidade foi muito baixa pois face ao número de isolados obtidos o número de perfis encontrados foi apenas um em ambas as situações relativas a Maria Gomes e Bical. Dados relativos a 2006.

Analisando o gráfico (figura 27), é possível verificar que se obtiveram maior número de perfis na vinha isolada do que na vinha mista, tal facto será explicado por um

maior número de isolados de *S. cerevisiae* obtido nas vinhas isoladas do que na vinha mista. Obtiveram-se ao todo 72 perfis diferentes.

Na casta Baga, tanto na vinha isolada como na mista, obtiveram-se réplicas com grande diversidade, mas também réplicas com baixo número de perfis, o mesmo aconteceu em Tinta Roriz na vinha isolada. Na casta Tinta Roriz onde foram estudadas duas réplicas, uma delas demonstrou grande diversidade com treze perfis, ao passo que a réplica BTR24 apresentou apenas um perfil (BTR2432). Assim, visto que esta casta alberga grande diversidade, a estirpe dominante da réplica BTR24 poderá apresentar bastante resistência aos factores que influenciam o processo fermentativo, bem como boa capacidade fermentativa. As duas castas brancas apresentaram baixa diversidade, mas só foi possível estudar uma réplica de cada uma delas. Os gráficos relativos à distribuição dos perfis por casta/vinha podem ser consultados no Anexo IV.

### **4.3. Análise Geral**

A análise de perfis inter- $\delta$ , melhorada por Legras e Karst (2003) tem um poder discriminatório semelhante ao de análises de cariótipo e de análise de restrição de DNA mitocondrial, sendo uma ferramenta extremamente útil no estudo de populações de *S. cerevisiae*.

Em 2006 foram analisados 563 isolados de *S. cerevisiae*, tendo-se detectado 72 perfis diferentes de *S. cerevisiae*. Em 2007, estudaram-se 858 isolados e detectaram-se 110 perfis diferentes de *S. cerevisiae*. Foram encontrados alguns perfis comuns entre as diversas castas, ainda que em número reduzido. Ao fazer a comparação entre perfis identificados, nos dois anos por casta, não se verificaram perfis comuns. Verificou-se que em algumas réplicas a fermentação foi conduzida apenas por uma estirpe, o que pode indicar uma estirpe resistente e capaz de se impor numa fermentação complexa. Os isolados BB1140, BB1531, BB2234, BB2630, BT1532, BT2231, BT2531, BT2231, BTR2432, BBi1230, BM2230 (isolados em 2006), e os isolados BBi2C\_82, BTR208\_61, BTR212\_61, BTR108\_74, BTR2C\_61, BB207\_61, BB208\_61, BB209\_61, BB211\_61, BB2C\_63, BB409\_61, BB410\_61, BB411\_61, BB4C\_61, BB112\_61, BT207\_61, BT208\_61, BT209\_65, BT212\_62, BT2C\_61 e BT1C\_61 (isolados em 2007)



correspondem a estirpes que dominaram a fermentação, podendo ter interesse para estudos de leveduras representativas da região da Bairrada.

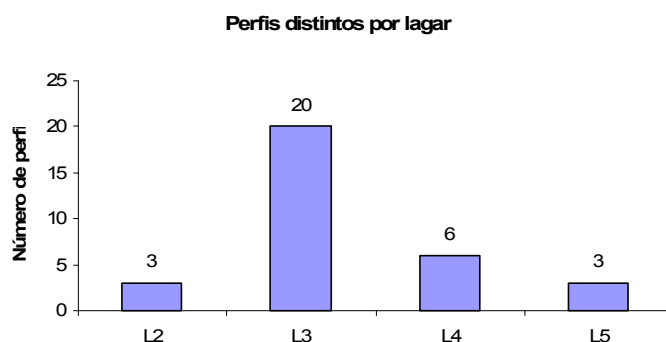
As castas tintas apresentaram um maior número de isolados de *S. cerevisiae*, no entanto as castas brancas, Maria Gomes e Bical, também apresentaram menor número de réplicas que terminaram a fermentação. De todas, a casta Maria Gomes, de vinhas monocasta de 2007, mostrou maior diversidade genética de *S. cerevisiae*. A casta Bical, de vinha monocasta em 2007, apresentou *S. cerevisiae* com três perfis diferentes, e em vinha mista em 2006 apresentou apenas 1 perfil. As réplicas de Tinta Roriz apresentaram nos dois anos baixo número de perfis inter- $\delta$  (3 perfis diferentes), contudo a réplica BTR21 (2006) apresentou 13 perfis diferentes. Também Touriga Nacional e Baga apresentaram baixo número de perfis inter- $\delta$  de *S. cerevisiae*, tendo-se identificado 6-8 perfis diferentes, nos dois anos. Foram a excepção na colheita de 2006 as réplicas BB12, BB21 e BB24 que apresentaram de 11 a 17 perfis diferentes.

As fermentações espontâneas foram feitas por uma ou mais estirpes dominantes, sendo a presença de estirpes “secundárias” muito reduzida. Contudo, certas fermentações foram feitas por comunidades heterogênea de leveduras sem estirpe(s) dominantes. Estes resultados confirmaram os de outros estudos que mostraram a existência de 1-2 estirpes dominantes, constituindo mais de 50% da biomassa total e um número variável de estirpes “secundárias” (Le Jeune *et al*, 2007; Schuller *et al*, 2005; Versavaud *et al*, 1995) ou a presença de muitas estirpes distintas sem serem predominantes (Sabate *et al*, 1998; Pramafteki *et al*, 2000).

Cappello e colaboradores (2004) efectuaram estudos de diversidade de *S. cerevisiae* em fermentações espontâneas onde as populações foram homogêneas nas diversas fermentações independentemente da casta. No caso da amostras da Bairrada as observações foram bastante diferentes, uma vez que a diversidade encontrada foi muito superior, e observou-se variação de estirpes entre castas e entre tipo de vinha (monocasta ou mista), o que está mais de acordo com o estudo de Le Jeune e colaboradores (2006).

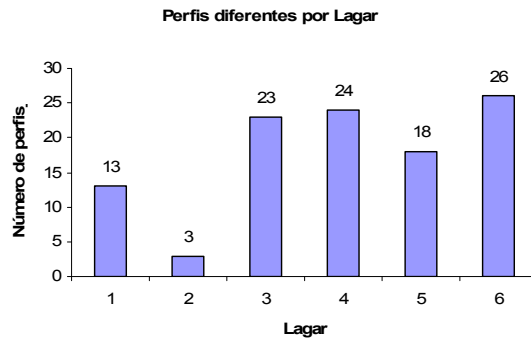
#### 4.4. Perfis inter- $\delta$ de *S. cerevisiae* associados a Lagares

Este estudo complementou estudos semelhantes realizados nas vinhas da Bairrada desde 2005, tendo sido possível fazer um estudo comparativo para o período 2005-2008. Em 2006 detectou-se *S. cerevisiae* em todos os mostos em final de fermentação, contudo tal não aconteceu em 2007. Em 2007, foram analisadas 30 amostras do lagar 2 onde foram identificados 3 perfis inter- $\delta$  diferentes. Do lagar 3 foram analisadas 28 amostras e foram identificados 20 perfis inter- $\delta$  diferentes. Nos lagares 4 e 5 identificou-se um baixo número de *S. cerevisiae*, tendo sido estudados 6 isolados do lagar 4 que originaram 6 perfis diferentes. No lagar 5 foram analisadas 3 amostras que corresponderam a três perfis diferentes. É importante referir que existem dois perfis comuns entre os lagares 3 e 5, L3\_69 é igual a L5\_82, L3\_82 é igual a L5\_75 e L3\_88 é igual a L4\_74

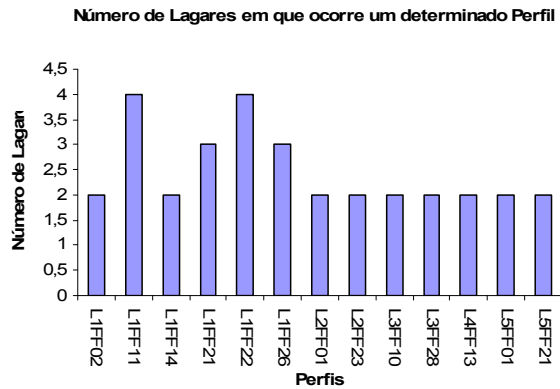


**Figura 28 - Diversidade de perfis de *S. cerevisiae* nos lagares, referentes a 2007.** Foram encontrados 32 perfis diferentes, sendo que a maioria foi isolada do lagar 3, que foi o lagar com maior diversidade. No lagar 2, das 30 amostras testadas foram identificados 3 perfis diferentes. Por fim, nos lagares 4 e 5 foram encontrados poucos perfis mas o número de isolados analisado também foi bastante reduzido, 6 e 3 respectivamente.

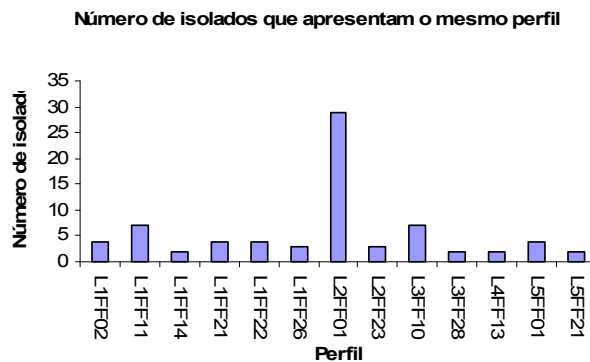
Em 2006, observámos maior diversidade de perfis inter- $\delta$  no lagar 6 (26 perfis), seguido pelo lagar 4 com 24, e pelo lagar-3 com 23 perfis. O lagar 2 apenas apresentou 3 perfis diferentes. Tal, deveu-se à presença de uma estirpe com perfil idêntico ao perfil de uma estirpe comercial, indicando que o mosto foi inoculado com uma estirpe comercial que dominou a fermentação. Esta levedura terá sido adicionada directamente ao lagar pois a disseminação de leveduras comerciais na vinha está restrita a distâncias curtas e a períodos de tempo limitados (Valero *et al*, 2005).



**Figura 29 - Diversidade de perfis nos lagares, referentes ao ano 2006.** Em 2006, a diversidade observada nos lagares foi bastante elevada, onde todos os lagares, à excepção do lagar 3, apresentaram um elevado número de perfis diferentes.

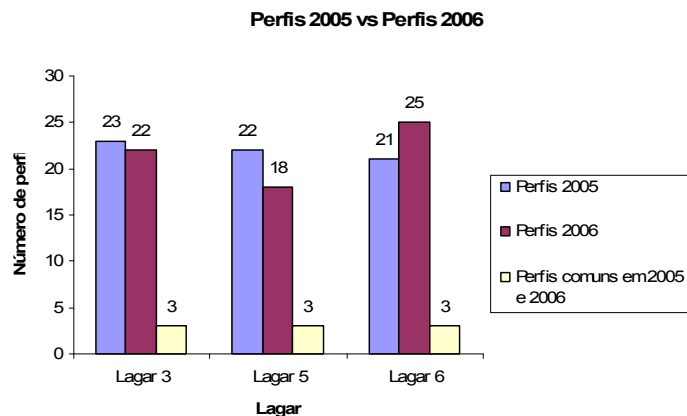


**Figura 30 - Ocorrência dos perfis por lagares em 2006.** Alguns dos perfis encontram-se dispersos pela área de estudo dos lagares. Tendo dois perfis sido encontrados em quatro dos lagares. Encontraram-se também três perfis diferentes distribuídos por três lagares. Por fim, 9 perfis cuja presença foram detectados em dois lagares. Os perfis não mostrados no gráfico ocorreram apenas num lagar.



**Figura 31 – Predominância dos perfis localizados em mais do que um lagar.** Dos perfis que ocorreram em mais do que 1 lagar, foi detectado o perfil L2FF01 que demonstrou ser dominante.

Foi possível observar que alguns dos perfis se encontraram dispersos pelos diversos lagares, e ainda que o perfil inter- $\delta$  dominante foi o L2FF01 (Figura 31), que é idêntico ao de uma estirpe comercial.



**Figura 32 - Comparação dos perfis obtidos em 2005 e 2006 de amostras de lagares.** O número de perfis encontrados por lagar nos dois anos foi semelhante, e foram sempre encontrados perfis em comum entre as duas alturas de colheita.

Observaram-se perfis inter- $\delta$  comuns nas estirpes isoladas em 2005 e 2006. Este resultado confirma resultados anteriores obtidos por J. Sabate e colaboradores (1998) e Torija e colaboradores (2001) que analisaram populações de *S. cerevisiae* em fermentações espontâneas em amostras de anos consecutivos. Tal, está relacionado com a existência de microflora vínica residente nos lagares (Fleet 2003). Entre 2006 e 2007 não foram identificados perfis inter- $\delta$  comuns.



## Discussão Geral e Conclusão

## Discussão Geral e Conclusão

De acordo com estudos de fermentação víquica (Torija *et al* 2001; Jemec *et al*, 2001; Beltran *et al*, 2002; Baleiras Couto *et al*, 2005; Querol *et al*, 1992) a fermentação alcoólica é conduzida por *S. cerevisiae*, e as espécies não-*Saccharomyces* são detectadas em elevado número nas fases iniciais do processo. Nas fases iniciais da fermentação, as espécies mais abundantes são *H. uvarum*, *M. pulcherrima* e *I. terricola*. No entanto, alguns estudos evidenciaram diferenças significativas relativamente à sobrevivência de espécies não-*Saccharomyces* em fases com elevado teor de álcool, e também à elevada variabilidade de estirpes de *S. cerevisiae* (Torija *et al*, 2001). A produção de etanol por *S. cerevisiae* é considerada um dos factores com mais influência no crescimento das espécies não-*Saccharomyces* durante a fermentação. Geralmente, espécies de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* e *Issatchenkia*, não toleram concentrações de etanol superiores a 5-7%, o que explica o seu declínio durante a fermentação (Fleet, 2003). A temperatura a que decorreu a fermentação pode explicar em parte a sobrevivência das espécies não-*Saccharomyces*, pois à medida que a temperatura diminui, a diversidade e viabilidade das leveduras aumenta. Assim a baixas temperaturas espécies não-*Saccharomyces* podem dominar o processo fermentativo (Torija *et al*, 2003; Fleet, 2003; Baleiras Couto *et al*, 2005).

Neste estudo, nas fermentações laboratoriais, *H. uvarum* e *I. terricola* foram as espécies mais importantes nos momentos iniciais do processo fermentativo, sendo que *I. terricola* foi isolada maioritariamente a partir de vinhas tintas monocasta e de vinhas mistas. Foram identificadas em menor número *Candida spp* (Touriga nacional), *Zygoascus meyeriae/hellenicus* (Tinta Roriz) e *Metschnikowia spp* (Baga), que surgiram apenas no mosto inicial das vinhas monocasta, com presença igual ou inferior a 1%. Relativamente ao final de fermentação, *S. cerevisiae* foi o organismo predominante, especialmente nas vinhas monocasta onde esteve associado a todas as castas, excepto Bical, onde coexistiu com *C. glabrata*, tendo sido esta última a espécie dominante. Na vinha mista *S. cerevisiae* foi dominante em Tinta Roriz e Touriga Nacional. Ainda na vinha mista, no final de fermentação, foram identificadas outras espécies, embora em baixo número, que não surgiram nos outros momentos de amostragem. Foram os casos de *Z. bailii* e *H. osmophila* presentes em Bical, e também de *P. membranifaciens* presente em Baga.

Ao longo do processo de fermentação ocorreu substituição das espécies, acompanhada por diminuição da diversidade. Foi possível verificar que as espécies encontradas no início já não estão presentes no final de fermentação, onde foram identificadas *S. cerevisiae*, *Saccharomyces spp.*, *H. osmophila*, *P. membranifaciens*, *C. glabrata*, *C. californica* e *Z. bailii*.

Em 2006, em mostos iniciais observou-se menor diversidade microbiana do que em 2007. *H. uvarum* foi isolada em mostos iniciais mas só se tornou dominante no início de fermentação. Por outro lado, em 2006 foram identificadas espécies que não apareceram na amostragem de 2007, nomeadamente *K. thermotolerans*, *K. waltii*, *R. glutinis* e *T. delbrueckii*. Relativamente aos isolados de mosto inicial de 2006, *M. pulcherrima* foi uma das espécies predominantes, juntamente com *H. uvarum* em menor grau.

*S. cerevisiae* foi também identificada no final de fermentação de todas as vinhas monocasta onde o processo fermentativo foi completado. Na vinha mista as castas Baga, Touriga Nacional e Bical apresentaram 100% dos isolados como *S. cerevisiae*, no entanto Maria Gomes foi fermentada por *Candida spp.* Nas fermentações laboratoriais de 2006 e 2007 verificou-se que a diversidade de espécies nas diferentes castas diminuiu do mosto inicial para o início da fermentação, confirmando resultados de outros grupos de investigação (Valero *et al*, 2005).

As diferentes castas em vinha monocasta demonstraram diferenças na composição da microflora vínica no mosto inicial e início da fermentação, que se poderá dever às diferentes localizações das vinhas onde foram recolhidas as uvas, e às próprias uvas, cujas características diferem de casta para casta (Caruso *et al*, 2002). No que concerne à casta Baga, as espécies *H. uvarum* e *I. terricola* estiveram presentes em todos os locais de colheita no mosto inicial e início de fermentação. No final de fermentação, *S. cerevisiae* foi a espécie identificada nas vinhas mistas, na vinha monocasta foram identificadas *C. californica* e com maior predominância *P. membranifaciens*, contudo grande parte dos isolados não foram identificados. Nas castas Brancas identificaram-se as mesmas espécies que nas castas tintas, no entanto as castas Maria Gomes e Bical apresentaram menor diversidade. É importante referir que apenas no final de fermentação das castas brancas é que foi possível detectar espécies dominantes não-*Saccharomyces*, nomeadamente Maria Gomes fermentada por *Candida spp.* em 2006 e de Bical fermentada por *C. glabrata* em 2007. Assim, estas espécies merecem especial atenção no âmbito de fermentações de



castas brancas, visto que algumas espécies de *Candida* possuem uma tolerância ao etanol semelhante à de *S. cerevisiae* (Fleet, 2003).

A fermentação de mostos em lagares da região da Bairrada mostrou alguma variabilidade na diversidade microbiana entre 2005, 2006 e 2007. Por exemplo, em 2007 não foram identificadas *Candida spp*, *C. stellata*, *P. guilliermondii* e *Pichia spp*. Relativamente às espécies mais representativas, *H. uvarum* foi a espécie mais frequente no início de fermentação excepto, mas em certos casos foi substituída por *S. cerevisiae*. No que diz respeito ao final de fermentação *S. cerevisiae* foi sempre predominante em 2006, no entanto esta situação não se manteve nos lagares 1, 4 e 5 em 2007, possivelmente por falhas na altura da colheita onde ainda não tinha atingido o final de fermentação. (Torija *et al*, 2003).

O estudo da variabilidade intraespecífica de *S. cerevisiae* é de extraordinária importância, pois a caracterização das estirpes selvagens da região da Bairrada é fundamental para a sua preservação e também para uma exploração que permita manter os traços típicos da região. A análise dos isolados de *S. cerevisiae* obtidos em fermentações laboratoriais permitiu obter um total de 1421 isolados, onde foi possível detectar 182 perfis diferentes, sendo a maioria dos perfis única, mostrando que a Bairrada tem uma grande diversidade genética de *S. cerevisiae*. Contudo, a utilização de leveduras comerciais elimina grande parte desta diversidade, pelo que será interessante estudar o *pool* de leveduras nativas da região com o objectivo de encontrar um grupo fermentador que seja representativo e que não mascare a contribuição das restantes leveduras.

A comparação de perfis inter- $\delta$  de *S. cerevisiae*, mostrou grandes diferenças entre isolados de 2006 e 2007, tendo-se observado que algumas fermentações foram conduzida apenas por uma estirpe. Nestes casos, a estirpe responsável pela fermentação reveste-se de especial interesse, pois conseguiu impor-se relativamente à restante microflora o que pode indicar que se trata de uma estirpe interessante do ponto de vista comercial.

No caso das fermentações realizadas em lagares, a diversidade microbiana encontrada foi bastante grande, e na maioria dos casos superior à existente nas fermentações laboratoriais. O que pode dever-se ao facto de nas fermentações em lagares ocorrer mistura de leveduras originárias das uvas de várias castas com as leveduras que compõem a microflora residente nos lagares (Le Jeune *et al*, 2006, Fleet, 2003)

Em 2005 foram encontradas estirpes comuns a quatro ou mais lagares, tendo os perfis inter- $\delta$  de *S. cerevisiae* dos lagares de 2005 e de 2006 sido bastante semelhantes,

indicando uma provável origem comum da microflora residente (Fleet 2003; Le Jeune, 2006). No que diz respeito à comparação entre os perfis obtidos nas amostras de 2006 e 2007 não foram identificados perfis inter- $\delta$  idênticos.

A possibilidade de isolar novas estirpes demonstra que as populações de leveduras sofrem alterações de ano para ano. No entanto algumas estirpes foram identificadas em anos consecutivos, sugerindo que estas estirpes fazem parte da microflora residente nos lagares. O facto de surgirem novas estirpes sugere variabilidade da microflora residente. A presença das mesmas estirpes em lagares diferentes pode ser explicada pelo facto dos lagares se situarem na mesma zona geográfica, ou então pelo transporte das estirpes por humanos ou insectos.

Este estudo permitiu monitorizar as espécies envolvidas na fermentação de mostos ao longo de 2 anos. A microflora fermentativa da região da Bairrada é bastante diversificada, existindo leveduras para além de *S. cerevisiae*, que contribuíram para o processo fermentativo, nomeadamente *C. glabrata* e *C. stellata* nas fermentações espontâneas brancas e *H. uvarum* em lagares. Como tal, será importante estudar o impacto destas espécies nas fermentações de mosto da Bairrada.

A variedade genética de *S. cerevisiae* foi bastante elevada e as fermentações foram conduzidas ou por populações heterogêneas de *S. cerevisiae* ou por uma estirpe dominante. Estão a ser estudados no Biocant os parâmetros fisiológicos das estirpes de *S. cerevisiae* isoladas, e será interessante identificar as características que permitem a determinada estirpe tornar-se dominante no processo fermentativo dos mostos da região da Bairrada. Uma outra perspectiva de estudo, que poderá ser relevante para a caracterização de *S. cerevisiae*, será a análise da presença de híbridos naturais na nossa colecção de leveduras. E, sendo estes detectados, determinar a sua distribuição na região e avaliar o seu impacto no perfil fermentativo dos mostos.



Referências

## Referências

Antunovics, Z., Irinyi, L. and Sipiczki, M. (2005) *Combined application of methods to taxonomic identification of Saccharomyces strains in fermenting botrytized grape must*. J Appl Microbiol 98:971-979

Baleiras Couto, M.M., Reizinho, R.G., Duarte, F.L. (2005) *Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations*. Int J Food Microbiology 102:49-56

Barros Lopes, M. Soden, A. Martens, A. Henschke, P. & Langridge, P. (1998) *Differentiation and species identification of yeasts using PCR*. Int J Syst Bacteriol 48:279-286

Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozes, N. & Mas, A. (2002) *Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study*. Syst Appl Microbiol 25:287-293

Cappelo, M. S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F. & Zacheo, G. (2004) *Characterization of Saccharomyces cerevisiae strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard*. J Appl Microbiol 97:1274-1280

Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J.-L., Le Jeune, C. (2004) *Predominance of Saccharomyces uvarum during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery*. J. Appl Microbiol 97:1140-1148

Di Maro, E., Ercolini, D., Coppola, S. (2007), *Yeast dynamics during spontaneous fermentation of the Catalanesca grape*. Int J Food Microbiol 117:201-210

Dominé, A. (2006) *Vinhos*. 1<sup>st</sup> Ed, Köneman, pp 670-671

Esteve-Zarzoso, B.; Manzanares, P.; Ramón, D.; Querol, A. (1998) *The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking*. Int Microbiol 1:143-148.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. (1999) *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. Int J Syst Bacteriol 49:329-337

Fernandez-Espinar, M. T., Lopez V., Ramon, D., Bartra, E. and Querol, A. (2001) *Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques*. Int J Food Microbiol 70:1-10.

Fleet, H., Heard, G.M., (1993) *Yeast-growth during fermentation*. In: Fleet H., *Wine Microbiology and Biotechnology*. Hardwood Academic publishers, Chur, Switzerland, pp.27-54

Fleet, G.H. (2003) *Yeast interactions and wine flavour*. Int J Food Microbiol 86:11-22

Fugelsang, K.C.; Edwards, C.G. (2007) *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2<sup>nd</sup> Ed., Springer, pp 83-86.

Garfinkel, D. J., Nyswaner, K. M., Stefanisko, K. M., Chang, C., Moore, S. P. (2005) *Ty1 copy number dynamics in Saccharomyces*. Genetics 169(4):1845-57

Glick, B., Pasternak, J. (2003) *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3<sup>rd</sup> Ed, Washington D.C., ASM Press

Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vincenzini, M. (1999) *Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region*. J Appl Microbiol 87:949-956

Guillamón, J. M., Sabaté, J. Barrio, E. Cano, J. Querol, A. (1998) *Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region*. Arch Microbiol 169:387-392

- Jemec, K. P., Cadez, N., Zagorc, T., Bubic, V., Zupec, A., Raspor, P. (2002) *Yeast population dynamics in spontaneous fermentations of Malvasia must*. Food Microbiol 18:247-259
- Jiang, Y. W. (2001) *Transcriptional cosuppression of yeast Ty1 retrotransposons*. Genes Dev 16(4):467-78.
- Kolbert, C. P., Persing, D. H. (1999) *Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens*. Curr Opin Microbiol 2(3):299-305
- Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., Lollier, M. (2006) *Evolution of the population of Saccharomyces cerevisiae from grape to wine in a spontaneous fermentation*. Food Microbiol 23(8):709-16.
- Legras, J.L., Karst, F. (2003) *Optimisation of interdelta analysis for Saccharomyces cerevisiae strain characterisation*. FEMS Microbiol Lett 221:249-255
- L\u00f3pez, V., Querol, A., Ram\u00f3n, D., Fern\u00e1ndez-Espinar, M. T. (2001) *A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts*. Int J Food Microbiol 68(1-2):75-81.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A. (2000) *The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage*. Lett Appl Microbiol 30(2):136-41
- Montrocher R., Verner MC, Briolay J, Gautier C, Marmeisse R (1998) Phylogenetic analysis of the Saccharomyces cerevisiae group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. Int J Syst Bacteriol 48:295\u2013303
- Nishida, Y., Ono, B. (2007) *An experimental system for the study of mutations in the HMR locus of Saccharomyces cerevisiae: the insertion of Ty into HMRA vs. the conversion of HMRA to HMRalpha*. Yeast. 24(9):723-30.

Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P. and Typas, M. A. (2000) *Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece*. J Appl Microbiol 89:236-248

Pretorius, I.S. (2000) *Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking*. Yeast 16 (8): 675-729

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. (1992) *Molecular monitoring of Wine fermentations conducted by active dry yeast strain*. Appl Envir Microbiol 58:2948-2953

Querol, A. Belloch, C.Fernández-Espinar, M. T. And Barrio, E. (2003) *Molecular evolution in yeast of biotechnological interest*. Int Microbiol 6:201–205

Rainieri, S., Zamonelli, C., Kaneko, Y. (2003) *Saccharomyces sensu stricto: Systematics, genetic diversity and evolution*. J Biosc Bioeng 96 (1):1-9

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. (2007) *Inventory and monitoring of wine microbial consortia*. Appl Microbiol Biotechnol 75(1):149-64

Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., Casal, M. (2004) *Survey of molecular methods for typing of wine yeast strains*. FEMS Microbiol Lett 231:19-26.

Schuller, D., Alves, H., Dequin, S. and Casal, M. (2005) *Ecological survey of Saccharomyces strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal*. FEMS Microbiol Ecol 51:167-177

Sabate, J., Cano, J., Querol, A., Guillamón, J. M. (1998) *Diversity of Saccharomyces strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years*. Lett Appl Microbiol 26:452-455

Toriya, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Mas, A. (2001) *Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years*. Antonie Van Leeuwenhoek 79(3-4):345-52.



Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Mas, A. (2003) *Effects of fermentation temperature on the strain population of Saccharomyces cerevisiae*. Int J Food Microbiol 80(1):47-53

Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M., Dequin, S. (2005) *Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study*. FEMS Yeast Research 5:959-969.

Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L. and Hallet, J.-N. (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. Appl Environ Microbiol 61:3521–3529

Anexos

## ANEXOS

### Anexo I - Perfis inter- $\delta$ de *S. cerevisiae* das vinhas em 2007

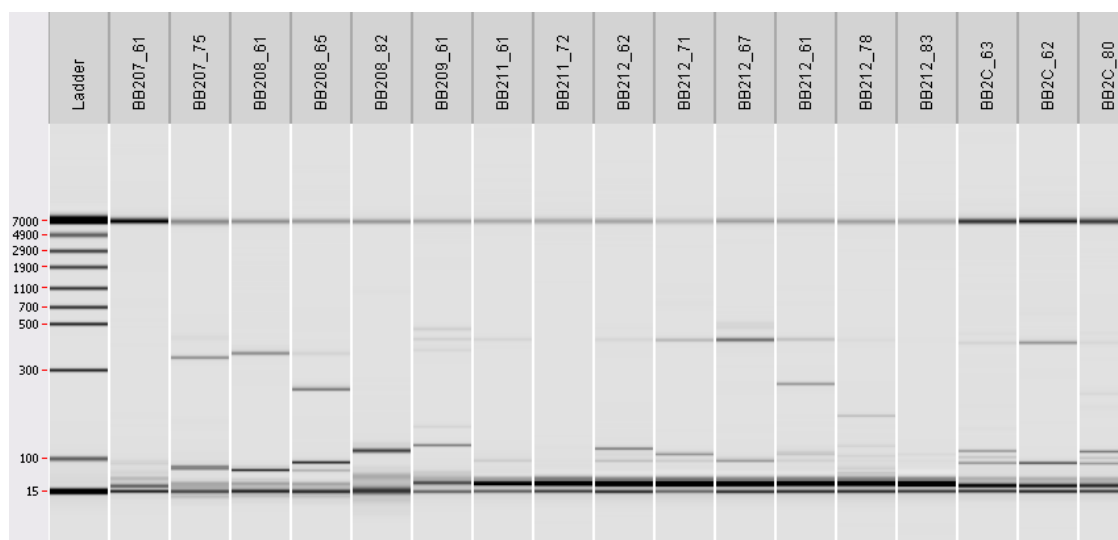


Figura 33 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Baga na vinha isolada 2.

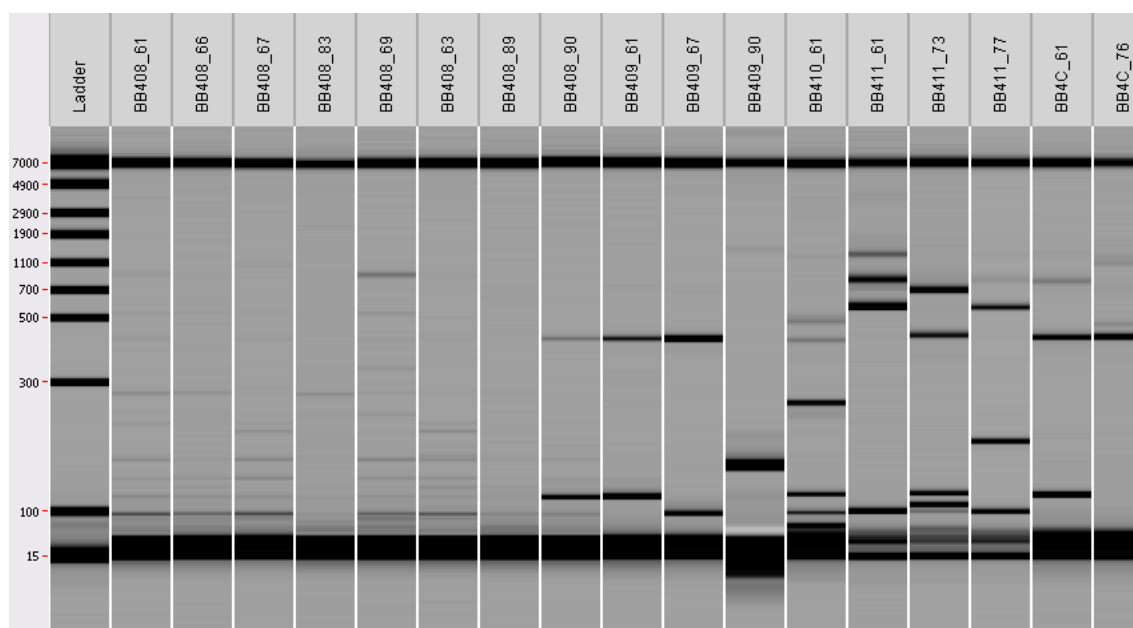


Figura 34 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Baga na vinha isolada 4.

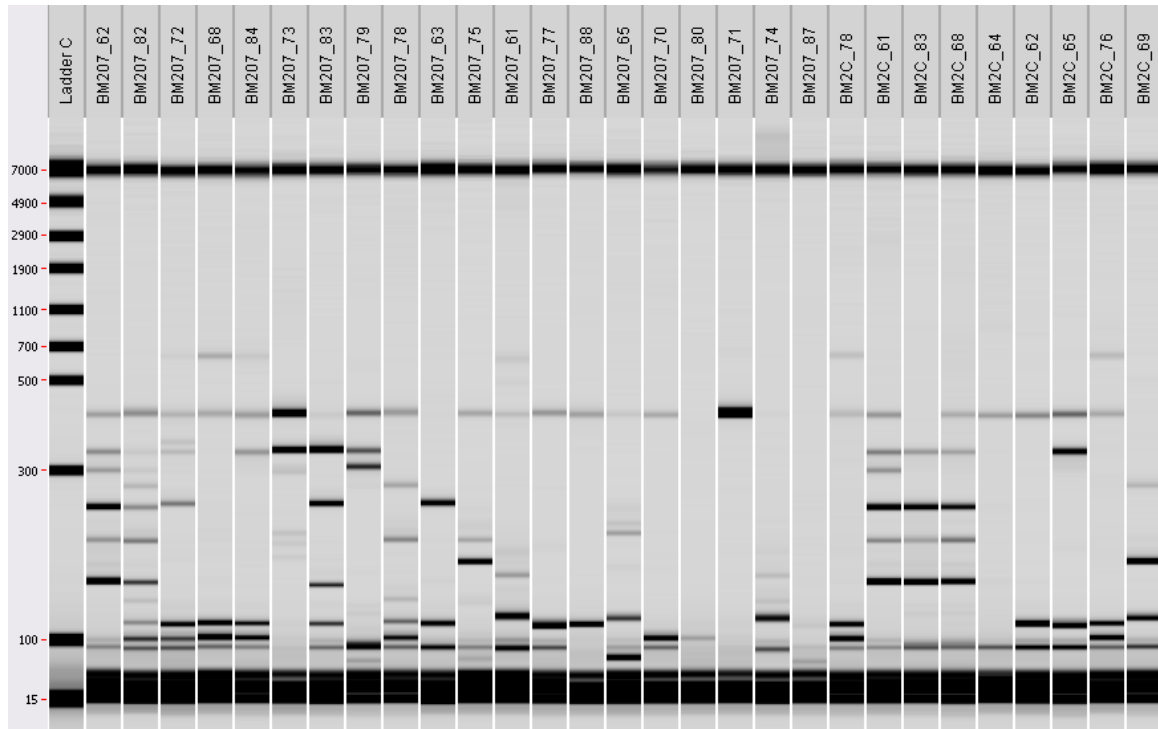


Figura 35 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Maria Gomes na vinha isolada, dados relativos a 2007.

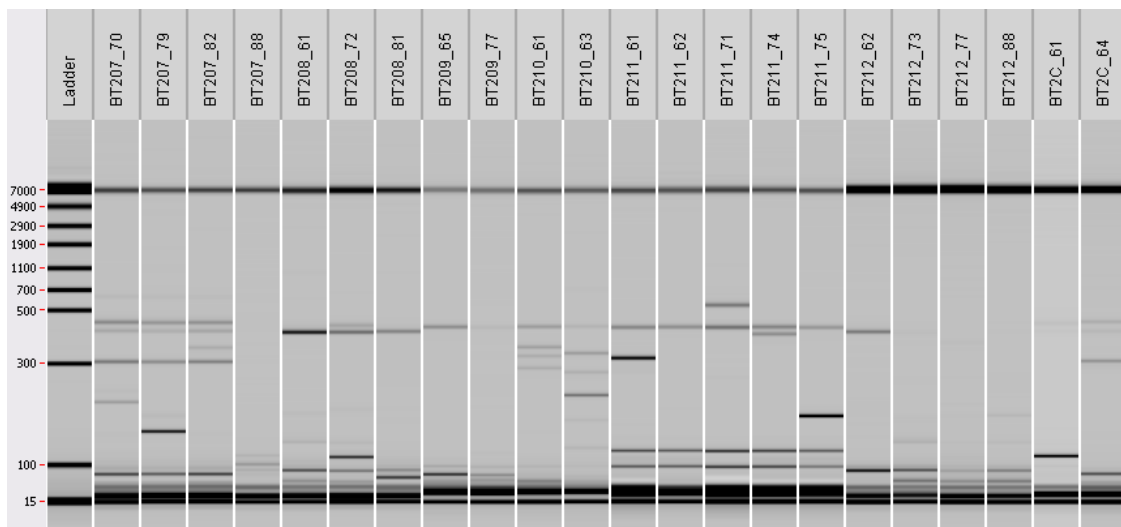


Figura 36 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Touriga Nacional na vinha isolada, dados referentes a 2007.

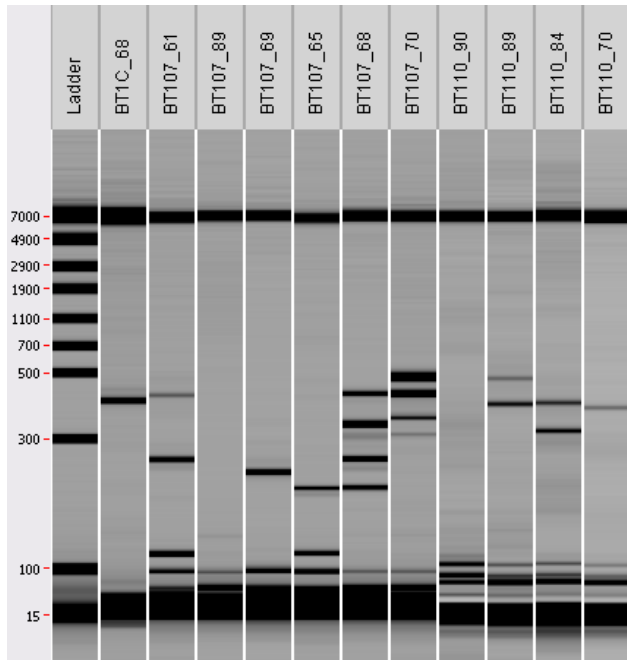


Figura 37 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Touriga Nacional na vinha mista, dados referentes a 2007.

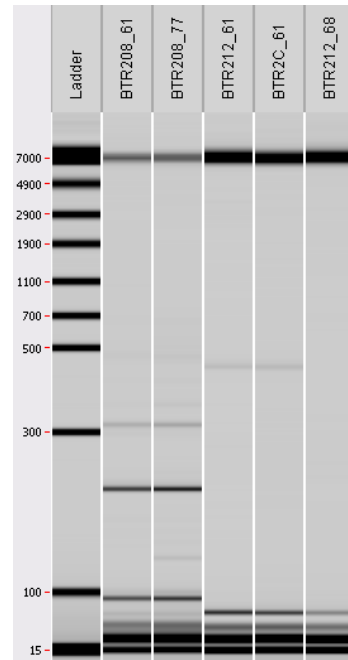


Figura 38 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Tinta Roriz na vinha isolada, dados relativos a 2007.

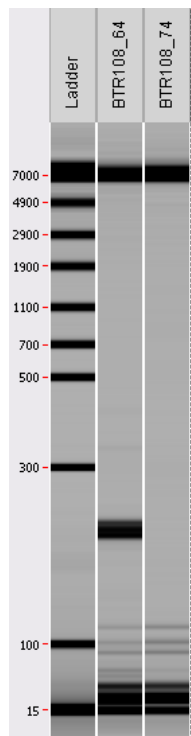


Figura 39 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Tinta Roriz na vinha mista, dados relativos a 2007.

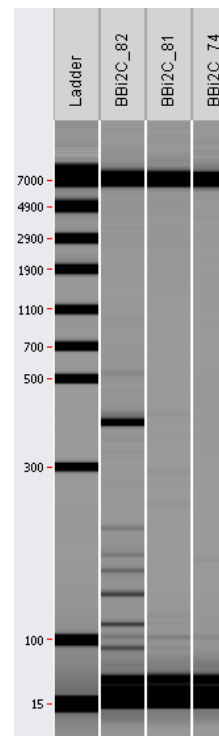


Figura 40 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Bical na vinha isolada, dados referentes a 2007.

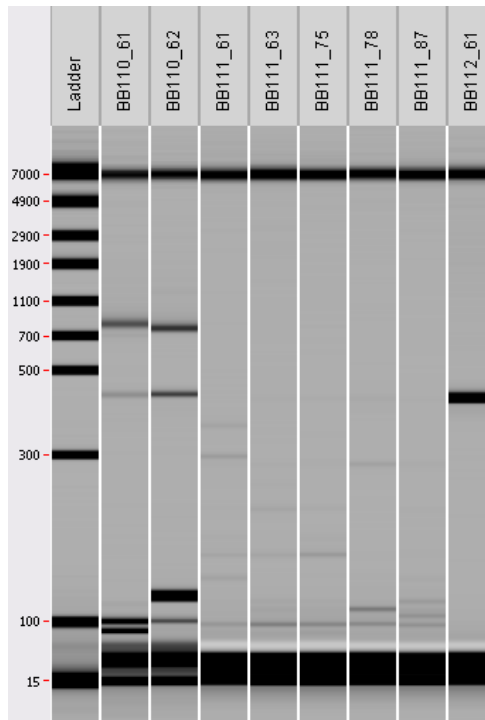


Figura 41 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Baga na vinha mista 1, dados referentes a 2007.

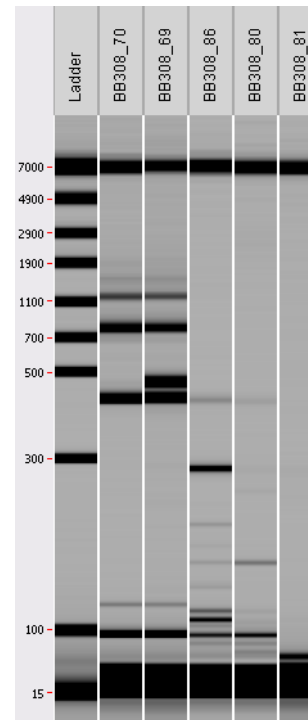
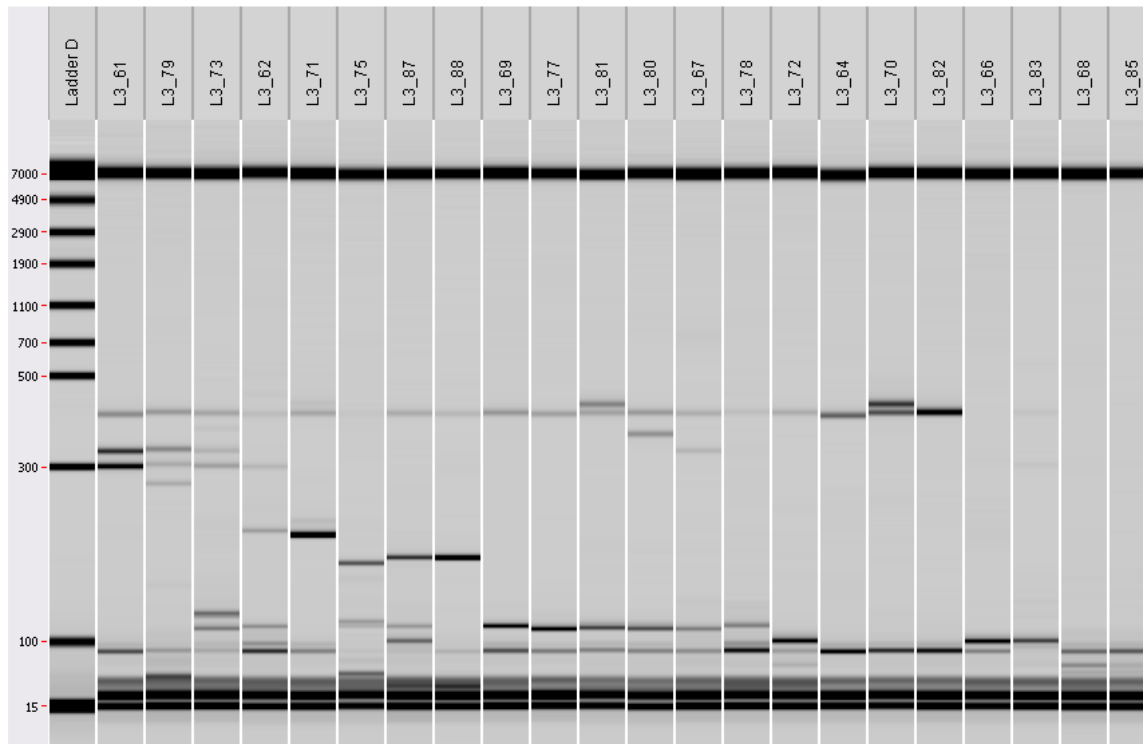
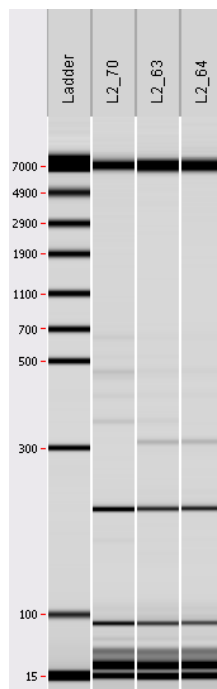


Figura 42 - Perfis inter- $\delta$  da Casta Baga na vinha mista 3, dados referentes a 2007.

**Anexo II - Perfis inter- $\delta$  de *S. cerevisiae* dos lagares em 2007.**



**Figura 43 - Perfis inter- $\delta$  do Lagar 3, dados referentes a 2007.**



**Figura 44 - Perfis inter- $\delta$  do Lagar 2, dados referentes a 2007.**

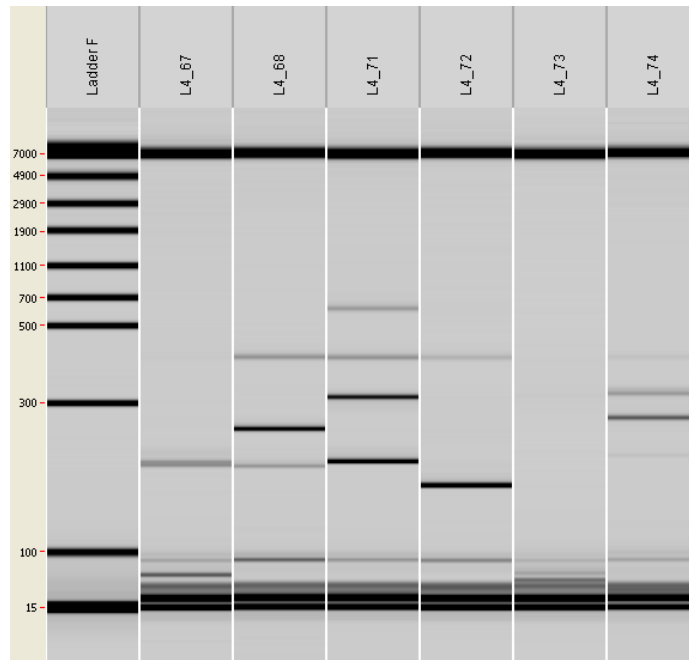


Figura 45 - Perfis inter- $\delta$  do Lagar 4, dados referentes a 2007.

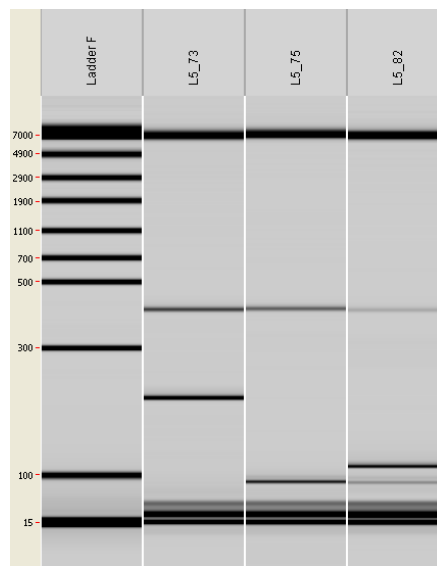
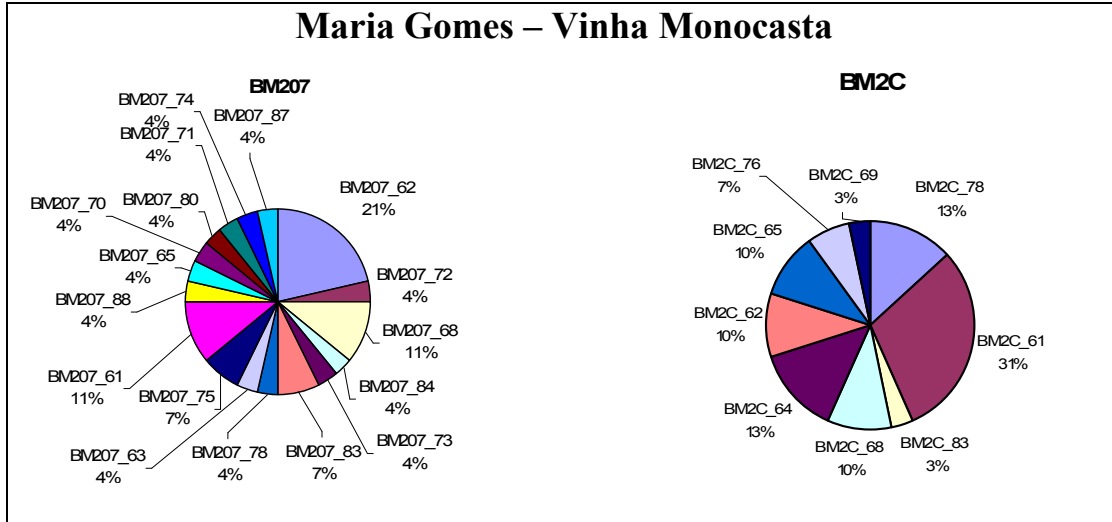


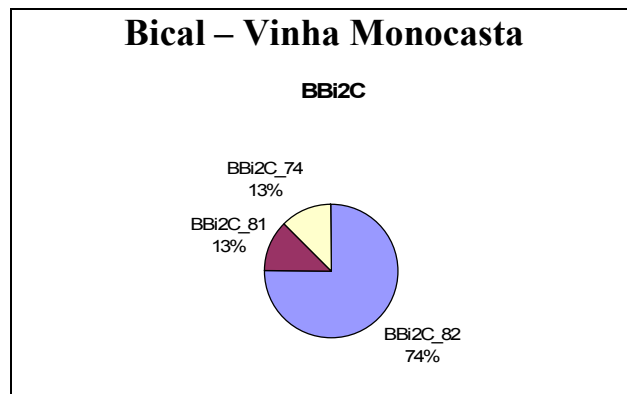
Figura 46 - Perfis inter- $\delta$  do Lagar 5, dados referentes a 2007.



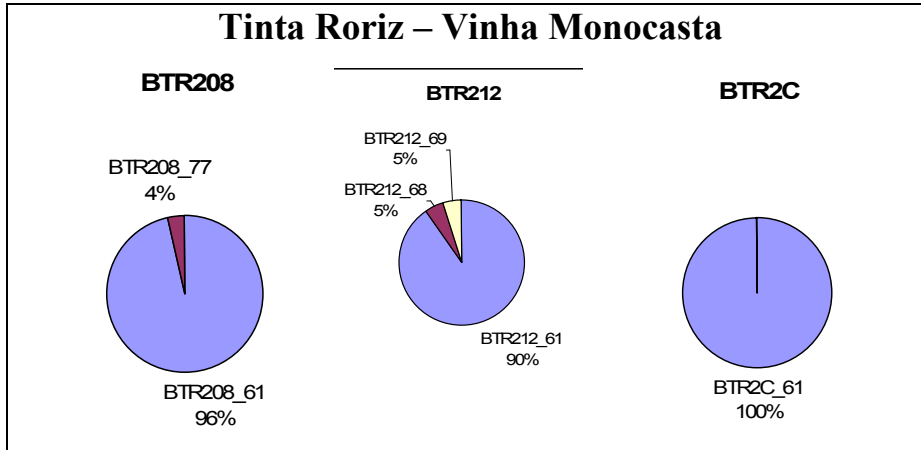
**Anexo III - Perfis inter- $\delta$  de *S. cerevisiae* das vinhas em 2007 – distribuição casta/vinha**



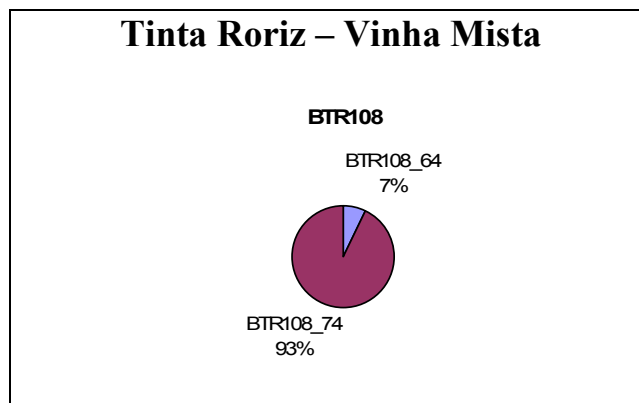
**Figura 47 - Perfis obtidos na Maria Gomes da Vinha monocasta. BM207 e BM2C, - réplicas. No caso da casta Maria Gomes só foi possível estudar duas réplicas da vinha isolada. Pode-se Existir uma grande diversidade nestas amostras, a réplica BM207 apresenta 17 perfis diferentes e BM2C exibe 9 perfis diferentes. Foi detectado um perfil em comum entre as réplicas que corresponde a BM2C\_76 que é igual a BM207\_68**



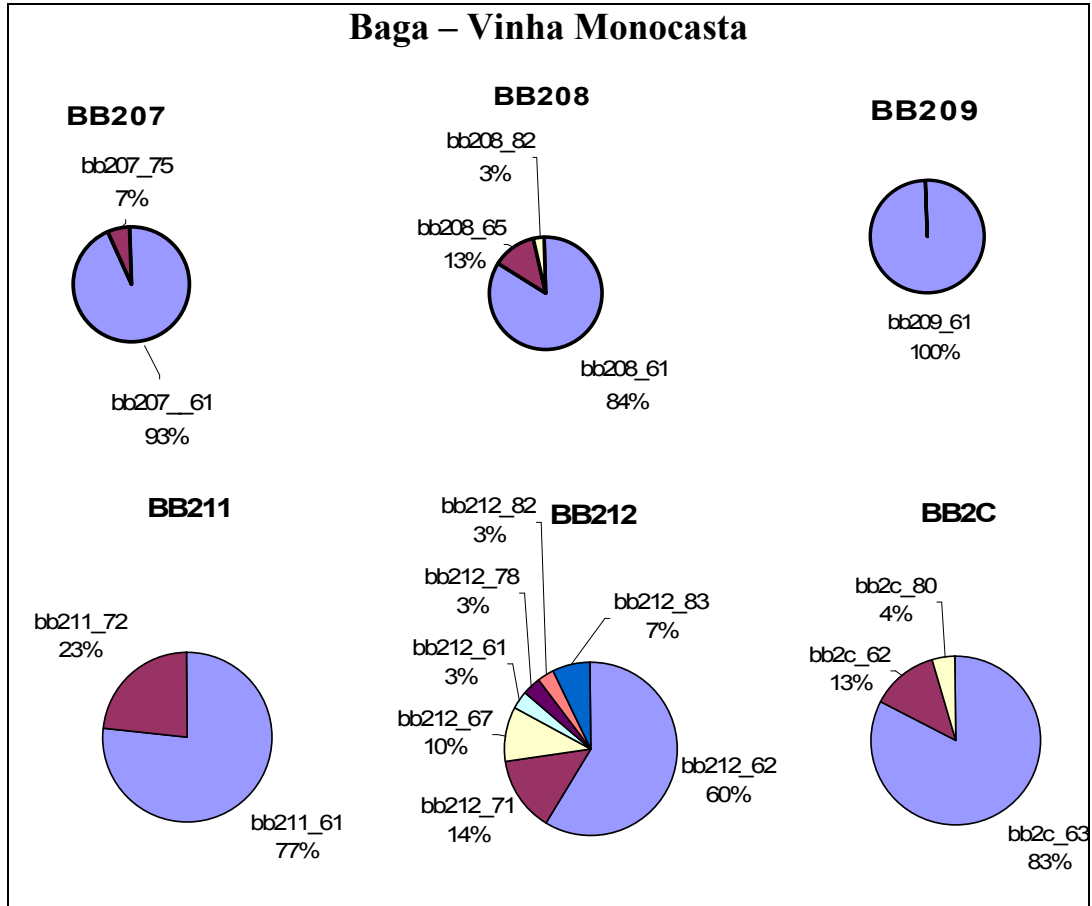
**Figura 48 - Perfis obtidos na Bical da Vinha monocasta. BBi2C, - réplica. Em Bical apenas foi possível analisar uma das réplicas, foram identificados três perfis, sendo o perfil BBi2C\_82 dominante.**



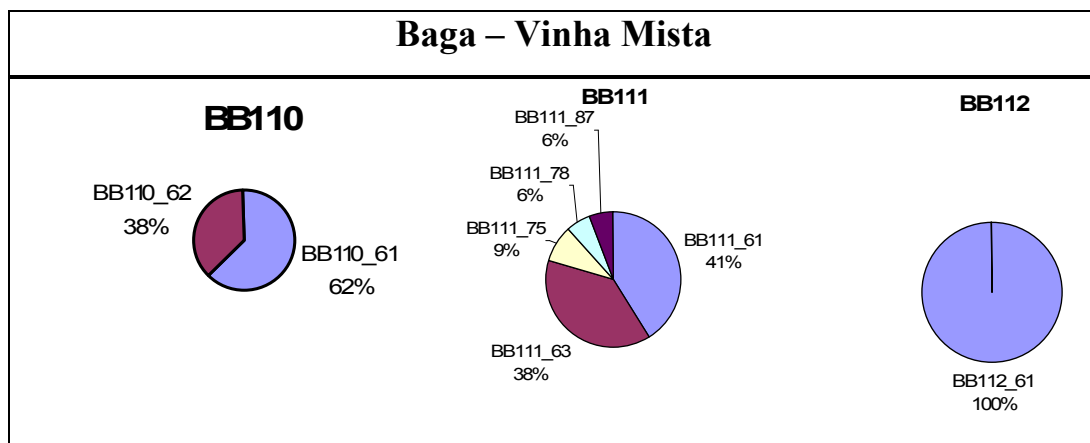
**Figura 49 - Perfis obtidos na Bical da Vinha monocasta.** BTR208, BTR212 e BTR2C - réplicas. Na casta Tinta Roriz foram analisadas amostras correspondentes a três réplicas. Na réplica BTR208 foram identificados dois perfis, em que BTR208\_61 correspondeu a 96% dos isolados. Na réplica BTR212 foram identificados três perfis, dos quais BTR212\_61 correspondeu a 90% das amostras. Na réplica BTR2C foi identificado apenas um perfil. É importante salientar que os perfis BTR212\_61 e BTR2C\_61 são iguais e que foram o perfil dominante na fermentação de ambas as réplicas.



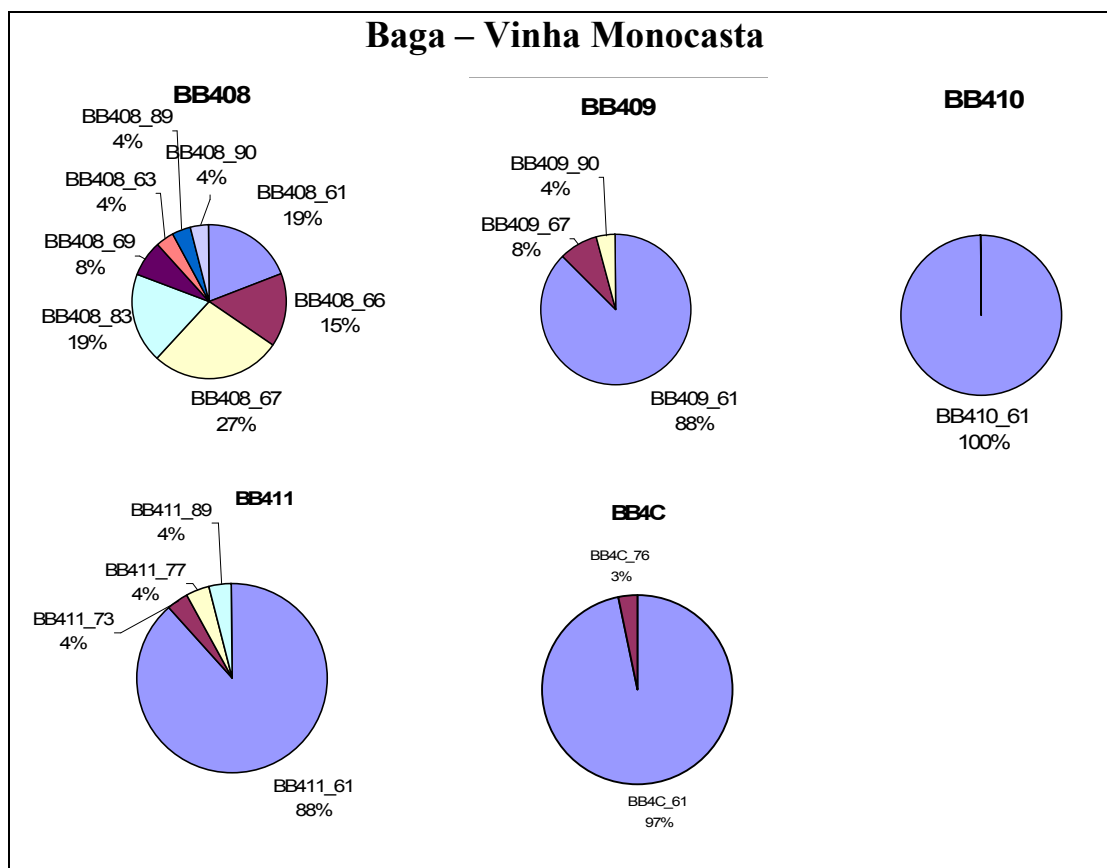
**Figura 50 - Perfis obtidos na Tinta Roriz da Vinha Mista.** BTR108 – réplica. Na vinha mista de Tinta Roriz foram identificados dois perfis, dos quais BTR108\_74\_ correspondeu a 93% dos isolados.



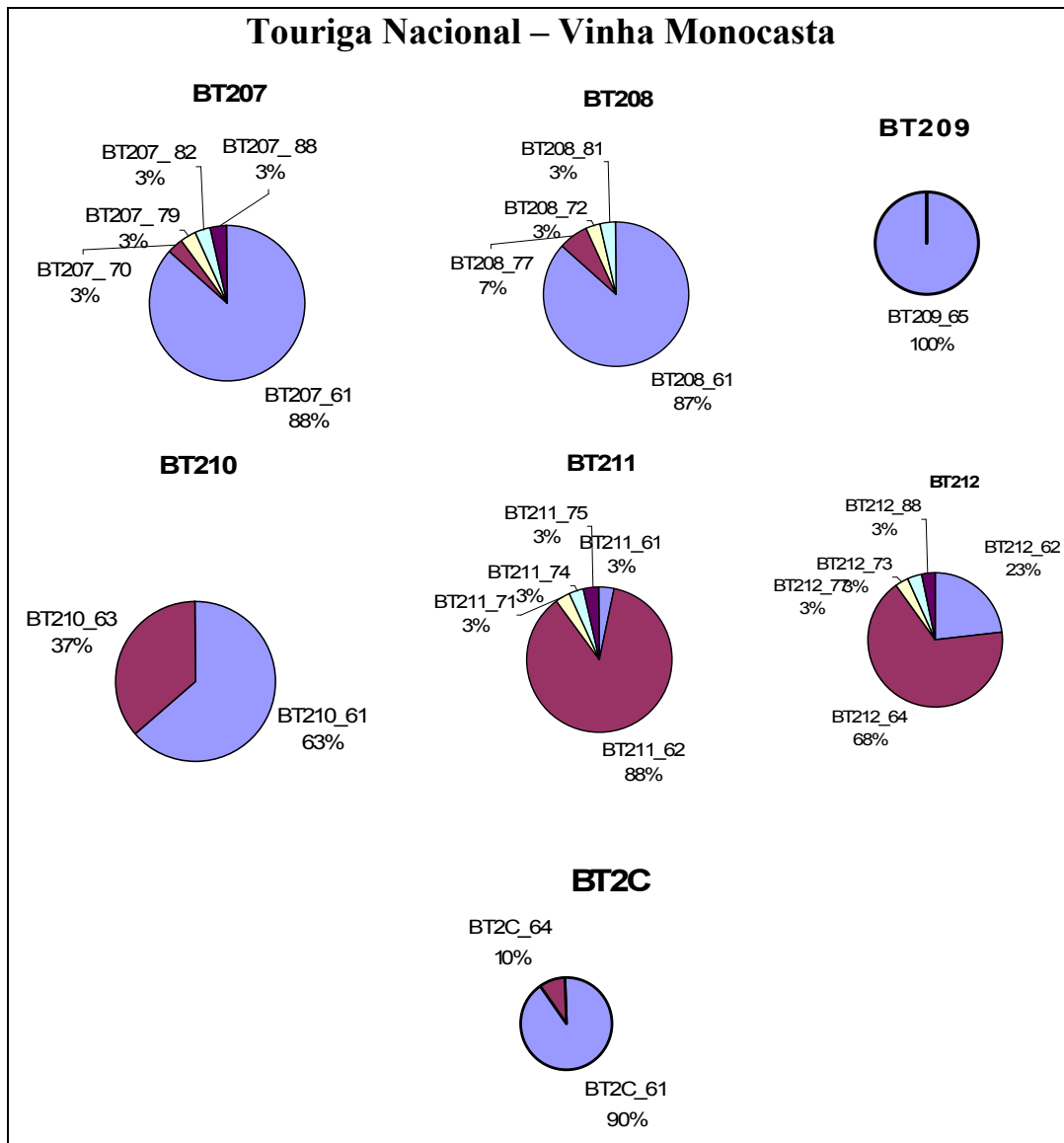
**Figura 51 - Perfis obtidos na Baga da Vinha monocasta 2.** BB207, BB208, BB209, BB211, BB212, BB2C - réplicas. Na vinha isolada da casta Baga houve um grande número de réplicas a terminar o processo de fermentação, e foi possível identificar um elevado número de estirpes de *S. cerevisiae*. Na réplica BB207 e BB211 foram identificados dois perfis. Na réplica BB208 foram identificados três. Na réplica BB209 foi encontrado apenas um perfil. e em BB2C foram identificados três perfis. Resta a réplica BB212 com sete perfis diferentes. Pode ainda concluir-se que existiu em todas as réplicas um perfil dominante. Foram ainda encontrados perfis comuns a algumas réplicas, os perfis BB2C\_63 e BB212\_62 demonstraram ser iguais.



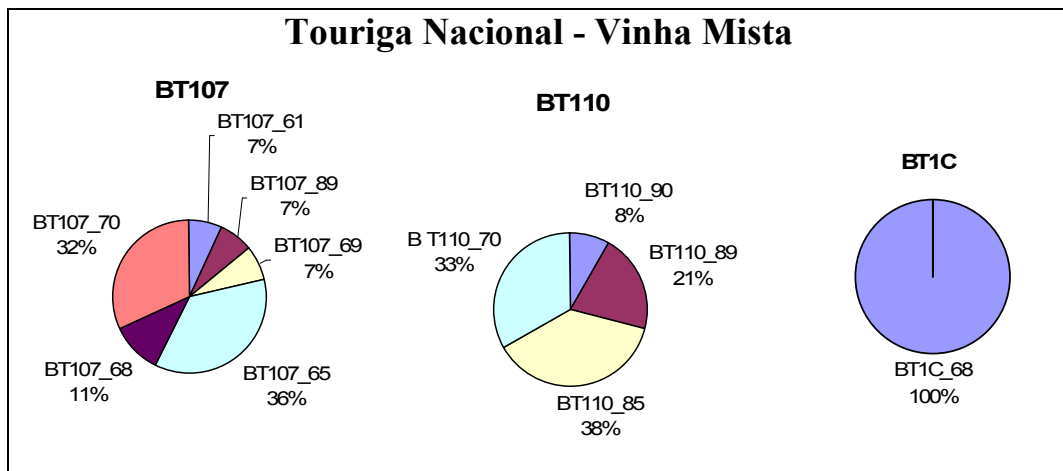
**Figura 52 - Perfis obtidos na Baga da Vinha Mista.** BB110, BB111, BB112. Nas amostras de Baga de vinha mista só três das réplicas terminaram a fermentação. Na réplica BB110 identificaram-se dois perfis e na réplica BB111 foram identificados seis perfis diferentes. Na réplica BB112 foi identificado apenas o perfil BB112\_61 que correspondeu a 100% dos isolados.



**Figura 53 - Perfis obtidos na Baga da Vinha monocasta 4.** BB408, BB409, BB410, BB411 e BB4C - réplicas. De todas as réplicas a que apresentou maior diversidade foi BB408 com 8 perfis diferentes, seguida de BB411 com 4 perfis identificados. Em BB409 foram identificados 3 perfis Na réplica BB4C identificaram-se 2 perfis diferentes. Por fim temos BB410 onde foi identificado o perfil BB410\_61 que correspondeu a 100% dos isolados. Relativamente aos perfis de *S. cerevisiae* identificados nas vinhas monocasta de Baga, BB4C\_81 e BB209\_61 são iguais

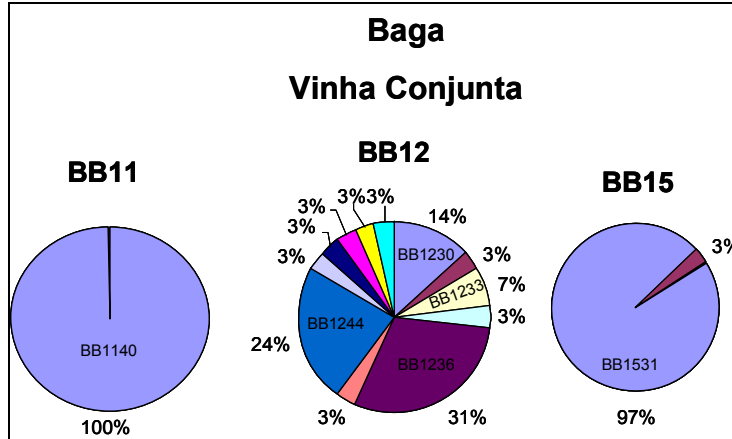


**Figura 54 - Perfis obtidos de Touriga Nacional na vinha Monocasta.** BT207, BT208, BT209, BT210, BT211, BT212 e BT2C - réplicas. No caso de Touriga Nacional em vinha isolada todas as réplicas terminaram a fermentação, pelo que foi possível recolher um elevado número de estirpes de *S. cerevisiae*. Com cinco perfis identificados surgem as réplicas BT207, BT211 e BT212. Na réplica BT208 foram identificados quatro perfis, em BT2C e BT210 foram identificados dois e por fim na réplica BT209 foi identificado um. Foram encontrados perfis em comum entre as réplicas, foi o caso de BT2C\_61 que é igual a BT208\_77 e de BT2C\_64 que é igual BT207\_61. Existiu em todas as réplicas uma estirpe dominante.

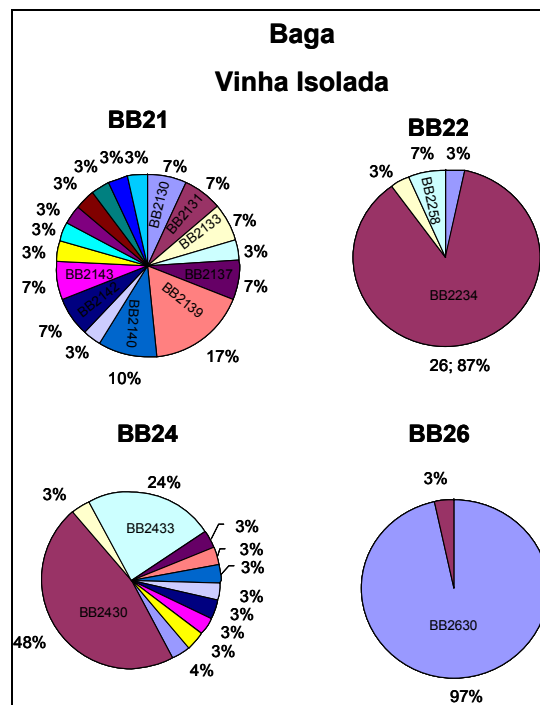


**Figura 55 - Perfis obtidos de Touriga Nacional na vinha Mista.** BT107, BT110 e BT1C - réplicas. A réplica BT1C foi a que apresentou menor diversidade, apenas com um perfil. A réplica BT107 apresentou seis perfis, e BT110 apresentou quatro. É importante referir que existe um perfil em comum entre as amostras da vinha isolada e da vinha mista.

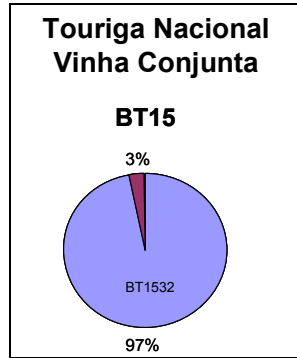
**Anexo IV - Perfis inter- $\delta$  de *S. cerevisiae* das vinhas em 2006 – distribuição casta/vinha**



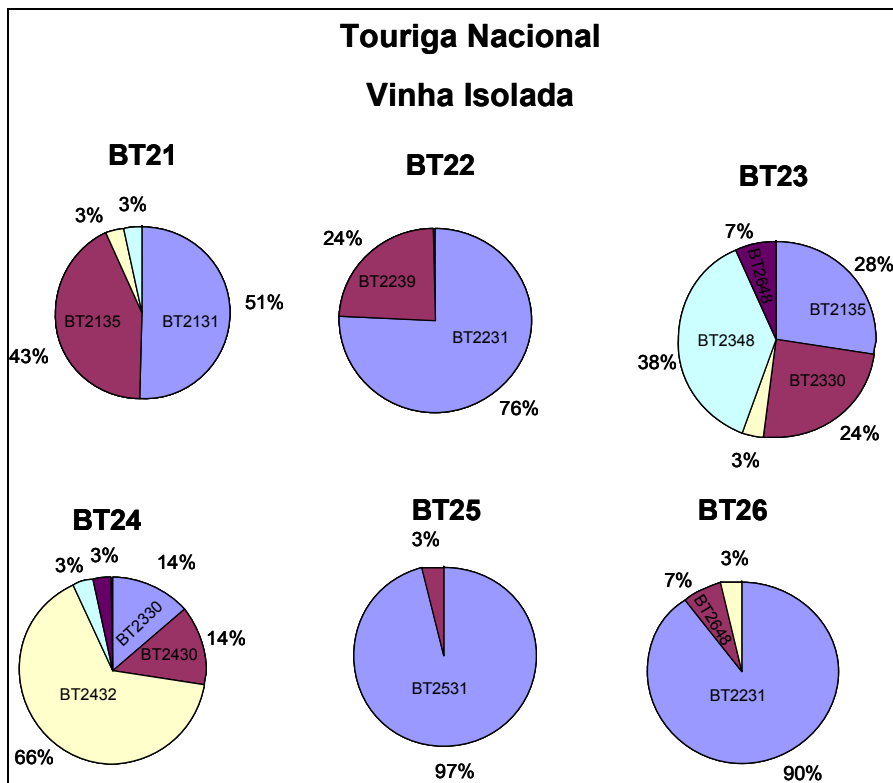
**Figura 56 – Perfis obtidos na Baga da Vinha mista.** BB11, BB12 e BB15 - réplicas. Os perfis predominantes na vinha mista de Baga são: BB1140 com 100% dos isolados na replica BB11; BB1244, BB1236 e BB1230 predominando 24%,31% e 14% respectivamente da replica BB12; na réplica BB15 o perfil predominante foi BB1531 com 97%.



**Figura 57 - Perfis obtidos na Baga da Vinha isolada.** BB21, BB22, BB24 e BB26- réplicas. Relativamente aos perfis encontrados na casta Baga na vinha moncasta podemos referir: na réplica BB21, entre 17 perfis diferentes, o perfil predominante é BB2139 com 17%; na réplica BB22, de entre quatro, o perfil predominante foi BB2234 com 87%; na réplica BB24 o perfil predominante entre os 11 encontrados foi BB2430 representando 48% e o perfil BB2433 com 24%; finalmente a replica BB26 apresenta dois perfis distintos, tendo como perfil predominante BB2630 com 97%.

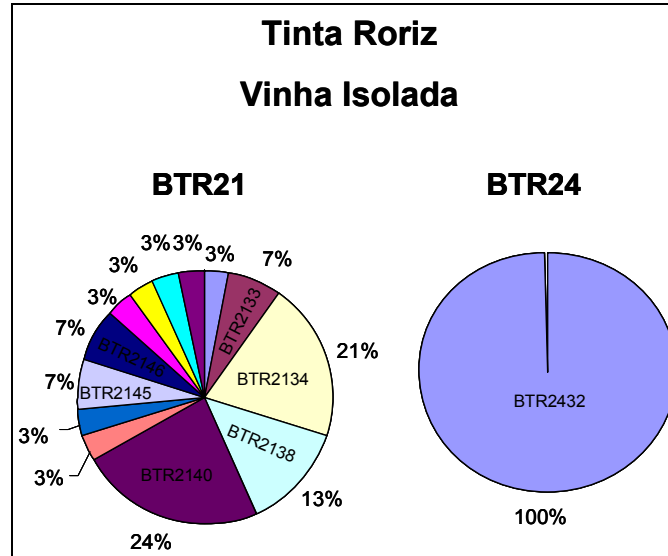


**Figura 58-** Perfis obtidos na Touriga Nacional da Vinha mista. BT15- réplica. Touriga Nacional na vinha mista apresenta como perfil dominante BT1532 sendo responsável por cerca de 97% perfis obtidos.

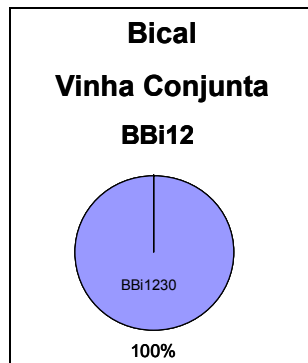


**Figura 59-** Perfis obtidos na Touriga Nacional da Vinhas monocasta. BT21, BT22, BT23, BT24, BT25 e BT26- réplicas. Relativamente a Touriga Nacional Vinha monocasta podemos referir: a réplica BT21 apresenta como perfis dominantes BT2131 e BT2135, representando 51% e 43% respectivamente; a réplica BT22 mostra como perfil predominante BT2231 com 76%; na réplica BT23 os perfis predominantes são BT2348 com 38%, BT2330 com 24% e de salientar o perfil já obtido na replica BT21, BT2135 com 28%; a réplica BT24 demonstra como perfil predominante o perfil BT2432 com 66%, é de salientar o perfil BT2330 com 14%, já obtido na réplica BT23; a réplica BT25 mostra como perfil dominante BT2531; finalmente a replica BT26 apresenta como perfil predominante BT2231, que já anteriormente tinha aparecido na réplica BT22. As réplicas de Baga apresentaram baixa diversidade, tendo variado o grupo de perfis diferentes de 2 a 6 de acordo com a réplica.

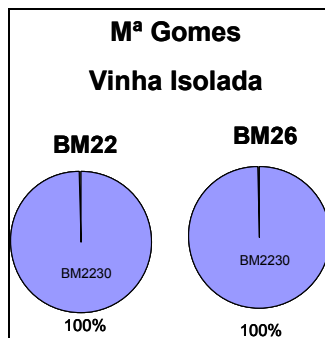




**Figura 60** - Perfis obtidos na Tinta Roriz da Vinha monocasta. BTR21 e BT24, - réplicas. A réplica BTR21 apresenta como perfis dominantes BTR2140 com 24%, BTR2134 com 21% e BTR2138 com 13%, e também importante referir que esta é uma réplica com grande diversidade apresentando 13 perfis distintos. Relativamente a replica BTR2432 esta apresenta um único perfil, BTR2432.



**Figura 61** - Perfis obtidos na Bical da Vinha mista. BBi12 - réplica. Bical colhida da vinha mista apenas apresentou um perfil BBi1230.



**Figura 62** - Perfis obtidos na Maria Gomes Vinha Isolada. BM22 e BM26. Relativamente aos perfis obtidos na Maria Gomes na vinha Isolada, nas réplicas BM22 e BM26 apenas se obteve um perfil em ambas, que foi BM2230.

Índice de figuras

Índice de Figuras

Figura 1 - Região amplificada pelos primers ITS1 e ITS4 (Guillamón <i>et al</i> 1998). .....	3
Figura 3 - Localização dos 6 lagares onde foram colhidas amostras de mosto em Setembro de 2007. ....	12
Figura 4 - Produtos de amplificação de DNA por PCR da região ITS, separados num Labchip. ....	20
Figura 5 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com <i>primers</i> específicos, separados em gel de agarose a 2%. .....	21
Figura 6 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com <i>primers</i> específicos, separados em gel de agarose a 2%. .....	22
Figura 7 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com <i>primers</i> específicos, separados em gel de agarose a 2%. .....	22
Figura 8 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com <i>primers</i> específicos, separados em gel de agarose a 2%. .....	23
Figura 9 - Produtos de amplificação de DNA por PCR com <i>primers</i> específicos, separados em gel de agarose a 2%. .....	23
Figura 10 – Produtos de amplificação de DNA por PCR com <i>primers</i> específicos, separados em gel de agarose a 2%. .....	24
Figura 11 - Exemplo de perfil de bandas de DNA amplificado de uma região do gene <i>MET2</i> após digestão com a enzima de restrição <i>EcoRI</i> . .....	25
Figura 12 - Perda de peso dos mostos ao longo da fermentação, referentes às castas de vinhas monocasta. ...	26
Figura 13 - Perda de peso dos mostos ao longo da fermentação, referentes às castas da vinha mista. ....	28
Figura 14 - Resumo das réplicas que concluíram a fermentação. ....	28
Figura 15 - Espécies identificadas nas vinhas monocasta nas castas Maria Gomes, Bical, Tinta Roriz, Touriga Nacional e Baga, no Mosto inicial e Início e Final de Fermentação .....	32
Figura 16 - Espécies identificadas na vinha mista nas castas Maria Gomes, Bical, Tinta Roriz, Touriga Nacional e Baga, no Mosto inicial e Início e Final de Fermentação. ....	35
Figura 17 - Folha e cacho de uvas da casta Baga. ....	36
Figura 18 - Espécies encontradas nas várias vinhas de Baga. ....	37
Figura 19 - Espécies encontradas nas vinhas monocasta, no Mosto inicial e Início e Final de Fermentação. ...	39
Figura 20 - Espécies encontradas na vinha mista no Mosto inicial e Início e Final de Fermentação .....	40
Figura 21 - Espécies encontradas nos Lagares 1, 2, 3, 4, 5 e 6. ....	44
Figura 22 - Espécies encontradas nos Lagares 3, 5 e 6 no Início de Fermentação. ....	45
Figura 23 - Espécies identificadas nos Lagares 1, 2, 3, 4, 5 e 6 no Início e Final de Fermentação. ....	46
Figura 24 - Total de isolados obtidos no final da fermentação em Vinha Mista e Vinha Monocasta. ....	48
Figura 25 - Quantidade de perfis obtidos referentes às várias castas em vinha monocasta e vinha mista. ....	48
Figura 26 – Total de isolados obtidos no final da fermentação em Vinha Mista e Vinhas Monocasta. ....	52
Figura 27 - Quantidade de perfis obtidos nas várias castas em vinha monocasta e vinha mista. ....	52
Figura 28 - Diversidade de perfis de <i>S. cerevisiae</i> nos lagares, referentes a 2007. ....	55
Figura 29 - Diversidade de perfis nos lagares, referentes ao ano 2006. ....	56
Figura 30 - Ocorrência dos perfis por lagares em 2006. ....	56
Figura 31 – Predominância dos perfis localizados em mais do que um lagar. ....	56
Figura 32 - Comparação dos perfis obtidos em 2005 e 2006 de amostras de lagares. ....	57
Figura 33 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Baga na vinha isolada 2. ....	72
Figura 34 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Baga na vinha isolada 4. ....	72
Figura 35 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Maria Gomes na vinha isolada, dados relativos a 2007. ....	73
Figura 36 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Touriga Nacional na vinha isolada, dados referentes a 2007. ....	73
Figura 37 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Touriga Nacional na vinha mista, dados referentes a 2007. ....	74
Figura 38 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Tinta Roriz na vinha isolada, dados relativos a 2007. ....	74
Figura 39 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Tinta Roriz na vinha mista, dados relativos a 2007. ....	74
Figura 40 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Bical na vinha isolada, dados referentes a 2007. ....	74
Figura 41 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Baga na vinha mista 1, dados referentes a 2007. ....	75
Figura 42 - Perfis inter- $\delta$ da Casta Baga na vinha mista 3, dados referentes a 2007. ....	75
Figura 43 - Perfis inter- $\delta$ do Lagar 3, dados referentes a 2007. ....	76
Figura 44 - Perfis inter- $\delta$ do Lagar 2, dados referentes a 2007. ....	76
Figura 45 - Perfis inter- $\delta$ do Lagar 4, dados referentes a 2007. ....	77
Figura 46 - Perfis inter- $\delta$ do Lagar 5, dados referentes a 2007. ....	77
Figura 47 - Perfis obtidos na Maria Gomes da Vinha monocasta. ....	78
Figura 48 - Perfis obtidos na Bical da Vinha monocasta. ....	78
Figura 49 - Perfis obtidos na Bical da Vinha monocasta. ....	79
Figura 50 - Perfis obtidos na Tinta Roriz da Vinha Mista. ....	79

Figura 51 - Perfis obtidos na Baga da Vinha monocasta 2.....	80
Figura 52 - Perfis obtidos na Baga da Vinha Mista.....	81
Figura 53 - Perfis obtidos na Baga da Vinha monocasta 4.....	81
Figura 54 - Perfis obtidos de Touriga Nacional na vinha Monocasta.....	82
Figura 55 - Perfis obtidos de Touriga Nacional na vinha Mista.....	83
Figura 56 – Perfis obtidos na Baga da Vinha mista.....	84
Figura 57 - Perfis obtidos na Baga da Vinha isolada.....	84
Figura 58- Perfis obtidos na Touriga Nacional da Vinha mista.....	85
Figura 59- Perfis obtidos na Touriga Nacional da Vinhas monocasta.....	85
Figura 60 - Perfis obtidos na Tinta Roriz da Vinha monocasta.....	86
Figura 61 - Perfis obtidos na Bical da Vinha mista.....	86
Figura 62 - Perfis obtidos na Maria Gomes Vinha Isolada.....	86



\u00cdndice de tabelas

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Ciclo de amplificação das regiões ITS.....	13
Tabela 2 - Espécie e tamanho do amplicão esperado usando os primers ITS1 e ITS4 (adaptado de Granchi <i>et al</i> , 1999).....	14
Tabela 3 – Regiões do genoma das leveduras usadas na sua identificação.....	15
Tabela 4 - Ciclo de PCR com <i>primers</i> específicos.....	16
Tabela 5 – Ciclo de PCR MET2 .....	16
Tabela 6 - Ciclo de PCR da região Inter- $\delta$ .....	17
Tabela 7 – Tabela resumo dos perfis inter- $\delta$ encontrados nas amostras da colheita de 2007.....	49