



Andreia Sofia Félix Teixeira

Licenciatura em Engenharia Biotecnológica

**Estudos moleculares e enológicos da biota
de leveduras de uvas da casta Touriga
Nacional**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Filomena L. Duarte, Investigador Auxiliar,
INRB/INIA - Dois Portos

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Vieira Viana Baptista
Arguente: Prof. Doutor José Paulo Sampaio



Andreia Sofia Félix Teixeira

Licenciatura em Engenharia Biotecnológica

**Estudos moleculares e enológicos da biota
de leveduras de uvas da casta Touriga
Nacional**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Filomena L. Duarte, Investigador Auxiliar,
INRB/INIA - Dois Portos

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Vieira Viana Baptista
Arguente: Prof. Doutor José Paulo Sampaio



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro, 2011

Estudos moleculares e enológicos da biota de leveduras de uvas da casta Touriga Nacional

Copyrighty © por **Andreia Sofia Félix Teixeira**, FTC/UNL e da UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Finalizada mais uma etapa importante da minha vida não poderia deixar o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram e me motivaram ao longo do trabalho.

Em primeiro lugar quero expressar o meu sincero agradecimento à Doutora Filomena Duarte pela oportunidade de estágio que me proporcionou, pela disponibilidade, ensinamentos transmitidos, pelo grande profissionalismo e pela maneira positiva com que sempre me incentivou a enfrentar os obstáculos e sobretudo pela motivação quando já nada fazia sentido nesta etapa final do trabalho. Pela confiança depositada em mim ao longo destes três anos de convivência e acima de tudo por acreditar sempre em mim. Foi um prazer trabalhar consigo! Pela amizade...Por tudo...

Ao professor Doutor José Paulo Sampaio, o meu elo de ligação à FCT, pelo acompanhamento do trabalho e pela disponibilidade sempre demonstrada.

Um agradecimento muito especial à Filomena Alemão, por toda a ajuda ao longo destes meses de trabalho, mesmo dispensando dias da sua aposentação. Por todos os incentivos, conselhos, pelo profissionalismo e sobretudo uma grande amizade. Recordarei sempre os bons momentos passados no laboratório de Microbiologia e as nossas peripécias encaradas sempre com alegria.

À Engenheira Ilda Caldeira pela preciosa ajuda e sempre disponibilidade ao longo do trabalho. Pela força, motivação, conselhos, convívio e partilha de momentos cheios de alegria!

Um agradecimento à Engenheira Sara Canas pela prestabilidade e ajuda no tratamento de alguns dados do trabalho, pela boa disposição e por contagiar todos com a sua alegria constante!

Um sincero obrigado a todos aqueles que dispensaram o seu tempo nas longas sessões de treino e prova de vinhos sem os quais não era possível a concretização do presente trabalho. Pelo empenhamento, persistência e disponibilidade particularmente à Doutora Filomena Duarte, Engenheira Ilda Caldeira, Engenheira Sara Canas, Engenheira Sofia Catarino, Doutora Geni Zanol, Engenheiro José Silvestre, Engenheiro Pedro Clímaco, Engenheiro João Brazão, Doutor Sun Baoshan, Filomena Alemão, Otília Cerveira e Mónica Assunção.

À Doutora Margarida Baleiras-Couto pela confiança depositada em mim e pelos momentos partilhados de extrema alegria no laboratório.

A todos os momentos partilhados no laboratório de Microbiologia no qual tive o prazer de conhecer pessoas fantásticas. Um obrigado à Maria pelos momentos partilhados, pela diversão e amizade, pela sempre companhia no “turno nocturno” durante a elaboração do trabalho prático. À Mónica pelo companheirismo desenvolvido no laboratório, pela ajuda e pela boa disposição.

À Deolinda e à Amélia pelo apoio e disponibilidade na concretização de algumas tarefas laboratoriais.

Apesar de não terem contribuído directamente para a realização deste trabalho, agradeço a motivação e os momentos de extrema alegria, confidências e amizade. Um muito obrigado ao Jorge e à Irene.

Um profundo obrigado a todos os funcionários e ex-funcionários da ex-Estação Vitivinícola Nacional com quem convivi ao longo deste tempo e que sempre me fizeram sentir parte desta grande família.

À Sara, Clau, Bá amigas e colegas de curso pela amizade, ajuda, diversão e compreensão em momentos difíceis.

Agradecimentos

Aos meus amigos, especialmente à Tânia, Vasco e Miguel, por toda a paciência do mundo e encorajamento em momentos mais difíceis, pela infinita amizade! Um muitíssimo obrigado!

Aos meus pais, por terem sempre acreditado em mim, pelo apoio, conselhos, pelo esforço que despenderam em mim durante estes anos e pelo orgulho que sempre demonstraram em mim e que sem eles seria impossível ter chegado aqui! Obrigada por estarem sempre presentes!

À minha irmã e ao meu cunhado pela amizade, carinho, compreensão, por todos os momentos! Por tudo...

Ao meu sobrinho, Santiago, que apesar de ser apenas 9 meses de gente sempre foi uma motivação para os momentos mais difíceis. Que possas sempre ver em mim um exemplo...

A todos...

...um infinito obrigado

Andreia

Resumo

A diversidade de leveduras encontradas em uvas da casta Touriga Nacional (TN) foi avaliada em três vinhas de duas regiões do país. Os isolados obtidos às 0 e 48 horas após o esmagamento das uvas e após a perda de peso de 70 g/l do mosto, foram caracterizados por análise dos perfis de restrição de uma região do rDNA 26S, com as enzimas *HaeIII*, *CfoI*, *MseI*, *HinfI* e *Apal*. Dos 570 isolados analisados, identificaram-se 21 espécies de leveduras, tendo a espécie *H. uvarum* sido a mais detectada em todas as vinhas. Observou-se uma boa correspondência entre a identificação obtida pelos perfis de restrição e os resultados da sequenciação.

Nas vinhas de Dois Portos, Palhacana e Montemor-o-Novo a diversidade de espécies detectadas foi diferente, observando-se maior biodiversidade para a vinha de Dois Portos. Embora para a vinha de Palhacana tenha sido encontrado um maior número de espécies, a grande maioria dos isolados pertencia apenas a uma espécie, reflectindo-se numa menor biodiversidade. Para a vinha de Montemor-o-Novo a diversidade de espécies foi reduzida.

Realizou-se a caracterização enológica de isolados das espécies encontradas às 70 g/l de perda de peso, sendo avaliados 23 isolados. Para os isolados em estudo observou-se um perfil de fermentação em massas vínicas de TN, mais lento do que para uma levedura comercial, utilizada como referência. Os isolados da espécie *I. terricola* revelaram-se os maiores produtores de sulfureto de hidrogénio, detectado química e sensorialmente. Verificou-se um efeito altamente significativo da espécie para a maioria dos parâmetros químicos avaliados. Efeito da espécie também foi observado para os descritores sensoriais do aroma orthonasal, aroma retronasal e caracterização do sabor. Sensorialmente os fermentados obtidos pelos isolados de *C. zemplinina* foram os que apresentaram intensidade significativamente maior dos aromas característicos da casta Touriga Nacional, designadamente esteva, bergamota e violeta e melhor apreciação global.

Palavras-chave: leveduras, ARDRA, biota de uvas, caracterização enológica, Touriga Nacional.

Abstract

Yeast diversity of Touriga Nacional grape variety was evaluated in three vineyards from two wine regions. The isolates obtained at 0 and 48 hours after crushing and when the must weight loss was 70 g/l, were characterized by restriction profiles analysis of a region from 26S rDNA with endonucleases *HaeIII*, *CfoI*, *MseI*, *HinfI* and *ApaI*. From the 570 isolates analyzed, 21 yeast species were identified, and *H. uvarum* was the most frequently detected species in all the vineyards. There was a good correspondence between the identification obtained by restriction profiles and the sequencing results. Dois Portos, Palhacana and Montemor-o-Novo presented different yeast diversity, with higher biodiversity in Dois Portos vineyard.

The oenological characterization of 23 isolates belonging to the species found at 70 g/l of weight of loss was performed. The isolates showed a fermentation profile in TN wine grapes slower than a commercial yeast, used as reference. The isolates of the specie *I. terricola* were the largest producers of hydrogen sulphide detected sensorial and chemically. There was a highly significant effect of the species on most chemical parameters evaluated. Species effect was also observed for the sensorial descriptors. The fermentation products obtained by *C. zemplinina* isolates presented significantly higher intensity of Touriga Nacional characteristic aromas, including bergamot-like, rock-rose and violet and a higher overall quality.

Keywords: yeasts, ARDRA, grapes biota, oenological characterization, Touriga Nacional.

Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Índice de Figuras.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Generalidades do vinho.....	1
1.2. Diversidade de leveduras na produção de vinho.....	1
1.2.1. Vinha e ambiente de adega.....	2
1.2.2. Fermentação.....	5
1.2.3. Características gerais.....	7
1.3. Metodologias de identificação das leveduras.....	11
1.4. Avaliação do aroma.....	14
1.5. A casta Touriga Nacional.....	15
1.6. Objectivos e enquadramento do trabalho.....	17
2. Material e Métodos.....	19
2.1. Identificação dos isolados.....	19
2.1.1. Amplificação de um fragmento do rDNA 26S.....	19
2.1.2. Digestão enzimática.....	21
2.1.3. Diferenciação de <i>H. uvarum</i> / <i>H. guilliermondii</i>	22
2.1.4. Sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S.....	23
2.2. Caracterização enológica.....	25
2.2.1. Selecção dos isolados para avaliação enológica.....	25
2.2.2. Preparação do mosto e massas prensadas.....	26
2.2.3. Preparação das massas vínicas e do pré-inóculo.....	26
2.2.4. Inoculação das leveduras e controlo da fermentação.....	27
2.3. Análises químicas.....	28
2.4. Análise sensorial.....	31
2.4.1. Constituição do grupo de prova.....	31
2.4.2. Selecção e treino dos descritores da casta Touriga Nacional.....	31
2.4.3. Análise sensorial dos vinhos fermentados.....	32

2.4.4.	Avaliação do grupo de prova.....	33
2.5.	Análise estatística dos resultados	34
2.5.1.	Determinação do índice de Shannon-Weaver e curvas de rarefação	34
2.5.2.	Análise química.....	34
2.5.3.	Análise sensorial.....	35
3.	Resultados e Discussão	37
3.1.	Identificação dos isolados.....	37
3.1.1.	Perfis de restrição de rDNA.....	37
3.1.2.	Diferenciação de <i>H. uvarum</i> / <i>H. guilliermondii</i>	52
3.1.3.	Sequenciação	53
3.1.4.	Diversidade de leveduras.....	55
3.2.	Caracterização enológica.....	60
3.2.1.	Perfil de fermentação dos isolados.....	61
3.2.2.	Formação de espuma	70
3.2.3.	Análise química dos fermentados de Touriga Nacional.....	71
3.2.4.	Produção de H ₂ S	76
3.2.5.	Análise sensorial dos fermentados de Touriga Nacional	78
4.	Conclusões	100
5.	Referências Bibliográficas	103

Anexo I – Meios de cultura e soluções

Anexo II – Descrição do ensaio

Anexo III – Identificação dos isolados

Anexo IV – Caracterização enológica

Anexo V - Análise sensorial

Índice de Figuras

Figura 1.1: Unidade do gene do rRNA (9.1) kbp.	12
Figura 1.2: A casta Touriga Nacional (http://www.inrb.pt/inia/informacao-tecnica/ampelografia/touriga-nacional-t).	16
Figura 2.1: Módulo de identificação dos isolados que se pretende identificar.	22
Figura 2.2: Comparação dos perfis de restrição do isolado desconhecido com os perfis da espécie mais semelhante na base de dados.	22
Figura 2.3: Preparação das massas vínicas: (a) frasco com mosto TN; (b) massas prensadas; e (c) frasco com massas vínicas TN.	27
Figura 2.4: Incubação das amostras em estufa a 25 °C.	28
Figura 2.5: Transferência dos fermentados para frascos esterilizados.	28
Figura 2.6: Análise dos fermentados no FTIR.	29
Figura 2.7: Determinação de parâmetros como os açúcares redutores dos fermentados por fluxo contínuo segmentado.	30
Figura 2.8: Bancada de prova.	33
Figura 3.1: Gel de electroforese do produto da PCR de alguns isolados das amostras TN12, 61 e 62/07. M- marcador de pesos moleculares 1kb.	37
Figura 3.2: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN11 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	39
Figura 3.3: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN12 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	40
Figura 3.4: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN21 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	42
Figura 3.5: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN22 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	44
Figura 3.6: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN23 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	45
Figura 3.7: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN61 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	47

Figura 3.8: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN62 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	48
Figura 3.9: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN63 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ^T – Estirpe tipo.....	49
Figura 3.10: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN64 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	49
Figura 3.11: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN65 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos do INIA – Dois Portos. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	50
Figura 3.12: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN66 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos do INIA – Dois Portos. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T – Estirpe tipo.	51
Figura 3.13: Fotografias de réplicas de placas incubadas a 25 °C (lado esquerdo) e 37 °C (lado direito). Os números correspondem aos isolados testados e as letras às espécies utilizadas como controlo (a – <i>H. guilliermondii</i> ; b- <i>H. uvarum</i>).....	52
Figura 3.14: Curvas de rarefacção dos isolados das amostras das 48 h das vinhas de Dois Portos (TN1), Palhacana (TN2) e de Montemor-o-Novo (TN6, 0 h e TN6, 48h).....	60
Figura 3.15: Perfil das fermentações da LSA comercial e respectivas réplicas (■).....	61
Figura 3.16: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN11 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN11.62 – <i>Z. bisporus</i> (◆); TN11.70 – <i>I. terricola</i> (▲); TN11.71 – <i>Z. bisporus</i> (●); TN11.74 – <i>C. zemplinina</i> (-); TN11.79 – <i>C. diversa</i> (■); TN11/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	62
Figura 3.17: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN12 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN12.68 – <i>C. zemplinina</i> (■); TN12.72 – <i>I. terricola</i> (▲); TN12.76 – <i>H. uvarum</i> (●); TN12/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	63
Figura 3.18: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN21 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN21.61 – <i>H. uvarum</i> (■); TN21.70 – <i>Zygoascus hellenicus</i> (▲); TN21.90 – <i>C. zemplinina</i> (●); TN21/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	64
Figura 3.19: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN22 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN22.64 – <i>I. orientalis</i> (▲); TN22.70 – <i>I. terricola</i> (-); TN22.71 – <i>Z. bailii</i> (✱); TN22.78 – <i>H. opuntiae</i> (◆); TN22.79 – <i>H. uvarum</i> (●); TN22/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	65
Figura 3.20: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN23 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN23.68 – <i>I. terricola</i> (◆); TN23.84 – <i>C. zemplinina</i> (▲); TN23/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	66
Figura 3.21: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN61. Isolado: TN61.72 – <i>H. guilliermondii</i> (◆); TN61/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	67

Figura 3.22: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN62. Isolado: TN62.75 – <i>H. guilliermondii</i> (▲); TN62/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	68
Figura 3.23: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN64. Isolado: TN64.69 – <i>H. uvarum</i> (●); TN64/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	68
Figura 3.24: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN65. Isolado: TN65.70 – <i>H. uvarum</i> (■); TN65/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	69
Figura 3.25: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN66. Isolado: TN66.80 – <i>H. guilliermondii</i> (*); TN66/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).	70
Figura 3.26: Perfil sensorial do fermentado obtido pela LSA comercial.	86
Figura 3.27: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>C. diversa</i>	87
Figura 3.28: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>C. zemplinina</i>	88
Figura 3.29: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>H. guilliermondii</i>	90
Figura 3.30: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>H. opuntiae</i>	91
Figura 3.31: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>H. uvarum</i>	92
Figura 3.32: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>I. orientalis</i>	93
Figura 3.33: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>I. terricola</i>	95
Figura 3.34: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>Z. bailii</i>	96
Figura 3.35: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>Zygoascus hellenicus</i>	97
Figura 3.36: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie <i>Z. bisporus</i>	98

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Isolados seleccionados para a caracterização enológica.....	25
Tabela 2.2: Descritores referidos na bibliografia utilizados (a negrito) com base na análise sensorial de vinhos de uvas da casta TN.....	32
Tabela 3.1: Resultados da comparação das sequências dos isolados, obtidos às 48 h e 70 g/l, com as sequências presentes em bases de dados internacionais, utilizando o BLAST.	53
Tabela 3.2: Diversidade de leveduras detectadas na vinha de Dois Portos.....	56
Tabela 3.3: Diversidade de leveduras detectadas na vinha de Palhacana.	57
Tabela 3.4: Diversidade de leveduras detectadas na vinha de Montemor-o-Novo na amostragem efectuada às 0 h.	59
Tabela 3.5: Diversidade de leveduras detectadas na vinha de Montemor-o-Novo nas amostragens efectuadas às 48 h e após perda de peso de 70 g/l.....	59
Tabela 3.6: Espessura máxima de espuma (mm) obtida para cada um dos fermentados obtidos pelos isolados de Dois Portos, Palhacana e Montemor-o-Novo.	71
Tabela 3.7: Resumo da análise de variância e avaliação do efeito do factor espécie nos resultados das análises químicas dos fermentados obtidos.	74
Tabela 3.8: Resultado do teste de produção de H ₂ S. Legenda: (-) ausência, (+) fraco, (++) médio, (+++) elevado.....	78
Tabela 3.9: Resultado dos testes de aroma de cada provador nas diferentes sessões de prova (positivos/total).....	79
Tabela 3.10: Coeficientes de correlação calculados com os resultados das diferentes sessões de prova do fermentado da LSA, para cada um dos provadores e respectivo valor de p (entre parêntesis). S: sessão; -: Sem correlação devido à ausência do provador na sessão de prova...80	80
Tabela 3.11: Resumo da análise de variância e avaliação do efeito do factor espécie para o aroma ortonasal.....	82
Tabela 3.12: Resumo da análise de variância e avaliação do efeito do factor espécie para o aroma retrornasal.....	83
Tabela 3.13: Resumo da análise de variância e avaliação do efeito do factor espécie na caracterização do sabor e apreciação global dos fermentados.	84

Abreviaturas

A	Adenina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
D1/D2	Domínios 1 e 2 do rRNA 26S
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
dNTP	Desoxirribonucleótido-trisfosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FTIR	Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de <i>Fourier</i>
G	Guanina
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa-espectrometria de massa
GC-O	Cromatografia gasosa-olfactometria
H ₂ S	Sulfureto de hidrogénio
IFOAM	<i>International Federation of Organic Agriculture Movement</i>
IGS	Espaçador intergénico
IPT	Índice de Polifenóis Totais
ITS	Espaçador intergénico transcrito
Kb	Kilobases
LSA	Levedura Seca Activa
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OIV	Organização Internacional do Vinho e da Vinha
p/v	peso/volume
pb	Pares de bases
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PRL	Perfis de restrição de Leveduras
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossómico
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossómico
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SUPW	<i>Sterile Ultrapure Water</i>
T	Timina
TE	Tampão Tris/EDTA
TN	Touriga Nacional
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UFC	Unidades formadoras de colónias
UV	Ultravioleta

Abreviaturas (Cont.)

v/v	volume/volume
YPD	Extracto de levedura peptona dextrose

Abreviaturas de Géneros de leveduras

C.	<i>Candida</i>
Deb.	<i>Debaryomyces</i>
H.	<i>Hanseniaspora</i>
I.	<i>Issatchenkia</i>
K.	<i>Kluyveromyces</i>
Kl.	<i>Kloeckera</i>
M.	<i>Metschnikowia</i>
P.	<i>Pichia</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
T.	<i>Torulaspora</i>
Z.	<i>Zygosaccharomyces</i>

Abreviaturas de espécies de leveduras

C. d.	<i>Candida diversa</i>
C. z.	<i>Candida zemplinina</i>
H. g.	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
H. o.	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
H. u.	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
I. o.	<i>Issatchenkia orientalis</i>
I. t.	<i>Issatchenkia terricola</i>
Z. bl.	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
Z. bp.	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
Z. h.	<i>Zygoascus hellenicus</i>

1. Introdução

1.1. Generalidades do vinho

O vinho é um produto que faz parte da cultura humana há milhares de anos. Desde a sua origem no Cáucaso, a tradição da vitivinicultura viajou para o sul da Palestina, Síria, Egito e Mesopotâmia. O vinho era considerado pelo Homem um dom divino, utilizando-o como oferenda aos deuses, recebendo por isso protecção. No Egito, por exemplo, o vinho era uma bebida privilegiada, uma vez que os sacerdotes faziam do vinho a sua bebida usual, enquanto que na Palestina, queimava-se o vinho como um sacrifício. A arte de vinificação é muito mais antiga do que aquilo que a história regista e o desenvolvimento da tecnologia de fermentação subjacente a este processo estende-se por um período de mais de 7000 anos (Rainieri e Pretorius, 2000; Amaral, 1994; Pretorius *et al.*, 1999; Soleas *et al.*, 1997). Os processos baseados na fermentação têm sido utilizados ao longo de milhares de anos para preparar alimentos e bebidas e nos famosos estudos sobre o vinho, Louis Pasteur (1866, *cit. in* Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) deu credibilidade ao ponto de vista biológico da fermentação alcoólica, demonstrando que as leveduras responsáveis pela fermentação espontânea do mosto de uvas esmagadas eram provenientes da superfície da uva. Para além disso, verificou que o tipo da levedura responsável pela fermentação alcoólica pode influenciar as características sensoriais do vinho (Kutyna *et al.*, 2010; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Desde Pasteur que as leveduras e a fermentação alcoólica têm desencadeado inúmeras pesquisas, fazendo o uso do progresso da microbiologia, bioquímica e mais recentemente a genética e biologia molecular (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Inúmeros estudos têm confirmado que as leveduras desempenham um papel crítico na determinação do corpo, viscosidade, cor, sabor e aroma dos vinhos (Rainieri e Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Jolly *et al.*, 2006; Fleet, 2008).

1.2. Diversidade de leveduras na produção de vinho

A fermentação espontânea das uvas é um processo microbiológico complexo, caracterizado pela presença de um grande número de microrganismos diferentes. Este inclui as interações ecológicas e bioquímicas entre leveduras, fungos filamentosos, bactérias lácticas, bactérias acéticas e vírus. Para além de permitir o desenvolvimento de uma população de microrganismos muito diversa, o mosto de uva pode exercer uma pressão selectiva sobre estas populações devido ao pH baixo (3 a 3,5) e ao elevado teor em açúcar (Fleet, 1993; Rainieri e Pretorius, 2000; Fleet, 2003; Raspor *et al.*, 2006; Fleet, 2008). De todos os microrganismos envolvidos as leveduras são as mais importantes, uma vez que metabolizam os açúcares e outros componentes da uva em etanol, dióxido de carbono e centenas de produtos secundários finais (Pretorius *et al.*, 1999).

A maioria dos estudos sobre microbiologia enológica tem-se focado na levedura principal da fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, no entanto, tem sido mostrado que leveduras não-*Saccharomyces* presentes nas etapas iniciais do processo de fermentação têm influência nas propriedades organolépticas finais do vinho, o que tem aumentado o interesse na sua aplicação industrial. O conhecimento das populações de leveduras e suas características é cada vez mais relevante para quem produz vinho, uma vez que permite alguma previsão das características do produto final (Pretorius *et al.*, 1999; Ganga e Martínez, 2004; Zott *et al.*, 2008; De Benedictis *et al.*, 2010).

1.2.1. Vinha e ambiente de adega

Sabe-se desde há muito que as uvas e o mosto de uvas recém-esmagadas possuem uma grande diversidade de espécies de leveduras. No entanto, a sua predominância nas uvas é dependente de alguns factores incluindo a localização geográfica da vinha, condições climáticas, a variedade da uva, tolerância aos inibidores químicos e agro-químicos e ainda a interacção com outras espécies de leveduras, bactérias e fungos filamentosos (Fleet, 2003).

Pasteur apesar de saber que as leveduras se encontravam sobre a película das uvas desconhecia qual a sua proveniência. Foi mais tarde, já no início do século XX que se verificou que a disseminação das leveduras era realizada por insectos, num trabalho realizado por Sergent e Rougebief (Duarte, 2000).

Ribéreau-Gayon e Peynaud (1964, *cit. in* Duarte, 2000) citam resultados de outros autores, os quais confirmaram que a presença de leveduras era predominante no solo das vinhas, na sua macrofauna e microflora, nas raízes de videira e na restante vegetação. Poulard *et al.* (1980, *cit. in* Duarte, 2000) e Cuinier (1980, *cit. in* Duarte, 2000) identificaram várias leveduras do solo de vinhas como *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces rosei*, *Rhodotorula rubra*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces uvarum*, *Candida vini*, *Hansenula saturnus* var. *saturnus*, *Kloeckera javanica* var. *lafarii*.

Ribéreau-Gayon e Peynaud (1964, *cit. in* Duarte, 2000) observaram que o número de leveduras presentes em uvas maduras era pequeno e irregular, sendo o número de leveduras *Saccharomyces* ainda menor. Por outro lado, Parle e di Menna (1966, *cit. in* Duarte, 2000) observaram que em uvas verdes, encontravam-se predominantemente leveduras não fermentativas, enquanto que em uvas maduras observaram-se leveduras fermentativas como *Kl. apiculata*, *S. ellipsoideus* e outras espécies de *Saccharomyces*. Outro estudo realizado por Sapis-Domercq e Guittard (1976, *cit. in* Duarte, 2000) mostrou que nas uvas estavam presentes principalmente leveduras da espécie *Hanseniaspora uvarum*, mas em uvas com maior teor em açúcar foi *Torulopsis stellata* e em menor número as espécies *Kluyveromyces veronae* e *S. ellipsoideus*. Fleet (2003) num trabalho de revisão bibliográfica refere que o estado de maturação das uvas também é um factor que condiciona o desenvolvimento das leveduras, uma vez que são detectadas em baixo número em uvas verdes, mas com o amadurecer a população de

leveduras começa a aumentar. Geralmente em uvas verdes os géneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Candida*, juntamente com fungos filamentosos com estado leveduriforme como *Aureobasidium pullulans* são detectados. No entanto, a maioria destas espécies também são isoladas de uvas maduras, mas nesta fase, predominam as leveduras apiculadas do género *Hanseniaspora*.

O número e a diversidade de leveduras presentes nos bagos de uva também variam consoante a localização geográfica e a variedade de videira. Raspor *et al.* (2006) estudaram a influência destes factores na biota de leveduras em cinco regiões da Eslovénia de uvas colhidas de três variedades. Estes autores verificaram que a diversidade de leveduras foi diferente consoante a localização. O género *Rhodotorula* foi encontrado em todos os locais de amostragem, no entanto a espécie *Aureobasidium pullulans* prevaleceu somente numa, contrariamente ao género *Cryptococcus* encontrado em todos os locais de amostragem mas em números reduzidos. Observaram também diferentes leveduras que surgiram apenas num local de amostragem, mas em números mais reduzidos, como as espécies *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, *Metschnikowia reukaufii*, *C. laurentii*, *Cryptococcus albidus* var. *albidus*, *Dioszegia hungarica* (*Cryptococcus hungaricus*) e espécies pertencentes ao género *Pichia*. A diversidade de leveduras isoladas das diferentes castas, também foi avaliada por estes autores, verificando que existiu a ocorrência de algumas espécies por determinadas variedades de uva, encontrando treze espécies de leveduras distintas e evidenciando a ausência de leveduras da espécie *S. cerevisiae*. Num estudo realizado por Cordero-Bueso *et al.* (2011) também compararam a influência da variedade da uva na população de leveduras presentes na fermentação. Diferentes espécies foram encontradas, verificando que a espécie *K. thermotolerans* foi a espécie predominante para duas castas, enquanto que as espécies *C. stellata* e *H. guilliermondii* foram encontradas em percentagens elevadas em todas as variedades. Percentagens menores foram encontradas para as espécies *C. sorbosa*, *M. pulcherrima* e *P. toletana*, ocorrendo apenas numa das variedades. A biodiversidade de leveduras em fermentações espontâneas foi avaliada pela primeira vez utilizando os índices de ecologia clássica.

Os tratamentos fitossanitários empregues na protecção das vinhas também condicionam o desenvolvimento das leveduras (Jolly *et al.*, 2006). Alguns estudos mostraram que os tratamentos fitossanitários também afectam a microbiota da uva, mas negativamente, reduzindo o número de leveduras isoladas e a sua diversidade, principalmente em leveduras fermentativas. É por este facto que as vinhas orgânicas têm sido avaliadas, uma vez que funcionam como um reservatório natural de leveduras de interesse. A Federação Internacional de Movimentos de Agricultura Orgânica (IFOAM – International Federation of Organic Agriculture Movement) define vinha orgânica, incluindo a viticultura e vinificação, como um sistema de gestão global de produção que promove e melhora a saúde do agro-ecossistema, incluindo a biodiversidade, os ciclos biológicos e a actividade biológica do solo. Este processo destaca o uso de práticas de gestão de preferência ao uso de bens ou serviços não-agrícolas, tendo em conta que as condições regionais requerem sistemas localmente adaptados (Tofalo *et al.*, 2010). Alguns estudos efectuados em vinhas orgânicas mostraram a presença de leveduras das espécies de *K.*

thermotolerans, *S. cerevisiae*, *C. stellata*, *M. pulcherrima*, *H. guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *M. fructicola*, *C. zemplinina*, *I. terricola*, *I. orientalis* e o género *Pichia*. Por outro lado, em vinhas convencionais a predominância para leveduras não-*Saccharomyces* foi elevada e encontrada para espécies de *K. thermotolerans*, *P. anomala*, *P. toletana*, *C. sorbosa*, *T. delbrueckii* e *H. guilliermondii* (Cordero-Bueso, *et al.*, 2010; Tofalo *et al.*, 2010).

Uma das questões que se tem colocado ao longo dos tempos é a origem da principal levedura de fermentação dos mostos de uva, *S. cerevisiae*. Esta espécie não é predominante nas uvas e alguns autores não conseguiram isolar esta espécie de uvas saudáveis e/ou maduras, levantando especulações e controvérsias quanto à sua origem na produção do vinho. (Fleet, 2003). Mortimer e Polsinelli (1999) confirmaram durante a vindima que em uvas danificadas a diversidade de microrganismos era elevada, incluindo números significativos desta levedura. Num em cada quatro bagos danificados detectaram entre 10^5 e 10^6 células de *S. cerevisiae*. No entanto, outros microrganismos estavam em quantidade superior com um total de 10^7 a 10^8 células por bago, fazendo da presença de *S. cerevisiae* minoritária.

Leveduras dos géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia* e *Zygosaccharomyces* têm sido detectados com maior incidência em uvas danificadas ou em mau estado sanitário (Fleet, 2003). A ocorrência de espécies fermentativas e de espécies de alteração do vinho é maior quando o bago da uva está danificado (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

Barata *et al.* (2008) analisaram espécies de leveduras em uvas danificadas com podridão ácida, durante a fermentação e a maturação da uva na vinha. Este estudo foi efectuado durante as vindimas de três anos sucessivos. Verificaram que durante o processo de amadurecimento e com a podridão ácida a diversidade de espécies de leveduras foi muito maior. Da totalidade de 22 espécies ascomicetas, 17 estavam presentes em uvas danificadas, sendo *Issatchenkia occidentalis* e *Zygoascus hellenicus* as espécies mais frequentes. As leveduras de alteração como *Zygosaccharomyces bailii* e *Zygosaccharomyces bisporus* também foram isoladas frequentemente de uvas danificadas. Demonstraram ainda que a espécie de alteração mais perigosa, *Z. bailii*, está fortemente associada à podridão ácida e sobrevive durante a fermentação com *S. cerevisiae*.

Na época de colheita, a riqueza das uvas em leveduras é elevada, aumentando ao longo dos trabalhos de vindima. Por exemplo nas mãos e tesouras dos vindimadores, no caso de vindimas manuais, vários autores encontraram uma diversidade muito elevada de espécies como *M. pulcherrima*, *Kl. apiculata*, *R. rubra*, *Hansenula. anomala var. anomala*, *S. capensis*, *S. rosei*, *Torulopsis domercqii* e ainda algumas leveduras do género *Saccharomyces* nomeadamente *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. chevalieri* e *S. uvarum*. Em termos de vindima mecânica a população de leveduras sobre as superfícies do equipamento em contacto com as videiras foi reduzida (Duarte, 2000).

Peynaud e Domercq (1959, *cit. in* Duarte, 2000) referem que na chegada à adega o número de leveduras aumenta significativamente assim como no início do processamento das uvas. Duarte (2000) refere ainda trabalhos de outros autores que identificaram leveduras associadas ao

ambiente de adega, verificando que esta contribuiu para uma diversidade maior de leveduras presente no mosto, detectando a presença de *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*, *S. rosei*, *Hansenula anomala*, *Z. baillii* nas cubas, chão e ambiente de adega. Outros trabalhos, como o de Ocón *et al.* (2010) demonstraram que a presença de leveduras não-*Saccharomyces* em ambiente de adega era superior à de *S. cerevisiae*, sendo esta encontrada em adega com proporções entre 30-40 % contrariamente às leveduras não-*Saccharomyces* com percentagens superiores a 60 % em todas as adegas analisadas. Foram isoladas 18 espécies, mas apenas os géneros *Cryptococcus*, *Pichia* e *Saccharomyces* foram detectados em todas as adegas. Verificaram que a espécie *Z. baillii* foi detectada numa adega limpa, em ambos os equipamentos de vinificação e fermentação. Também foi observado que a diversidade de leveduras nas instalações variou com o tipo de produtos utilizados para a higienização da adega.

No laboratório onde o presente trabalho foi desenvolvido deu-se início a um estudo da biota de leveduras associadas a diferentes castas nacionais. Em 2005 foram colhidas uvas de três castas distintas avaliando a diversidade de leveduras. Para a casta Touriga Nacional foram identificadas leveduras das espécies *C. fermentati*, *M. pulcherrima* e *Aureobasidium pullulans*, embora nas fermentações em mostos das castas Aragonês e Arinto apenas se detectou a espécie *H. uvarum* (Ramos, 2007). Já no ano de 2006 foram caracterizados isolados de uvas da casta Touriga Nacional, mas de regiões distintas do país nomeadamente na Estremadura, Dois Portos e Palhacana; Península de Setúbal, em Azeitão e Alentejo numa vinha de Montemor-o-Novo. A biota de leveduras presentes nos mostos foi diversa consoante o local de amostragem. Em Dois Portos detectaram-se as espécies *H. uvarum*, *Saccharomycopsis vini*, *I. terricola* e *C. zemplinina*; em Azeitão *H. uvarum*, *I. hanoiensis*, *C. zemplinina* e *I. terricola*; em Palhacana a espécie *H. uvarum* e leveduras dos géneros *Cryptococcus* e *Lachancea*; e na vinha de Montemor-o-Novo apenas foi detectado a espécie *A. pullulans* (Costa, 2007).

1.2.2. Fermentação

No geral, nas primeiras fases da fermentação espontânea do mosto as leveduras encontradas pertencem aos géneros *Hanseniaspora/Kloeckera* e *Candida*, seguido de *Metschnikowia*, *Pichia* e ocasionalmente, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Rhodotorula* e *Zygosaccharomyces*. No entanto, estas leveduras têm uma actividade fermentativa muito baixa, o que leva ao desenvolvimento e ao domínio da espécie *S. cerevisiae*, que acaba por completar o processo fermentativo (Pretorius *et al.*, 1999; Fleet, 2003; Jolly *et al.*, 2006; Fleet, 2008).

Marques Gomes (1949, *cit. in* Duarte, 2000) estudou a evolução de leveduras adicionadas em partes iguais a mosto estéril pertencentes às espécies *Kl. apiculata*, *Torulopsis pulcherrima*, *Hansenula anomala* e *S. ellipsoideu*. Concluiu que *Kl. apiculata* e *Torulopsis pulcherrima* são leveduras de início de fermentação e que as espécies *S. ellipsoideus* e *Hansenula anomala* desenvolveram-se em todas as fases de fermentação. Estudou também factores como a

temperatura, concentração inicial de açúcar, adição inicial de etanol ao mosto, da superfície de exposição ao ar, do dióxido de enxofre e do tanino, sobre a evolução desta população de leveduras. Observou que temperaturas mais elevadas favoreceram o crescimento de *Kl. apiculata* e *Torulopsis pulcherrima*. A espécie *S. ellipsoideus* apresentou maior resistência em todos os parâmetros em avaliação. Por outro lado *Kl. apiculata* ficou inibida aquando da adição do dióxido de enxofre. Já a espécie *Hansenula anomala* desenvolveu-se melhor em mostos diluídos e a temperaturas mais elevadas, bem como nas fermentações com grande superfície de exposição ao ar.

Durante muitos anos, procedeu-se ao estudo da ecologia microbiana ao longo da fermentação, no entanto a sua quantificação não era avaliada. Fleet *et al.* (1984) realizaram um dos primeiros trabalhos em que quantificaram as populações detectadas no mosto. Verificaram que durante a fermentação espontânea dos mostos de uva estavam presentes leveduras dos géneros *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida* e *Metschnikowia*, mas morriam assim que a fermentação se começava a desenrolar, devido ao seu metabolismo pouco fermentativo. Espécies como *Kl. apiculata*, *Torulopsis stellata* e *S. cerevisiae* também estavam presentes durante a fermentação, no entanto *Kl. apiculata* e ocasionalmente *Torulopsis stellata*, morriam com o decorrer da fermentação. Para além de *S. cerevisiae*, *Torulopsis stellata* foi quantitativamente a espécie mais importante encontrada durante a fermentação de mostos de uvas tintas e brancas, estando presente até ao final da fermentação (Duarte, 2000).

A inoculação com estirpes seleccionadas, nomeadamente, *S. cerevisiae* é uma prática muito comum em enologia, permitindo um maior controlo sobre a fermentação, no entanto, foi demonstrado que nestas fermentações as leveduras indígenas continuam a ser numerosas. Em 1985, Heard e Fleet, estudaram o efeito da inoculação de mostos com *S. cerevisiae* sobre o crescimento da microflora natural. Apesar do domínio da levedura vínica *S. cerevisiae*, outras espécies como *Kl. apiculata*, *C. stellata* e *C. pulcherrima* foram detectadas, não sendo muito afectadas pela inoculação de *S. cerevisiae* (Duarte, 2000). Martínez *et al.* (1990) compararam o comportamento de quatro estirpes de *S. cerevisiae* e uma estirpe de *T. delbrueckii* inoculadas em mosto não estéril. Com o decorrer da fermentação confirmaram que, embora estas espécies se mantivessem até ao final da fermentação, houve também desenvolvimento da microflora natural.

Um trabalho mais recente realizado por Baleiras-Couto *et al.* (2005) analisaram a diversidade de espécies de leveduras durante a fermentação do vinho de massas tintas adicionadas de levedura seca activa (LSA), verificando ainda a influência de parâmetros como a adição de enzimas, activadores de fermentação e adição de taninos na população microbiana. A população de leveduras não-*Saccharomyces* foi analisada em dois tempos distintos da fermentação. No início da fermentação, existiu um domínio de leveduras identificadas como *Candida cf. stellata* (actualmente *C. zemplinina*), seguido de *H. uvarum*. No segundo tempo de isolamento, *Candida cf. stellata* predominou, seguido por *T. delbrueckii*, *K. thermotolerans* e *Z. bailii*. Para além disso não detectaram influência dos aditivos comerciais, nas populações de leveduras.

Zott *et al.* (2008) avaliaram a dinâmica das leveduras não-*Saccharomyces* durante a maceração a frio na fermentação alcoólica do mosto de uva, tendo verificado que estas estavam presentes entre 10^4 - 10^5 UFC/ml. No início da fermentação, a comunidade de leveduras não-*Saccharomyces* era já de 10^6 - 10^7 UFC/ml mas rapidamente diminuiu no final do processo fermentativo. Espécies de *H. uvarum*, *M. pulcherrima* e géneros de *Lodderomyces* foram detectadas em maior número e com menor abundância encontraram espécies como *P. anomala*, *P. membranifaciens*, *T. delbrueckii* e *I. orientalis*.

1.2.3. Características gerais

Produção de compostos do aroma

O papel das leveduras não-*Saccharomyces* na fermentação alcoólica tem sido reavaliado. A procura de uma diversidade maior no produto final tem levado ao desenvolvimento de novas estratégias de inoculação com o objectivo de explorar as propriedades destas leveduras no perfil aromático do vinho (Ugliano e Henschke, 2009; Ciani e Comitini, 2011; Domizio *et al.*, 2011, Manzanares *et al.*, 2011). No entanto, as leveduras não-*Saccharomyces* caracterizam-se pela sua capacidade fermentativa mais reduzida, como já referido, havendo mesmo algumas espécies que não conseguem completar a fermentação, uma vez que só uma parte dos açúcares da uva é que são fermentados. É por este facto, que muitos autores têm descrito estratégias que envolvem a co-fermentação ou fermentações sequenciais com leveduras *Saccharomyces*, principalmente com a espécie *S. cerevisiae*, com o intuito de completar a fermentação. Diferentes estudos têm avaliado a interacção existente entre as leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* verificando que estas podem modelar a expressão de algumas características enológicas importantes das leveduras não-*Saccharomyces*. É por isso que as leveduras não-*Saccharomyces* podem ser seleccionadas com base na sua capacidade para a produção de compostos favoráveis para o *bouquet* final do vinho. Em termos quantitativos os compostos voláteis produzidos durante a fermentação pelas leveduras representam a fracção mais importante do aroma dos vinhos e vários são os estudos nesta área (Ciani e Maccarelli 1998; Lambrechts e Pretorius, 2000; Rojas *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2003 a e b; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004; Falco da Costa, 2004; Clarke e Bakker, 2004; Jolly *et al.*, 2006; Domizio *et al.*, 2011; Capece *et al.*, 2011).

Os ácidos gordos voláteis são uma das classes de compostos produzidos pelas leveduras durante a fermentação, que conferem aromas desagradáveis como a gordura, ranço e aromas tipo queijo. O ácido acético, sensorialmente e quantitativamente, é o principal componente dos ácidos gordos durante a fermentação alcoólica, sendo este responsável por 90 % da acidez volátil dos vinhos. Os restantes ácidos voláteis como o ácido propiónico e hexanóico são produzidos como resultado do metabolismo dos ácidos gordos das leveduras e bactérias. No entanto, é o ácido acético que tem maior relevância no vinho, sendo que em elevadas concentrações confere um aroma a vinagre. As concentrações de ácido acético variam muito

(<0,2 a > 2,0 g/l) e dependem também do tipo de vinho (Swiegers *et al.*, 2005; Ugliano e Henschke, 2009; Mendes-Ferreira *et al.*, 2011). A produção deste ácido por leveduras não-*Saccharomyces* é diversa, por exemplo as espécies *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* e *I. orientalis* produzem teores baixos a moderados, enquanto que leveduras apiculadas e *C. stellata* e *Pichia anomala* produzem teores elevados (Ugliano e Henschke, 2009). Alguns estudos de co-fermentação com culturas mistas de leveduras, as quais produzem diferentes concentrações de ácido acético em cultura pura, normalmente apresentam níveis mais baixos de ácido acético (Soden *et al.*, 2000; García *et al.*, 2010). A importância do ácido acético resulta também dos ésteres formados a partir dele. Viana *et al.* (2008) estudaram a formação de ésteres do ácido acético em meio sintético por 38 estirpes de leveduras pertencentes aos géneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*. Para além disso avaliaram o seu comportamento na fermentação em mosto de uva com o objectivo final de seleccionar linhagens de interesse biotecnológico para a realização de fermentações em culturas mistas. Os resultados deste estudo mostraram que os géneros *Candida* e *Hanseniaspora* destacaram-se como melhores produtores de ésteres do ácido acético. No perfil de fermentação, foi a espécie *H. osmophila* que exibiu o melhor perfil, demonstrando uma natureza glucofílica sendo capaz consumir 90 % do açúcar inicial. Apresentou também teores de ácido acético, ácidos gordos de cadeia média e acetato de etilo dentro de intervalos normais descritos para o vinho. Estes autores sugerem que esta espécie é uma boa candidata para realizar fermentações em culturas mistas, no entanto interacções com *S. cerevisiae* requerem investigação futura.

Os álcoois superiores não são os mais produzidos pelas leveduras mas, quantitativamente, são o maior grupo de compostos associados ao aroma (Mendes-Ferreira *et al.*, 2011). As concentrações totais dos álcoois superiores nos vinhos variam entre 100 a 500 mg/l, sendo o álcool isoamílico o maior componente. Em concentrações excessivas os álcoois superiores conferem um aroma e sabor forte e pungente, enquanto que quantidades moderadas transmitem um carácter frutado ao vinho (Lambrechts e Pretorius, 2000; Swiegers *et al.*, 2005; Mendes-Ferreira *et al.*, 2011). A maioria das leveduras não-*Saccharomyces* produz menores quantidades de álcoois superiores que a espécie *S. cerevisiae*, no entanto em fermentações mistas possa existir uma maior produção destes compostos (Ugliano e Henschke, 2009; Clemente-Jimenez *et al.* (2004) verificaram a produção de álcoois superiores como 2-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, observando que o melhor perfil foi encontrado para *S. cerevisiae*, seguido de *H. uvarum*, *I. orientalis* e *C. stellata*. As espécies *M. pulcherrima* e *P. fermentans* foram as que menos produziram estes compostos. No entanto estas duas espécies mostraram uma produção elevada para caprilato de etilo, 2-fenil etanol e teores elevados de 2,3-butanodiol. A concentração de 2,3-butanodiol tem sido usada como marcador de diferenciação do carácter do vinho. Este composto pode ter efeito sobre o *bouquet* do vinho e a sua viscosidade contribuiu favoravelmente para o seu corpo. Os esterosisómeros 2,3-butanodiol e acetoina foram analisados por Romano *et al.* (2003b) que verificaram que estes compostos são característicos das espécies *S. cerevisiae* e *K. apiculata*, confirmando que a espécie *S. cerevisiae* produz em maior quantidade este composto comparativamente à espécie *K. apiculata*.

A fracção com maior impacto no aroma do vinho são os ésteres, compostos estes produzidos maioritariamente pelas leveduras. Os ésteres mais produzidos são o acetato de etilo (aroma tipo solvente), acetato de isoamilo (aroma a banana), caproato de etilo e caprilato de etilo (aroma tipo pêra), acetato de 2-feniletilo (aroma frutado), butanoato de etilo (aroma floral ou frutado), entre outros (Swiergers *et al.*, 2005). Vários géneros de leveduras não-*Saccharomyces* foram descritos na literatura como bons produtores de ésteres, principalmente o acetato de etilo. As espécies *H. guilliermondii*, *H. uvarum*, *I. orientalis*, *I. terricola*, *M. pulcherrima* e *P. anomala* são as que mais produzem este composto em comparação com *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *K. thermotolerans* e *C. stellata*. (Ugliano e Henschke, 2009; Viana *et al.*, 2008; Mendes-Ferreira *et al.*, 2011). Rojas *et al.* (2003) avaliaram espécies de *H. guilliermondii* e *C. stellata* em fermentações mistas com *S. cerevisiae*. Os vinhos produzidos por estas espécies apresentaram níveis de acetaldeído, ácido acético, glicerol e álcoois superiores dentro de intervalos descritos para o vinho, no entanto verificaram que aumentou a produção de ésteres de acetato. O acetato de etilo foi o principal éster produzido, seguido do acetato de isoamilo e do acetato de 2-feniletilo. A espécie *H. guilliermondii* foi descrita como uma grande produtora de acetato de 2-feniletilo em cultura pura e mista com *S. cerevisiae*.

Os compostos de enxofre e fenóis voláteis são compostos importantes produzidos igualmente pelas leveduras. As propriedades sensoriais destes compostos variam muito, mas a maior parte deles, estão associados a descritores aromáticos negativos, nomeadamente aromas a couve, ovos podres, sulfuroso, cebola e borracha, embora alguns possam contribuir positivamente com aromas a morango, frutos vermelhos e toranja (Falco da Costa, 2004; Swiergers *et al.*, 2005; Swiegers e Pretorius, 2007). Um dos compostos mais estudados é o sulfureto de hidrogénio (H_2S) que confere um aroma a ovos podres quando em concentrações elevadas. Os níveis de H_2S produzidos pelas leveduras dependem do elemento enxofre presente nas uvas, naturalmente presente como sulfato numa concentração média de 200 mg/l e também da quantidade de dióxido de enxofre adicionado ao mosto de uva antes da fermentação, devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Swiergers *et al.*, 2005; Manzanares *et al.*, 2011; Mendes-Ferreira *et al.*, 2011). Strauss *et al.* (2001) avaliaram a produção de sulfureto de hidrogénio de leveduras não-*Saccharomyces*. Verificaram que as maiores produtoras de H_2S foram estirpes de *C. stellata*, *C. helenica*, *C. sorbosa*, *C. oleophila*, *K. apiculata* e *Deb. hanseni*. No entanto, em algumas estirpes de *K. apiculata* não se observou a produção deste composto. Outro estudo efectuado por De Benedicts *et al.* (2010) avaliaram a produção de H_2S por estirpes de *H. uvarum* tendo como controlo uma estirpe de *H. uvarum* certificada e uma levedura comercial de *S. cerevisiae*. A produção variou consoante as estirpes, observando que os controlos produziram teores de H_2S mais reduzidos. Dentro dos compostos de enxofre, as leveduras produzem os denominados compostos “pesados” de enxofre (Moreira *et al.*, 2004) embora, o papel destes compostos durante a fermentação ainda não é bem documentado na literatura. Moreira *et al.* (2008) analisaram o papel de *H. guilliermondii* e *H. uvarum* em culturas de arranque puras e mistas com *S. cerevisiae* para a produção destes compostos. Os resultados obtidos indicaram que em culturas mistas estas leveduras não aumentaram o seu teor.

A contaminação microbiológica de leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*, que estão associadas à contaminação de barricas de madeira, produzem compostos com aromas desagradáveis nomeadamente aromas a estrebaria e suor de cavalo conferindo defeito ao aroma e sabor do vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira; 2003, Malfeito-Ferreira, 2010).

Produção de enzimas

A importância das leveduras não-*Saccharomyces* deriva também do seu papel enquanto produtoras de enzimas como as esterases, glucosidades, lípases, proteases, celulasas, etc., característica que as distingue de *S. cerevisiae*. Por interacção com os substratos do meio, estas enzimas são capazes de melhorar determinadas fases da vinificação como a maceração, filtração ou clarificação, aumentando assim o rendimento na extracção da cor e aumentando as características do vinho, especialmente no aroma (Charoenchai *et al.*, 1997). Uma vez que as uvas produzem uma quantidade muito pequena de enzimas com uma actividade muito limitada, as enzimas exógenas têm sido introduzidas como alternativa no processo de vinificação. No entanto, muitos autores têm explorado as actividades enzimáticas das leveduras para melhorar o processo de vinificação e características sensoriais do vinho (Charoenchai *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 2000; Dizy e Bisson 2000; Strauss *et al.*, 2001).

As enzimas pectolíticas clivam longas cadeias de pectinas para gerar cadeias mais curtas e consequentemente cadeias mais solúveis. Durante a vinificação auxiliam no esmagamento das uvas e na clarificação do mosto. Para além disso aumentam a extracção de substâncias que contribuem para a cor e aroma do vinho. As enzimas pectolíticas mais usadas são as pectinases, sendo classificadas de acordo com o mecanismo de acção. As poligalacturonases do ponto de vista enológico são as mais importantes e alguns estudos demonstraram que espécies dos géneros *Candida*, *Pichia* e *Kluyveromyces* secretam esta enzima (Strauss *et al.*, 2001, Manzanares *et al.*, 2011).

As proteases produzidas pelas leveduras desempenham um papel importante no processo de envelhecimento do vinho e na formação de espuma. A análise desta actividade em leveduras não-*Saccharomyces* demonstrou que as fontes de azoto são importantes na produção de enzimas extracelulares. Dizy e Bisson (2000) demonstraram que algumas espécies de *Kloeckera/Hanseniaspora* apresentam significativa actividade proteásica e reduzindo a concentração de proteína no mosto aproximadamente a um terço.

As glucosidades apresentam um potencial para aumentar o aroma do vinho, uma vez que podem rapidamente hidrolisar precursores de aroma e libertar o composto volátil associado. Assim esta enzima tem sido utilizada para modelar o aroma do vinho e aumentar consequentemente a expressão de determinadas características sensoriais. A produção desta actividade tem sido encontrada em alguns géneros como *Candida*, *Pichia* e *Hanseniaspora* (Strauss *et al.*, 2001; Ugliano e Henschke, 2009). Mendes-Ferreira *et al.* (2001) avaliaram o efeito da β -glucosidase em estirpes de vinho observando que *K. apiculata* foi a que apresentou maior intensidade da

actividade β -glucosidase, seguida de *P. anomala* e *M. pulcherrima*. Foi ainda observada uma fraca actividade para a espécie *S. cerevisiae*.

1.3. Metodologias de identificação das leveduras

Os métodos convencionais de identificação e caracterização de leveduras, baseados em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, continuam a ser utilizados taxonomicamente. As características morfológicas relacionam-se com a reprodução sexuada e vegetativa, o crescimento microscópico e macroscópico. Quanto às fisiológicas incluem a fermentação de açúcares, a assimilação de compostos de carbono e azoto, necessidades vitamínicas, temperatura máxima de crescimento, resistência à cicloheximida, entre outras (Duarte, 2000). Porém os métodos convencionais para a identificação das leveduras requerem uma avaliação de aproximadamente 80-100 testes, resultando num processo complexo, muito laborioso e um excessivo consumo de tempo. Para além disso a fragilidade da classificação de leveduras baseada exclusivamente nestes testes tem sido posta em evidência desde há algum tempo (Barnett *et al.*, 1990; Kurtzman e Fell, 1998; Duarte, 2000; Manzanares *et al.*, 2011).

Estudos baseados em análises proteicas são desde há muito utilizados no estabelecimento de relações entre os organismos, especialmente em termos evolutivos. A utilização das proteínas para a identificação de leveduras deve-se ao facto da sua função e estrutura serem determinadas pela sequência primária de aminoácidos, a qual se encontra codificada no DNA e assim, se a informação genética estiver conservada, então a estrutura do produto desse gene também se encontra conservada (Duarte, 2000). De entre as análises proteicas destaca-se a análise de perfis isoenzimáticos. As diferenças encontradas em sequências de aminoácidos entre enzimas de diferentes organismos é um reflexo de divergência genética dos organismos. As substituições de aminoácidos podem ser detectadas a partir da distância e migração exibida por enzimas em géis de electroforese, visualizando padrões designados por zimogramas. Comparações de perfis de enzimas têm sido utilizados para estudar relações taxonómicas entre leveduras e na descrição de algumas espécies. (Yamazaki, *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 1999; Duarte, 2000; Sampaio, *et al.*, 2001; Manzanares *et al.*, 2011).

Ao longo das últimas décadas, foram sendo desenvolvidos diferentes métodos moleculares baseados em estudos comparativos de DNA com objectivo de obter uma caracterização e identificação das leveduras mais fiável e sensível.

A comparação do genoma entre organismos diferentes por técnicas de reassociação DNA-DNA tem permitido a determinação da homologia genética existente entre esses mesmos organismos. A utilização desta metodologia permite uma reafirmação ao nível molecular do princípio evolutivo da descendência comum. Se dois organismos estão relacionados, contém nos genomas, sequências de bases que descendem das sequências de um ancestral comum e os organismos mais relacionados conservarão maior proporção dessas sequências de bases, do que organismos com maior divergência (Duarte, 2000). As experiências de reassociação DNA-DNA

permitem assim avaliar a complementaridade global das sequências de DNA genómico de duas estirpes diferentes. A determinação do grau de complementaridade pode ser efectuada por desnaturação térmica do DNA das amostras e a comparação da cinética de renaturação do DNA de cada uma das estirpes e da sua mistura em partes iguais (Rose e Harrison, 1987).

Kurtzman (1998) refere que a informação dada por estas reassociações teve um impacto considerável na sistemática das leveduras. Esta metodologia permitiu demonstrar que as características morfológicas e fisiológicas utilizadas para a definição de determinadas espécies e géneros são características de *taxon*, mas sem significado filogenético (Kurtzman, 1994). No entanto, uma das limitações desta metodologia deve-se ao facto do estabelecimento destas relações taxonómicas ser ao nível da espécie, não fornecendo informações sobre relações mais distantes. Além disso para a identificação é necessário fazer comparações caso a caso (Duarte, 2000).

Outros métodos foram desenvolvidos para a identificação de espécies de leveduras usando a informação contida nas moléculas de DNA e RNA. A determinação precisa da sequência de nucleótidos de determinadas regiões do genoma é o método mais directo de análise do DNA, a partir da qual se poderá identificar e caracterizar os organismos. Uma dessas regiões é o RNA ribossómico (rRNA) / DNA ribossómico (rDNA) e a importância desta região deve-se ao facto dos ribossomas estarem presentes em todas as células, e terem uma origem evolutiva comum. O facto de algumas sequências do rRNA/rDNA estarem conservadas e serem homólogas para todos os organismos permitem a comparação entre áreas menos conservadas e ainda o estabelecimento de relações evolutivas (Kurtzman, 1994; Kurtzman e Blanz, 1998). A unidade de repetição do rDNA é composta por regiões conservadas e variáveis, repetindo-se em várias cópias pelo genoma. As sequências estão localizadas no gene nas regiões que codificam para as subunidades pequenas, 18S, 5.8S, 5S e grandes 25-28S do rRNA (Figura 1.1). Entre cada subunidade existem as denominadas regiões espaçadoras como a ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e a ETS (*External Transcribed Spacer*), regiões que são transcritas mas não processadas. Por sua vez, as unidades de codificação são separados pelos espaçadores intergénicos (IGS), também designados por NTS (*Non-Transcribed Spacer*) que são regiões mais variáveis (Beh *et al.*, 2006; Fernández-Espinar *et al.*, 2006).



Figura 1.1: Unidade do gene do rRNA (9.1) kbp.

A sequência do gene da subunidade 26S do rRNA, em particular os domínios D1 e D2 tem sido igualmente aplicada para o estudo da filogenia dos diferentes taxa de leveduras e revela-se uma poderosa ferramenta na identificação das mesmas. A investigação exhaustiva que foi realizada nas últimas décadas evidenciou que estas regiões exibem diferenças suficientes nas leveduras para que se possa avaliar relações intra e inter-específicas (Kurtzman, 1998; Fell *et al.*, 2000; Fernández-Espinar *et al.*, 2006). A disponibilidade destas sequências em bases de dados, especialmente no caso da região D1/D2 do gene do rRNA 26S, torna esta técnica muito útil para classificar uma levedura desconhecida numa determinada espécie quando a percentagem de homologia é superior ou semelhante a 99% embora haja excepções (Kurtzman e Robnett, 1998). Uma das metodologias nomeadamente o método de *Sanger* baseia-se na cópia de DNA *in vitro* pela DNA polimerase e a inserção de quatro bases (dNTPs – A, G, T, C). Juntamente com estas bases são adicionadas bases homólogas didesoxirribonucleotidos trifosfato (ddNTP), as quais se ligam ao local da base correspondente, mas que actuam como terminais de transcrição, dado que não possuem o local de ligação da base seguinte originando-se desta forma segmentos de oligonucleótidos com tamanhos diversos. A base terminal é a ddNTP a qual pode estar marcada com um fluoróforo específico e assim ser detectada e identificada por um sequenciador automático de DNA (Towner e Cockayne, 1993).

Mais recentemente outras metodologias de sequenciação de DNA têm sido estudadas as quais são designadas por segunda geração de sequenciação de DNA, como por exemplo a sequenciação electroforética realizada em *microchips*, a sequenciação por hibridação e a sequenciação em tempo real. Nos últimos anos têm sido estudadas várias aplicações para esta geração de sequenciação e a sua aplicação passa por ressequenciação do genoma completo para a descoberta de mutações ou polimorfismos, mapeamento de rearranjos estruturais, análise de metilações no DNA em larga escala, entre outras. Estas metodologias continuam a ser estudadas e testadas e futuramente espera-se que sejam generalizadas e utilizadas em rotina (Shendure e Ji, 2008).

Os métodos mais rápidos, entre as técnicas moleculares que têm sido utilizados para diferenciar e identificar leveduras ao nível da espécie são baseados em PCR ou reacção em cadeia da polimerase. As técnicas baseadas em PCR consistem na amplificação de determinados segmentos de DNA, sendo esta uma ferramenta base para inúmeras metodologias de análise do DNA. O processo inicia-se com a desnaturação da molécula de DNA por aplicação de temperatura elevada. Após a diminuição da temperatura, dois oligonucleótidos de cadeia simples, complementares às regiões flanqueadoras desse segmento, funcionando como iniciadores ou *primers*, ligam-se a essas regiões iniciando-se a síntese de DNA por acção de uma DNA polimerase termoestável. Seguem-se ciclos de desnaturação, ligação dos *primers* e alongamento dos mesmo pela acção da DNA polimerase. Os ciclos repetem-se várias vezes, resultando assim na amplificação do segmento alvo (Towner e Cockayne, 1993). Os métodos baseados em PCR tornam-se vantajosos devido à facilidade de execução e para além disso é necessário uma pequena quantidade de DNA, o qual não necessita de ser purificado (van der Vossen e Hofstra, 1996).

Uma das ferramentas de identificação de microrganismos passa pela análise de restrição de fragmentos do rDNA amplificados por PCR, designada por ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossômico Amplificado). Esta análise baseia-se na diferença de comprimento dos fragmentos resultantes do corte por endonucleases de um fragmento de rDNA amplificado. Para realizar a análise são escolhidos determinados locais do rDNA, amplificados por PCR, originando elevadas quantidades da região de rDNA a qual se pretende fazer reagir com as enzimas de restrição. Esta metodologia tem permitido a diferenciação de leveduras ao nível da espécie. (Baleiras-Couto *et al.*, 1995, Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Baleiras-Couto *et al.*, 2005; Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

A análise de restrição pode incidir sobre as diferentes regiões da molécula de rDNA. Guillamón *et al.* (1998) utilizaram esta técnica para a diferenciação de 33 espécies de leveduras durante a fermentação espontânea do vinho, a partir da região que abrange o ITS1, o ITS2 e o gene do rRNA 5,8S. Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) também identificaram um total de 132 espécies de leveduras pertencentes a 25 géneros diferentes, utilizando as mesmas regiões do estudo anterior. Neste trabalho, utilizaram as enzimas de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*, verificando que cada padrão de restrição obtido com estas enzimas era exclusivo para cada espécie. Em 2003, Capece *et al.* (2003) identificaram um total de 32 estirpes de leveduras pertencentes a espécies de leveduras não-*Saccharomyces* associadas ao processo de vinificação. Esta identificação teve como base a análise da região 18S e o espaçador não transcrito (NTS) do rRNA, seguido por restrição das endonucleases *HaeIII* e *MspI*.

Num estudo mais recente realizado por Baleiras-Couto *et al.* (2005) analisaram a diversidade de espécies de leveduras durante a fermentação de vinho tinto. A análise incidiu sobre os padrões de restrição obtidos, pelas enzimas *MseI*, *HinfI* e *Apal*, de regiões amplificadas do gene do rRNA. Foram diferenciados 19 perfis de um total de 121 estirpes isolados de leveduras não-*Saccharomyces*. A identificação das espécies foi confirmada por sequenciação do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA, verificando uma elevada correlação dos resultados obtidos.

1.4. Avaliação do aroma

O aroma e sabor do vinho resultam de centenas de compostos diversos entre os quais os voláteis, sendo bastante difíceis de quantificar e qualificar. A composição complexa dos vinhos resulta da acção conjugada de vários mecanismos, incluindo o metabolismo das uvas durante a maturação, os fenómenos bioquímicos que ocorrem aquando do esmagamento das uvas, o metabolismo dos microrganismos responsáveis pelas fermentações alcoólica e maloláctica, a extracção de constituintes da madeira durante o estágio ou da fermentação, e as reacções químicas e enzimáticas que ocorrem durante o armazenamento dos vinhos (Falco da Costa, 2004). O aroma e sabor não dependem somente da concentração dos diferentes compostos existentes no vinho, mas a sua percepção pelos nossos sentidos é determinante no impacto sensorial (Vilanova *et al.*, 2008). Por exemplo a avaliação do aroma exige um envolvimento

pluridisciplinar. Por um lado a análise química com recurso às técnicas separativas, que permite a identificação e quantificação dos compostos voláteis; e por outro lado, a análise sensorial, com recurso a diferentes metodologias, procura determinar quais as características sensoriais dos compostos individuais e quais as características sensoriais de cada produto (Caldeira, 2004).

A análise sensorial envolve uma série de técnicas destinadas ao estudo de um determinado atributo do vinho, como são percebidos e ainda como estes se relacionam com as características químicas, varietais ou regionais. Permite assim que diferentes sensações e determinados atributos dos produtos possam ser identificados e quantificados por pessoas com formação e experiência. Esta metodologia tem sido utilizada para corroborar a influência das características ambientais, a inoculação com estirpes de leveduras, o tempo de armazenamento, diferentes tratamentos enológicos ou o factor envelhecimento sobre o perfil aromático de vinhos (Falqué *et al.*, 2004; Vilanova *et al.*, 2008).

Existem várias metodologias utilizadas para a avaliação do aroma e sabor do vinho consoante os objectivos pretendidos. A análise sensorial descritiva é uma destas metodologias e consiste na pesquisa de um mínimo de descritores, que permitam dar um máximo de informação sobre as propriedades sensoriais do produto a analisar; medir a intensidade da sensação percebida para cada um dos descritores escolhidos e construir, com o conjunto dos descritores quantificados, o perfil do produto (Caldeira *et al.*, 1999). Nesta metodologia existe um painel de provadores bem treinados, os quais usam palavras / termos para descrever com precisão as características dos vinhos. A utilização de um sistema de pontuação permite que os dados numéricos obtidos possam ser submetidos a análise estatística (Clarke e Bakker, 2004).

1.5. A casta Touriga Nacional

A casta Touriga Nacional é uma variedade de *Vitis vinifera*, de porte retombante e vigoroso. É caracterizada por um abrolhamento médio e com uma fertilidade elevada. Esta casta é bastante resistente ao oídio, míldio, podridão cinzenta, cigarrinha e traça, no entanto é susceptível ao stress hídrico. O cacho é de tamanho pequeno a médio, com bago pequeno e película rija, sendo de difícil separação (Figura 1.2). A maturação desta casta é média a precoce. Os mostos apresentam um teor alcoólico provável muito elevado, acidez elevada, no entanto muito equilibrados. Dá vinhos de cor retinta intensa, com tonalidades violáceas quando novos. O aroma é igualmente intenso a frutos pretos muito maduros. Já na boca apresenta-se cheio, encorpado, persistente, robusto, taninoso e muito frutado quando jovem. Possui um enorme potencial para envelhecimentos prolongados, adquirindo nesta altura uma elegância, um aroma e sabor aveludado inconfundíveis (Brites e Pedroso, 2000, Eiras-Dias *et al.*, 2011).



Figura 1.2: A casta Touriga Nacional (<http://www.inrb.pt/inia/informacao-tecnica/ampelografia/touriga-nacional-t>).

Em 1999 Freitas *et al.*, estudaram alguns compostos voláteis associados ao aroma a esteva (*Cistus ladaniferus*) o qual está associado à qualidade sensorial de vinhos do Porto produzidos com a casta Touriga Nacional e Touriga Francesa. Através da análise por cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) identificaram os compostos associados ao aroma da esteva nomeadamente o 2,2,6-trimetilciclohexanona e dihidrocinamato de etilo. Observaram ainda que os compostos em maior quantidade parecem ter uma maior influência nos vinhos produzidos com a casta Touriga Nacional do que com a Touriga Francesa.

Falqué *et al.* (2003) avaliaram sensorialmente os vinhos da casta Touriga Nacional também da região do Douro. Estes vinhos foram caracterizados com aromas a amora, cereja, aguardente de ameixa, frutos silvestres e passas.

Em 2004, Falco da Costa avaliou os compostos odorantes presentes nos vinhos de quatro clones da casta Touriga Nacional, também com o intuito de avaliar a variabilidade interclonal dos compostos, mediante análises de cromatografia em fase gasosa-olfactometria (GC-O). Os compostos que apresentaram maior intensidade no aroma foram β -damascenona, sotolon, 2-feniletanol, linalol, vanilato de etilo, (E,Z)-6-nonadienal, 3-metil-1-butanol, 4-etoxicarbonil- γ -butanolactona, 4-etilguaiacol, eugenol, 2,3-dihidrocinamato de etilo, 2,6-dimetoxifenol, vitispirano, 3-(metiltio)propanal, ácido 3-metilbutanoico, 3-metilbutanoato de etilo, (Z)-3-hexen-1-ol, butanoato de etilo e 3-(4-hidroxifenil)-propeonato. Observou igualmente que não existiram diferenças significativas entre os vinhos dos clones quanto aos compostos do aroma. Os vinhos foram avaliados sensorialmente e dos vários descritores encontrados aqueles que caracterizaram os vinhos produzidos por esta casta foram os frutos vermelhos, pimentos verdes, floral, compota, mel e citrino.

Os vinhos produzidos com Touriga Nacional são também caracterizados por um aroma frutado cítrico, muitas vezes caracterizado como um citrino doce e fresco evocando o fruto de bergamota (*Citrus bergamia*). Actualmente o descritor tipo bergamota é o mais utilizado para descrever o aroma tipo floral de vinhos desta casta com elevada qualidade. Guedes de Pinho *et al.* (2007) identificaram os compostos voláteis presentes em extractos do fruto bergamota (principalmente

os terpénicos), verificando qual contribuía mais para a percepção global da bergamota, relacionando os dados com a composição volátil dos vinhos de Touriga Nacional. Avaliaram os vinhos por um painel de provadores treinados onde foram seleccionados três descritores nomeadamente tipo bergamota, violeta e tipo laranja. Ao efectuarem uma análise GC-O verificaram que três zonas odorantes mais importantes relacionadas com estes descritores correspondiam à presença dos compostos linalol e acetato linalilo. Efectuaram ainda um teste de similaridade com um vinho sem ser produzido com a casta Touriga Nacional onde foram adicionados estes compostos isoladamente ou em combinação. A maior similaridade foi verificada apenas quando adicionado o composto linalol. Concluíram que o facto de terem encontrado concentrações elevadas de linalol em vinhos produzidos com a casta Touriga Nacional, pode ser uma das pistas importantes do aroma varietal de vinhos desta casta.

1.6. Objectivos e enquadramento do trabalho

A presente dissertação está inserida num estudo de caracterização da biota de leveduras associada a castas nacionais provenientes de diferentes regiões vitivinícolas do país. A caracterização incidiu sobre uvas da casta Touriga Nacional, colhidas no ano de 2007 em três vinhas, duas situadas na região da Estremadura, Dois Portos e Palhacana e uma situada na região do Alentejo, Montemor-o-Novo (Anexo II). Os isolados estudados encontravam-se conservados a -80 °C numa solução de glicerol (30 %, v/v).

Os principais objectivos do trabalho foram assim a identificação da biota de leveduras associadas a uvas da casta Touriga Nacional e a caracterização enológica de isolados dessa biota. Em relação à identificação dos isolados foram utilizados métodos moleculares, nomeadamente perfis de restrição de uma região do gene do rRNA 26S e sequenciação dos domínios D1 e D2 do referido gene. Foi realizada a fermentação em massas vínicas de uvas da casta Touriga Nacional de isolados das espécies encontradas para cada amostra. Os produtos da fermentação obtidos foram analisados química e sensorialmente.

Sumariamente os objectivos da presente dissertação dividiram-se nas seguintes tarefas:

1. Identificação dos isolados obtidos de uvas da casta TN imediatamente e 48 horas após o seu esmagamento e assim que a perda de peso do mosto atingiu as 70 g/l;
2. Avaliação do perfil e características de fermentação dos isolados das espécies encontradas para cada amostra;
3. Análise química por métodos convencionais, fluxo contínuo segmentado e por Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de *Fourier* (FTIR) dos fermentados obtidos;
4. Análise sensorial descritiva quantitativa dos fermentados, recorrendo a um painel de provadores treinado.

2. Material e Métodos

2.1. Identificação dos isolados

2.1.1. Amplificação de um fragmento do rDNA 26S

Lise celular por choque térmico

As células de leveduras foram cultivadas em meio YPD sólido (Anexo I) e incubadas a 25 °C durante 48 horas (Estufa: FB 420, Heraeus). Suspenderam-se duas ansadas de cada isolado em 500 µl de água ultrapura esterilizada (SUPW) e agitou-se em vortex (Vortex: Reax 2000, Heidolph). A suspensão de células resultante foi colocada em azoto líquido durante 5 minutos, seguido de imersão em banho de água termostatizada (Banho de água termostatizada: Gallenkamp) a 100 °C, também durante 5 minutos. Este lisado de células foi mantido em gelo até à sua utilização directamente na reacção de amplificação (PCR).

Lise celular por agitação com microesferas de vidro

Colocaram-se 200 µl de microesferas de vidro (\varnothing 0,5 mm) em tubos *ependorf* de 1,5 ml e a estes adicionou-se 500 µl de tampão lise (Anexo I). Suspenderam-se duas a três ansadas de massa celular de cada isolado, agitando-se de seguida em vortex durante 2 minutos. A suspensão foi incubada a 65 °C durante 1 h em banho de água termostatizada. Após a incubação voltou-se a agitar as amostras em vortex durante 2 minutos. Centrifugou-se (Centrífuga: Biofuge stratos, Heraeus) os tubos a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante para outros tubos e guardou-se a -80 °C até à sua utilização no PCR após diluição 1:250 (v/v).

Apesar do método de lise por choque térmico ser de execução mais rápida, foi abandonado devido à baixa taxa de amplificação obtida, sendo substituído por este método.

Purificação do DNA

A não amplificação do fragmento de DNA por PCR após lise celular por microesferas, levou a que se procedesse à purificação do DNA, de modo a eliminar eventuais inibidores dessa reacção. Assim, ao sobrenadante resultante da lise celular foi adicionado 600 µl da solução clorofórmio:álcool isoamílico (2:1; v/v). Homogeneizou-se por inversão e centrifugou-se a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Após a recolha do sobrenadante para novo tubo, precipitou-se o DNA com a adição 1/10 do volume de acetato de sódio (Anexo I) e 2,5 volumes de etanol absoluto (Merck) a -20 °C, misturando-se por inversão. Realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições, rejeitando-se o sobrenadante. A lavagem do DNA foi feita com 500 µl de solução de etanol a 70 % (v/v) a -20 °C. Esta solução foi retirada deixando-se escorrer completamente, e os tubos foram colocados em estufa a 37 °C durante 30 minutos. Após este período ressuspendeu-se o pellet em 50 µl de TE (Anexo I).

Conservou-se a 4 °C, durante pelo menos 12 horas para a solubilização do pellet do DNA. Efectuou-se a quantificação do DNA por electroforese em suporte horizontal em gel de agarose (Sistema de electroforese Sub – Cell GT, Bio-Rad). Utilizou-se uma concentração de 0,8 % (p/v) de agarose (Electrophoresis Grade, Invitrogen) em solução TBE 0,5x (Anexo I) com SUPW. Preparou-se o marcador de peso moleculares, λ DNA/*Hind*III de acordo com as recomendações do fabricante (Fermentas, Anexo I) e as respectivas amostras (Anexo I). Os poços centrais do gel foram carregados com as diferentes concentrações do marcador λ DNA/*Hind*III, e os restantes poços com as amostras de DNA. A electroforese decorreu durante 50 minutos, com uma voltagem 100 V (fonte de alimentação EPS 301 Amersham, Pharmacia Biotech). Terminada a corrida o gel foi colocado numa solução de brometo de etídio (Anexo I) durante aproximadamente 10 minutos, para a revelação das bandas de DNA. Após este tempo o gel foi colocado em água durante 10 minutos para remover o excesso do brometo de etídio. O gel foi colocado num transiluminador (Transiluminador: Vilber Lourmat) e as bandas foram visualizadas mediante luz ultravioleta ($\lambda= 312$ nm). O gel foi fotografado com uma câmara digital (Máquina digital: Kodak 290C) em câmara escura (Câmara escura: Sistema Edas 290 – Kodak). A imagem foi tratada com o *software* Kodak 1 D – *Image Analysis Limited Edition*, versão 3.5.4. A intensidade da banda de DNA das amostras foi comparada com as bandas do marcador λ DNA/*Hind*III, seguindo-se diluição adequada de modo a assegurar aproximadamente 20 ng na reacção de PCR.

Reacção de amplificação

A reacção de amplificação (PCR) realizou-se para um volume total de 50 μ l contendo: 0,75 pmol/ μ l dos *primers* NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG, Invitrogen) e LR6 (5'-CGCCAGTTCTGCTTACC, Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂ (MBI Fermentas); 0,25 mM de dNTPs (MBI, Fermentas); 1x tampão PCR (MBI Fermentas, Anexo I), 2 U de enzima Taq Polimerase (MBI Fermentas, Anexo I) e 2 μ l de DNA. Efectuou-se uma centrifugação instantânea (Centrifuga: Galaxy MiniStar, VWR) e realizou-se a reacção de amplificação no termociclador (Termociclador: T Gradient 96, Whatman-Biometra). A amplificação decorreu durante 2 horas e 35 minutos com uma desnaturação inicial a 94 °C durante 3 minutos seguida de 36 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de emparelhamento a 58 °C e 1,5 minutos de extensão a 72 °C. O tempo final de extensão foi de 5 minutos a 72 °C. O produto da PCR resultante foi armazenado a -20 °C. A verificação do produto de PCR foi realizada através de uma corrida electroforética como descrito na Purificação do DNA, utilizando neste caso uma concentração de 1,2 % (p/v) de agarose. Os poços do gel foram carregados com a mistura de 3 μ l de amostra e 1 μ l de 6x *Loading Dye Solution* (Anexo I). Os poços nas extremidades foram carregados com 3 μ l de marcador 1 Kb DNA *Ladder* (MBI Fermentas, Anexo I). A electroforese decorreu durante 1 hora e 15 minutos, com uma voltagem de 120 V. Terminada a separação electroforética as bandas de DNA foram visualizadas como descrito em Purificação do DNA. Os fragmentos obtidos foram comparados visualmente com o marcador de pesos moleculares 1 Kb

Ladder na intensidade e tamanho das bandas. Esta relação permitiu estimar a quantidade de produto PCR a utilizar na reacção enzimática.

2.1.2. Digestão enzimática

Reacção de restrição com as enzimas *HinfI*, *MseI*, *Apal*, *CfoI* e *HaeIII*

As enzimas utilizadas na análise de restrição foram as enzimas *Apal*, *MseI*, *HinfI* (MBI Fermentas, Anexo I), *CfoI* e *HaeIII* (Promega). A reacção de digestão ocorreu num volume de 20 µl com 2 µl de 10x tampão de digestão e 3 U de enzima (*Apal*, *MseI*, *HinfI*, *CfoI* e *HaeIII*) e utilizou-se 7 µl do produto PCR, perfazendo o total do volume com SUPW. As digestões foram realizadas em estufa (Estufa: Julabo WS 60) a 37 °C durante 4 horas para as enzimas *HaeIII* e *CfoI* (indicações do fabricante) e 14 horas para as enzimas *HinfI* e *Apal* (indicações do fabricante). A digestão com a enzima *MseI* foi efectuada em estufa (Estufa: FB 420, Heraeus) a 65 °C durante 14 horas (indicações do fabricante). Terminada a reacção de digestão, realizou-se uma electroforese em gel de agarose de 2 % (p/v), com 26 poços onde os poços das posições 1, 13 e 26 foram carregados com 5 µl de marcador 100 bp DNA *Ladder* (MBI Fermentas, ver anexo I) e os restantes com a mistura de 10 µl de amostra e 2 µl de Loading Dye Solution 6x. A corrida decorreu durante 2 horas com as condições semelhantes às referidas na purificação do DNA. Terminada a electroforese visualizaram-se os perfis de restrição como referido em Purificação do DNA.

Análise dos perfis de restrição

As fotografias dos géis de restrição obtidas foram analisadas utilizando o *software* Gelcompar II versão 5.1. Para a identificação dos isolados usou-se o módulo “*Identification*” deste programa, recorrendo à biblioteca de perfis de restrição de leveduras (PRL) constituída pelas estirpes estudadas por Zanol *et al.* (2010) que fazem parte da base de dados existente no INIA – Dois Portos.

Para a identificação o *software* efectua a comparação dos perfis de restrição das entradas desconhecidas com os perfis das entradas da biblioteca usando o coeficiente de Dice. Este coeficiente é expresso pela equação $S_D = \frac{2a}{2a+b+c}$, onde *a* representa o número de características presentes em simultâneo nas duas estirpes, *b* o número de características presentes apenas numa das estirpes e *c* o número de características presente apenas na outra estirpe (Figura 2.1) (Duarte, 2000).

A identificação de cada isolado foi confirmada individualmente, recorrendo à inspecção visual dos perfis de restrição com os perfis de restrição das estirpes de cada “unidade” (espécies) da biblioteca (Figura 2.2).

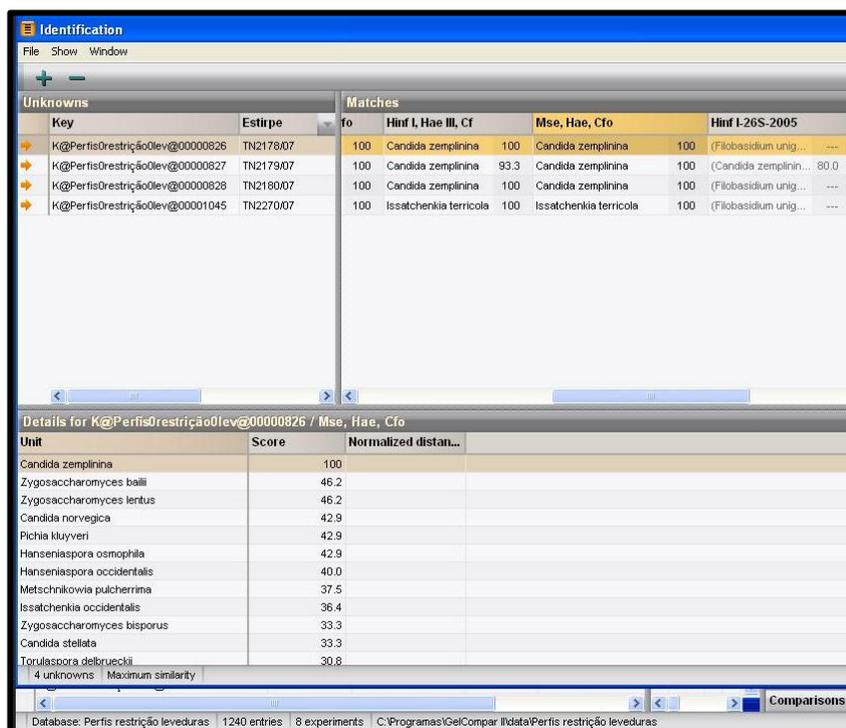


Figura 2.1: Módulo de identificação dos isolados que se pretende identificar.

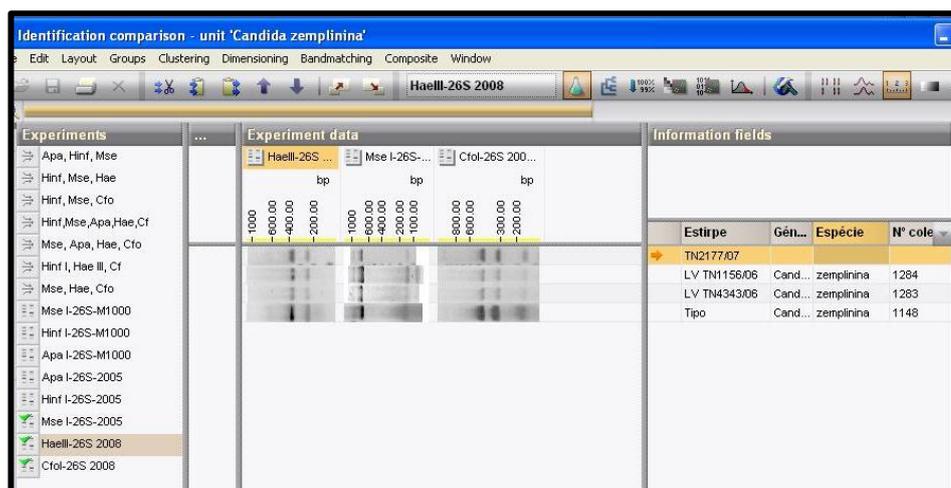


Figura 2.2: Comparação dos perfis de restrição do isolado desconhecido com os perfis da espécie mais semelhante na base de dados.

Foram consideradas as identificações que apresentaram percentagem de semelhança com as estirpes da biblioteca superior a 70 %.

2.1.3. Diferenciação de *H. uvarum* / *H. guilliermondii*

Os perfis de restrição de *H. uvarum* e *H. guilliermondii* foram idênticos para as endonucleases ensaiadas e para as diferenciar foi realizado um teste de temperatura de crescimento, uma vez que *H. guilliermondii* cresce a 37 °C e *H. uvarum* não, como descrito por Cadez *et al.* (2003) e Barata *et al.* (2008).

Como controlo utilizaram-se leveduras da colecção de microrganismos EVN, a espécie *H. uvarum*, EVN 393 e 394 (CBS 104 e 314) e a espécie *H. guilliermondii*, EVN 390, (CBS 2591). Os isolados foram crescidos previamente em meio YPD sólido a 25 °C durante 48 h, efectuando-se a repicagem dos mesmos em placas de meio YPD divididas em 6 sectores e incubadas às duas temperaturas de 25 °C e 37 °C.

2.1.4. Sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S

Purificação do produto da PCR

Para a purificação do produto da PCR obtido como descrito em reacção de amplificação utilizou-se o kit de purificação JET quick Spin Column Technique (Genomed) e o kit GFX PCR DNA – *Gel Band Purification* (GE Healthcare) seguindo as instruções dos fabricantes. Após a purificação a concentração próxima do produto da PCR purificado foi avaliada por electroforese em gel de agarose os procedimentos já descritos em 2.1.1.

Reacção de sequenciação

Inicialmente diluiu-se a amostra de DNA purificado em SUPW de maneira a obter uma concentração de aproximadamente 40 ng DNA/ μ l, num volume total de 10 μ l (preparação realizada em duplicado). Efectuou-se uma centrifugação instantânea a 4°C (Centrifuga: Biofuge stratos, Heraeus) e colocaram-se as amostras no termociclador para proceder à desnaturação das cadeias de DNA a 95°C durante 9 minutos. Preparou-se a mistura de sequenciação com 4,0 μ l de Master Mix, 0,4 μ l de tampão de sequenciação, 3,6 μ l de SUPW e 2 μ l do *primer* NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') (25 pmol/ μ l, Invitrogen) ou 2 μ l do *primer* NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (25 pmol/ μ l, Invitrogen), consoante se trata da sequenciação da cadeia *forward* ou da cadeia *reverse*. A cada tubo de DNA já desnaturado adicionou-se 10 μ l desta mistura e centrifugou-se instantaneamente a 4 °C. Colocou-se os tubos no termociclador para a realização da PCR de 36 ciclos com uma desnaturação de 20 segundos a 96 °C, seguida de emparelhamento 20 segundos a 50 °C e por fim extensão durante 4 minutos a 60 °C.

Precipitação e lavagem do DNA

Preparou-se a solução STOP constituída por 1 volume de glicogénio (Roche), 2 volumes de acetato de sódio 3 M (Sigma) e 2 volumes de EDTA 100 mM (Sigma). Adicionou-se a cada tubo 5 μ l desta solução e agitou-se ligeiramente. Adicionou-se a cada tubo 60 μ l de etanol a 95 % (v/v) a -20 °C e misturou-se com a micropipeta “*up & down*”. Os tubos foram incubados durante 10 minutos a -20 °C. Procedeu-se a uma centrifugação a 13000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, removendo-se no final o sobrenadante cuidadosamente com uma micropipeta. Efectuou-se a lavagem do DNA com 200 μ l de etanol a 70 % (v/v) a -20 °C e centrifugou-se novamente a

13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, removendo-se o sobrenadante com uma micropipeta. Este passo foi efectuado novamente removendo-se completamente o sobrenadante. Deixou-se secar os tubos abertos à temperatura ambiente durante 40 minutos e terminado este tempo ressuspendeu-se o *pellet* em 30 µl de formamida (SLS) (Bioreagent – ultrapuro, J.T.Baker) e os tubos foram guardados a -20°C até à sua utilização para a sequenciação.

Análise em sequenciador automático de DNA

Transferiu-se para uma placa de 96 poços, específica para o aparelho de sequenciação, o volume total das amostras resultantes da suspensão do pellet. Centrifugou-se instantaneamente a 3000 rpm e adicionou-se a cada poço uma gota de óleo mineral (Beckman Coulter). A placa foi introduzida no sequenciador automático de DNA (Sequenciador: CEQ 8000 Genetic Analysis System, Beckman Coulter) colocando igualmente outra placa mas com tampão de separação (Beckman Coulter) nos poços correspondentes aos da placa das amostras. Após introdução das placas no aparelho realizou-se uma electroforese capilar. A desnaturação das amostras decorreu durante 120 segundos à temperatura de 90 °C, sendo injectadas com uma voltagem 2.0 KV durante 15 segundos. Para a separação por electroforese capilar foi aplicada uma voltagem de 4,2 KV durante 85 minutos.

As sequências obtidas (directa e inversa) foram alinhadas com o *software* CEQ Investigator (Beckman Coulter Sequence Software) e corrigiram-se eventuais imprecisões, obtendo quando possível a sequência consenso.

Comparação das sequências obtidas

Introduziu-se as sequências obtidas no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Estados Unidos da América), no qual existem ferramentas de busca de sequências nucleotídicas semelhantes em diversas bases de dados como o Gen Bank (NCBI, EUA), EMBL (*European Molecular Biology Laboratory* – European Bioinformatics Institute, Reino Unido), DDBJ (*DNA Data Bank of Japan* – National Institute of Genetics, Japão) e PDB (*Protein Data Bank* – NCBI, Estados Unidos da América).

A ferramenta de busca de locais de alinhamento (BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) forneceu as sequências nucleotídicas mais semelhantes às obtidas no presente trabalho. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências das estirpes tipo existentes.

2.2. Caracterização enológica

2.2.1. Selecção dos isolados para avaliação enológica

Para cada amostra de uvas da casta Touriga Nacional foi escolhido um isolado de cada espécie de quando o mosto apresentou uma perda de peso de 70 g/l.

Foram seleccionadas 25 leveduras (Tabela 2.1) para a realização de fermentações controladas em laboratório, tendo como base mosto e massas prensadas (massas vnicas) provenientes de uvas da casta Touriga Nacional. Para além destas leveduras foi utilizada uma LSA (estirpe de *S. cerevisiae*) apropriada para vinhos tintos, utilizada como referência.

Tabela 2.1: Isolados seleccionados para a caracterização enológica.

Região	Isolado	Espécie
Dois Portos	11.62	<i>Z. bisporus</i>
	11.70	<i>I. terricola</i>
	11.71	<i>Z. bisporus</i>
	11.74	<i>C. zemplinina</i>
	11.79	<i>C. diversa</i>
	12.63	<i>P. mandshurica</i>
	12.68	<i>C. zemplinina</i>
	12.72	<i>I. terricola</i>
	12.76	<i>H. uvarum</i>
	12.81	<i>P. mandshurica</i>
Palhacana	21.61	<i>H. uvarum</i>
	21.70	<i>Zygoascus hellenicus</i>
	21.90	<i>C. zemplinina</i>
	22.64	<i>I. orientalis</i>
	22.70	<i>I. terricola</i>
	22.71	<i>Z. bailii</i>
	22.78	<i>H. opuntiae</i>
	22.79	<i>H. uvarum</i>
	23.68	<i>I. terricola</i>
23.84	<i>C. zemplinina</i>	
Montemor-o-Novo	61.72	<i>H. guilliermondii</i>
	62.75	<i>H. guilliermondii</i>
	64.69	<i>H. uvarum</i>
	65.70	<i>H. uvarum</i>
	66.80	<i>H. guilliermondii</i>
LSA comercial	LSA	<i>S. cerevisiae</i>

É de referir que foram avaliados dois isolados da espécie *Z. bisporus*, TN11.62 e 11.77 provenientes da mesma amostra, porque quando a selecção foi realizada desconhecia-se a identificação do isolado TN11.77. No entanto não se desprezou os resultados obtidos.

2.2.2. Preparação do mosto e massas prensadas

Foram colhidas uvas da casta Touriga Nacional, tendo o cuidado de apanhar exclusivamente os cachos intactos, excluindo-se assim os danificados, com fissuras, demasiado secos e com outras alterações. As uvas foram transportadas em caixas para a adega experimental do INIA – Dois Portos e foram pesadas perfazendo um total de 117 kg de uva. Procedeu-se ao desengaço e esmagamento das uvas num mini-desengaçador/esmagador (Grifo) e ao seu esmagamento, seguida de pisa a pés por aproximadamente 15 minutos sendo depois esmagadas numa prensa hidráulica (FNI) onde se obteve cerca de 70 litros de mosto. As massas prensadas resultantes do esmagamento foram pesadas (Balança: Sartorius) no laboratório em porções de 150 g, embrulhadas em papel de alumínio e esterilizadas em autoclave a 100 °C durante 1 hora (Autoclave: AJC). Após esterilização as massas foram conservadas a -20 °C até à sua utilização.

Dividiu-se o mosto resultante para dois microvinificadores de aço inoxidável (Microvinificadores: Silvas FAS) adicionando-se o volume de uma solução de dióxido de enxofre de modo a obter uma concentração final de 30 mg/l. Os microvinificadores foram colocados em câmara a 4 °C (Câmara frigorífica: r-134a DUPONT SUVA) durante 48 horas para defecação. O mosto defecado foi homogeneizado e distribuído por garrafas de 75 cl sendo rolhadas automaticamente (Rolhadora automática: VIEIRINOX). Procedeu-se de seguida à tinalização do mosto. O autoclave foi regulado de modo a que o mosto fosse aquecido a 80 °C durante 30 minutos. Terminado o processo, as garrafas foram mantidas em autoclave repetindo-se este processo decorridas 24 horas.

2.2.3. Preparação das massas vínicas e do pré-inóculo

Para a preparação das massas vínicas, cada garrafa de mosto TN foi devidamente agitada e limpa com álcool a 70 % (v/v), procedendo-se à transferência do mosto à chama para frascos de 1 l (Frascos: SCHOTT ou Simax, ISO 4796), com tampa de membrana (GL-45). Ao mosto adicionaram-se 150 g de massas, homogeneizando-se de seguida (Figura 2.3).

Decorridas 15-16 horas da inoculação procedeu-se à medição da D.O., seguida de contagens celulares em câmara de Neubauer. De acordo com os ensaios preliminares efectuados para o pré-inóculo (Anexo IV) estimou-se a concentração celular deste e o volume necessário de inóculo a adicionar às massas vínicas de modo a que ficassem com aproximadamente 10^6 cel/ml. Foram realizadas contagens em placas para confirmação posterior do número de células por mililitro adicionado (ver 2.2.3).

No caso da LSA efectuou-se a sua rehidratação e inoculação a partir do valor indicado pelo fabricante (Lallemand) de 20 biliões de células para 1 kg de LSA.

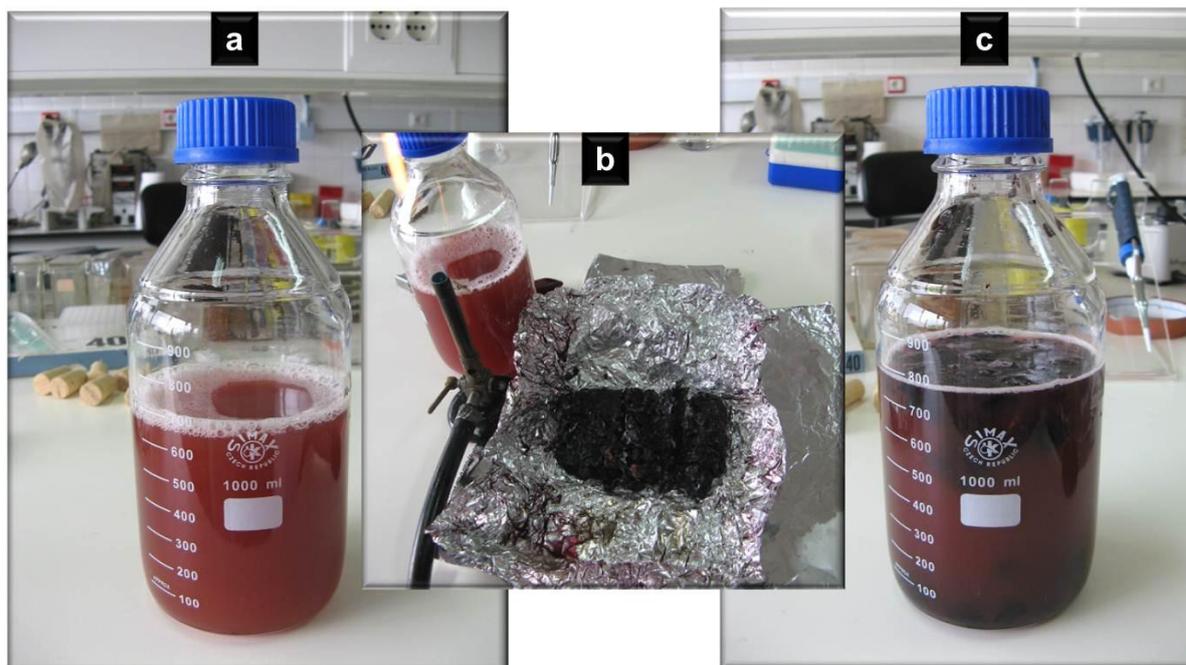


Figura 2.3: Preparação das massas vínicas: (a) frasco com mosto TN; (b) massas prensadas; e (c) frasco com massas vínicas TN.

2.2.4. Inoculação das leveduras e controlo da fermentação

A inoculação de cada um dos isolados foi realizada em câmara de fluxo laminar (Câmara de Fluxo laminar: FluFrance), em duplicado usando pré-inóculos diferentes.

A fermentação de cada um dos isolados foi realizada em estufa com temperatura controlada a 25 °C (Estufa: Cassel). A cinética de cada fermentação foi monitorizada diariamente por determinações gravimétricas, avaliando a perda de peso que ocorre maioritariamente devido à produção de CO₂ (Figura 2.4). Realizou-se igualmente um controlo da formação de espuma diária de cada um dos isolados através da medição da sua espessura em milímetros (mm) com o auxílio de uma régua.

Para verificar a implantação da levedura inoculada realizou-se uma despistagem aproximadamente às 30 g/l de perda de peso através de inoculação em meio YPD sólido de algumas amostras, por espalhamento à superfície com vareta de vidro.

Quando a perda de peso foi mínima cada fermentado foi transferido para frascos esterilizados de 500 ml (Frasco: SCHOTT ou Simax), sendo apenas transferido o líquido resultante e as massas foram rejeitadas. No entanto, foi estabelecido para as fermentações mais rápidas um mínimo de pelo menos 15 dias em contacto com as massas e a transferência das fermentações mais lentas quando a perda de peso não excedesse 0,7 g/l. Este procedimento foi realizado à chama de bico de *Bunsen* com o auxílio de um coador metálico flamejado com álcool (Figura 2.5). Após estabilização das amostras (aproximadamente 15 dias) transferiu-se novamente para novos frascos esterilizados. Introduziu-se azoto em cada um dos fermentados para diminuir oxidações e foram armazenados em sala com temperatura controlada (20 °C) até à sua utilização.



Figura 2.4: Incubação das amostras em estufa a 25 °C.



Figura 2.5: Transferência dos fermentados para frascos esterilizados.

2.3. Análises químicas

Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR)

Todas as amostras foram analisadas por FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier) para os parâmetros teor alcoólico, glucose, frutose e glicerol. Para isso procedeu-se à centrifugação das amostras a 5000 rpm durante 5 minutos, sendo transferidas para copos apropriados para o aparelho (FTIR: WineScan FT120) (Figura 2.6).



Figura 2.6: Análise dos fermentados no FTIR.

pH

A determinação do pH foi realizada de acordo com o método único da Organização Internacional do Vinho e da Vinha (OIV). Trata-se de um método potenciométrico, baseado na determinação da diferença de potencial entre dois eléctrodos imersos no meio em análise. Na técnica, o aparelho é calibrado com duas soluções-tampão, com valores de pH 4 e 7. Antes de se proceder à medição do pH as amostras foram centrifugadas como referido para o FTIR (Curvelo-Garcia, 1988).

Acidez volátil

A determinação da acidez volátil dos fermentados foi realizada pelo aparelho Cazenave. Baseia-se na separação dos ácidos voláteis por arrastamento numa corrente de vapor de água, seguida de rectificação, condensação e titulação (Curvelo-Garcia, 1988).

Acidez total

A determinação da acidez total foi realizada por titulação na presença do azul de bromotimol (Curvelo-Garcia, 1988).

Intensidade corante

Para a determinação da intensidade corante (I) seguiu-se o método usual da OIV. Procedeu-se à centrifugação de cada uma das amostras, em duplicado, como referido anteriormente em análise no FTIR. Determinou-se a absorvência a 420 nm, 520 nm e 620 nm, com um percurso óptico de 0,1 cm. A intensidade corante corresponde ao somatório das absorvências obtidas (Curvelo-Garcia, 1988).

Índice de polifenóis totais (IPT)

A determinação do IPT foi realizada por mediação de absorção por UV. Procedeu-se inicialmente à centrifugação de cada uma das amostras, em duplicado, como referido na análise no FTIR. Diluiu-se a amostra de vinho com água destilada na razão de 1:100. Determinou-se a absorvência a 280 nm, sob 1 cm de percurso óptico e relativamente à água. O índice de polifenóis totais é obtido pelo valor da absorvência multiplicado pelo factor de diluição (Curvelo-Garcia, 1988).

Determinação dos açúcares

A determinação dos açúcares redutores dos vinhos foi realizada em fluxo contínuo segmentado (Figura 2.7), pelo doseamento colorimétrico dos produtos da reacção dos açúcares redutores com a neocuproina (Curvelo-Garcia e Godinho, 1988).



Figura 2.7: Determinação de parâmetros como os açúcares redutores dos fermentados por fluxo contínuo segmentado.

Determinação do ácido málico

O doseamento do ácido L(-)-málico em vinho foi efectuado por fluxo contínuo segmentado. Na presença de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD), o anião L(-)-malato é oxidado em oxaloacetato numa reacção catalisada pela L-MDH (L(-)-malato-desidrogenase). A formação de NADH, medida pelo aumento de absorvência a 340 nm, é proporcional à quantidade de L-malato presente (Curvelo-Garcia, 1988).

Determinação do ácido láctico

O doseamento do ácido L(+)-láctico foi efectuado por fluxo contínuo segmentado. Na presença de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD), o anião L(+)-lactato é oxidado em piruvato, em reacções catalisadas pela L-LDH (L(+)-lactato-desidrogenase). A formação de NADH, determinada pelo aumento da absorvência a 340 nm, é proporcional à quantidade de lactato presente (Curvelo-Garcia, 1988).

Produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S)

A produção H₂S foi avaliada através da introdução de uma tira de papel embebida numa solução de acetato de chumbo saturada (Anexo I), em tubos de ensaio com mosto TN, sendo a sua produção detectada pelo escurecimento do papel.

O pré-inóculo foi obtido de acordo com o ponto 2.2.3, sendo os isolados incubados apenas por aproximadamente 10 horas. Decorrido este tempo transferiu-se um volume de inóculo para tubos de ensaio com mosto TN, colocando-se a tira de papel, depois de seca, nos respectivos tubos de modo a ficar a 5 mm do mosto fixada com a rolha de celulose. Utilizou-se ainda um controlo negativo sem adição de inóculo.

Os isolados foram incubados a 25 °C, observando-se os resultados ao fim de 6 e de 30 dias (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001; De Benedicts *et al.*, 2010).

2.4. Análise sensorial

A análise sensorial do aroma dos vinhos de uvas da casta Touriga Nacional foi realizada na Sala de Prova do INIA – Dois Portos.

2.4.1. Constituição do grupo de prova

Para a avaliação dos fermentados recorreu-se ao painel de prova do INIA - Dois Portos e recrutamento externo. O grupo de prova foi constituído por um total de 13 provadores (9 mulheres e 4 homens) com idades compreendidas entre os 24 e os 59 anos. Todos os participantes em questão possuíam conhecimentos base na área do vinho assim como de todo o processo de vinificação envolvido.

2.4.2. Selecção e treino dos descritores da casta Touriga Nacional

Os produtos fermentados foram avaliados segundo análise sensorial descritiva quantitativa. Os descritores sensoriais foram seleccionados com base na literatura referente à casta Touriga

Nacional (de Freitas *et al.*, 1999; Falco da Costa, 2004; Falqué *et al.*, 2004; Guedes de Pinho *et al.*, 2007).

Apresenta-se na tabela 2.2 os descritores seleccionados para este estudo. Para efeito de treino foram realizadas quatro sessões de prova nas quais foi englobado um treino dos descritores em estudos com base em soluções de aromas (Anexo I) e ainda com treino dos descritores a nível do aroma ortonasal, aroma retronasal, descritores do sabor em vinhos da casta Touriga Nacional. Nas duas últimas sessões foram utilizados nove fermentados que foram elaborados apenas para efeito de treino. Estas duas últimas sessões tiveram também como objectivo dar a conhecer o tipo de amostras a avaliar. Os provadores pontuaram cada descritor, de acordo com uma escala estruturada (0 – sem percepção até 5 – percepção mais elevada).

Tabela 2.2: Descritores referidos na bibliografia utilizados (a negrito) com base na análise sensorial de vinhos de uvas da casta TN.

Chocolate	Frutos secos	Cravinho	Fumo	Compota	Mentol
Bergamota	Frutos secados	Floral	Madeira	Herbáceo	Violeta
Esteva	Mel	Laranja	Terroso	Manteiga	Pimenta
Eucalipto	Maracujá	Pimentos verdes	Caramelo	Lácteo	-
Maçã	Frutos silvestres	Citrino	Banana	Frutado	-

Dos descritores (tabela 2.2) seleccionados eliminou-se a madeira, terroso e pimenta por terem sido irrelevantes para as amostras em análise, no entanto outros foram introduzidos nomeadamente o oxidado, acetato de etilo e fermento de padeiro, por serem mencionados pela maioria dos provadores (Anexo V).

2.4.3. Análise sensorial dos vinhos fermentados

As sessões de prova realizaram-se durante a manhã, pelas 12 horas. Em cada sessão foram provadas entre 8 e 10 amostras.

As amostras foram provadas em copos de prova para vinhos em forma de tulipa (ISO 3591), num volume aproximado de 30 ml, à temperatura ambiente e tapados com tampas de caixas de Petri, para evitar a perda de voláteis (Figura 2.8). Para evitar a fadiga dos provadores foi facultado bolachas de água e sal para quem desejasse efectuar uma pausa, evitando a fadiga sensorial.

No início de cada sessão, foi realizado um teste com as soluções de aromas facultadas durante as sessões de treino. Foi também fornecido a cada provador uma escala estática de intensidade odorante (Anexo I) para auxiliar na quantificação dos descritores (Falco da Costa, 2004).

Em todas as sessões foram provados os fermentados obtidos pela LSA que resultaram de cinco fermentações que foram misturadas e homogeneizadas. Este fermentado funcionou como referência e ainda permitiu avaliar a consistência dos provadores nas diferentes sessões de prova.

A ficha de prova fornecida incluiu um total de 22 descritores avaliando o aroma ortonasal, 22 descritores para o aroma retronasal, 6 descritores para a caracterização do sabor e ainda a apreciação global dos fermentados obtidos (*cf.* anexo V).

Para minimizar qualquer efeito da ordem da apresentação, as amostras foram servidas em todas as posições possíveis (antes e após qualquer outra), (*cf.* anexo V) (Naes e Risvik, 1996).



Figura 2.8: Bancada de prova.

2.4.4. Avaliação do grupo de prova

A avaliação da consistência dos provadores foi realizada com base na análise sensorial dos fermentados pela LSA, utilizados como referência, nas diferentes sessões de prova, tendo em conta o aroma ortonasal, retronasal, características do sabor e apreciação global. A partir dos resultados btidos foram estimados os coeficientes de correlação com o *software* STATISTICA (versão 5.0), no módulo *Basics Statistics*.

2.5. Análise estatística dos resultados

2.5.1. Determinação do índice de Shannon-Weaver e curvas de rarefacção

Foi determinado, para cada vinha, o índice de diversidade de Shannon-Weaver (D), com base no número de espécies detectadas nas diferentes amostras. Este índice dá uma medida do grau de incerteza na identificação de um determinado isolado, a partir de uma determinada amostra, e será tanto maior quanto maior for a diversidade da população presente na amostra, sendo determinado pela equação:

$$D = \sum (p_i \times \ln p_i)$$

em que p_i representa a abundância relativa da i -ésima espécie de levedura numa amostra (Moreno, 2001; Silva, 2003).

As curvas de rarefacção foram construídas com base numa ferramenta disponibilizada online (http://biome.sdsu.edu/fastgroup/cal_tools.htm). Estas curvas permitem comparar amostras de tamanhos diferentes quanto à riqueza em espécie, estimando-se o valor $E(s)$, que representa o número de espécies que seria esperado isolar se fossem recolhidas a partir das amostras n estirpes de uma população contendo um total de N indivíduos, valor este que se obtém a partir da equação:

$$E(s) = \sum_{i=1}^s \left\{ 1 - \left[\frac{\binom{N-n_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right] \right\}$$

Em que n_i é o número de indivíduos pertencentes à i -ésima espécie, e s o número total de espécies encontradas. Uma curva de rarefacção em subida acentuada até ao número total de isolados poderá indicar que a amostra foi muito pequena para ser caracterizada, enquanto que uma curva com um declive a tender para a estabilização revela que foi isolado o número suficiente de isolados para uma boa caracterização (Moreno, 2001; Silva, 2003).

2.5.2. Análise química

Os parâmetros teor alcoólico, frutose, glucose, glicerol, pH, acidez volátil, acidez total, açúcares redutores, ácido málico, ácido láctico, intensidade corante e IPT foram tratados por análise de variância com o *software* STATISTICA, no módulo ANOVA/MANOVA para avaliar o efeito do isolado e o efeito da espécie nas características dos fermentados. Testou-se a homogeneidade das variâncias e quando se detectou efeito do factor espécie realizou-se a comparação das médias pelo teste da mínima diferença significativa.

2.5.3. Análise sensorial

Os resultados médios obtidos na avaliação do aroma ortonasal, retronasal, características do sabor e apreciação global dos diferentes fermentados foram tratados por análise de variância com o *software* STATISTICA, no módulo ANOVA/MANOVA. Esta análise permitiu avaliar o efeito do isolado e o efeito da espécie nas características aromáticas dos fermentados. Também foi testado a homogeneidade das variâncias e quando se detectou efeito do factor espécie realizou-se a comparação das médias pelo teste da mínima diferença significativa.

3. Resultados e Discussão

3.1. Identificação dos isolados

Foram identificados 570 isolados de uvas da casta Touriga Nacional provenientes das regiões de Dois Portos, Palhacana e Montemor-o-Novo. Esta identificação incidiu sobre os isolados obtidos imediatamente (0 horas), 48 horas após o esmagamento das uvas e quando o mosto atingiu uma perda de peso de 70 g/l, que corresponde ao consumo de aproximadamente 2/3 do açúcar do mosto.

3.1.1. Perfis de restrição de rDNA

Após amplificação por PCR foram obtidos fragmentos dos isolados das amostras das regiões do estudo, em que o seu tamanho variou entre 1000 e 1200 pares de base (bp). Apresenta-se na Figura 3.1 o resultado de um gel das amostras TN12, TN61 e TN62 observando-se no geral que os fragmentos estão compreendidos entre 1000 e 1150 bp.

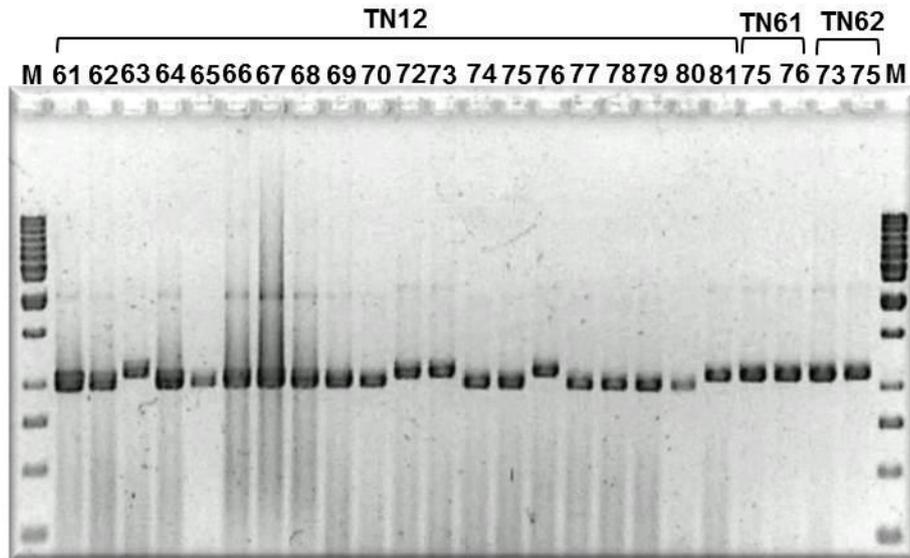


Figura 3.1: Gel de electroforese do produto da PCR de alguns isolados das amostras TN12, 61 e 62/07. M- marcador de pesos moleculares 1kb.

A análise de perfis de restrição, do fragmento amplificado com os *primers* NL1 e LR6 e que inclui os domínios D1 e D2 do gene do rRNA 26S, foi realizada com as enzimas *MseI*, *HinI*, *ApaI*, *HaeIII* e *CfoI*. Nos isolados das 48 horas utilizaram-se, inicialmente, apenas três enzimas nomeadamente *MseI*, *HinI* e *ApaI*, porque esta era a metodologia que foi iniciada no laboratório (Baleiras-Couto *et al.*, 2005). Posteriormente as enzimas *HaeIII* e *CfoI* foram também estudadas, tendo sido verificado por Zanol *et al.*, 2010, que as enzimas *HaeIII*, *CfoI* e *MseI* são as mais discriminantes para a generalidade das espécies de interesse enológico existentes na base de dados de perfis de restrição de leveduras (PRL) existente no INIA - Dois Portos.

Passou-se então a utilizar estas três enzimas de restrição para os restantes isolados e em casos pontuais de identificação inconclusiva utilizaram-se adicionalmente as enzimas *Apal* e/ou *HinI*.

Quatrocentos e noventa e sete isolados foram identificados por comparação dos perfis obtidos com os da biblioteca de PRL do INIA-Dois Portos (cf. 2.1.2).

A análise dos isolados da amostra TN11 permitiu observar oito perfis de restrição distintos e apenas dois dos perfis obtidos não tiveram correspondência com os PRL da biblioteca (Figura 3.2). A maioria dos perfis de restrição dos isolados desta amostra foi idêntica ao da espécie *C. zemplinina* com percentagem de semelhança muito elevada. Neste caso a enzima mais discriminante foi *CfoI* sendo também bastante polimórfica.

O isolado TN11.57 foi um dos casos pontuais onde se efectuou a reacção de digestão com uma enzima adicional, neste caso com a enzima *HaeIII*, uma vez que com o perfil de *HinI*, *MseI* e *Apal* a identificação não foi conclusiva, pelo facto de ser semelhante a mais de uma espécie da biblioteca de PRL. Mesmo com a adição do perfil de restrição de *HaeIII*, a semelhança obtida com os PRL da biblioteca foi baixa, sendo a sua identificação realizada por sequenciação.

Os isolados TN11.61, 11.77, 11.78, 11.79 e 11.86 apresentaram um perfil de restrição diferente para as enzimas *HaeIII* e *CfoI*, distinguindo-os dos restantes perfis, observando-se um perfil com duas bandas muito características. Os isolados TN11.77, 11.79 e 11.86 foram seleccionados para sequenciação por apresentarem um perfil novo relativamente aos da base de dados.

O isolado TN11.54 apresentou um perfil muito característico em *MseI* revelando-se idêntico ao da espécie *Zygoascus hellenicus* existente na biblioteca de PRL.

De todas as enzimas, observou-se que a *Apal* foi a menos discriminante, por não ter digerido o produto da PCR da maioria dos isolados.

Em casos pontuais, como nos isolados TN11.45, 50 e 60 foi realizado a digestão adicional da enzima *CfoI* precisamente por ser a enzima mais discriminante para a espécie *C. zemplinina*, confirmando assim a identificação destes isolados.

Também nos isolados TN11.34 e 11.49 identificados como *I. terricola* foi realizada a digestão com *CfoI* para a confirmação da identificação.

Relativamente aos isolados TN11.62, 71 e 73 foram identificados como *Z. bisporus*.

Os restantes isolados tiveram correspondência elevada com duas espécies nomeadamente *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*. Visto que estas duas espécies apresentaram perfis de restrição idênticos, como se pode observar na figura 3.2, não foi possível identificar os isolados com base na análise de restrição.

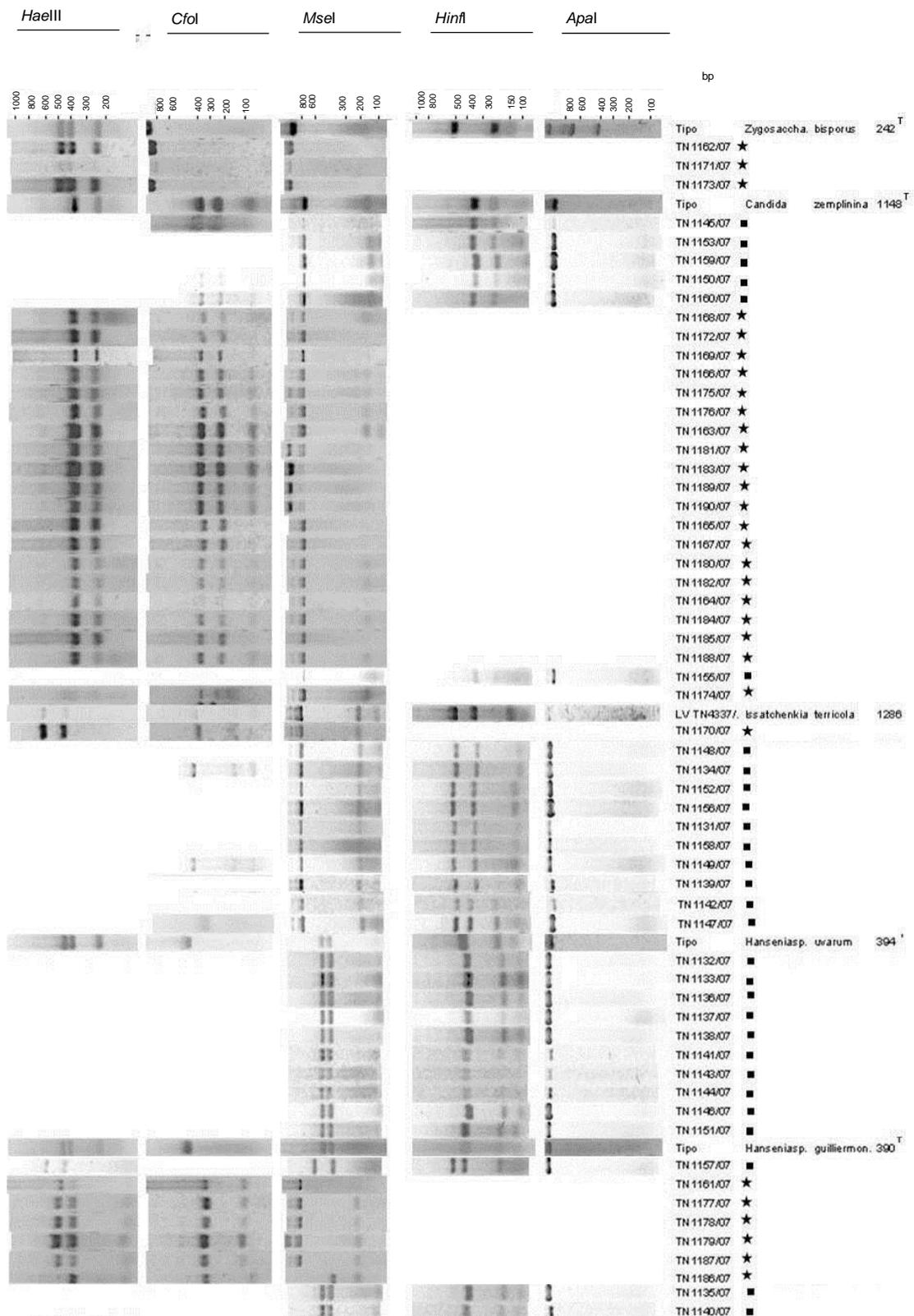


Figura 3.2: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN11 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T - Estirpe tipo.

Já na amostra TN12 foram encontrados cinco perfis diferentes correspondentes às espécies *C. zemplinina*, *M. pulcherrima*, *I. terricola*, *P. mandshurica* e *H. uvarum*/*H. guilliermondii* (Figura 3.3).

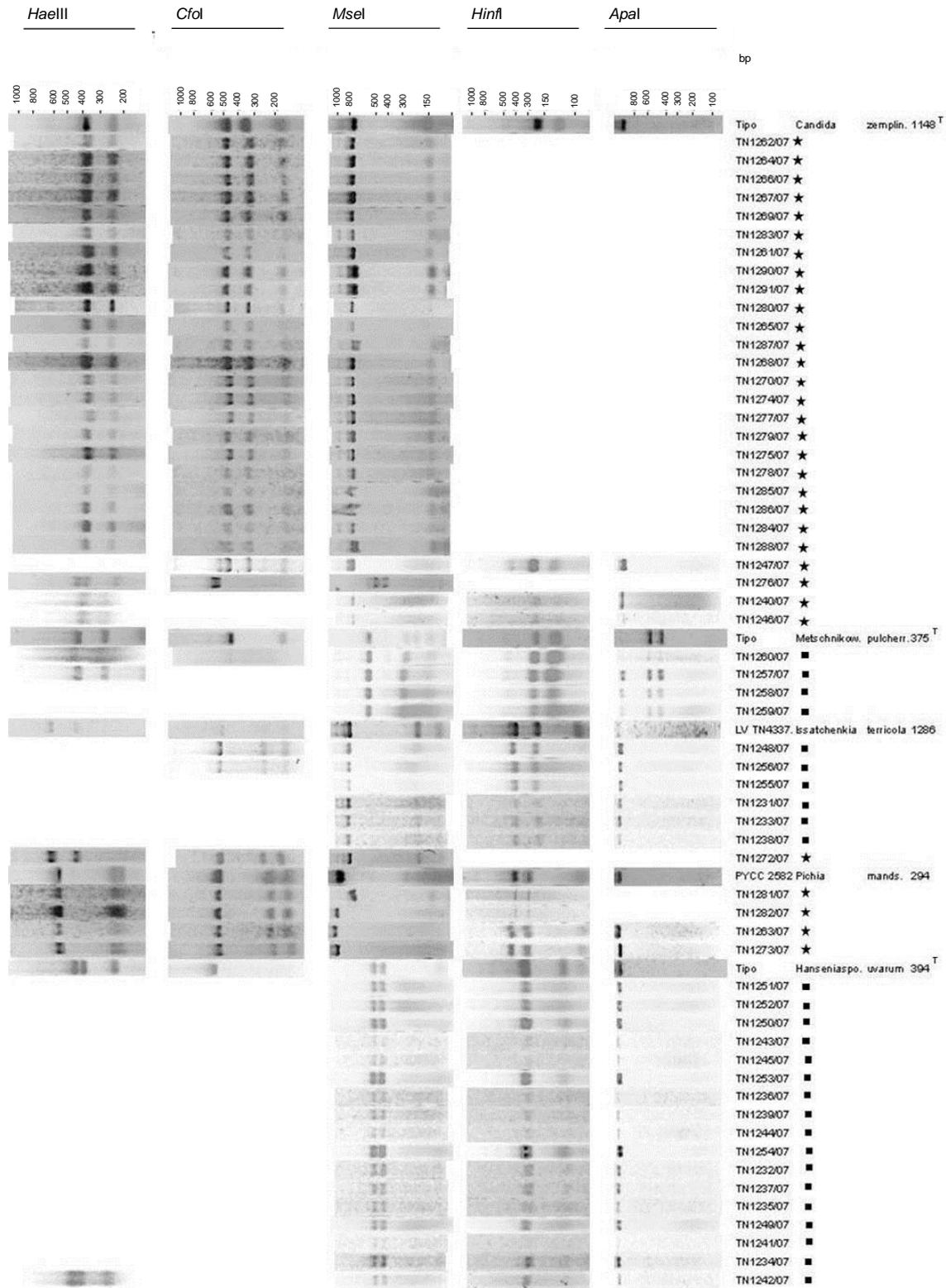


Figura 3.3: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN12 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T - Estirpe tipo.

Mais uma vez se observou que com base nos PRL da biblioteca a maioria dos isolados foram identificados como *C. zemplanina* seguindo-se *H. uvarum*/*H. guilliermondii* e *I. terricola*.

De todas as enzimas, tal como se verificou na amostra anterior, a *Apal* foi a menos polimórfica, não existindo digestão na maioria dos isolados. Apenas os isolados TN12.57, 58, 59 e 60 apresentaram um perfil de duas bandas muito característico. Também se observou um perfil muito polimórfico para as enzimas *MseI* e *HinfI* confirmando a sua identidade com a espécie *M. pulcherrima*. Aos isolados TN12.57 e 60 foi realizada a digestão adicional com a enzima *HaeIII* para confirmação da identificação, uma vez que também esta enzima para esta espécie apresenta um perfil característico com três bandas distintas.

Os perfis de restrição dos isolados TN12.63, 73, 81 e 82 apresentaram semelhança com mais do que uma espécie da biblioteca de PRL, realizando-se a digestão com enzimas adicionais, *HinfI* e *Apal*, para dois dos isolados, TN12.63 e 73. Com os perfis obtidos verificou-se a elevada semelhança com *P. mandshurica*, tendo sido seleccionado um dos isolados, TN12.63, para sequenciação para confirmar o resultado obtido.

Na amostra TN21 observaram-se oito perfis de restrição diferentes, um dos quais não teve correspondência com as espécies existentes na biblioteca de PRL (Figura 3.4). Nesta amostra, a maioria dos isolados apresentaram elevada semelhança com as espécies *H. uvarum* e *H. guilliermondii* as quais não são distinguíveis pela análise de perfis de restrição realizada no presente trabalho (Zanol *et al.*, 2010). Também se observou correspondência de vários isolados com a espécie *C. zemplanina*.

Cinco isolados foram identificados como *Zygoascus hellenicus*, tendo apresentado um perfil de *MseI* característico desta espécie, já referido anteriormente. Nesta amostra o produto da PCR dos isolados TN21.33, 36 e 42 apresentou digestão por *Apal*, confirmando-se a elevada semelhança com a espécie *M. pulcherrima*. Dois isolados, TN21.38 e 48, apresentaram um perfil correspondente à espécie *I. terricola*, confirmada com o perfil de *CfoI* determinado para um deles. Apenas o isolado TN21.83 foi identificado como *Z. bisporus*.

Os isolados TN21.31, 34, 44 e 55 apresentaram perfil idêntico mas sem correspondência com os PRL da biblioteca. Destes foi seleccionado apenas o isolado TN21.44 para a sequenciação, uma vez que esta iria também ser realizada para o isolado TN11.57, que apresentou perfis de restrição idênticos.

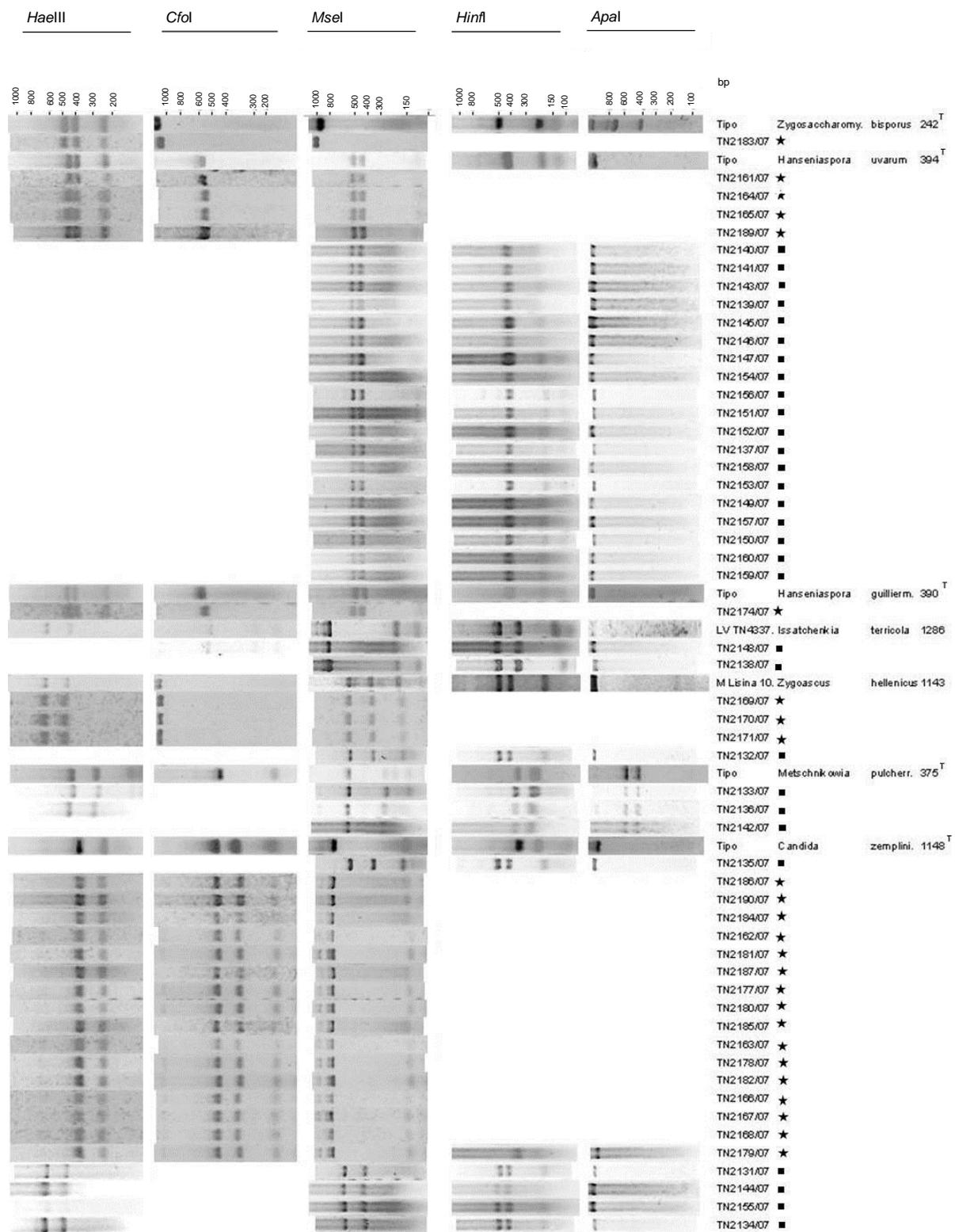


Figura 3.4: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN21 e comparação com as estirpes da coleção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T - Estirpe tipo.

Os isolados da amostra TN22 apresentaram oito perfis de restrição diferentes, sendo muito polimórficos e variados (Figura 3.5). O maior número de isolados foi identificado como *H. guilliermondii* ou *H. uvarum*. Um dos isolados, TN22.78, apresentou uma percentagem de semelhança elevada com estas duas espécies. No entanto, não se obteve digestão por *MseI* como seria de esperar se correspondesse à espécie *H. uvarum* ou *H. guilliermondii*, procedeu-se, por isso, à sua sequenciação.

Para muitos dos isolados observou-se uma semelhança elevada de perfis com os da espécie *Z. bailii*, sendo o perfil de *CfoI* o mais discriminante. Para confirmação, um dos isolados (TN22.71) foi seleccionado para sequenciação.

Nove isolados foram identificados como *I. terricola*, três como *P. kluyveri var kluyveri* e um como *P. mandshurica*. No entanto para a espécie *P. kluyveri var kluyveri* o perfil de *HinfI* apresentou algumas variações, efectuando-se digestão com uma enzima adicional, *CfoI*, e ainda confirmação da identificação de um dos isolados por sequenciação.

Apenas um isolado, TN22.64, apresentou perfis semelhantes à espécie *I. orientalis*, observando-se um polimorfismo elevado para as enzimas *HaeIII* e *CfoI*.

Um outro isolado, TN22.53, obteve boa correspondência com a espécie *I. occidentalis*. Observou-se para este isolado um perfil muito característico para *MseI* e *Apal*, uma vez que estas enzimas não digerem o produto da PCR, resultados confirmados no trabalho de Baleiras-Couto *et al.* (2005).

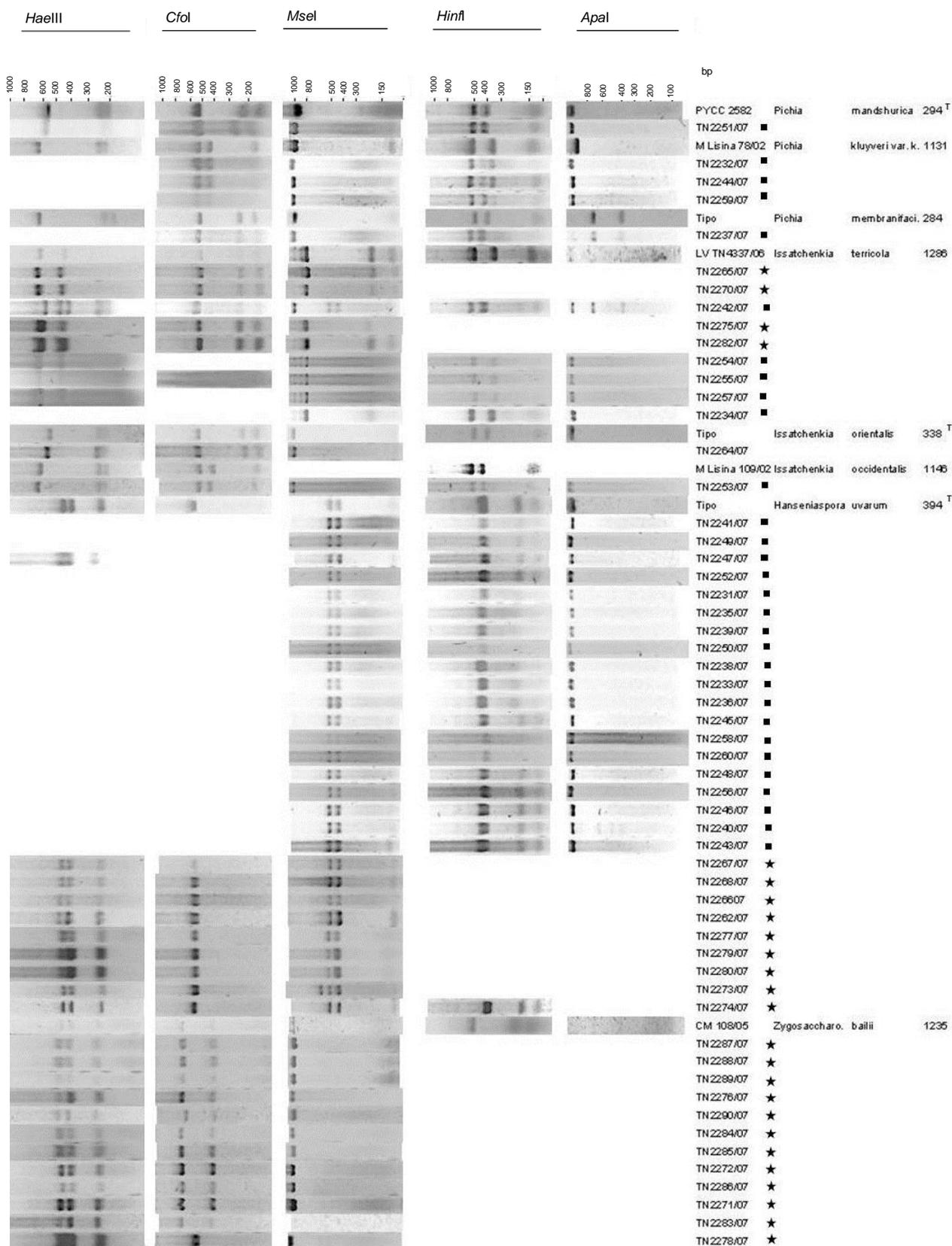


Figura 3.5: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN22 e comparação com as estirpes da coleção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; T – Estirpe tipo.

Na amostra TN23 observou-se sete perfis de restrição diferentes, cinco dos quais correspondentes às espécies *C. zemplinina*, *H. uvarum*/*H. guilliermondii*, *I. terricola*, *A. pullulans* e *P. membranifaciens* da biblioteca de PRL (Figura 3.6).

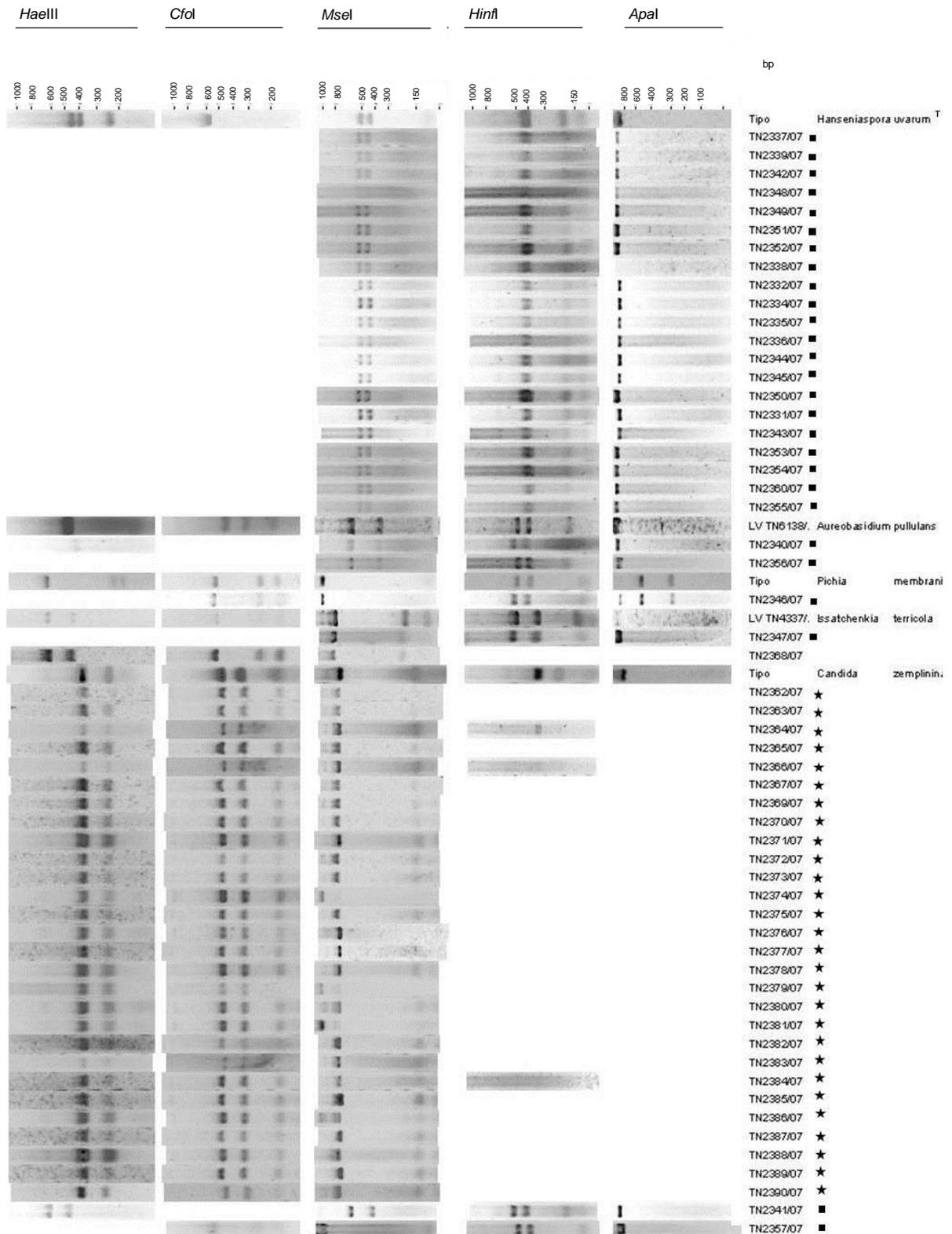


Figura 3.6: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN23 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T - Estirpe tipo.

Dos isolados cujos perfis não tiveram correspondência, o isolado TN23.41 apresentou perfis de restrição semelhantes a isolados de outras amostras, TN11.57 e TN21.44, já seleccionados para sequenciar. Em relação ao isolado, TN23.57, observou-se um perfil diferente dos existentes na biblioteca, pouco polimórfico, não apresentando digestão para as enzimas *MseI* e *Apal*, sendo necessário proceder à sua sequenciação. Dois isolados, TN23.40 e 56 destacaram-se pelo seu perfil muito polimórfico para as enzimas *CfoI*, *MseI* e *HinfI*, evidenciando-se uma semelhança muito elevada com *A. pullulans*. De referir que se trata de um fungo filamentoso muito detectado em estudos da biota de leveduras em uvas, por ter no seu ciclo de vida um estado leveduriforme (Fleet, 2003).

Em relação à vinha de Montemor-o-Novo a identificação foi ainda realizada para os isolados obtidos às 0 horas. De referir que 52 destes isolados foram agrupados pela sua macromorfologia em meio sólido tendo sido analisado pelo menos um isolado de cada grupo por perfis de restrição, considerando-se que os restantes pertenciam à mesma espécie. Encontra-se em anexo a percentagem de semelhança dos isolados com a espécie mais idêntica da base de dados (Anexo III).

A generalidade dos isolados da amostra TN61 foi identificada como *H. guilliermondii* ou *H. uvarum*, seguido da espécie *A. pullulans* (Figura 3.7).

Observou-se um perfil de restrição diferente para o isolado TN61.30. Os perfis de restrição de *HaeIII*, *CfoI* e *MseI* revelaram um polimorfismo elevado correspondente a *Cryptococcus albidus*.

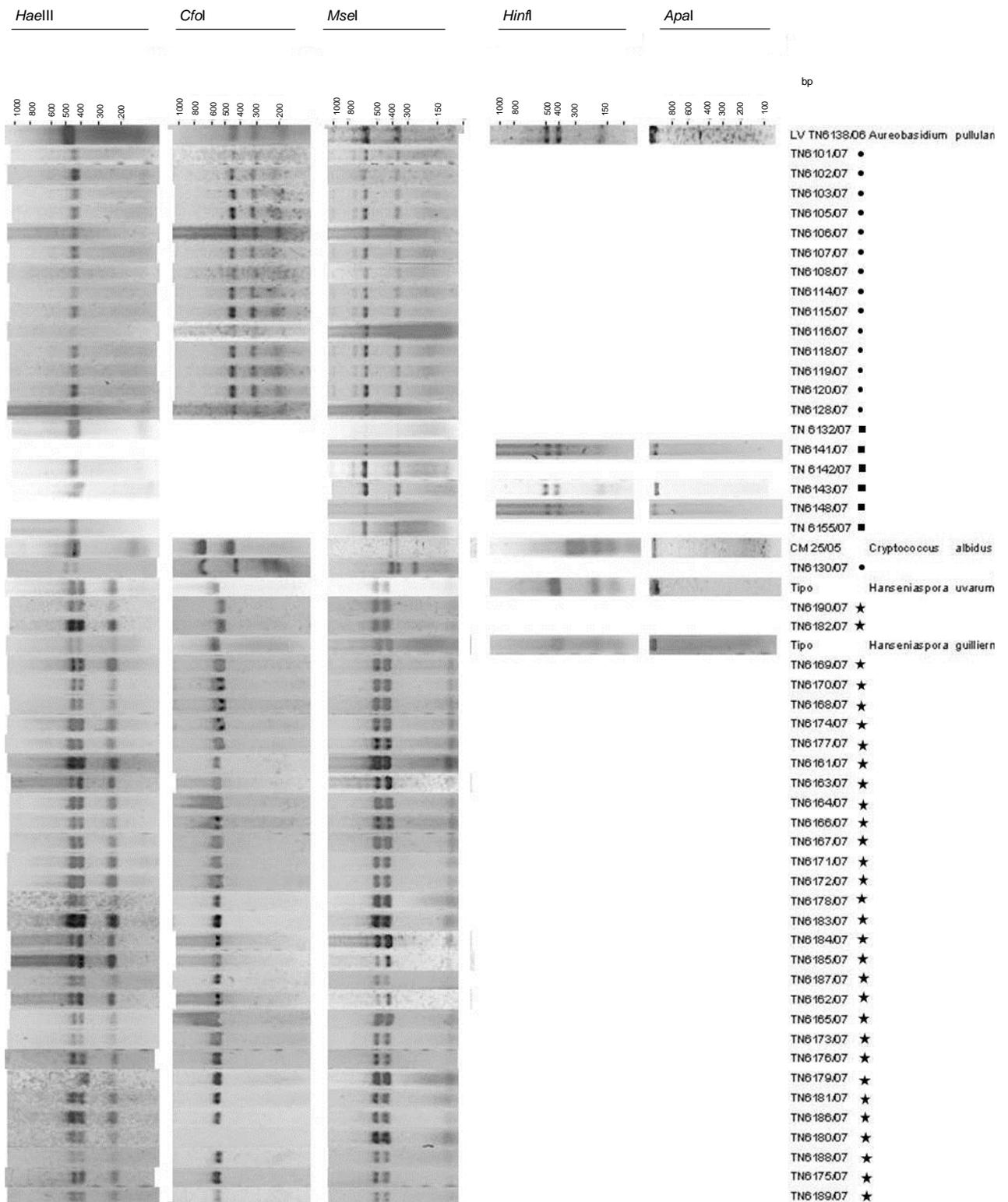


Figura 3.7: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN61 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos EVN. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; T – Estirpe tipo.

Na amostra TN62 os isolados tiveram elevada semelhança com os perfis de restrição das espécies *A. pullulans*, *H. uvarum* ou *H. guilliermondii* (Figura 3.8).

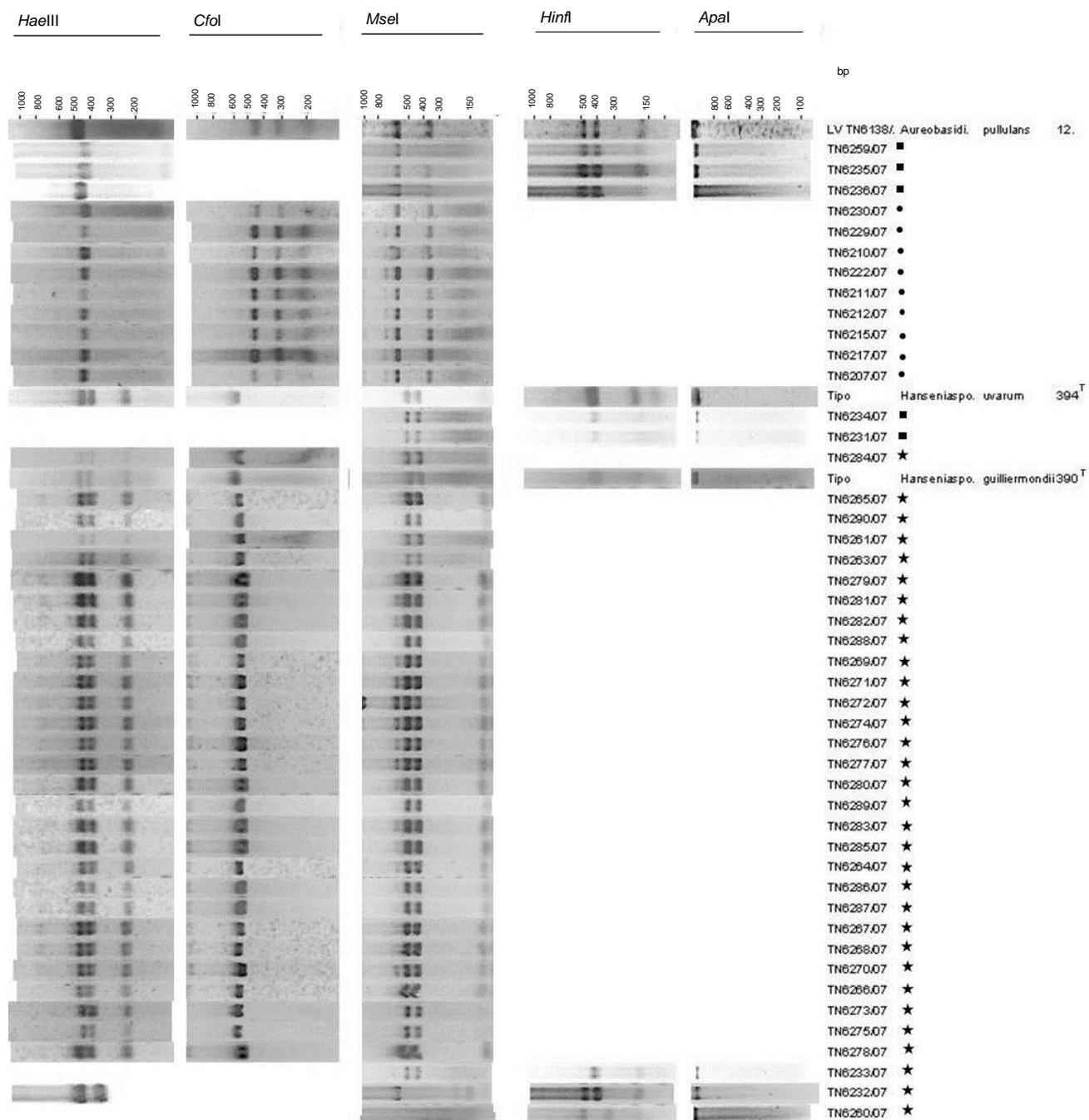


Figura 3.8: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN62 e comparação com as estirpes da coleção de microrganismos EVN. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ■ - 48 h após o esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T - Estirpe tipo.

O isolado TN62.60 apresentou perfis de restrição diferentes dos restantes isolados para *MseI* e *HinfI*, sendo necessário a sua sequenciação. Também para o isolado TN62.32 foram observados perfis distintos, no entanto a sua perda de viabilidade impediu a sua sequenciação.

Em relação à amostra TN63 apenas se identificou os isolados das 0 horas, uma vez que os das 48 horas perderam viabilidade e não foi possível analisá-los (Figura 3.9). Estes isolados foram identificados como *A. pullulans* com base nos perfis de restrição obtidos.

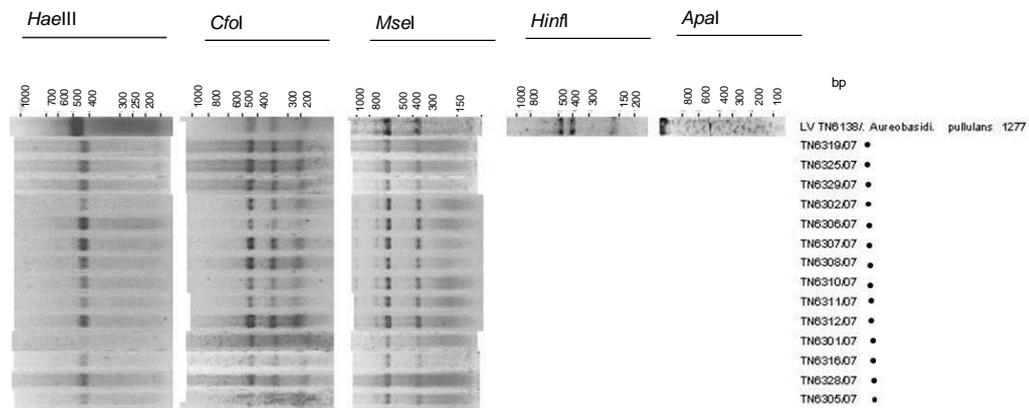


Figura 3.9: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN63 e comparação com as estirpes da coleção de microrganismos EVN. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; T – Estirpe tipo.

Já a amostra TN64 a identificação compreendeu apenas os isolados das 0 horas e das 70 g/l (Figura 3.10). A maioria destes isolados teve uma boa correspondência com as espécies *H. uvarum* ou *H. guilliermondii* seguida de *A. pullulans*.

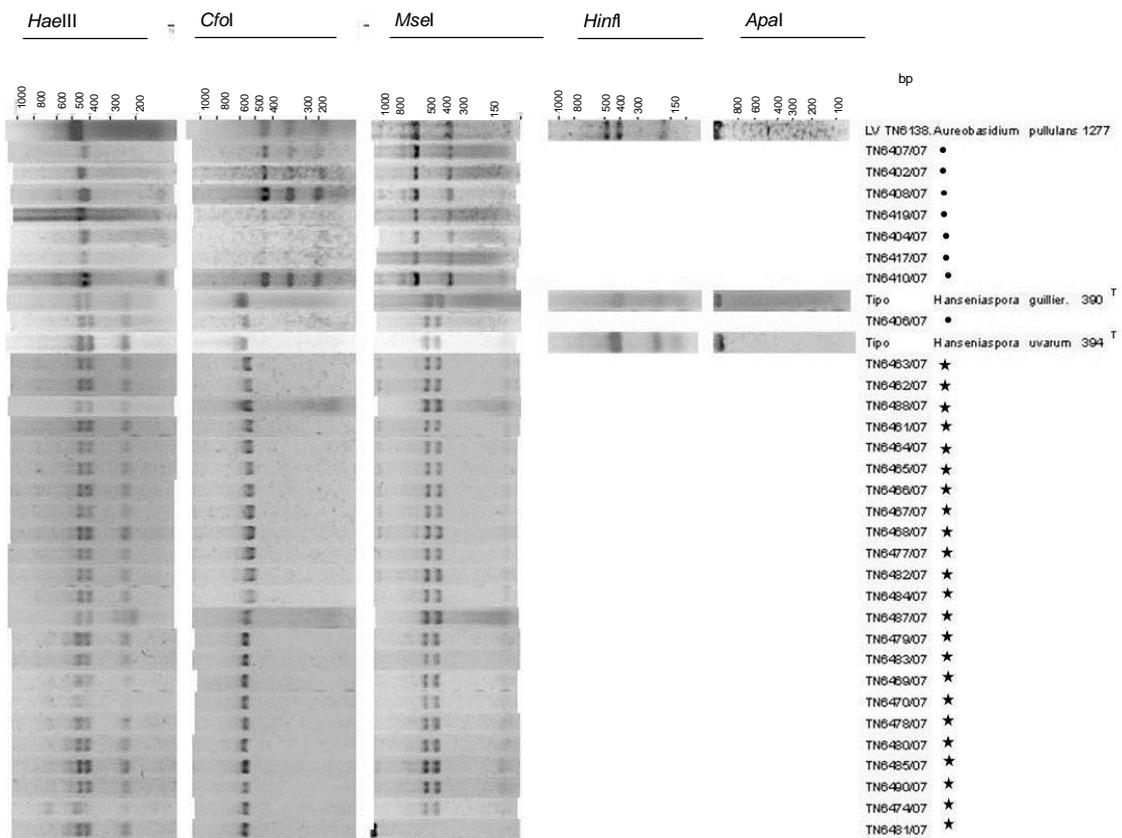


Figura 3.10: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN64 e comparação com as estirpes da coleção de microrganismos EVN. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; T – Estirpe tipo.

A globalidade dos isolados da amostra TN65 foi identificada como *H. uvarum*/*H. guilliermondii* e *A. pullulans* (Figura 3.11). Nesta amostra um dos isolados, TN65.04, apresentou perfis de restrição semelhantes aos da espécie *Cryptococcus flavescens*. No entanto, observou-se diferenças no perfil de restrição de *CfoI* e *HinI*. Este isolado foi assim identificado, como *Cryptococcus sp.* não se efectuando a sua sequenciação, pelo facto de não se tratar de um género relevante para este estudo.

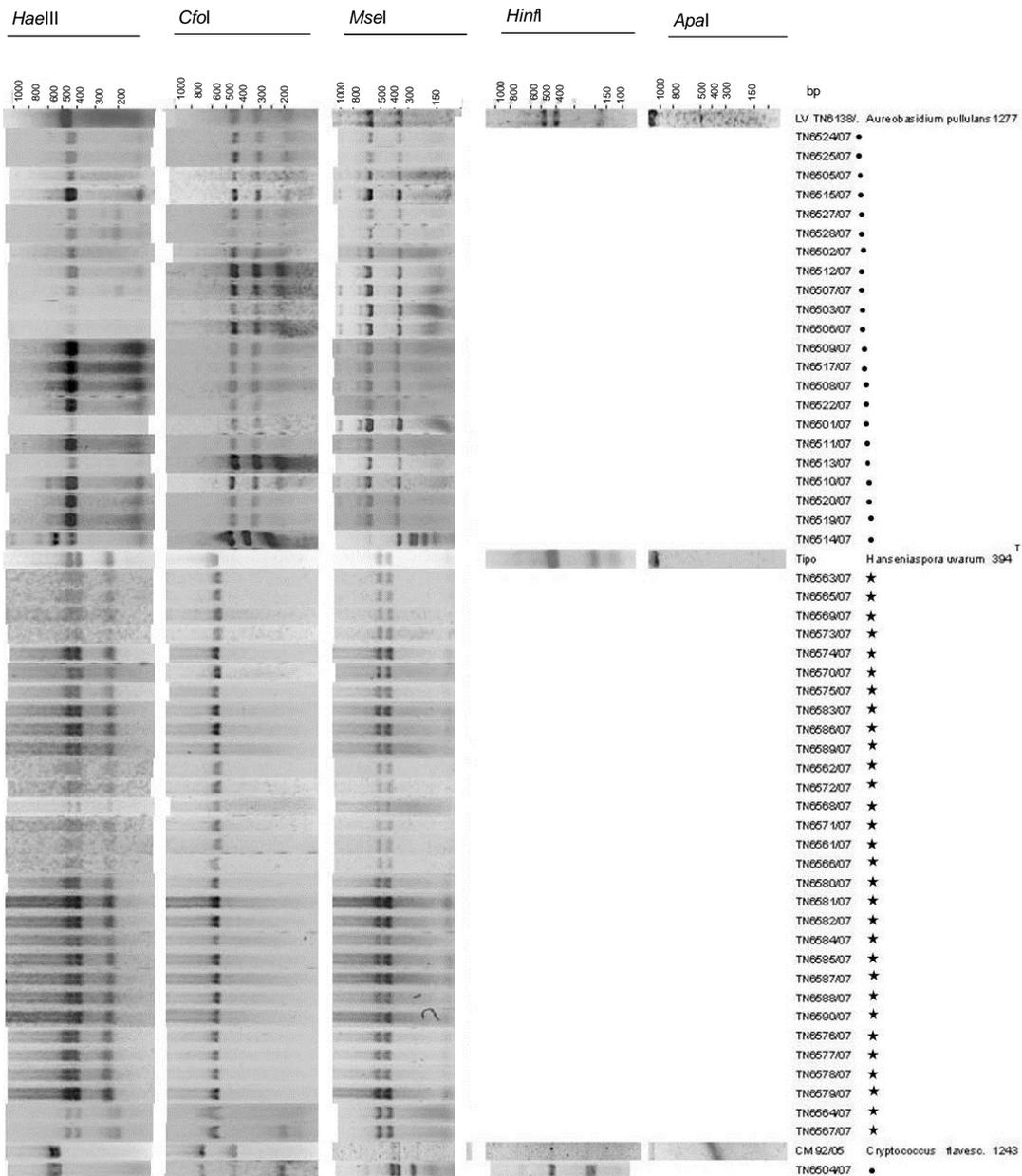


Figura 3.11: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN65 e comparação com as estirpes da colecção de microrganismos do INIA – Dois Portos. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; T – Estirpe tipo.

Os perfis de restrição dos isolados da amostra TN66 apresentaram semelhança elevada com os perfis das espécies *H. guilliermondii* ou *H. uvarum*, *A. pullulans* e *I. terricola* da biblioteca de PRL (Figura 3.12).

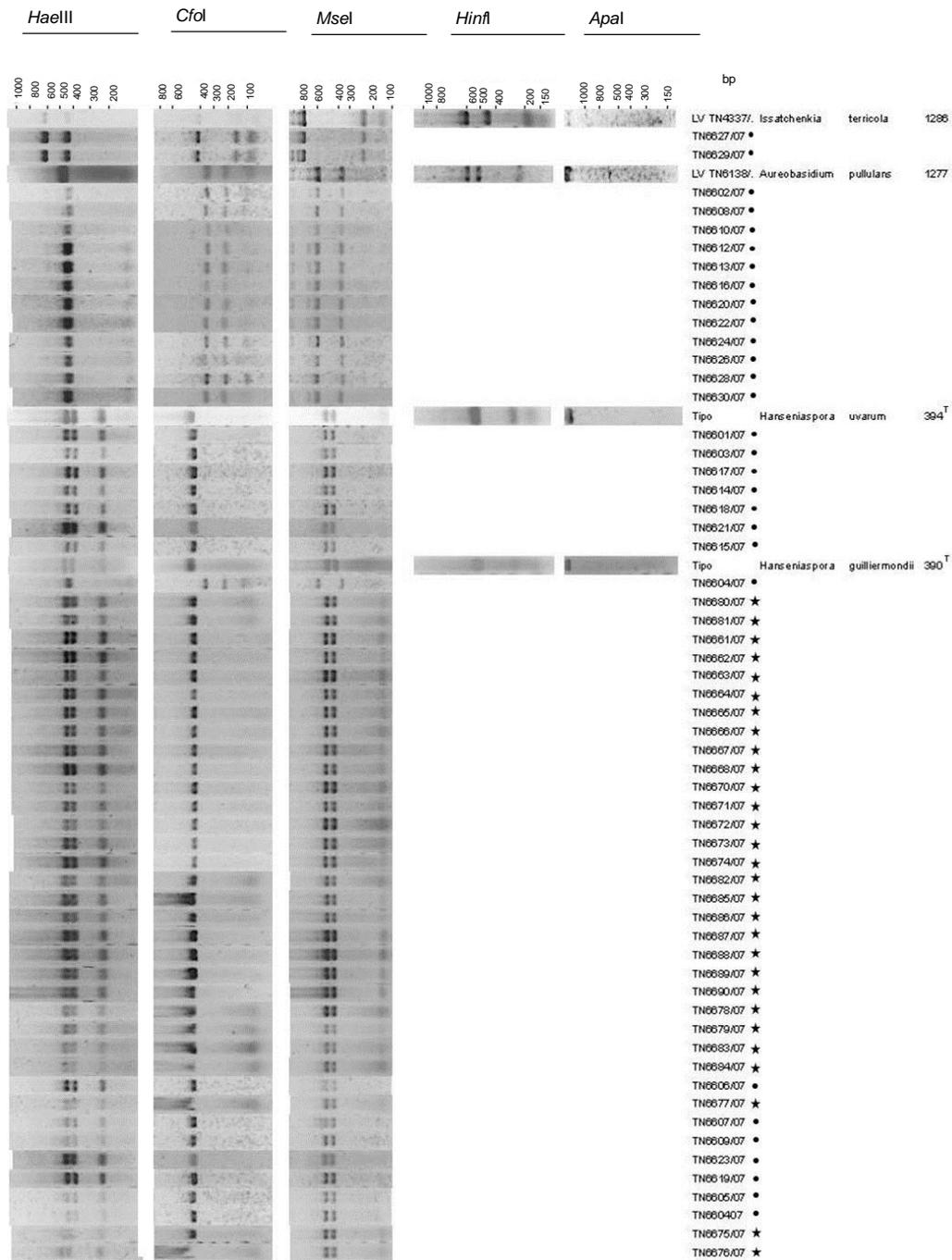


Figura 3.12: Perfis de restrição obtidos para os isolados da amostra TN66 e comparação com as estirpes da coleção de microrganismos do INIA – Dois Portos. Isolados: ● - 0 h após esmagamento das uvas; ★ - Após perda de peso de 70 g/l; ^T - Estirpe tipo.

3.1.2. Diferenciação de *H. uvarum* / *H. guilliermondii*

Avaliados os perfis de restrição dos diferentes isolados observou-se que 287 isolados apresentaram perfis idênticos aos das espécies *H. uvarum* ou *H. guilliermondii*, de acordo com Zanol *et al.* (2010). Cadez *et al.* (2003) referem que estas duas espécies são distinguíveis por crescimento a temperaturas diferentes, uma vez que apenas a espécie *H. guilliermondii* cresce a 37 °C. Na figura 3.13 apresentam-se fotografias de réplicas de placas incubadas respectivamente a 25 °C e a 37 °C. Verificou-se que 167 isolados correspondiam à espécie *H. uvarum* (crescimento a 37 °C negativo) e 120 a *H. guilliermondii* (crescimento a 37 °C positivo).

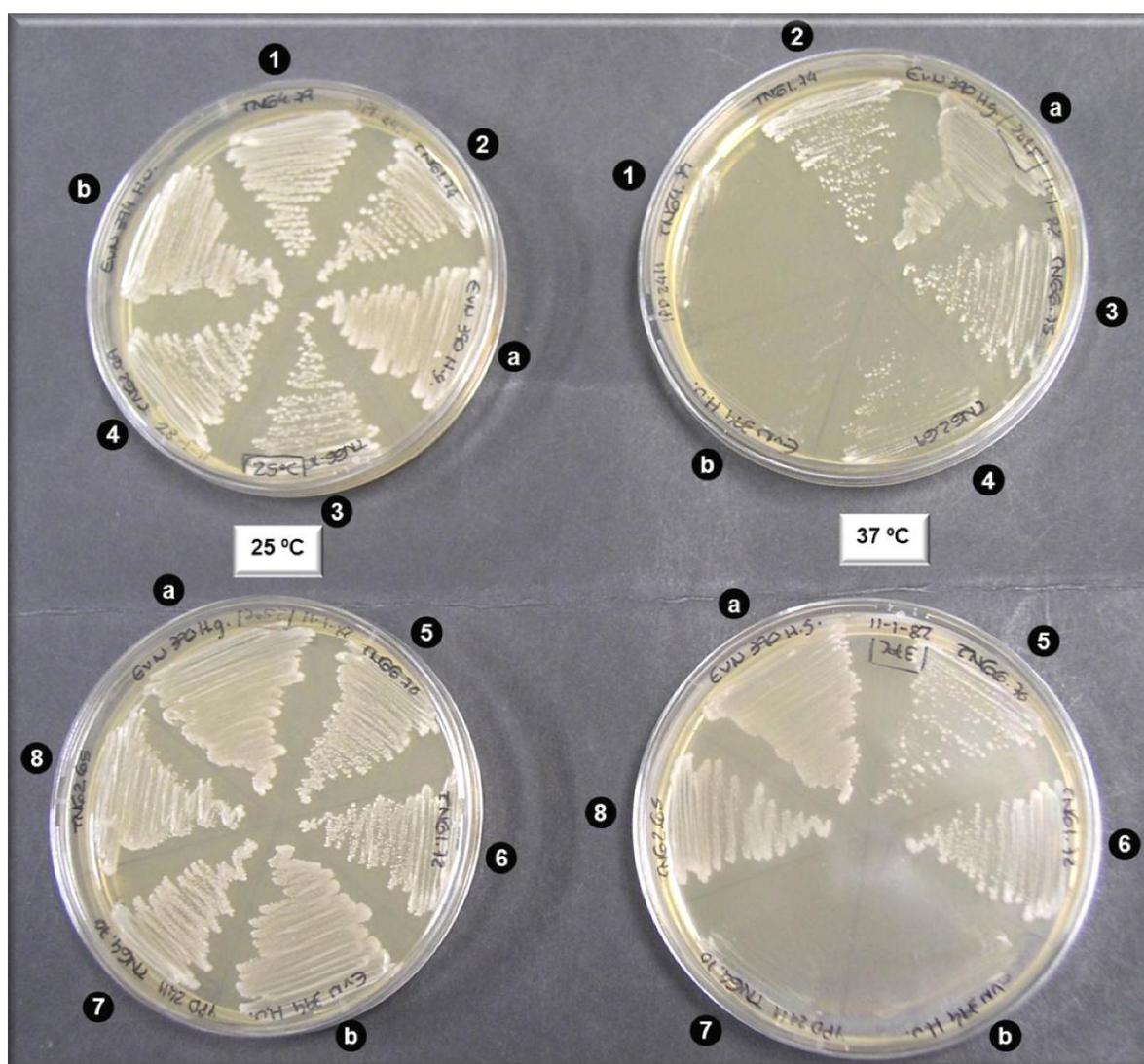


Figura 3.13: Fotografias de réplicas de placas incubadas a 25 °C (lado esquerdo) e 37 °C (lado direito). Os números correspondem aos isolados testados e as letras às espécies utilizadas como controlo (a – *H. guilliermondii*; b- *H. uvarum*).

Após a identificação destes isolados, foram sequenciados seis isolados da espécie *H. uvarum* e dois isolados de *H. guilliermondii* para confirmação da fiabilidade da identificação.

3.1.3. Sequenciação

Foi realizada a sequenciação de isolados que apresentaram baixa semelhança com as espécies de leveduras existentes na biblioteca de PRL e ainda para esclarecer e/ou confirmar alguns dos resultados obtidos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Resultados da comparação das sequências dos isolados, obtidos às 48 h e 70 g/l, com as sequências presentes em bases de dados internacionais, utilizando o BLAST.

Amostragem	Isolados	Tamanho fragmento (bp)	Estirpe tipo mais semelhante (nº de acesso)	Semelhança (%)
48 h	TN11.57 ^a	579	<i>Candida oleophila</i> (U45793.1)	99,4
	TN21.44 ^a	584	<i>Candida railenensis</i> (U45800.1)	99,4
	TN22.59 ^a	568	<i>Pichia kluyveri</i> var <i>kluyveri</i> (U75727.1)	99,4
	TN23.57 ^a	573	<i>Candida californica</i> (EF550230.1)	100,0
	TN62.60 ^b	509	<i>Rhodospodium babjevae</i> (AF070420.1)	99,0
70 g/l	TN11.71 ^a	473	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i> (U72162.1)	99,3
	TN11.73 ^a	378	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i> (U72162.1)	99,7
	TN11.77 ^b	528	<i>Candida diversa</i> (U71064.1)	100,0
	TN11.86 ^a	523	<i>Candida diversa</i> (U71064.1)	99,6
	TN11.79 ^a	528	<i>Candida diversa</i> (U71064.1)	100,0
	TN12.63 ^a	341	<i>Pichia mandshurica</i> (AB041002.1)	99,7
	TN12.72 ^b	542	<i>Issatchenkia terricola</i> (U76345)	99,8
	TN22.67 ^a	450	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (U84229.1)	99,1
	TN22.71 ^a	427	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (U72161.1)	99,5
	TN22.74 ^a	547	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (U84229.1)	100,0
	TN22.78 ^a	544	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> (AJ512453.1)	99,6
	TN22.79 ^b	561	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (U84229.1)	99,8
	TN23.76 ^a	468	<i>Candida zemplinina</i> (AY160761.1)	100,0
	TN23.79 ^a	470	<i>Candida zemplinina</i> (AY160761.1)	100,0
	TN61.72 ^b	558	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> (U84230.1)	100,0
	TN64.69 ^a	520	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (U84229.1)	100,0
	TN64.81 ^a	353	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (U84229.1)	99,1
TN65.70 ^a	563	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (U84229.1)	100,0	
TN66.80 ^b	553	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> (U84230.1)	100,0	

^a – Sequência obtida apenas com a cadeia inversa; ^b – Sequência *consensus*.

A sequência do isolado TN11.57 apresentou maior semelhança com a sequência da estirpe tipo de *C. oleophila*, enquanto que a sequência do isolado TN21.44 foi mais semelhante com a sequência da estirpe tipo de *C. railenensis*. Taxonomicamente estas duas espécies já foram relatadas como sendo do mesmo grupo filogenético, mas em trabalhos de reassociação de DNA foi verificado que as espécies *C. railenensis* e *C. oleophila* não eram conspecíficas (Meyer *et al.*, 1998). Estas espécies diferem na sequência das bases da região D1/D2 em 0,9 % quando comparadas as sequências das estirpes tipo. A espécie *C. oleophila* (CBS 2219) foi originalmente encontrada em azeitonas, no entanto ao longo dos anos tem sido relatada também em vinhos (van Keulen *et al.*, 2003). Esta espécie foi também estudada e registada para uso comercial como um agente de biocontrolo em uvas, uma vez que possui uma forte actividade antifúngica (Droby *et al.*, 1998 *Cit. in*, Fleet, 2003). Já a espécie *C. railenensis* tem sido isolada de troncos podres designadamente de *Nothofagus dombeyii* (Meyer *et al.*, 1998). Esta espécie também já foi relatada em vinhas situadas no arquipélago dos Açores, sendo encontrada em variedades de videira híbridas tanto em vinhas tratadas como abandonadas (Drumonde-Neves *et al.*, 2010).

Os restantes isolados que apresentaram perfis de restrição idênticos podem assim pertencer a qualquer uma destas espécies sendo quantificadas como *C. oleophila*/*C. railenensis*. À semelhança do teste de temperatura de crescimento utilizado para diferenciar *H. guilliermondii* e *H. uvarum* terá que ser pesquisado a existência de um teste rápido para diferenciar estas duas espécies.

O isolado TN23.57 apresentou 100,0 % de semelhança com a estirpe tipo da espécie *C. californica*. Durante muito tempo esta espécie foi classificada como sinónimo da espécie *P. membranifaciens* (Kurtzman, 1998), no entanto, posteriormente foi considerada como uma nova espécie (Wu *et al.*, 2006). Os perfis de restrição obtidos no presente trabalho permitiram a distinção clara das duas espécies.

O isolado TN62.60 também foi identificado por sequenciação, uma vez que os seus perfis de restrição não correspondiam com os PRL da biblioteca, sendo identificado como *Rhodospidium babjevae*. Esta espécie é frequentemente encontrada em plantas herbáceas mas também é encontrada em uvas maduras (Fell e Statzell-Tallman, 1998; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004).

O isolado TN22.78 apresentou um perfil idêntico ao das espécies *H. uvarum* e *H. guilliermondii* à excepção do obtido com a enzima *Msel*, a qual não digeriu o produto da PCR. Ainda assim foi realizado o teste de crescimento a 37 °C onde se constatou crescimento a esta temperatura e foi um dos isolados seleccionados para a confirmação da identificação por sequenciação. Observou-se que a sequência do isolado foi 99,6 % semelhante à sequência da estirpe tipo de *Hanseniaspora opuntiae*. Segundo Cadez *et al.* (2003) esta espécie apenas se distingue de *H. uvarum* e *H. guilliermondii* por sequenciação, no entanto uma alternativa, sem recorrer à sequenciação, poderá passar por análise dos perfis de restrição da região compreendida do ITS 1 e 2 e 5,8S utilizando uma enzima adicional designada por *MbolI* que separa *H. opuntiae* de *H. guilliermondii*.

Os isolados TN11.71 e 73 foram identificados como *Z. bisporus*, obtendo uma semelhança muito elevada de 99,3 % e 99,7 % respectivamente. A presença das leveduras desta espécie nas uvas está associada à maturação das mesmas mas também a uvas danificadas. Também o isolado TN22.71 apresentou semelhança elevada de 99,5 % com a espécie *Z. bailii*. Esta espécie está associada à podridão ácida, no entanto, tem resistência para sobreviver até ao final da fermentação. Também é conhecida por ser uma levedura de alteração do vinho, pelo que a sua persistência ao longo da fermentação não é desejável (Fleet, 2003; Barata *et al.*, 2008).

Os isolados TN11.77, 79 e 86 foram identificados como *C. diversa*. Apesar do isolado TN11.86 apresentar um perfil diferente dos restantes isolados (TN11.77 e 79) apresentou uma semelhança de 99,6 % com *C. diversa*. Esta espécie é frequentemente isolada em mosto de uvas e a sua presença ao longo da fermentação tem também sido detectada (Meyer *et al.*, 1998; Baleiras-Couto *et al.*, 2005; Hierro *et al.*, 2006).

O isolado TN12.63 foi identificado como *P. mandshurica* apresentando uma percentagem elevada de semelhança com a estirpe tipo de *P. mandshurica*. Apesar de esta espécie ter uma fraca capacidade fermentativa tem sido detectada nos vinhos mas sobretudo pela sua capacidade de alteração (Kurtzman, 1998; Saez *et al.*, 2011).

Seis isolados foram confirmandos como *H. uvarum* e dois como *H. guilliermondii*. Apesar de estas espécies não se distinguirem por perfis de restrição, apresentam diferenças significativas quando comparadas as sequências das estirpes tipo (diferença de 1,0 %). Os resultados da sequenciação destes isolados vieram também confirmar a fiabilidade do teste de crescimento a 37 °C testado para os isolados identificados como *H. uvarum* ou *H. guilliermondii*. Estas duas leveduras são encontradas predominantemente nas uvas e nas fases iniciais da fermentação alcoólica, mas com o decorrer da fermentação a sua presença não é detectada (Smith, 1998;).

Os isolados TN23.76 e 79 apresentaram uma semelhança de 100,0 % com a espécie *C. zemplinina*. Já o isolado TN12.72 foi identificado como *I. terricola*, observando-se uma boa correspondência entre os perfis de restrição e os resultados de sequenciação obtidos.

3.1.4. Diversidade de leveduras

A diversidade de leveduras identificadas nos três tempos de amostragem variou consoante a região de onde foram isoladas, tendo sido encontrado um total de 22 espécies de 10 géneros. Para simplificação, os isolados das amostras obtidas após perda de peso do mosto de 70 g/l vão designar-se por “70 g/l”. São ainda apresentadas curvas de rarefacção dos isolados das amostras das 48 horas para a vinha de Dois Portos e Palhacana e isolados das 0 e 48 horas para a vinha de Montemor-o-Novo.

Na vinha de Dois Portos foram identificadas 10 espécies (Tabela 3.2). Verificou-se uma diversidade maior nos isolados obtidos 48 horas após o esmagamento das uvas, com predominância da espécie *H. uvarum*. O domínio desta espécie nas etapas iniciais da fermentação vem confirmar o que vem descrito na literatura, uma vez que geralmente os géneros *Hanseniaspora*, *Candida* e *Metschnikowia* são os que iniciam a fermentação e são em grande parte provenientes apenas das uvas (Fleet, 2003). Observou-se igualmente que algumas espécies, apenas foram detectadas neste tempo de amostragem como foi o caso de *H. guilliermondii*, *M. pulcherrima*, *Zygoascus hellenicus* e *C. oleophila*.

De acordo com a curva de rarefacção obtida para a totalidade de espécies (48 horas) da vinha de Dois Portos observou-se uma tendência para a estabilização (Figura 3.14). O valor do índice de biodiversidade de Shannon-Weaver (D) foi de 1,43.

Na amostragem das 70 g/l a espécie *C. zemplinina* foi a que predominou. Espécies como *P. mandshurica* e *Z. bisporus* foram somente detectadas neste tempo de amostragem. Apesar de *P. mandshurica* ter fraca capacidade fermentativa, algumas estirpes conseguem desenvolver-se ao

longo da fermentação, pois algumas células permanecem presentes em quantidades reduzidas e viáveis, sendo detectáveis ao longo da fermentação (Kurtzman, 1998; Saez *et al.*, 2011). Já a espécie *Z. bisporus* está presente ao longo da fermentação, possuindo uma elevada tolerância ao etanol, assim como um poder fermentativo elevado, embora seja considerada como uma espécie de alteração do vinho (Fleet, 2008). No entanto diferentes estudos já confirmaram que a maioria das leveduras pertencentes a este género produz enzimas envolvidas na libertação de compostos aromáticos dos precursores não aromáticos provenientes das uvas, aumentando assim o aroma e sabor do vinho (Domizio *et al.*, 2011).

As espécies *I. terricola* e *C. zemplinina* foram encontradas em ambos os tempos de amostragem. Esta sucessão microbiana nos diferentes tempos revela a evolução natural da fermentação alcoólica como descrito na literatura. Sabe-se que leveduras do género *Candida* são encontradas frequentemente em elevados números até ao final da fermentação pelo facto de serem tolerantes ao etanol e pela sua capacidade fermentativa elevada. (Jolly *et al.*, 2006). Por exemplo a espécie *C. stellata*, (ou muito provavelmente *C. zemplinina*, de acordo com Sipiczki, 2004) pode tolerar aproximadamente 12 % do etanol, o que explica a sua presença ao longo do processo fermentativo (Baleiras-Couto *et al.*, 2005; Combina *et al.*, 2005).

Tabela 3.2: Diversidade de leveduras detectadas na vinha de Dois Portos.

Tempo de amostragem	48 h		70 g/l	
	11	12	11	12
<i>H. guilliermondii</i>	2	0	0	0
<i>H. uvarum</i>	10	17	0	1
<i>I. terricola</i>	10	6	1	1
<i>C. zemplinina</i>	6	3	20	23
<i>M. pulcherrima</i>	0	4	0	0
<i>Zygoascus hellenicus</i>	1	0	0	0
<i>C. oleophila</i>	1	0	0	0
<i>Z. bisporus</i>	0	0	3	0
<i>C. diversa</i>	0	0	6	0
<i>P. mandshurica</i>	0	0	0	3
Total de espécies	6	4	4	4

Para a vinha de Palhacana a diversidade de espécies detectada foi maior, com um total de 17 espécies diferentes (Tabela 3.3), mas o número de amostras também foi superior comparativamente com a vinha anterior. De facto o índice de biodiversidade de Shannon-Weaver foi de 1,30. Quando comparado com a amostra anterior a biodiversidade foi inferior. A tendência para a estabilização da curva de rarefacção não é tão evidente pelo que seria conveniente a análise de um maior número de amostras. Tal como na região anterior verificou-se que a diversidade de leveduras foi maior para os isolados das 48 horas após o esmagamento das uvas e com predominância também da espécie *H. uvarum*. Esta espécie também foi detectada quando existiu um consumo de 2/3 do açúcar do mosto (amostragem das 70 g/l), embora em números

mais baixos. Nesta amostra a espécie *C. zemplinina* foi a que predominou, à excepção de uma das amostras em que a espécie *Z. bailii* prevaleceu. Esta espécie tal como a espécie *Z. bisporus* também tem sido detectada ao longo da fermentação, no entanto também é considerada uma levedura de alteração do vinho (Fleet, 2003; Jolly *et al.*, 2006). Para além disso, diversos estudos têm demonstrado que esta espécie está associada à podridão ácida conseguindo sobreviver ao longo da fermentação com *S. cerevisiae* (Baleiras-Couto *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2008; Domizio *et al.*, 2010).

As espécies *I. terricola* e *Zygoascus hellenicus* foram as únicas encontradas em ambos os tempos de amostragem. Por outro lado espécies como *M. pulcherrima*, *P. membranifaciens*, *C. oleophila*, *C. railenensis*, *P. kluyveri var kluyveri*, *P. mandshurica*, *I. occidentalis* e *A. pullulans* foram identificadas apenas na amostra das 48 horas. Também se constatou que as espécies *H. guilliermondii*, *C. zemplinina*, *H. opuntiae*, *I. orientalis*, *Z. bisporus* e *Z. bailii*, só foram detectadas quando o mosto perdeu 70 g/l de peso.

Tabela 3.3: Diversidade de leveduras detectadas na vinha de Palhacana.

Tempo de amostragem	48 h			70 g/l			
	Número da amostra	21	22	23	21	22	23
<i>H. guilliermondii</i>		0	0	0	1	1	0
<i>H. uvarum</i>		19	20	21	4	8	0
<i>I. terricola</i>		2	4	1	0	4	1
<i>C. zemplinina</i>		0	0	0	17	0	28
<i>M. pulcherrima</i>		3	0	0	0	0	0
<i>P. membranifaciens</i>		0	1	1	0	0	0
<i>Zygoascus hellenicus</i>		2	0	0	3	0	0
<i>C. oleophila</i>		0	0	0	0	0	0
<i>C. railenensis</i>		1	0	0	0	0	0
<i>P. kluyveri var kluyveri</i>		0	3	0	0	0	0
<i>H. opuntiae</i>		0	0	0	0	1	0
<i>P. mandshurica</i>		0	1	0	0	0	0
<i>I. occidentalis</i>		0	1	0	0	0	0
<i>I. orientalis</i>		0	0	0	0	1	0
<i>Z. bisporus</i>		0	0	0	1	0	0
<i>Z. bailii</i>		0	0	0	0	11	0
<i>A. pullulans</i>		0	0	2	0	0	0
<i>C. railenensis/C. oleophila</i>		3	-	1	-	-	-
<i>C. californica</i>		0	0	1	0	0	0
Total de espécies		6	6	6	5	6	2

Observou-se que para as amostras das 48 horas foi detectada uma maior diversidade, enquanto que na amostragem das 70 g/l há uma maior dominância, pois a grande maioria dos isolados pertence apenas a uma espécie.

Foram isoladas leveduras nos três tempos de amostragem como já foi referido anteriormente, tendo o tempo inicial, 0 horas, apenas sido analisado para os isolados da vinha de Montemor-o-Novo. O valor do índice de biodiversidade de Shannon-Weaver foi de 0,56 para os isolados das amostras das 0 horas, valor bastante inferior ao observado para a biodiversidade nas vinhas de Dois Portos e de Palhacana. Relativamente à curva de rarefacção observou-se um declive a tender para a estabilização com valores baixos para o número estimado de espécies, $E(s)$. Devido à perda de viabilidade da maioria dos isolados das amostras das 48 horas observou-se uma curva de rarefacção com uma subida muito acentuada reflectindo a insuficiência do número de isolados identificados. Deste modo não foi estimado o índice de biodiversidade de Shannon-Weaver.

A diversidade de leveduras para a vinha de Montemor-o-Novo foi inferior à encontrada nas restantes vinhas (Tabela 3.4 e Tabela 3.5). De referir que o teor em açúcar das amostras de uvas provenientes de Dois Portos variou entre 190-204 g/l, em Palhacana variou entre 209-219 g/l e em Montemor-o-Novo entre 173-213 g/l, sendo inferior a 200 g/l em três das amostras. Assim a diferente diversidade observada não é, neste caso, devida ao estado de maturação das uvas. Estes resultados poderão eventualmente ser explicados pelo microclima existente na região do Alentejo, por se tratar de um ambiente mais exposto, árido e seco em comparação com o clima da Estremadura que é mais húmido reflectindo-se na dimensão das populações microbianas presentes nas vinhas. Esta hipótese estaria de acordo com as observações verificadas por outros autores, que referem um impacto positivo de elevados níveis de humidade nas populações microbianas (Kinkel, 1997 *cit. in* Silva, 2003).

Para algumas amostras das 0 horas procedeu-se ao agrupamento de isolados com base na sua macromorfologia em meio sólido, tendo sido identificados por perfis de restrição apenas alguns elementos de cada grupo. Constatou-se uma boa correspondência entre a identidade dos isolados segundo a sua macromorfologia e os perfis de restrição obtidos, muito embora a diversidade de espécies identificadas tenha sido baixa.

Verificou-se que no início da fermentação, isto é às 0 e 48 horas, *A. pullulans* foi a espécie que predominou, no entanto com o decorrer da fermentação não foi detectada. Esta espécie é encontrada predominantemente quando os bagos de uva ainda não se encontram maduros mas com o decorrer da maturação a sua presença é minoritária (Fleet, 2003). Neste caso, a predominância de *A. pullulans* foi no tempo inicial da fermentação não sendo detectado a sua presença nos isolados das amostras das 70 g/l. Para além disso no tempo inicial da fermentação (0 horas) a biodiversidade de leveduras foi muito pequena, encontrando em menores números as espécies *H. guilliermondii*, *H.uvarum*, *I. terricola*, *Cryptococcus albidus*, *R. babjevae* e o género *Cryptococcus sp.*

De referir que nos isolados das 48 horas houve uma grande perda de viabilidade sendo muito reduzido o número de isolados identificados.

As espécies *H. uvarum* e *H. guilliermondii* foram as únicas detectadas após o consumo de cerca de 2/3 do açúcar do mosto, confirmando a sua presença não só no início da fermentação bem como ao longo do processo fermentativo.

Tabela 3.4: Diversidade de leveduras detectadas na vinha de Montemor-o-Novo na amostragem efectuada às 0 h.

Tempo de amostragem	0 h						
	Número da amostra	61	62	63	64	65	66
<i>H. guilliermondii</i>		0	0	0	1	0	8
<i>H. uvarum</i>		0	0	0	0	0	7
<i>A. pullulans</i>		25	23	27	18	24	13
<i>I. terricola</i>		0	0	0	0	0	2
<i>Cryptococcus albidus</i>		1	0	0	0	0	0
<i>Cryptococcus sp.</i>		0	0	0	0	1	0
Total de espécies		2	1	1	2	2	4

Tabela 3.5: Diversidade de leveduras detectadas na vinha de Montemor-o-Novo nas amostragens efectuadas às 48 h e após perda de peso de 70 g/l.

Tempo de amostragem	48 h		70 g/L					
	Número de amostra	61	62	61	62	64	65	66
<i>H. guilliermondii</i>		0	1	28	27	0	0	29
<i>H. uvarum</i>		0	2	2	1	23	30	0
<i>A. pullulans</i>		6	3	0	0	0	0	0
<i>R. babjevae</i>		0	1	0	0	0	0	0
<i>Hanseniaspora sp.</i>		-	-	-	1	-	-	-
Total de espécies		1	4	2	3	1	1	1

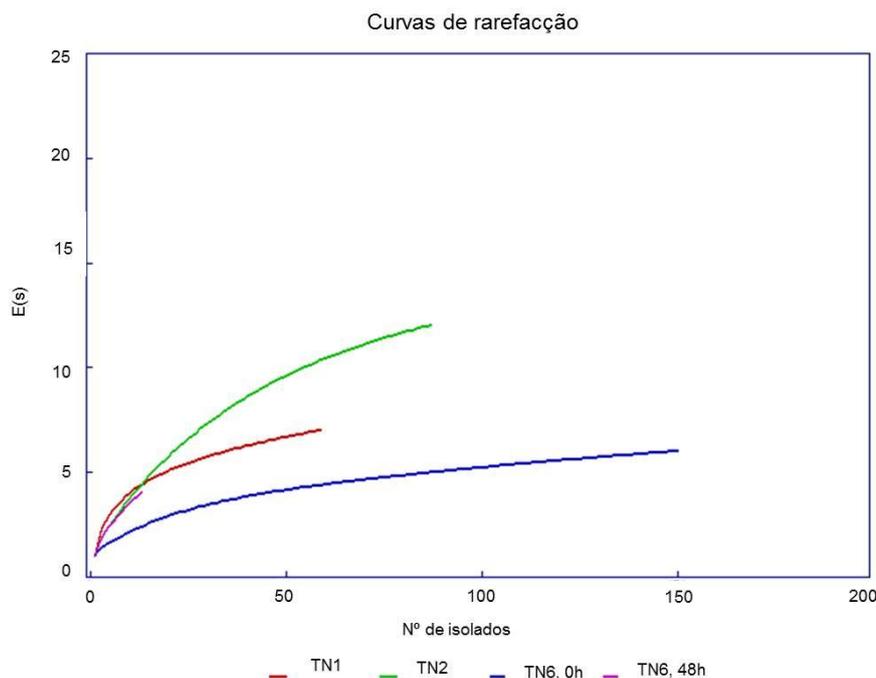


Figura 3.14: Curvas de rarefacção dos isolados das amostras das 48 h das vinhas de Dois Portos (TN1), Palhacana (TN2) e de Montemor-o-Novo (TN6, 0 h e TN6, 48h).

Vários factores estão implícitos na diversidade de leveduras encontradas nas uvas. Segundo Fleet *et al.*, (2003) há um “enigma” não resolvido na sucessão de determinadas espécies de leveduras como os géneros *Hanseniaspora/Kloeckera* e *Metschnikowia* que predominam nas uvas e no mosto e outras espécies como por exemplo *S. cerevisiae* que estão ausentes em determinadas circunstâncias. No presente estudo a espécie *S. cerevisiae* não foi encontrada para nenhuma das amostras. A ausência desta espécie pode estar relacionada com o facto de se ter colhidos cachos de uvas preferencialmente sãs. Van Zyl e Du Plessis (1961) verificaram que a distância das vinhas à adega, quando a fermentação está a decorrer, não possui praticamente influência na população das leveduras nas uvas. No entanto, em uvas danificadas, por pássaros, insectos, fungos ou outros agentes, aumentam a ocorrência de determinados microrganismos, especialmente em leveduras aeróbias. Para além disso detectaram a presença de *S. cerevisiae* em uvas danificadas. O mesmo também foi determinado quantitativamente no trabalho efectuado por Mortimer e Polsenilli (1999), verificando que a presença de *S. cerevisiae* é superior quando a película da uva é lesada.

3.2. Caracterização enológica

O objectivo da caracterização enológica foi de avaliar o efeito de isolados de espécies diferentes nos fermentados obtidos em cultura pura para alguns parâmetros químicos e características sensoriais que possam influenciar o aroma e sabor dos fermentados.

A selecção foi realizada entre os isolados obtidos quando o mosto perdeu cerca 70 g/l de peso, pois a probabilidade de se encontrar leveduras com características fermentativas mais adequadas para a produção de vinho será mais elevada. Um total de 23 isolados e uma levedura

seca activa (LSA) comercial que funcionou como referência foi avaliado, tendo sido cada uma das fermentações realizada em duplicado. Dois dos isolados inicialmente seleccionados, TN12.63 e TN12.81, identificados posteriormente como a mesma espécie, *P. mandshurica*, (TN12.63 e TN12.81) não foram caracterizados e fermentados, pelo facto de ser uma espécie pouco fermentativa (Barnett *et al.*, 1999).

3.2.1. Perfil de fermentação dos isolados

As fermentações foram monitorizadas diariamente por medição indirecta da produção de CO₂, a qual corresponde maioritariamente à perda de peso dos frascos das fermentações.

De seguida apresentam-se os perfis de fermentação de cada um dos isolados ensaiados em duplicado, assim como o perfil de fermentação das amostras iniciais realizadas em 2007 de fermentação das uvas de TN (Anexo II).

A LSA foi adicionada ao mosto de acordo com as indicações do fabricante, de modo a obter uma concentração celular inicial de 10⁶ cel/ml. Esta levedura apresentou um perfil de fermentação com rápida perda de peso atingindo as 70 g/l ao fim de 5 dias de fermentação. As cinco réplicas apresentaram um perfil muito idêntico e atingiram todas aproximadamente 140 g/l de perda de peso e a fermentação terminada entre os 15 e os 30 dias (Figura 3.15).

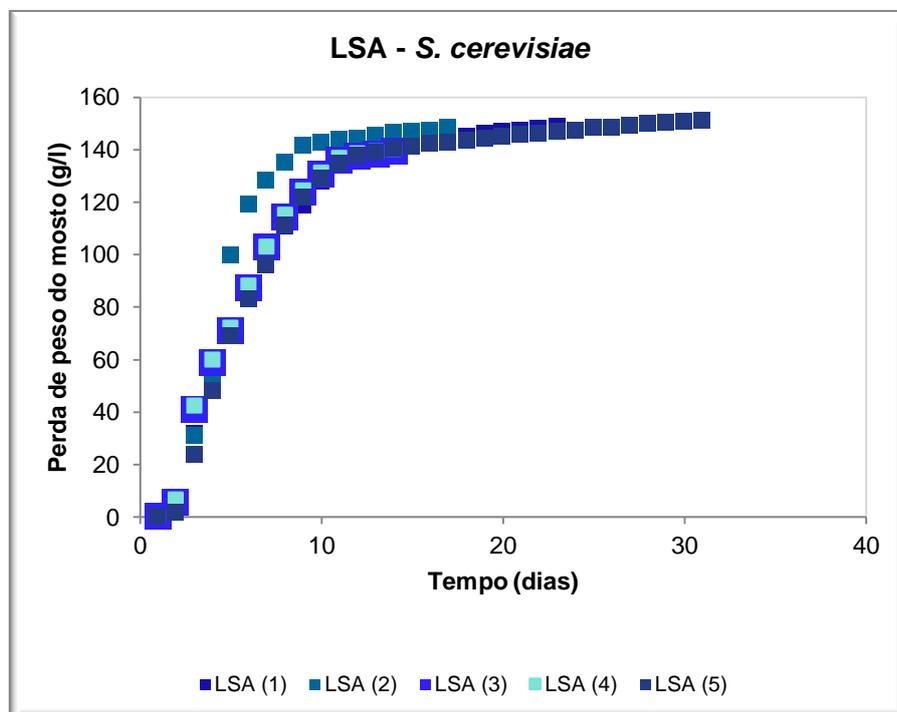


Figura 3.15: Perfil das fermentações da LSA comercial e respectivas réplicas (■).

Da amostra TN11 da região de Dois Portos foram seleccionados 5 isolados para caracterização enológica em duplicado. Na figura 3.16 apresentam-se os perfis de fermentação respectivos bem como o perfil de fermentação da amostra original, TN11/07.

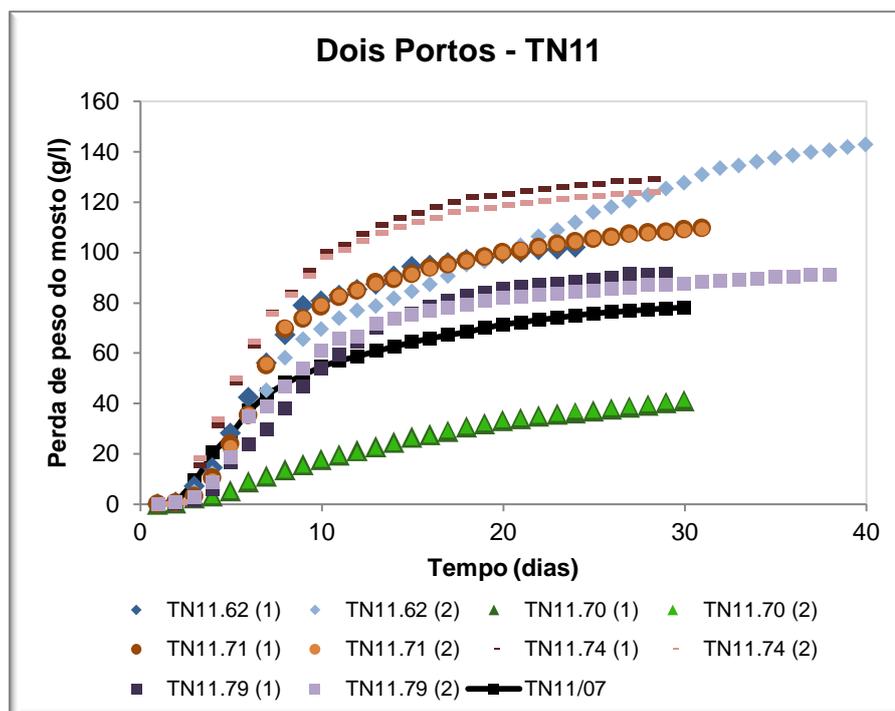


Figura 3.16: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN11 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN11.62 – *Z. bisporus* (◆); TN11.70 – *I. terricola* (▲); TN11.71 – *Z. bisporus* (●); TN11.74 – *C. zemplinina*(+); TN11.79 – *C. diversa* (■); TN11/07 – Amostra de uvas original (2007) (-■-).

Verificou-se que o isolado TN11.70 da espécie *I. terricola* não conseguiu chegar às 70 g/l de perda de CO₂, atingindo sensivelmente 45 g/l, revelando uma fermentação muito lenta.

Com uma fermentação relativamente rápida, o isolado TN11.79 da espécie *C. diversa* atingiu uma perda de peso de cerca de 90 g/l.

O isolado TN11.74 da espécie *C. zemplinina* apresentou a maior perda de CO₂ assim como um perfil fermentativo muito rápido.

Foram fermentados dois isolados da espécie *Z. bisporus*, TN11.62 e TN11.71, uma vez que quando a selecção dos isolados para caracterização enológica foi realizada, a identificação era desconhecida. Observou-se para estes isolados uma perda de aproximadamente 100 g/l, assim como uma fermentação relativamente rápida. De referir que em um dos isolados desta espécie, TN11.62 (2), observou-se um perfil de fermentação diferente dos outros três fermentados. Verificou-se que para este fermentado, TN11.62 (2), o número de células por mililitro (cel/ml), quando avaliada a pureza da fermentação, aproximadamente às 30 g/l de perda de peso, apresentava um número de colónias superior e de aspecto macromorfológico diferente, suspeitando-se de uma contaminação.

Nos isolados TN11.70 (1) e (2), TN11.71 (2) e TN11.74 (2) foi também verificado a implantação da levedura no mosto, não sendo detectada qualquer contaminação.

A curva de fermentação da amostra inicial, TN11/07 apresentou uma perda de peso de cerca de 80 g/l em 30 dias de fermentação. De salientar que às 70 g/l de perda de peso a espécie *C.*

zemplinina é a que predomina, no entanto, a perda de peso máxima na amostra inicial foi muito menor do que a observada para *C. zemplinina*.

Relativamente à amostra TN12 (Figura 3.17) desta mesma região foram seleccionados 5 isolados em duplicado, excepto o isolado TN12.72 da espécie *I. terricola*, em que o frasco de um dos duplicados se partiu durante a fermentação.

O isolado TN12.68 da espécie *C. zemplinina* foi o que apresentou maior perda de CO₂ atingindo as 120 g/l de perda em menos de 30 dias, revelando uma rápida perda inicial de peso, sendo este resultado semelhante ao obtido para o isolado da espécie *C. zemplinina* da amostra anterior.

Em relação ao isolado TN12.72 identificado como *I. terricola*, não se observou uma grande perda de CO₂, assemelhando-se ao perfil de fermentação do isolado da mesma espécie da amostra anterior (TN11.70).

O isolado da espécie *H. uvarum*, TN12.76, apesar de ter tido uma velocidade de fermentação idêntica à de *C. zemplinina* até ao 5º dia de fermentação, a sua perda máxima de peso não ultrapassou as 80 g/l.

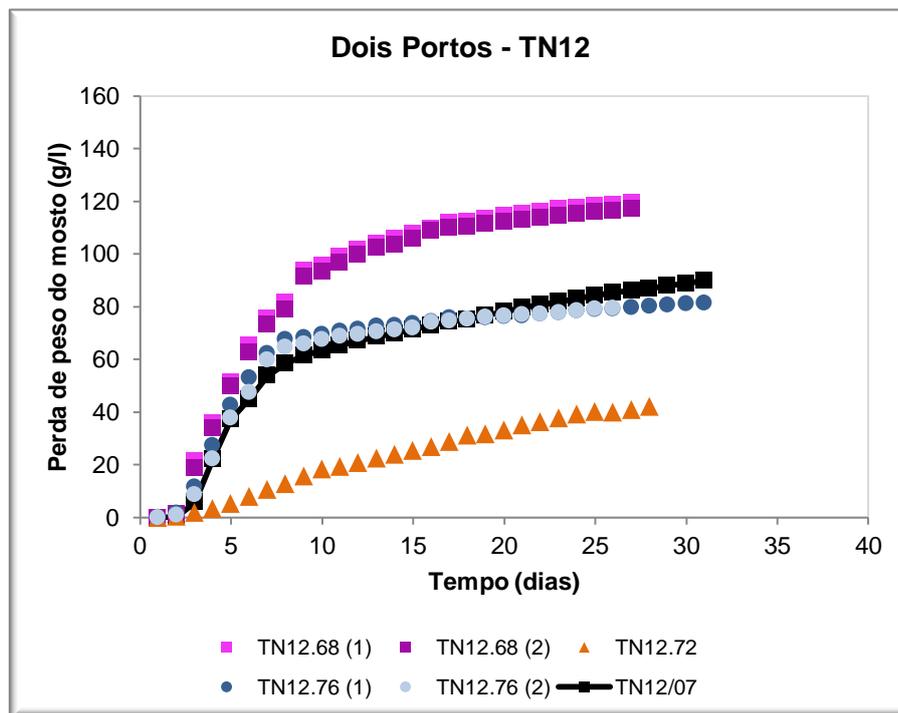


Figura 3.17: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN12 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN12.68 – *C. zemplinina* (■); TN12.72 – *I. terricola* (▲); TN12.76 – *H. uvarum* (●); TN12/07 – Amostra de uvas original (2007) (■).

Observou-se ainda que os perfis de fermentação foram muito semelhantes entre os respectivos duplicados.

Não foram detectadas colónias diferentes das dos isolados, TN12.68 (2) e 12.76 (2) adicionados, aquando da pesquisa da sua implantação após perda de peso de 30 g/l.

A amostra inicial, TN12/07 apresentou uma perda rápida de peso atingindo um máximo de cerca de 90 g/l.

Para a amostra TN21 foram estudados os isolados das espécies *H. uvarum* (TN21.61), *Zygoascus hellenicus* (TN21.70) e *C. zemplinina* (TN21.90) (Figura 3.18). Apesar de se ter identificado mais duas espécies diferentes nesta amostra, nomeadamente *H. guilliermondii* e *Z. bisporus*, não foi realizada a respectiva caracterização enológica porque quando foi realizada a selecção dos isolados a identificação destes ainda estava em curso.

Dos isolados seleccionados apenas o isolado da espécie *Zygoascus hellenicus* apresentou uma fermentação lenta perdendo cerca de 40 g/l de peso.

Quanto aos isolados TN21.61 da espécie *H. uvarum* apresentaram um perfil de fermentação rápido com uma perda de aproximadamente 80 g/l o que vem ao encontro com o perfil obtido para os isolados desta espécie.

Os perfis de fermentação dos isolados TN21.90 pertencentes à espécie *C. zemplinina* foram idênticos aos perfis de outras amostras desta espécie. Neste caso os perfis dos duplicados foram menos semelhantes do que observado para a maioria dos isolados desta espécie.

A implantação da levedura nas fermentações das massas vínicas de TN foi realizada para os isolados TN21.61 (2) e TN21.90 (2) não se observando qualquer contaminação.

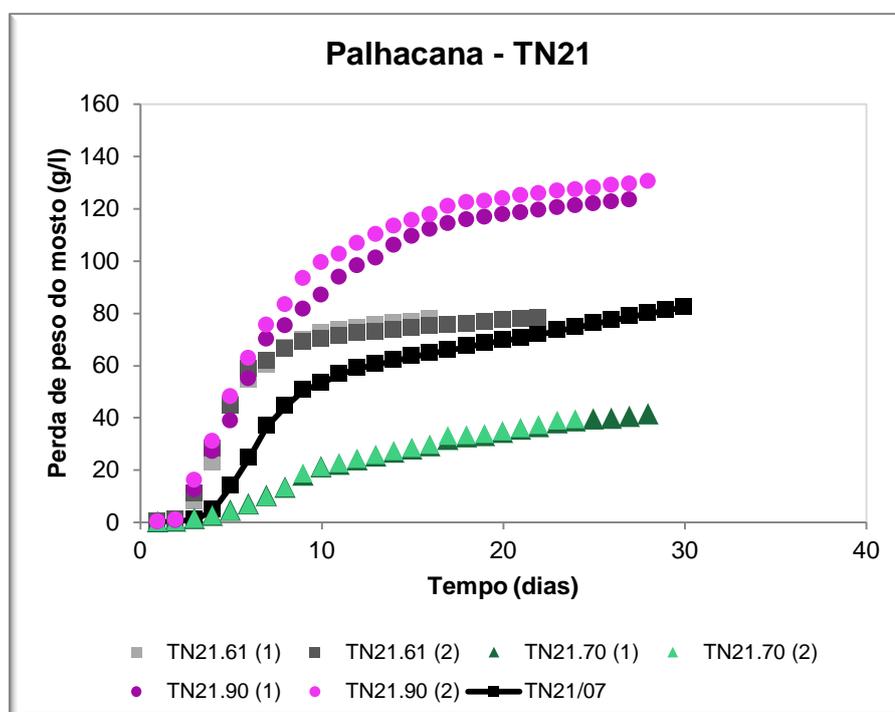


Figura 3.18: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN21 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN21.61 – *H. uvarum* (■); TN21.70 – *Zygoascus hellenicus* (▲); TN21.90 – *C. zemplinina* (●); TN21/07 – Amostra de uvas original (2007) (◼).

Em relação à amostra TN22 foi detectada maior diversidade de espécies e como tal foram seleccionados isolados de 5 espécies para caracterização enológica designadamente *I. orientalis* (TN22.64), *I. terricola* (TN22.70), *Z. bailii* (TN22.71), *H. opuntiae* (TN22.78) e *H. uvarum* (TN22.79), originando perfis muito diferentes dentro desta amostra (Figura 3.19). O isolado TN22.73 da espécie *H. guilliermondii* não foi seleccionado para fermentação, uma vez que a sua identificação não estava concluída aquando da selecção dos isolados.

Os isolados das espécies *I. terricola*, TN22.70, apresentaram maior velocidade de fermentação do que os anteriormente mencionados (TN11.70 e TN12.72) perdendo aproximadamente 80 g/l.

Mais uma vez o perfil de fermentação do isolado TN22.79 da espécie *H. uvarum* foi muito rápido e semelhante aos isolados desta espécie encontrados para as amostras anteriores.

Observou-se uma velocidade de fermentação elevada para o isolado da espécie *H. opuntiae*, TN22.78, e perda de peso de 90 g/l.

A maior perda de peso foi observada para os isolados TN22.71 e TN22.64 correspondentes às espécies *Z. bailii* e *I. orientalis* respectivamente. A perda de peso observada para ambos os isolados esteve compreendida entre 125-130 g/l.

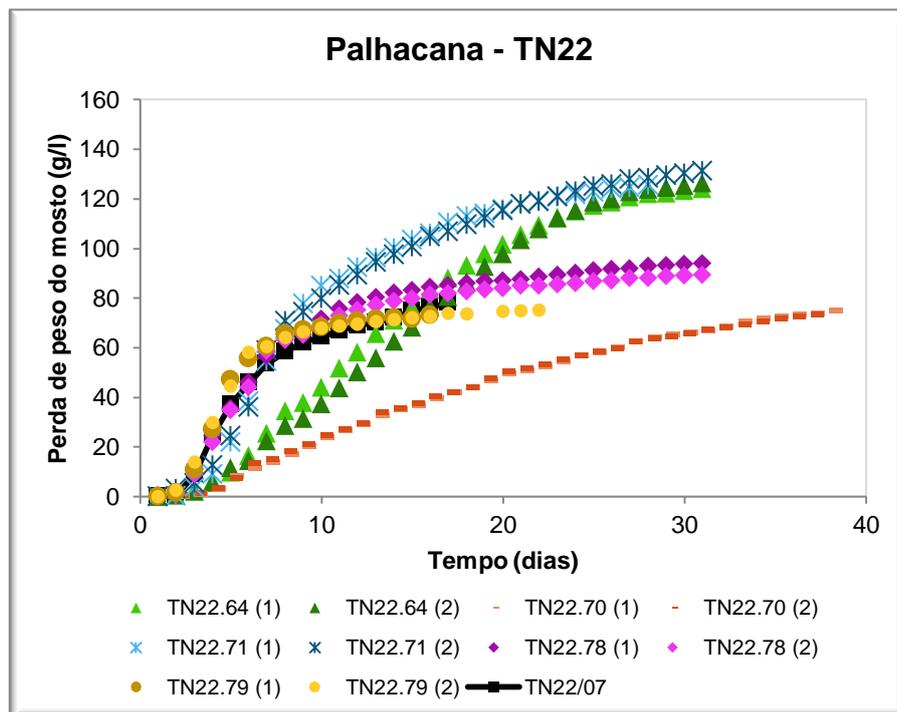


Figura 3.19: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN22 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN22.64 – *I. orientalis* (▲); TN22.70 – *I. terricola* (*); TN22.71 – *Z. bailii* (*); TN22.78 – *H. opuntiae* (◆); TN22.79 – *H. uvarum* (●); TN22/07 – Amostra de uvas original (2007) (■).

A implantação da levedura adicionada foi pesquisada para as fermentações dos isolados TN22.64 (2), 22.79 (1), 22.71 (1) e 22.78 (1) não sendo detectados contaminantes.

Na amostra TN23 foram seleccionadas duas espécies sendo as únicas identificadas nesta amostra nomeadamente o isolado da espécie *I. terricola*, TN23.68 e o isolado TN23.84 de *C. zemplinina* (Figura 3.20).

Um dos isolados da espécie *I. terricola* apresentou um perfil de fermentação que foi muito distinto dos observados anteriormente para esta espécie. Apesar de não se ter pesquisado a implantação da levedura adicionada na fermentação do isolado TN23.68 (1), tudo sugere que tenha ocorrido uma contaminação.

O isolado da espécie *C. zemplinina*, TN23.84, apresentou um perfil idêntico ao observado para os restantes desta espécie evidenciando-se a rápida fermentação e a perda de peso de cerca de 130 g/l. Realizou-se a verificação da pureza não se observando nenhuma contaminação.

Quanto à amostra original apresentou um perfil de fermentação com uma perda de aproximadamente 90 g/l, semelhante com o perfil de fermentação encontrado para a amostra inicial TN21 desta região.

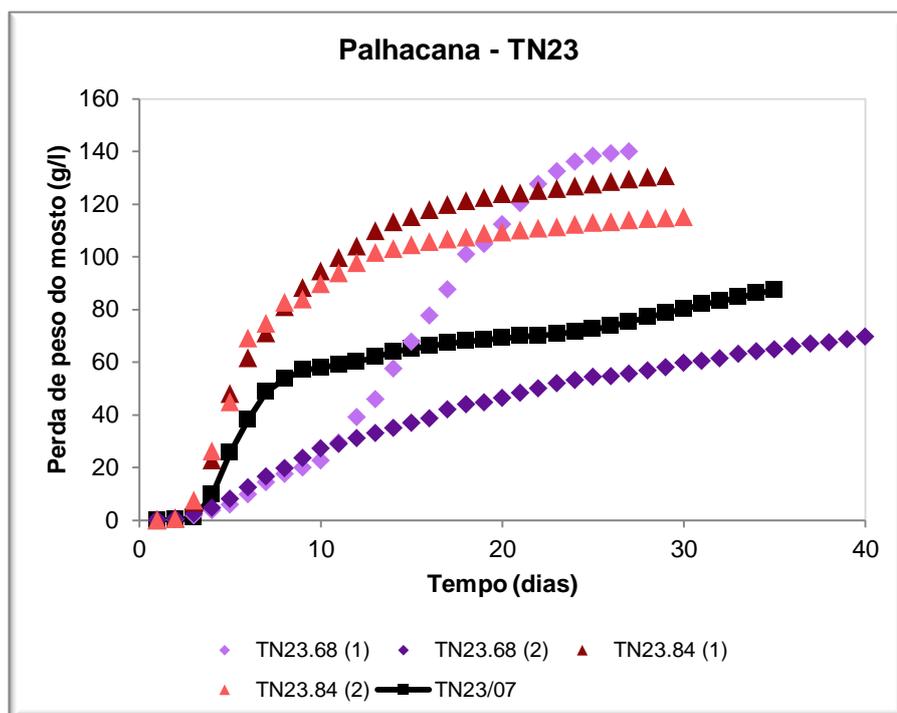


Figura 3.20: Perfil das fermentações dos isolados da amostra TN23 e respectivos duplicados (1) e (2). Isolados: TN23.68 – *I. terricola* (◆); TN23.84 – *C. zemplinina* (▲); TN23/07 – Amostra de uvas original (2007) (■).

A diversidade de leveduras encontrada na região de Montemor-o-Novo foi menor e como tal só foi seleccionado um isolado de cada uma das amostras, TN61, 62, 64, 65 e 66.

Da amostra TN61 foi seleccionado um isolado da espécie *H. guilliermondii*, TN61.72 (Figura 3.21). Apesar de se ter detectado dois isolados da espécie *H. uvarum*, a sua identificação foi concluída posteriormente ao ensaio das fermentações, pelo que não foi realizada a sua

caracterização enológica. A velocidade de fermentação alcançada por este isolado foi elevada, observando-se uma perda de peso de aproximadamente 90 g/l em cerca de 20 dias.

A amostra inicial demorou mais tempo a iniciar a perda de peso possivelmente pelo facto de no início ser detectada apenas a espécie *A. pullulans*.

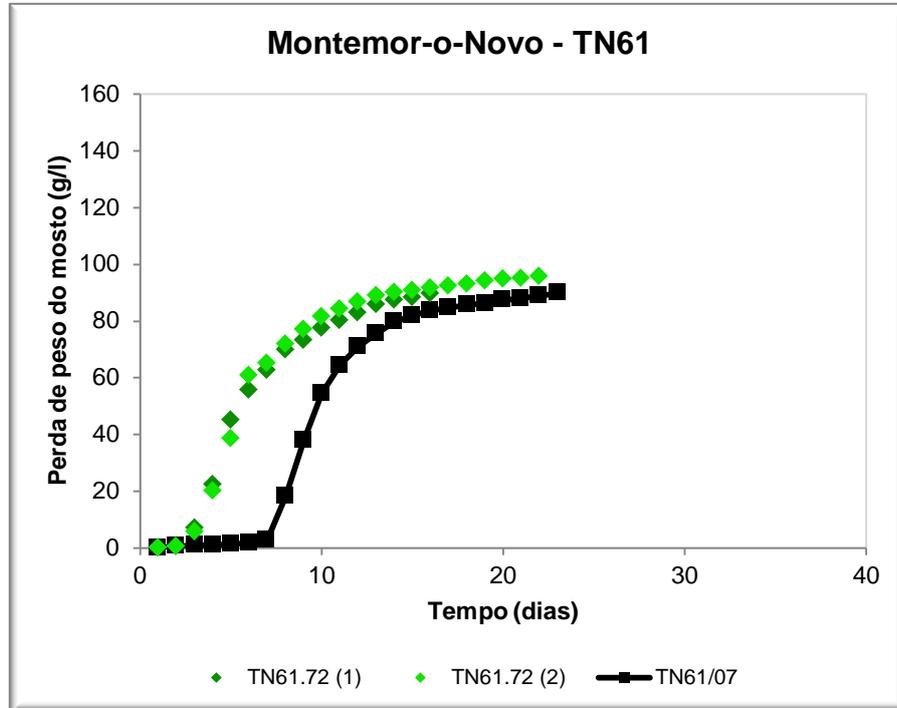


Figura 3.21: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN61. Isolado: TN61.72 – *H. guilliermondii* (◆); TN61/07 – Amostra de uvas original (2007) (■).

Em relação à amostra TN62, seleccionou-se o isolado TN62.75 da espécie *H. guilliermondii* (Figura 3.22). Tal como se verificou para a amostra anterior também um isolado da espécie *H. uvarum* foi encontrado, mas como foi identificado posteriormente não foi efectuada a respectiva caracterização.

O perfil de fermentação, como se pode observar pelo gráfico da Figura 3.22, é muito idêntico ao isolado da amostra anterior (TN61) observando-se uma rápida perda de peso inicial. A verificação da implantação nas massas vínicas foi efectuada para o fermentado TN62.75 (2), não se detectando contaminantes.

A amostra original, TN62/07, apresentou uma perda de peso inicial mais rápida que a amostra anterior TN61/07, eventualmente, por se ter detectado na amostra inicial leveduras fermentativas.

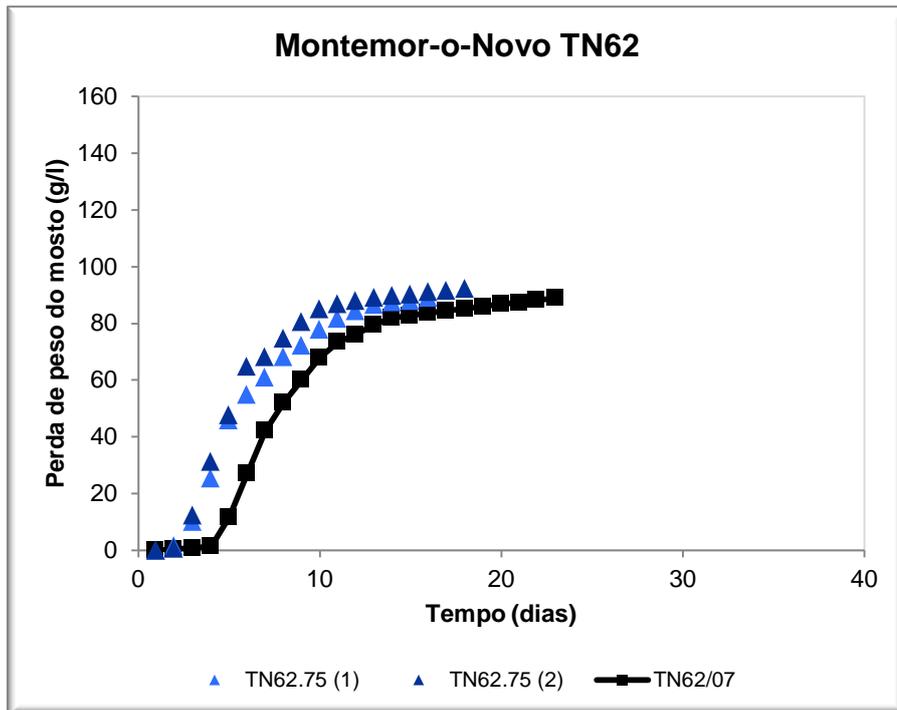


Figura 3.22: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN62. Isolado: TN62.75 – *H. guilliermondii* (▲); TN62/07 – Amostra de uvas original (2007) (■).

Para a amostra TN64, foi seleccionado um isolado, TN64.69, da espécie *H. uvarum* (Figura 3.23). O perfil de fermentação revelou-se muito idêntico aos isolados desta espécie encontrada nas amostras das vinhas de Dois Portos e Palhacana, com perda de peso relativamente rápida de aproximadamente 70 g/l de CO₂.

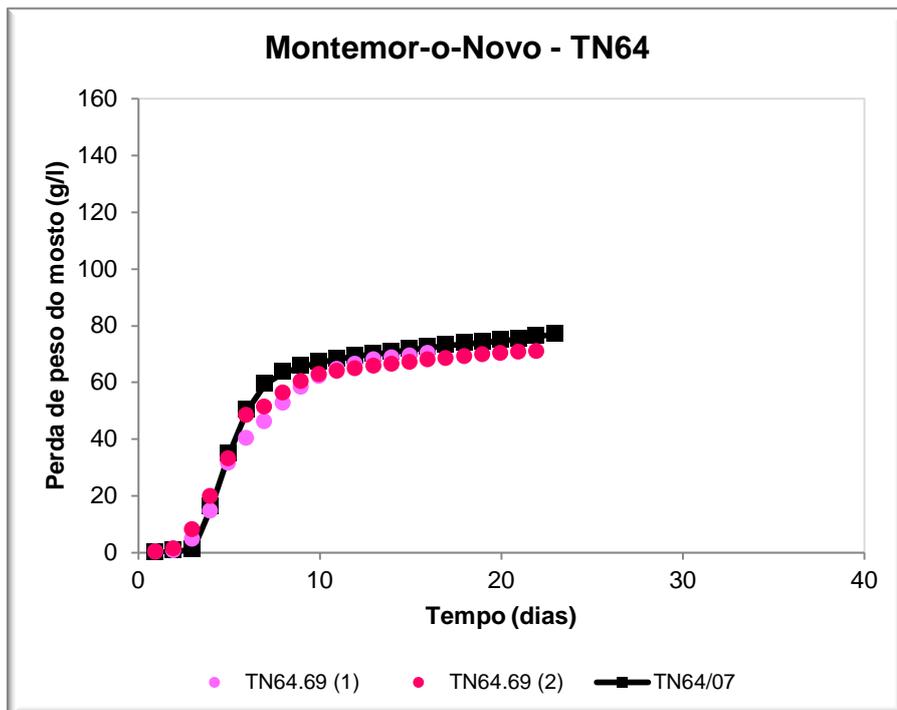


Figura 3.23: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN64. Isolado: TN64.69 – *H. uvarum* (●); TN64/07 – Amostra de uvas original (2007) (■).

Foi também avaliada a pureza da implantação do isolado TN64.69 (2) desta espécie, não se observando contaminação.

O perfil de fermentação da amostra inicial apresentou uma perda mais lenta mas com perda de peso próxima das 80 g/l.

Relativamente à amostra TN65 seleccionou-se apenas um isolado também da espécie *H. uvarum* (TN65.70) (Figura 3.24). Observou-se uma semelhança elevada com o perfil de fermentação dos restantes isolados desta espécie.

A amostra original foi mais lento a iniciar a perda de peso, no entanto, observou-se uma perda de aproximadamente 70 g/l de CO₂.

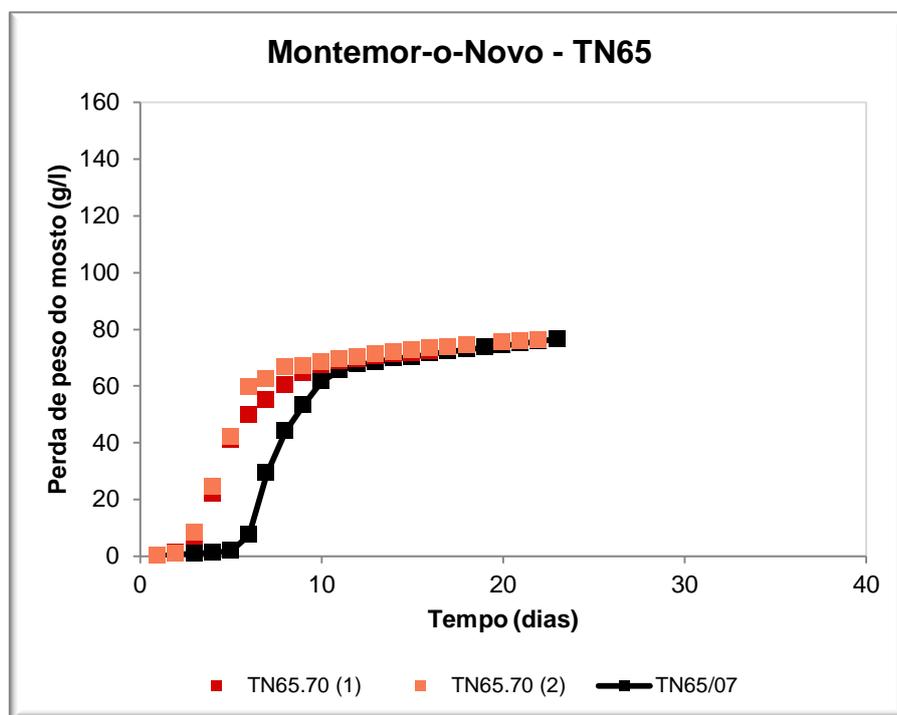


Figura 3.24: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN65. Isolado: TN65.70 – *H. uvarum* (■); TN65/07 – Amostra de uvas original (2007) (■-■).

Da amostra TN66, foi seleccionado apenas um isolado da espécie *H. guilliermondii* (TN66.80) (Figura 3.25). Este isolado apresentou uma perda de peso superior comparativamente aos isolados da mesma espécie encontrada nas amostras TN61 e TN62.

A pureza da implantação nas massas vnicas foi verificada para o isolado TN66.80 (2) não se detectando qualquer contaminação.

A amostra original demorou pouco tempo a iniciar a fermentação o que pode estar relacionado com a diversidade de leveduras fermentativas encontradas na amostra inicial.

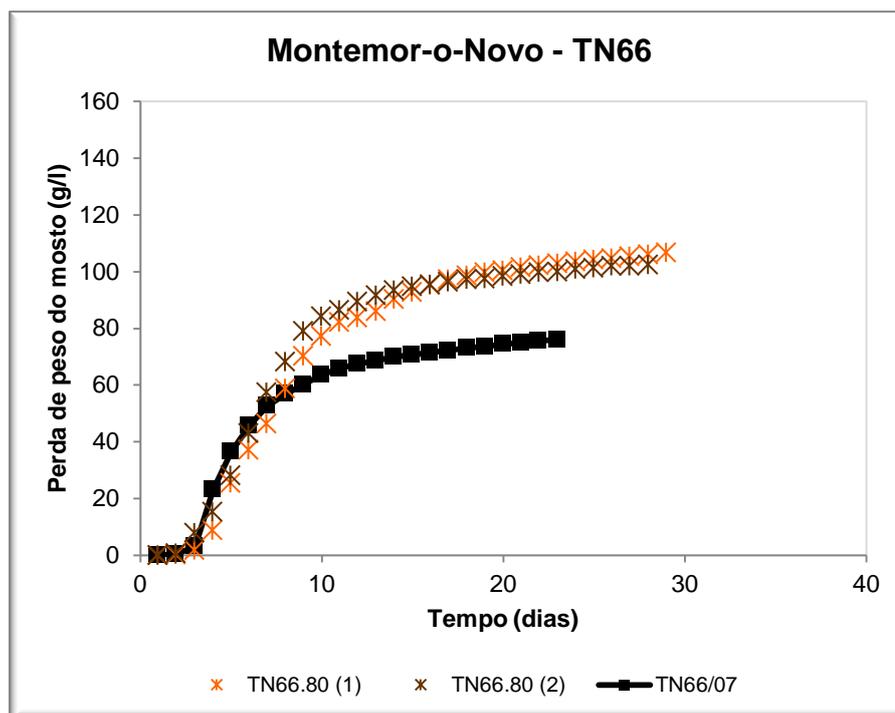


Figura 3.25: Perfil das fermentações do isolado e duplicado (1) e (2) da amostra TN66. Isolado: TN66.80 – *H. guilliermondii* (*); TN66/07 – Amostra de uvas original (2007) (■).

3.2.2. Formação de espuma

No decorrer da fermentação pode existir a formação de espuma devido à libertação de CO_2 . Esta pode ser influenciada pela própria levedura ou por substâncias do mosto, nomeadamente por mucilagens, gorduras e outras substâncias, que tornam as espumas e o véu mais ou menos mucilaginosos permitindo um maior ou menor desprendimento de CO_2 durante a fermentação (Marques Gomes *et al.*, 1962, San Romão *et al.*, 1982).

Apesar de não existirem referências da formação de espuma em mosto de uvas sabe-se que o seu controlo é importante, uma vez que, está associada a problemas tecnológicos durante o processo de vinificação, como o transbordo dos mostos do tanque de fermentação. Para evitar este problema os tanques são cheios até metade da sua capacidade, no entanto não é uma solução viável para quem produz vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Neste ensaio mediu-se a espuma formada durante a fermentação de cada um dos isolados nas massas vínicas de TN (*cf.* 2.2.4). Os resultados que se seguem dizem respeito ao valor máximo de espuma atingido por cada isolado durante a fermentação, utilizando como referência as fermentações realizadas com a LSA (Tabela 3.6). Os valores de espessura máxima de espuma formada pela LSA nas diferentes fermentações realizadas variaram entre 6 e 10 mm. Relativamente aos isolados em estudo, observou-se também alguma variabilidade na espessura da espuma entre os duplicados, bem como entre isolados da mesma espécie. Para estes, os valores obtidos foram semelhantes aos da LSA.

Tabela 3.6: Espessura máxima de espuma (mm) obtida para cada um dos fermentados obtidos pelos isolados de Dois Portos, Palhacana e Montemor-o-Novo.

Vinha	Dois Portos		Palhacana		Montemor-o-Novo	
	Isolados	Máx.	Isolados	Máx.	Isolados	Máx.
<i>C. diversa</i>	TN11.79 (1)	11				
	TN11.79 (2)	12				
<i>C. zemplinina</i>	TN11.74 (1)	9	TN21.90 (1)	8		
	TN11.74 (2)	8	TN21.90 (2)	10		
	TN12.68 (1)	12	TN23.84 (1)	11		
	TN12.68 (2)	9	TN23.84 (2)	4		
<i>H. guillermondii</i>					TN61.72 (1)	3
					TN61.72 (2)	6
					TN62.75 (1)	6
					TN62.75 (2)	5
					TN66.80 (1)	10
<i>H. uvarum</i>					TN66.80 (2)	12
	TN12.76 (1)	7	TN21.61 (2)	6	TN64.69 (1)	4
	TN12.76 (2)	9	TN22.79 (2)	8	TN64.69 (2)	10
					TN65.70 (1)	0
					TN65.70 (2)	7
<i>H. opuntiae</i>			TN22.78 (1)	6		
			TN22.78 (2)	11		
<i>I. orientalis</i>			TN22.64 (1)	12		
			TN22.64 (2)	12		
<i>I. terricola</i>	TN11.70 (1)	8	TN22.70 (1)	8		
	TN11.70 (2)	10	TN22.70 (2)	11		
	TN12.72 (2)	5	TN23.68 (2)	10		
<i>Z. bailii</i>			TN22.71 (1)	10		
			TN22.71 (2)	10		
<i>Zygoascus hellenicus</i>			TN21.70 (1)	6		
			TN21.70 (2)	10		
<i>Z. bisporus</i>	TN11.62 (1)	12				
	TN11.71 (1)	8				
	TN11.71 (2)	12				

3.2.3. Análise química dos fermentados de Touriga Nacional

Os fermentados foram analisados por FTIR, metodologias convencionais e por fluxo contínuo segmentado. Os resultados dos parâmetros avaliados por estas metodologias encontram-se no anexo IV. Estes resultados foram tratados estatisticamente tendo-se avaliado a influência do isolado e da espécie na composição química dos fermentados obtidos.

Todos os produtos fermentados foram analisados quimicamente à excepção do isolado TN23.68 (1) e TN11.62 (2) por possivelmente terem contaminado durante a fermentação.

3.2.3.1. Análise de variância

Os resultados da análise química foram tratados por análise de variância (ver 2.5.1), com o factor espécie como factor independente e os parâmetros químicos, como variáveis dependentes. Apresentam-se apenas os resultados obtidos para a influência da espécie para simplificar a sua análise e discussão dos resultados.

Na tabela 3.9 apresenta-se a síntese dos resultados da análise de variância, com os valores médios de cada um dos parâmetros assim como o seu nível de significância. Verificou-se que em todos os parâmetros existiu um efeito altamente significativo da espécie, à excepção da intensidade corante e do IPT que foram não significativos.

O fermentado obtido com a LSA, apresentou valores médios mais baixos para os açúcares redutores em relação aos restantes fermentados, mostrando que esta levedura teve a capacidade para metabolizar todo o açúcar presente no mosto, completando o processo fermentativo. Este facto também foi confirmado pelos valores médios baixos obtidos para os seus constituintes principais nomeadamente a glucose e frutose. Paralelamente esta levedura produziu teores de etanol mais elevados em comparação com os restantes fermentados, aproximando-se do grau provável estimado inicialmente para o mosto (*cf.* Anexo IV). O fermentado apresentou também teores mais reduzidos de glicerol, ácido láctico e valores intermédios para ácido málico. Relativamente à acidez total e acidez volátil apresentou valores intermédios. A espécie *S. cerevisiae* por norma produz níveis baixos de ácido acético se não existirem problemas ao longo da fermentação alcoólica (produção entre 0,1-03 g/l) (Jolly *et al.*, 2003, Ugliano e Henschke, 2009).

Quanto aos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *C. diversa*, estes apresentaram teores relativamente elevados para a acidez volátil, açúcares redutores, ácido málico, frutose e glicerol. Por outro lado os valores da acidez total, pH, ácido láctico foram intermédios. O teor elevado em açúcares redutores demonstrou que o isolado desta espécie não conseguiu fermentar todo o açúcar presente no mosto, o que se confirmou também pelos valores da glucose e frutose. Esta espécie tem sido encontrada ao longo da fermentação em vinhos e também em uvas afectadas pela podridão ácida (Barata *et al.*, 2008; Pais, 2010) e uvas botritizadas (Nisiotou *et al.*, 2007). No entanto pouco está descrito sobre as características químicas em fermentações vínicas.

Em relação aos isolados da espécie *C. zemplinina* produziram fermentados, com teores intermédios de acidez total e acidez volátil e valores mais elevados para o glicerol e teor alcoólico. Estão associados aos fermentados desta espécie valores médios mais baixos dos parâmetros pH, açúcares redutores. De acordo com os resultados obtidos estes fermentados apresentaram valores muito baixos para a frutose. Relativamente ao teor alcoólico verificou-se que este foi um dos fermentados com teores mais elevados, próximo do grau provável estimado a partir da análise do mosto inicial. Observou-se também pelos teores dos componentes principais do açúcar que os isolados da espécie *C. zemplinina* consumiram praticamente toda a frutose, havendo ainda alguma glucose por fermentar, o que poderá ser uma vantagem tecnológica, sendo que esta espécie é caracterizada pela sua frutofílica desde há muito conhecida (Magyar e Tóth, 2011). Os valores obtidos na análise química vêm ao encontro do que está descrito na literatura. Um outro caso é a produção de glicerol, sendo uma das espécies ao nível de leveduras não-*Saccharomyces*, que mais produz este composto (Ciani e Maccarelli, 1998; Ugliano e Henschke, 2009). Comparativamente com os isolados das outras espécies,

estes foram de facto os que concederam maiores teores deste composto aos fermentados. Esta levedura não-*Saccharomyces* está associada à produção de níveis moderados a elevados de ácido acético, o que se verificou com os valores obtidos para a acidez volátil, que estão dentro da gama de valores encontrados para a espécie *C. zemplinina*, nomeadamente de 0,6-1,3 g/l de ácido acético (Ugliano e Henschke, 2009). A presença desta levedura tem sido muito estudada e relatada ao longo da fermentação (Andorrà *et al.*, 2010; Magyar e Tóth, 2011).

Relativamente aos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *H. guilliermondii* apresentaram valores médios elevados para os parâmetros ácido málico e glucose. Por outro lado observou-se teores intermédios para a acidez total e volátil, pH, açúcares redutores, teor alcoólico e glicerol. Teores mais baixos foram obtidos para o ácido láctico e frutose em comparação com os das outras espécies. Verificou-se que em média os isolados desta espécie não conseguiram metabolizar todo o açúcar presente, o que também se deduz pelos valores de glucose e frutose ainda presentes nos fermentados. Os fermentados apresentaram um teor alcoólico intermédio, próximo do valor descrito na literatura, uma vez que esta espécie é caracterizada com uma produção de etanol de aproximadamente 9,6 % (v/v) (Ugliano e Henschke, 2009). Observou-se também uma acidez volátil superior ao que vem descrito na literatura para esta espécie de 0,53 g/l de ácido acético (Ugliano e Henschke, 2009).

Relativamente aos fermentados originados pelos isolados da espécie *H. uvarum* apresentaram valores médios mais elevados para os parâmetros açúcares redutores, glucose e glicerol. Teores mais reduzidos foram apenas detectados para o ácido láctico, acidez total e teor alcoólico. A presença de açúcar no fermentado reflectiu que os isolados desta espécie não conseguiram desdobrar todo o açúcar presente no mosto. Tal facto também se confirmou pelos seus componentes principais, a glucose e frutose onde se observaram valores elevados para ambos. De acordo com o descrito na literatura a espécie *H. uvarum* produz níveis de etanol entre 3-6,5 % (v/v), observando-se que o teor alcoólico obtido para os fermentados situou-se dentro deste intervalo, assim como a capacidade para produzir elevados teores de ácido acético (entre 0,2 – 2,5 g/l) (Ugliano e Henschke, 2009; Moreira *et al.*, 2011).

Os fermentados obtidos pelos isolados da espécie *H. opuntiae* foram caracterizados pela elevada produção de ácido acético, como se pode observar pelos teores elevados obtidos para a acidez volátil, no entanto os valores para acidez total foram intermédios. Para além disso apresentou valores médios elevados para os açúcares redutores, ácido málico, ácido láctico e glucose. Mais uma vez se constatou a presença de teores elevados de açúcar assim como de frutose e glucose, sugerindo que também os isolados desta espécie não conseguiram fermentar todo o açúcar presente no mosto.

Tabela 3.7: Resumo da análise de variância e avaliação do efeito do factor espécie nos resultados das análises químicas dos fermentados obtidos.

Efeito da espécie nos resultados das análises químicas												
Parâmetros	Efeito	LSA	C. d.	C. z.	H. g.	H. u.	H. o.	I. o.	I. t.	Z. bl.	Z. bp.	Z. h.
Acidez total (g/l)	***	5,95bcd	6,50d	6,21d	5,90bc	5,70b	6,04bcd	6,21cd	4,97a	7,20e	7,79f	5,21a
Acidez volátil (g/l)	***	0,78bc	1,08d	0,71b	0,82bc	0,88c	1,33e	1,09de	0,42a	0,68b	1,05cd	0,27a
pH	***	3,47de	3,41cd	3,37b	3,41c	3,43cd	3,42cd	3,44cde	3,48e	3,43cd	3,31a	3,40bc
Int. corante	n.s.	1,07	1,04	1,11	0,96	0,77	0,89	1,04	0,87	1,04	1,04	0,87
IPT	n.s.	46,43	47,06	46,72	44,53	43,01	46,94	44,54	44,47	41,01	42,34	44,99
Açúcares red. (g/l)	***	1,20a	103,50d	43,45b	90,03cd	133,96e	103,90d	40,50b	160,27f	27,70ab	76,13c	179,35g
Ácido L-málico (g/l)	***	2,10b	2,80g	2,30bc	2,60ef	2,45de	2,45cde	2,75fg	1,57a	1,70a	2,43cde	2,35bcd
Ácido L-láctico (g/l)	***	0,10a	0,65c	0,47bc	0,18a	0,36ab	0,50bc	0,65c	0,58c	0,55bc	0,50bc	0,55bc
Teor alcoólico (%)	***	12,79g	7,80cd	10,41e	8,17cd	6,20b	7,30c	10,89ef	4,96a	11,35f	8,65d	4,18a
Glucose (g/l)	***	0,25a	22,17b	39,10c	60,84def	69,47g	65,18efg	2,12a	53,46de	23,09b	65,96fg	49,96cd
Frutose (g/l)	***	0,81a	70,98e	1,56a	22,10b	51,28d	35,60c	33,41c	90,40f	2,16a	3,13a	106,42g
Glicerol (g/l)	***	4,17a	13,11e	13,34e	10,90c	11,93d	10,17c	7,68b	13,40e	5,27a	10,96c	13,90e

Valores médios na mesma linha, seguido de letras diferentes apresentam diferenças significativas; n.s.- não significativo; *** altamente significativo ($\alpha < 0,001$); os valores médios com a mesma letra não diferem entre si para $\alpha < 0,05$.

Espécies em análise: **LSA** – *Levedura seca activa*; **C.d.**- *Candida diversa*; **C.z.**- *Candida zemplinina*; **H.g.** – *Hanseniaspora guilliermondii*; **H.u.**- *Hanseniaspora uvarum*; **H.o.**- *Hanseniaspora opuntiae*; **I.o.** – *Issatchenkia orientalis*; **I.t.**- *Issatchenkia terricola*; **Z. bl.** – *Zygosaccharomyces bailii*; **Z. bp.**- *Zygosaccharomyces bisporus*; **Z.h.**- *Zygoascus hellenicus*.

Observou-se um grande paralelismo entre os diferentes isolados do género *Hanseniaspora*. Os isolados da espécie *H. uvarum* e *H. guilliermondii* apresentaram fermentados idênticos em alguns parâmetros como a acidez total e volátil, embora a espécie *H. uvarum* esteja associada à produção de concentrações mais elevadas de ácido acético do que a espécie *H. guilliermondii* (Ugliano e Henschke, 2009). Em relação à metabolização do açúcar presente no mosto verificou-se que os isolados da espécie *H. guilliermondii* e *H. opuntiae* apesar de não terem fermentado todo o açúcar do mosto apresentaram um consumo de aproximadamente metade do açúcar inicial. O facto de estas leveduras não conseguirem metabolizar todo o açúcar presente deve-se à sua baixa tolerância ao etanol, uma vez que estas espécies encontram-se no início da fermentação, mas com a progressão do processo fermentativo muitas delas acabam por morrer (Fleet, 2003). No entanto em fermentações mistas com *S. cerevisiae* podem produzir vinhos com um equilíbrio entre a formação de compostos voláteis e não-voláteis (Jolly *et al.*, 2006; Ugliano e Henschke, 2009).

Jolly *et al.* (2006) citam um estudo de Caridi e Ramondino (1999) onde avaliaram a capacidade enológica de vinte *Hanseniaspora spp.* para fermentar o mosto. Observaram que o etanol produzido variava entre 5,02 a 8,72 %, em comparação com o controlo, neste caso uma espécie de *S. cerevisiae*, com produção de 11,17 %, no entanto, a produção de acidez volátil foi maior (0,75 – 2,25 g/l) do que para o controlo (0,65 g/l).

Os fermentados dos isolados da espécie *I. orientalis* foram caracterizados por uma acidez volátil elevada com valores próximos do descrito na literatura para esta espécie (0,3 – 1 g/l de ácido acético) (Ugliano e Henschke, 2009). Estes caracterizaram-se igualmente por teores mais elevados de ácido málico, ácido láctico bem como o teor alcoólico o qual se mostrou superior ao que vem descrito na literatura entre 1-6,5 % (v/v) (Ugliano e Henschke, 2009). Valores médios mais baixos foram encontrados para os açúcares redutores assim como para a glucose, demonstrando o carácter glucofílico de *I. orientalis*.

Em relação aos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *I. terricola* apresentaram valores médios elevados para o pH, os açúcares redutores, o ácido láctico, a glucose, a frutose e glicérol. Por outro lado observou-se teores mais baixos de ácido málico, teor alcoólico e acidez volátil. A acidez total dos fermentados foi relativamente baixa e próxima da acidez total do mosto TN. De todos os fermentados estes foram onde se observou um teor alcoólico muito baixo. No entanto, segundo Ugliano e Henschke, (2009) a associação desta espécie com *S. cerevisiae*, originam vinhos mais equilibrados do que em cultura pura (Ugliano e Henschke, 2009).

Os isolados da espécie *Z. bailii* caracterizaram fermentados com teores muito elevados de acidez total comparativamente aos fermentados obtidos pelos isolados das outras espécies. Para além disso, a seguir ao fermentado de referência (obtido pela LSA) foram os que mais se aproximaram de teores normais de álcool estabelecidos para o vinho, apresentando também um valor adequado de acidez volátil.

Também se observaram teores mais reduzidos para os açúcares redutores, sendo mesmo a espécie que a seguir à LSA apresentou valores mais baixos. Os resultados dos teores de frutose e glucose, mais elevados para este último açúcar, confirmam o carácter frutofílico desta espécie o que não se verifica para a maioria das leveduras não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* (Ugliano e Henschke, 2009).

Os fermentados pelos isolados da espécie *Zygoascus hellenicus* apresentaram os valores mais elevados para os açúcares redutores e para a frutose, confirmando que esta espécie em cultura pura não consegue levar a fermentação até ao final. Este facto também se verificou pelos teores muito reduzidos de teor alcoólico. Observou-se valores médios elevados para a glucose e glicérol e teores mais baixos foram observados para o pH e para a acidez total e para a acidez volátil sendo a mais baixa comparativamente aos restantes fermentados.

Da análise dos fermentados pelos isolados da espécie *Z. bisporus* constatou-se elevada acidez total e elevada a acidez volátil. Por outro lado apresentou teores mais baixos para o pH e frutose. Pelo consumo de açúcares redutores verificou-se que os isolados desta espécie conseguiram metabolizar muito do açúcar presente no mosto, indiciando um consumo preferencial da frutose em relação à glucose. Para além disso os fermentados apresentaram teores alcoólicos relativamente elevados em comparação com os restantes fermentados.

3.2.4. Produção de H₂S

Procedeu-se à detecção da produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S) dos isolados seleccionados para caracterização enológica. A detecção deste composto foi realizada segundo Martínez-Rodríguez *et al.* (2001) e De Benedictis *et al.* (2010), utilizando uma fita de papel embebida numa solução saturada de acetato de chumbo. A quantidade de sulfureto de chumbo formado é proporcional à quantidade de sulfureto de hidrogénio produzido, sendo reconhecido por uma mancha preta. Este método é simples e fácil e tem também a vantagem de ser realizado em mosto de uvas, mas permite somente uma detecção da produção de H₂S, não quantificado numa escala numérica.

Ao fim de 6 e de 30 dias observou-se a produção de H₂S, sendo os resultados registados e fotografados (Anexo IV). Utilizou-se uma escala de intensidade descrita por De Benedictis *et al.* (2010) sendo os isolados classificados com elevada produção (+++), média produção (++) , baixa produção (+) e sem produção (-), consoante maior ou menor ou mesmo ausência de escurecimento da fita de papel de acetato de chumbo.

Algumas leveduras da colecção de microrganismos EVN também foram avaliadas na produção deste composto por indicação da bibliografia como sendo espécies produtoras de H₂S. De facto, Viana *et al.* (2008) verificaram que duas estirpes de *P. membranifaciens* não produziram este composto, enquanto que em estirpes de *H. guilliermondii* e *H. osmophila* verificou-se uma

produção intensa de H₂S. Quando testadas as leveduras da colecção de microrganismos EVN observou-se uma fraca produção para as estirpes de *P. membranifaciens* ao fim do sexto dia, aumentando a produção de uma das estirpes ao fim 30º dia, baixa produção para a espécie *H. guilliermondii* e ausência de produção de H₂S pela espécie *H. uvarum*. Analisando assim os vários resultados, conclui-se que esta detecção da produção de H₂S deve ser realizada em todas as estirpes que se pretenda estudar pois a produção deste composto varia com a estirpe.

Ao fim de trinta dias verificou-se que o controlo TN (mosto TN) permaneceu sem alteração como seria de esperar. Verificou-se que os isolados das espécies *Z. bisporus* (TN11.62 e 71), *Zygoascus hellenicus* (TN21.70) e *Z. bailii* (TN22.71) não escureceram o papel de acetato de chumbo, indicando a não produção de H₂S (Tabela 3.8). Nos isolados da espécie *C. zemplinina* observou-se um comportamento diferente na produção de H₂S. Os isolados TN11.74, 12.68 e 23.84 ao fim do sexto dia não foi detectada a produção de H₂S, mas ao fim de trinta dias verificou-se uma produção fraca para o isolado TN23.84 e média para os isolados TN11.74 e 12.68. Observou-se uma produção fraca para o isolado TN21.90 ao 6º dia, no entanto, ao fim de trinta dias o papel de acetato de chumbo apresentou uma macha negra e intensa, evidenciado a produção de H₂S. Para os isolados da espécie *H. guilliermondii* observou-se resultados diferentes ao 6º dia, mas ao fim dos trinta dias de inoculação a produção de H₂S foi fraca para todos os isolados. Não se observou produção de H₂S para os isolados da espécie *H. opuntiae* ao fim do 6º dia, embora ao 30º se tenha observado uma produção fraca. Em relação aos isolados da espécie *H. uvarum*, a maioria ao fim do sexto dia apresentaram fraca produção de H₂S, à excepção do isolado TN21.61 em que se observou uma mancha de intensidade média no papel de acetato de chumbo.

Tabela 3.8: Resultado do teste de produção de H₂S. Legenda: (-) ausência, (+) fraco, (++) médio, (+++) elevado.

Isolado	Espécie	Produção de H ₂ S	
		6º Dia	30º Dia
11.79	<i>C. diversa</i>	+	+
11.74	<i>C. zemplinina</i>	-	++
12.68	<i>C. zemplinina</i>	-	++
21.90	<i>C. zemplinina</i>	+	+++
23.84	<i>C. zemplinina</i>	-	+
61.72	<i>H. guilliermondii</i>	-	+
62.75	<i>H. guilliermondii</i>	+	+
66.80	<i>H. guilliermondii</i>	+	+
22.78	<i>H. opuntiae</i>	-	+
12.76	<i>H. uvarum</i>	+	+
21.61	<i>H. uvarum</i>	++	++
22.79	<i>H. uvarum</i>	+	+
64.69	<i>H. uvarum</i>	+	+
65.70	<i>H. uvarum</i>	+	+
22.64	<i>I. orientalis</i>	+++	+++
11.70	<i>I. terricola</i>	+++	+++
12.72	<i>I. terricola</i>	++	++
22.70	<i>I. terricola</i>	+	+
23.68	<i>I. terricola</i>	++	++
22.71	<i>Z. baillii</i>	-	-
11.62	<i>Z. bisporus</i>	-	-
11.71	<i>Z. bisporus</i>	-	-
21.70	<i>Zygoascus hellenicus</i>	-	-

Nos isolados da espécie *C. diversa* também foi detectado uma produção fraca deste composto durante o período avaliado. De todos os isolados a maior produção de H₂S observou-se para os isolados da espécie *I. orientalis* e para um dos isolados da espécie *I. terricola* (TN11.70). Os restantes isolados nomeadamente TN12.72, 23.68, e 22.70 observou-se média e fraca produção respectivamente, mantendo-se a intensidade da mancha até à observação ao 30º dia.

3.2.5. Análise sensorial dos fermentados de Touriga Nacional

Um dos objectivos das fermentações, conduzidas pelos isolados de diferentes espécies, foi de avaliar os perfis aromáticos, que evidenciassem e enaltecem características da casta Touriga Nacional. Como já referido, a casta TN apresenta um aroma frutado, cítrico, floral e é muitas vezes caracterizado como um citrino doce e fresco evocando o fruto de bergamota, esteva e violeta.

A análise sensorial descritiva dos vinhos fermentados foi realizada por um painel de provadores treinados com base nos descritores da ficha de prova – Anexo V. Os provadores citaram pontualmente outros descritores que não foram tratados estatisticamente.

3.2.5.1. Avaliação e caracterização do grupo de prova

O grupo de prova foi constituído por um total de 13 provadores, no entanto não foi possível manter o mesmo número de provadores em todas as sessões de treino e nas sessões de prova.

No início de cada sessão de prova realizou-se um teste de identificação de soluções de aromas dos descritores em estudos, fornecendo a cada provador seis soluções de aroma aleatoriamente e não identificadas. Na Tabela 3.9 apresentam-se os resultados do desempenho de cada um dos provadores nestes testes nas diferentes sessões. No geral, verificou-se um bom desempenho de todos os provadores onde a maioria conseguiu identificar os descritores em estudo.

A partir dos resultados da análise sensorial efectuada por cada provador nas diferentes sessões de prova para o fermentado obtido pela LSA, foi ainda avaliado o desempenho individual de cada provador, através do cálculo do coeficiente de correlação entre os diferentes resultados (ver 2.4.4). Os resultados apresentam-se na tabela 3.10 onde para cada provador foram estimadas no máximo 15 correlações, dependendo da assiduidade. Verificou-se no geral um bom desempenho dos provadores sendo a maioria dos valores superior a 0,60, no entanto, estabeleceu-se um limite de 0,50 para o valor médio de todas as correlações obtidas, abaixo do qual o provador seria eliminado.

Tabela 3.9: Resultado dos testes de aroma de cada provador nas diferentes sessões de prova (positivos/total).

	Provador												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Sessão 1	6/6	6/6	4/6	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	5/6	5/6	3/6	6/6	-
Sessão 2	6/6	6/6	-	6/6	-	5/6	4/6	3/6	5/6	-	-	5/6	-
Sessão 3	6/6	6/6	6/6	6/6	-	4/6	6/6	4/6	6/6	5/6	-	6/6	-
Sessão 4	6/6	6/6	-	5/6	-	6/6	4/6	5/6	-	4/6	3/6	6/6	6/6
Sessão 5	5/6	6/6	-	6/6	-	6/6	6/6	-	5/6	-	4/6	6/6	4/6
Sessão 6	5/6	6/6	4/6	6/6	-	5/6	6/6	-	-	6/6	3/6	5/6	2/6

Tabela 3.10: Coeficientes de correlação calculados com os resultados das diferentes sessões de prova do fermentado da LSA, para cada um dos provadores e respectivo valor de p (entre parêntesis). S: sessão; -: Sem correlação devido à ausência do provador na sessão de prova.

Cruzamento		Provadores												
S	S	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	2	0,64 (0,000)	0,87 (0,000)	-	0,78 (0,000)	0,70 (0,000)	0,74 (0,000)	0,64 0,000	0,44 (0,001)	0,51 (0,000)	-	-	0,58 (0,000)	-
1	3	0,69 (0,000)	0,82 (0,000)	0,76 (0,000)	0,72 (0,000)	-	0,66 (0,000)	0,78 (0,000)	0,83 (0,000)	0,78 (0,000)	0,59 (0,000)	-	0,39 (0,005)	-
1	4	0,60 (0,000)	0,78 (0,000)	-	0,77 (0,000)	-	0,60 (0,000)	0,67 (0,000)	0,60 (0,000)	-	0,43 (0,001)	0,71 (0,000)	0,30 (0,033)	-
1	5	0,69 (0,000)	0,63 (0,000)	-	0,67 (0,000)	-	0,87 (0,000)	0,70 (0,000)	-	0,84 (0,000)	-	0,56 (0,000)	0,40 (0,004)	-
1	6	0,61 (0,000)	0,62 (0,000)	0,72 (0,000)	0,51 (0,000)	-	0,76 (0,000)	0,69 (0,000)	-	-	0,52 (0,000)	0,79 (0,000)	0,34 (0,015)	-
2	3	0,61 (0,000)	0,80 (0,000)	-	0,78 (0,000)	-	0,74 (0,000)	0,60 (0,000)	0,39 (0,005)	0,36 (0,008)	-	-	0,50 (0,000)	-
2	4	0,59 (0,000)	0,68 (0,000)	-	0,85 (0,000)	-	0,38 (0,006)	0,63 (0,000)	0,14 (0,315)	-	-	-	0,32 (0,022)	-
2	5	0,64 (0,000)	0,65 (0,000)	-	0,93 (0,000)	-	0,62 (0,000)	0,54 (0,000)	-	0,45 (0,001)	-	-	0,46 (0,001)	-
2	6	0,57 (0,000)	0,62 (0,000)	-	0,68 (0,000)	-	0,60 (0,000)	0,51 (0,000)	-	-	-	-	0,42 (0,002)	-
3	4	0,72 (0,000)	0,80 (0,000)	-	0,86 (0,000)	-	0,37 (0,000)	0,79 (0,000)	0,63 (0,000)	-	0,61 (0,000)	-	0,40 (0,004)	-
3	5	0,77 (0,000)	0,72 (0,000)	-	0,73 (0,000)	-	0,59 (0,000)	0,76 (0,000)	-	0,69 (0,000)	-	-	0,41 (0,003)	-
3	6	0,71 (0,000)	0,74 (0,000)	0,76 (0,000)	0,58 (0,000)	-	0,55 (0,000)	0,62 (0,000)	-	-	0,53 (0,000)	-	0,45 (0,001)	-
4	5	0,87 (0,000)	0,54 (0,000)	-	0,91 (0,000)	-	0,78 (0,000)	0,74 (0,000)	-	-	-	0,84 (0,000)	0,45 (0,001)	0,31 (0,027)
4	6	0,85 (0,000)	0,59 (0,000)	-	0,66 (0,000)	-	0,58 (0,000)	0,63 (0,000)	-	-	0,35 (0,012)	0,70 (0,000)	0,67 (0,000)	0,52 (0,000)
5	6	0,91 (0,000)	0,91 (0,000)	-	0,76 (0,000)	-	0,84 (0,000)	0,83 (0,000)	-	-	-	0,67 (0,000)	0,47 (0,000)	0,34 (0,014)
Média		0,70	0,72	0,75	0,75	0,70	0,65	0,67	0,50	0,61	0,51	0,71	0,44	0,34

Este facto verificou-se para os provadores L e M. Apesar de o provador L ter estado presente em todas as sessões de treino e de prova os valores de correlação entre os resultados de cada sessão, para o fermentado referência, foram sempre mais baixos, a maioria inferior a 0,50. O mesmo critério foi aplicado ao provador M que esteve presente em menos sessões e apresentou correlações com valores médios muito baixos, resultando numa média inferior ao estabelecido como um desempenho aceitável.

3.2.5.2. Análise de variância

Nas diferentes sessões de prova foram avaliados 22 descritores de aroma orthonasal, 22 descritores de aroma retronasal e 6 descritores para o sabor. Foi ainda efectuada a apreciação global de cada fermentado obtido. Os resultados da análise sensorial obtidos foram tratados estatisticamente, por análise de variância, tendo-se avaliado a influência do isolado e da espécie na composição aromática dos fermentados obtidos. Apresentam-se apenas os resultados obtidos para a influência da espécie para simplificar a sua análise e discussão dos resultados.

Nas tabelas 3.11, 3.12 e 3.13 apresenta-se o resumo da análise de variância, com os valores médios por espécie de cada um dos descritores avaliados assim como o seu nível de significância.

Da análise de variância efectuada verificou-se que não existe efeito significativo da espécie para os descritores frutos silvestres, laranja, mel, caramelo, compota, chocolate, eucalipto e mentol, no caso do aroma orthonasal; para o aroma retronasal verificou-se o mesmo para os descritores laranja, banana, frutos secos, caramelo, maçã, manteiga, eucalipto e mentol. Em relação aos descritores do sabor, verificou-se que não houve efeito da espécie para o parâmetro corpo e para a persistência.

A intensidade para a generalidade dos descritores foi baixa excepto para os descritores acetato de etilo, frutos secados, herbáceo e oxidado, com valores médios mais elevados comparativamente aos restantes descritores.

Tabela 3.11: Resumo da análise de variância e avaliação do efeito do factor espécie para o aroma ortonasal.

Efeito da espécie no aroma ortonasal												
Descritores	Efeito	LSA	C. d.	C. z.	H. g.	H. o.	H. u.	I. o.	I. t.	Z. bl.	Z. bp.	Z. h.
F. silvestres	n.s.	0,95	1,22	1,39	0,85	1,06	1,14	0,71	0,76	1,04	0,93	0,51
Tipo laranja	n.s.	0,06	0,21	0,37	0,31	0,25	0,26	0,36	0,30	0,24	0,20	0,07
Banana	*	0,00a	0,05a	0,06a	0,09a	0,00a	0,03a	0,11a	0,03a	0,00a	0,00a	0,40b
Maracujá	***	0,07ab	0,12ab	0,03a	0,02a	0,00a	0,00a	0,11ab	0,69c	0,06a	0,00a	0,40b
Maçã	***	0,93d	0,65cd	0,53c	0,11a	0,19ab	0,18ab	0,17ab	0,27ab	0,51bc	0,28ab	0,06a
F. secos	**	0,38abcd	0,72cd	0,71d	0,17ab	0,22ab	0,45bcd	0,13ab	0,23ab	0,40abcd	0,37abc	0,06a
F. secados	**	0,50a	1,15bc	1,11bc	1,01bc	1,22bc	1,28c	0,46a	0,57a	0,66ab	0,80ab	0,70ab
Bergamota	***	0,00a	0,14a	0,59b	0,09a	0,13a	0,21a	0,00a	0,07a	0,29a	0,12a	0,00a
Mel	n.s.	0,06	0,25	0,49	0,38	0,31	0,39	0,22	0,19	0,28	0,20	0,69
Caramelo	n.s.	0,06	0,00	0,27	0,16	0,13	0,16	0,00	0,05	0,52	0,04	0,00
Compota	n.s.	0,06	0,68	0,58	0,48	0,50	0,46	0,17	0,48	0,49	0,23	0,67
Chocolate	n.s.	0,16	0,21	0,09	0,09	0,06	0,05	0,00	0,26	0,37	0,04	0,13
Manteiga	***	0,00a	0,05a	0,06a	0,00a	0,00a	0,02a	0,22a	0,38a	0,44a	0,20a	1,23b
Esteva	**	0,26a	0,30ab	0,59b	0,21a	0,31ab	0,25a	0,18a	0,13a	0,28a	0,31ab	0,06a
Eucalipto	n.s.	0,06	0,09	0,20	0,14	0,06	0,12	0,06	0,06	0,14	0,08	0,00
Mentol	n.s.	0,32	0,21	0,34	0,25	0,19	0,22	0,06	0,22	0,20	0,24	0,00
Cravinho	**	0,00a	0,07ab	0,21b	0,02a	0,00a	0,02a	0,00a	0,00a	0,07ab	0,18b	0,00a
Herbáceo	**	0,88b	0,55ab	0,30a	0,15a	0,47ab	0,29a	0,46ab	0,51ab	1,15b	1,00b	0,00a
Violeta	**	0,00a	0,05a	0,36b	0,06a	0,00a	0,07a	0,00a	0,08a	0,06a	0,16a	0,00a
Ac. etilo	***	0,18a	0,09a	0,23a	2,86c	1,91b	1,96b	3,61c	0,27a	0,00a	0,32a	0,00a
Oxidado	***	1,82e	0,82bcd	0,81c	0,59abc	0,63abc	0,40ab	0,35ab	0,45ab	1,00cd	1,20d	0,22a
Ferm. padeiro	***	0,06a	0,22a	0,06a	0,09a	0,00a	0,07a	0,06a	0,90b	0,28a	0,24a	2,13c

Valores médios na mesma linha, seguido de letras diferentes apresentam diferenças significativas; n.s.- não significativo; * - significativo ($\alpha < 0,05$); ** - muito significativo ($\alpha < 0,01$); *** altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Espécies em análise: LSA – *Levedura seca activa*; C.d.- *Candida diversa*; C.z.- *Candida zemplinina*; H.g. – *Hanseniaspora guilliermondii*; H.o.- *Hanseniaspora opuntiae*; H.u.- *Hanseniaspora uvarum*; I.o. – *Issatchenkia orientalis*; I.t.- *Issatchenkia terricola*; Z. bl. – *Zygosaccharomyces bailii*; Z. bp.- *Zygosaccharomyces bisporus*; Z.h.- *Zygoascus hellenicus*.

Tabela 3.12: Resumo da análise de variância e avaliação do efeito do factor espécie para o aroma retronasal.

Efeito da espécie no aroma retronasal												
Descritores	Efeito	LSA	C. d.	C. z.	H. g.	H. o.	H. u.	I. o.	I. t.	Z. bl.	Z. bp.	Z. h.
F. silvestres	*	0,69 ab	1,30 c	1,07 bc	0,82 ab	0,88 abc	1,01 bc	0,53 a	0,59 a	0,86 abc	0,76 ab	0,56 a
Tipo laranja	n.s.	0,27	0,21	0,44	0,37	0,38	0,34	0,24	0,33	0,29	0,44	0,29
Banana	n.s.	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,05	0,06	0,07	0,00	0,00	0,20
Maracujá	***	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,02 a	0,00 a	0,03 a	0,06 ab	0,50 c	0,00 a	0,04 ab	0,31 bc
Maçã	n.s.	0,34	0,44	0,45	0,15	0,06	0,18	0,17	0,47	0,20	0,31	0,06
F. secos	n.s.	0,40	0,70	0,56	0,40	0,25	0,46	0,18	0,32	0,49	0,32	0,00
F. secados	***	0,33 a	1,43 cd	0,72 ab	1,13 bdc	1,22 bcd	1,49 d	0,58 ab	0,87 abc	0,37 a	0,83 abc	1,23 bcd
Bergamota	**	0,07 a	0,09 a	0,56 b	0,11 a	0,06 a	0,19 a	0,06 a	0,04 a	0,25 a	0,17 a	0,17 a
Mel	*	0,00 a	0,62 bcde	0,44 abcd	0,60 cde	0,50 abcde	0,61 cde	0,17 abc	0,72 de	0,06 ab	0,28 abc	0,98 e
Caramelo	n.s.	0,00	0,32	0,13	0,24	0,06	0,20	0,11	0,39	0,06	0,04	0,07
Compota	***	0,00 a	1,12 d	0,28 ab	0,46 bc	0,34 ab	0,82 cd	0,44 abc	1,06 d	0,11 ab	0,12 ab	1,11 d
Chocolate	*	0,00 a	0,00 a	0,01 a	0,10 a	0,00 a	0,03 a	0,00 a	0,10 a	0,11 ab	0,00 a	0,27 b
Manteiga	n.s.	0,06	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,06	0,18	0,00	0,12	0,39
Esteva	***	0,06 a	0,09 a	0,46 b	0,18 a	0,06 a	0,20 a	0,06 a	0,06 a	0,53 b	0,16 a	0,00 a
Eucalipto	n.s.	0,00	0,05	0,10	0,10	0,00	0,03	0,00	0,08	0,00	0,08	0,11
Mentol	n.s.	0,20	0,05	0,24	0,19	0,19	0,18	0,06	0,18	0,07	0,24	0,00
Cravinho	*	0,00 a	0,00 a	0,11 b	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,14 b	0,04 ab	0,00 a
Herbáceo	***	1,58 d	0,19 a	0,85 c	0,37 ab	0,41 ab	0,15 a	0,74 bc	0,26 a	1,58 d	1,16 cd	0,00 a
Violeta	*	0,00 a	0,00 a	0,14 b	0,04 a	0,00 a	0,01 a	0,00 a	0,06 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
Ac. etilo	***	0,07 a	0,14 a	0,26 a	1,83 c	1,50 bc	1,26 b	2,92 d	0,06 a	0,33 a	0,32 a	0,00 a
Oxidado	***	1,87 e	0,32 ab	0,62 bc	0,55 ab	0,56 abc	0,37 ab	0,35 ab	0,27 a	1,05 c	1,14 d	0,28 ab
Ferm. pão	***	0,06 ab	0,00 a	0,06 ab	0,02 a	0,19 bc	0,02 a	0,06 ab	0,29 c	0,00 a	0,08 ab	1,44 d

Valores médios na mesma linha, seguido de letras diferentes apresentam diferenças significativas; n.s.- não significativo; * - significativo ($\alpha < 0,05$); ** - muito significativo ($\alpha < 0,01$); *** altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Espécies em análise: **LSA** – Levedura seca activa; **C.d.**- *Candida diversa*; **C.z.**- *Candida zemplinina*; **H.g.** – *Hanseniaspora guilliermondii*; **H.o.**- *Hanseniaspora opuntiae*; **H.u.**- *Hanseniaspora uvarum*; **I.o.** – *Issatchenkia orientalis*; **I.t.**- *Issatchenkia terricola*; **Z. bl.** – *Zygosaccharomyces bailii*; **Z. bp.**- *Zygosaccharomyces bisporus*; **Z.h.**- *Zygoascus hellenicus*.

Tabela 3.13: Resumo da análise de variância e avaliação do efeito do factor espécie na caracterização do sabor e apreciação global dos fermentados.

Efeito da espécie na caracterização do sabor e apreciação global dos fermentados												
Descritores	Efeito	LSA	<i>C. d.</i>	<i>C. z.</i>	<i>H. g.</i>	<i>H. o.</i>	<i>H. u.</i>	<i>I. o.</i>	<i>I. t.</i>	<i>Z. bl.</i>	<i>Z. bp.</i>	<i>Z. h.</i>
Corpo	n.s.	2,49	2,51	2,69	2,37	2,47	2,45	2,45	2,31	2,39	2,50	2,44
Macieza	***	1,74a	2,74def	2,15bc	2,42cd	2,34cd	2,81ef	2,11abc	2,62de	1,88ab	2,12abc	3,01f
Complexidade	*	1,90a	2,43bc	2,49c	2,09ab	2,09ab	2,24abc	2,01ab	2,00a	2,17abc	2,20abc	2,13abc
Persistência	n.s.	2,50	2,60	2,71	2,62	2,38	2,46	2,55	2,41	2,53	2,62	2,42
Equilíbrio	***	1,91ab	2,15cd	2,27e	1,81ab	1,94abc	1,91abc	1,88abc	1,82ab	1,98abc	2,04bcd	1,72a
Doce	***	0,57a	3,10def	1,54c	2,62d	2,75de	3,17ef	1,48abc	3,56f	0,82ab	1,70c	3,63f
Aprec. Global	***	2,03abc	2,56cd	2,69d	2,00b	1,97ab	2,27bc	1,53a	2,02b	2,05abc	2,18bc	2,04abc

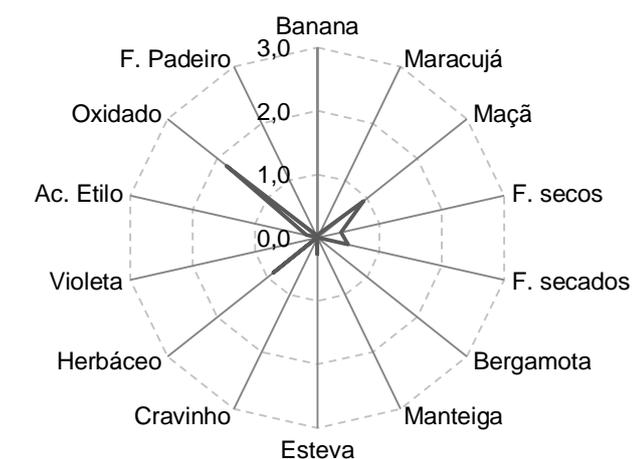
Valores médios na mesma linha, seguido de letras diferentes apresentam diferenças significativas; n.s.- não significativo; * - significativo ($\alpha < 0,05$); *** altamente significativo ($\alpha < 0,001$). Espécies em análise: **LSA** – Levedura seca activa; **C.d.**- *Candida diversa*; **C.z.**- *Candida zemplinina*; **H.g.** – *Hanseniaspora guilliermondii*; **H.o.**- *Hanseniaspora opuntiae*; **H.u.**- *Hanseniaspora uvarum*; **I.o.** – *Issatchenkia orientalis*; **I.t.**- *Issatchenkia terricola*; **Z. bl.** – *Zygosaccharomyces bailii*; **Z. bp.**- *Zygosaccharomyces bisporus*; **Z.h.**- *Zygoascus hellenicus*.

3.2.5.3. Características do aroma, sabor e apreciação global

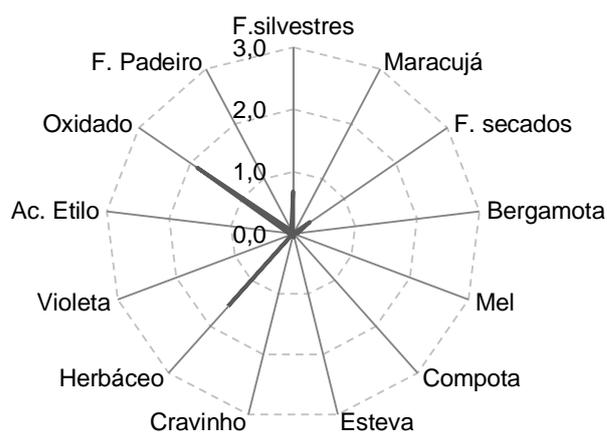
As características do aroma e sabor e a apreciação global resultantes da análise sensorial para as quais houve efeito da espécie foram representadas graficamente para salientar as mais importantes (Figura 3.26 a 3.35). Dentro de cada espécie estão representados os resultados de cada isolado muito embora para alguns dos descritores não houve efeito significativo do isolado. A grande vantagem da representação gráfica é a visualização do perfil sensorial evidenciando desde logo as diferenças aromáticas dos fermentados obtidos.

O fermentado obtido pela LSA diferenciou-se dos restantes com um aroma mais intenso para os descritores maçã e oxidado no aroma ortonasal e também oxidado no aroma retronasal (Figura 3.26). Apresentou também um dos valores médios mais elevados para o descritor herbáceo, com maior intensidade no aroma retronasal. Para além destes, outros descritores foram detectados como frutos secados, frutos secos e esteva para o aroma ortonasal. Relativamente às características do sabor, o fermentado foi caracterizado com pouca macieza, complexidade e pouco doce, mas com um certo equilíbrio. Globalmente foi classificado com uma qualidade intermédia. O fermentado originado por esta estirpe de *S. cerevisiae* foi também qualificado por um aroma a ácido acético, embora este descritor não tenha sido analisado estatisticamente. A detecção deste aroma no vinho pode ser explicada pela acidez volátil do fermentado, como foi analisado quimicamente. Uma média de 4 provadores por sessão de prova detectou este descritor neste fermentado. Outros descritores foram referidos pelo grupo tanto para o aroma ortonasal como retronasal nomeadamente os descritores pimenta, flor (alteração por leveduras de véu) e amargor, por 2 a 3 provadores.

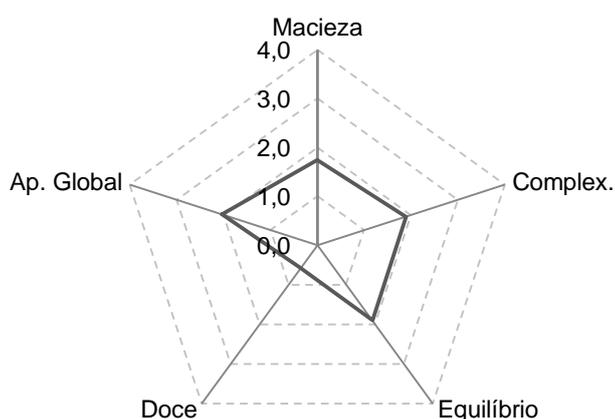
O defeito a oxidado salientado para este fermentado pode possivelmente relacionar-se com o excesso de tempo antes de se proceder à sua transferência para novo frasco e a adição de azoto para evitar a oxidação.



(a) Aroma orthonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final

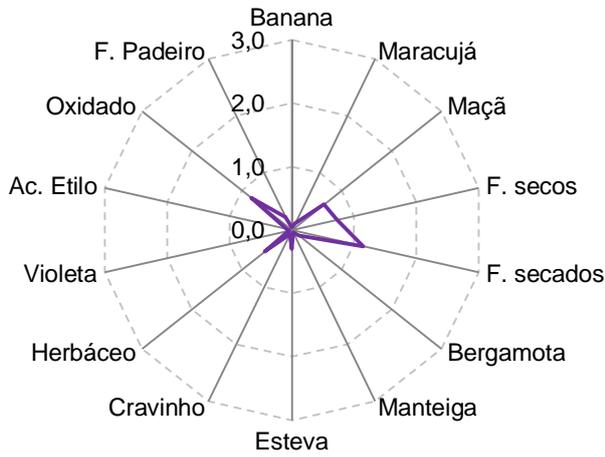


Figura 3.26: Perfil sensorial do fermentado obtido pela LSA comercial.

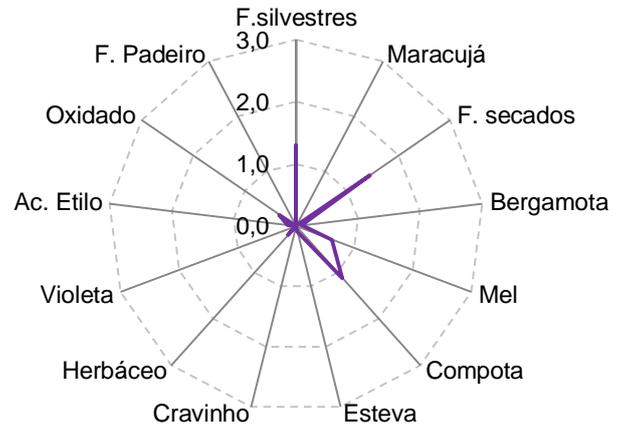
Em relação com os fermentados das outras espécies, os fermentados obtidos pelos isolados espécie *C. diversa* apresentaram maior intensidade para o descritor frutos secos para o aroma orthonasal e frutos silvestres e compota ao nível do aroma de boca (Figura 3.27). Verificou-se ainda valores intermédios para os descritores frutos secados em ambos os aromas, assim como mel para o aroma retronasal. Com menos intensidade foi detectado um ligeiro oxidado, maçã, cravinho, herbáceo e esteva no aroma orthonasal assim como o descritor oxidado no aroma retronasal.

Os aromas a borracha, ácido acético e flor foram descritores referidos por dois provadores na mesma sessão de prova para o aroma orthonasal. Apesar de não terem sido analisados estatisticamente a presença do odor a ácido acético neste fermentado pode corroborar com os

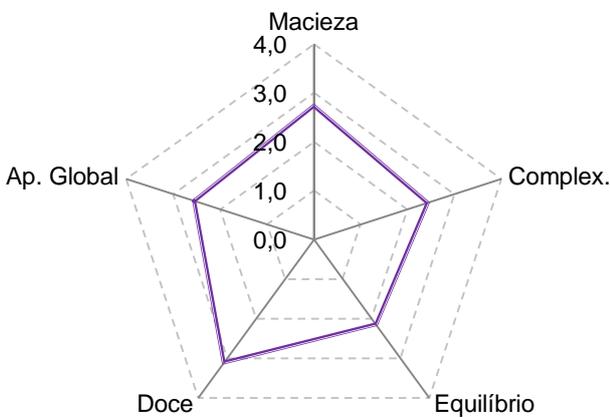
valores elevados obtidos na análise química para acidez volátil. Na avaliação do sabor o fermentado foi caracterizado como muito doce. O facto de esta levedura não ter fermentado todo o açúcar presente no mosto, pode explicar o excesso de doce que caracterizou este vinho. No entanto, apresentou macieza e complexidade, destacando-se assim pela sua qualidade, como se pode confirmar com os valores médios obtidos.



(a) Aroma ortonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final

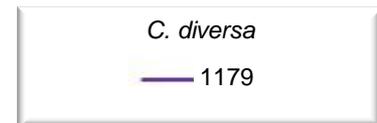
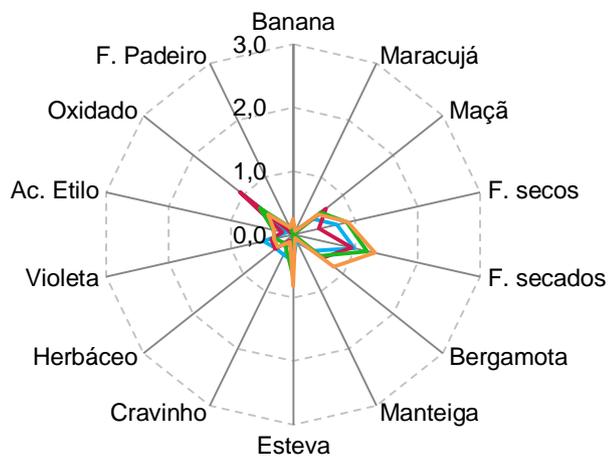


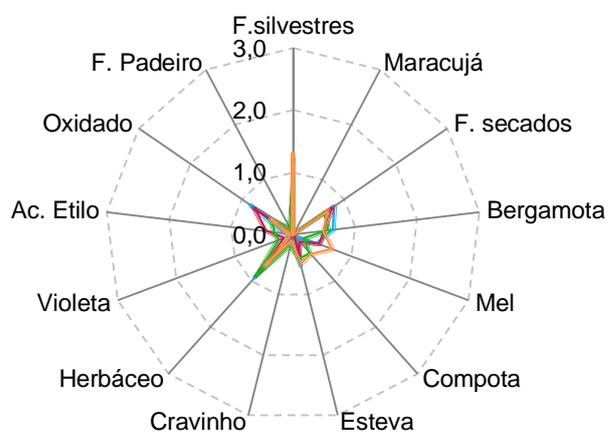
Figura 3.27: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *C. diversa*.

Os isolados da espécie *C. zemplinina*, comparativamente com os restantes, concederam um aroma mais diversificado aos fermentados (Figura 3.28). Estes foram os que apresentaram maior intensidade para os descritores bergamota, violeta, esteva e frutos secos no aroma ortonasal. Destacaram-se com menos intensidade os descritores oxidado, frutos secados e maçã. Já no

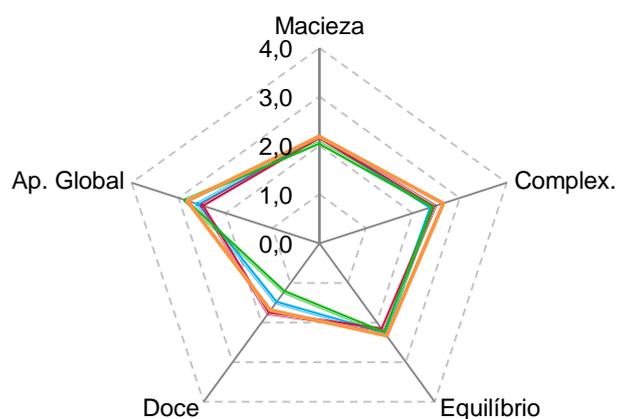
aroma retronasal verificou-se maior intensidade para os descritores bergamota, esteva e violeta. Ainda neste aroma diferenciou-se das restantes espécies, com menor intensidade para os descritores frutos silvestres, oxidado, herbáceo, compota, mel e frutos secados.



(a) Aroma orthonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final

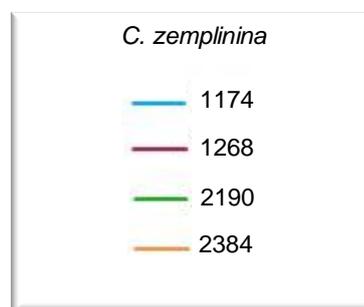
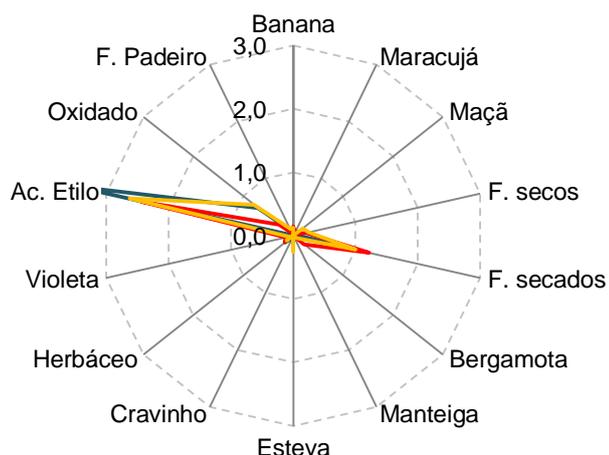


Figura 3.28: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *C. zemplinina*.

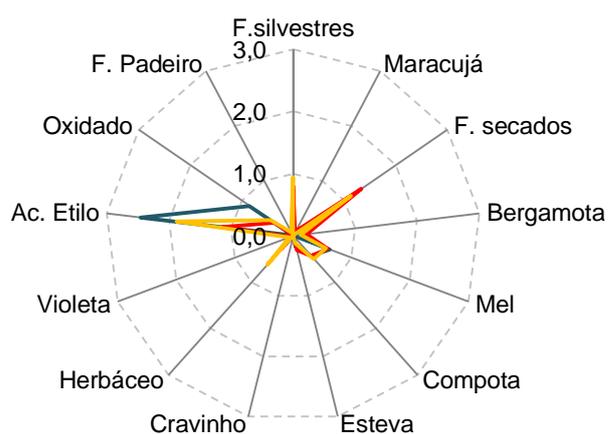
É possível observar na figura 3.28 que os fermentados obtidos pelos diferentes isolados apresentaram alguma variabilidade. Por exemplo o fermentado obtido pelo isolado TN23.84 apresentou-se mais intenso para os descritores frutos secos e secados, bergamota e esteva no aroma orthonasal, salientando-se também a esteva, o mel, frutos silvestres, compota e bergamota para o aroma retronasal. O mesmo se constatou para o isolado TN11.74 apresentando valores médios mais elevados para o descritor violeta mas apenas no aroma orthonasal, pois no aroma de boca observou-se maior intensidade para os frutos secados e herbáceo. A bergamota e a violeta

foram os descritores mais intensos para o aroma retronasal do fermentado obtido pelo isolado TN21.90. Já o fermentado do isolado TN12.68 apenas foi caracterizado com o defeito a oxidado em ambos os aromas detectando a presença de maçã para o aroma ortonasal. Na caracterização do sabor, os fermentados caracterizaram-se pela elevada qualidade, revelando ainda uma grande complexidade e equilíbrio, assim como valores intermédios para a macieza e doce. Confirmou-se também que de todos os fermentados, os fermentados obtidos pelo isolado TN23.84 se destacaram dos demais, apresentando para a maioria dos descritores valores médios mais elevados. Para além disso foram os fermentados que mais se aproximaram do aroma característico dos vinhos produzidos com a casta Touriga Nacional com destaque para os aromas a bergamota, violeta e esteva que caracterizaram estes fermentados.

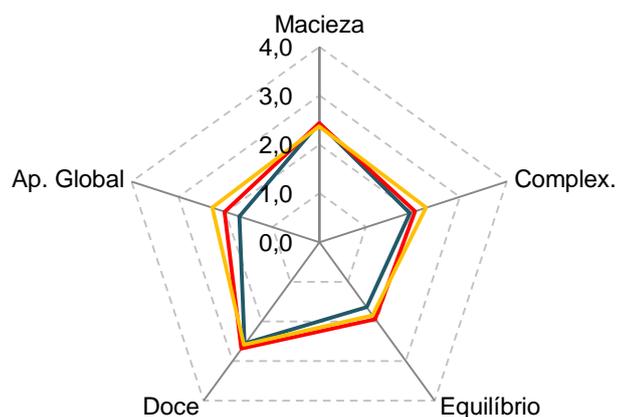
Os fermentados obtidos pelos isolados da espécie *H. guilliermondii* destacaram-se por um aroma intenso a acetato de etilo (Figura 3.29). Devido possivelmente à intensidade deste defeito os fermentados apresentaram-se pobres aromaticamente, uma vez que para além do acetato de etilo só foram detectados os descritores frutos secados e oxidado no aroma ortonasal e os descritores mel, frutos secados, compota, frutos silvestres e herbáceo mas para o aroma retronasal, embora com intensidade menor. Comparando os diferentes fermentados obtidos, confirmou-se que o isolado TN62.75 caracterizou os fermentados com maior intensidade para o descritor frutos secados em ambos os aromas. Nestes fermentados foram detectados por dois provadores, no aroma ortonasal, a presença de ácido acético. Já os descritores acetato de etilo apresentaram valores médios mais elevados para os fermentados obtidos pelo isolado TN61.72. Os fermentados obtidos pelo isolado TN66.80 apenas se destacaram pelo aroma a esteva no aroma ortonasal e para o aroma retronasal foram os descritores frutos silvestres, compota e herbáceo. Na caracterização do sabor observaram-se fermentados com macieza, menos complexidade mas intensos para o doce. Na apreciação global apresentaram uma qualidade baixa possivelmente pelo facto de terem originado produtos pouco equilibrados. Esta espécie na literatura é descrita por possuir um equilíbrio entre a produção de compostos voláteis e não voláteis, incluindo a produção de acetato de 2-feniletilo caracterizando os vinhos com um aroma frutado, a mel e tipo rosas (Rojas *et al.*, 2003). No entanto, tal como aconteceu com os fermentados do presente trabalho os níveis de acetato de etilo produzidos por esta espécie são elevados (até 400 g/l), bem como o acetaldeído (19 g/l) o qual está relacionado com o aroma oxidado detectado (Ugliano e Henschke, 2009). Para além destes, outros compostos como o ácido acético são produzidos por esta espécie. Apesar de não terem sido tratados estatisticamente o painel de provadores identificou a presença deste aroma. A produção em excesso destes compostos pode ser moderado com a utilização desta espécie em co-fermentação com a levedura *S. cerevisiae*, uma vez que segundo Ugliano e Henschke (2009), tem potencial para melhorar e aumentar a complexidade do aroma do vinho.



(a) Aroma orthonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final

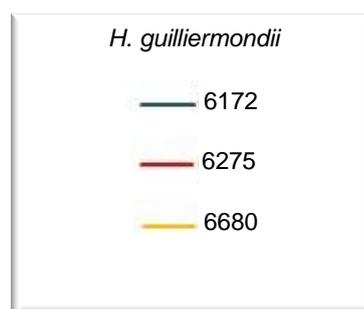
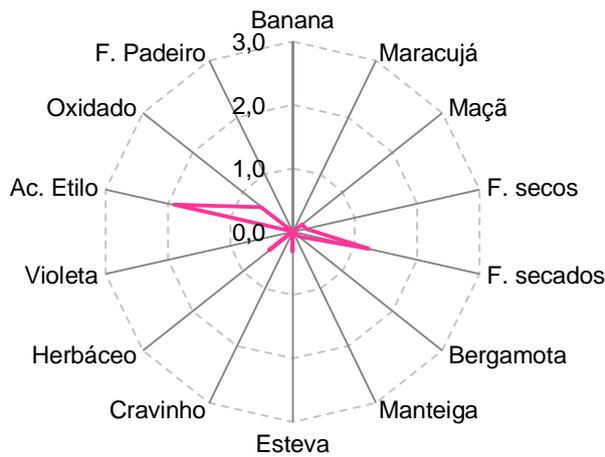
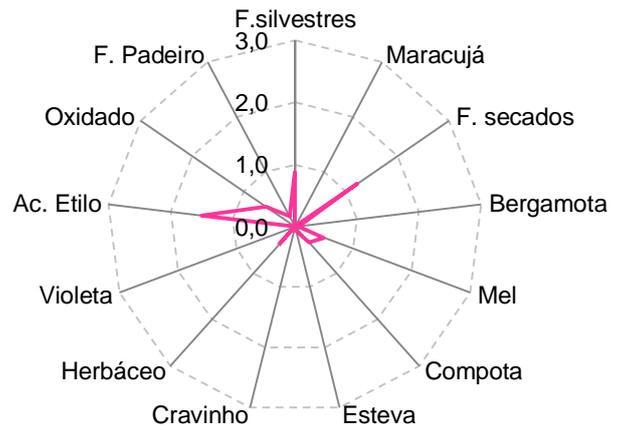


Figura 3.29: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *H. guilliermondii*.

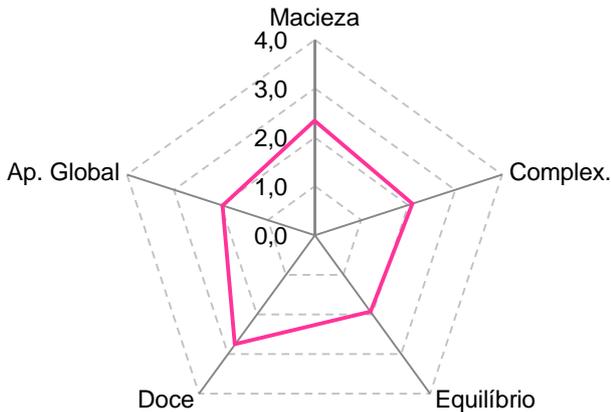
Os fermentados obtidos pelo isolado da espécie *H. opuntiae* não se destacaram em nenhum descritor quer no aroma orthonasal quer no retronasal (Figura 3.30). No entanto apresentou valores médios mais elevados para os descritores acetato de etilo, frutos secados no aroma orthonasal e retronasal. Tal como se verificou para os fermentados anteriores também neste foram detectados aromas a ácido acético e pútrido por dois provadores. Quanto ao sabor os fermentados obtidos foram caracterizados por alguma macieza, alguma complexidade e intensidade elevada para o doce, tendo sido considerado com baixa qualidade e menos equilibrado pelo painel de provadores.



(a) Aroma orthonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final

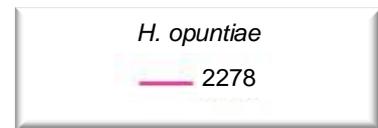
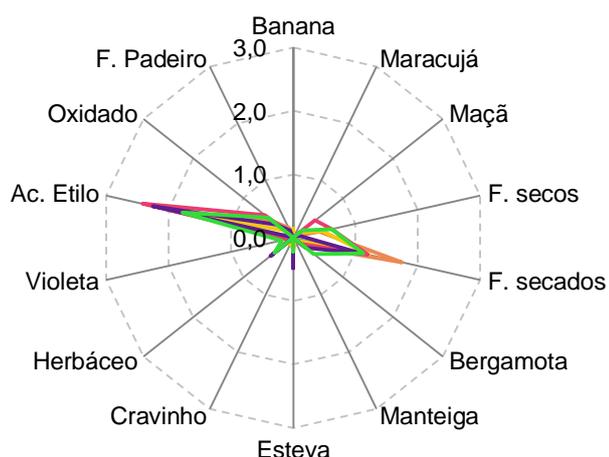
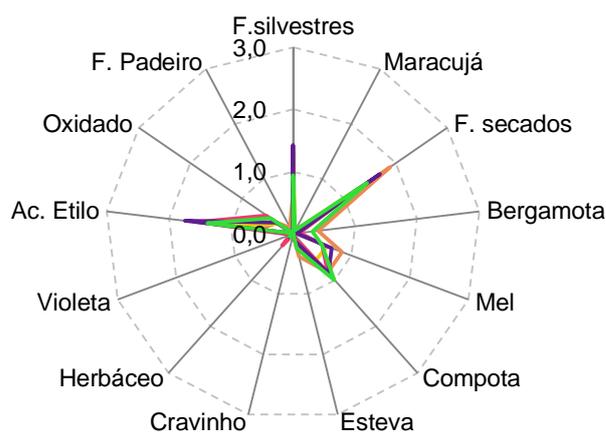


Figura 3.30: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *H. opuntiae*.

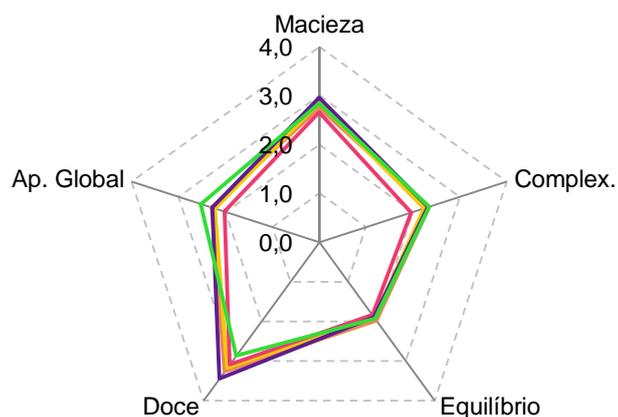
Já os isolados da espécie *H. uvarum* concederam aos fermentados aromas intensos a frutos secados em ambos os aromas (Figura 3.31). Para além destes outros descritores foram detectados como os frutos secos, acetato de etilo, herbáceo, esteva, bergamota e maçã para o aroma orthonasal. Já no aroma retronasal os fermentados foram caracterizados com menor intensidade para os descritores frutos silvestres, bergamota, compota, herbáceo, acetato de etilo, oxidado e mel. Os perfis dos diferentes fermentados são muito semelhantes, destacando-se apenas o descritor frutos secados para o aroma orthonasal. Também estes fermentados, foram marcados pelo acetato de etilo, embora com pequenas variações entre isolados. Apesar de haver efeito significativo da espécie não se revelou o mais intenso comparativamente com os outros fermentados.



(a) Aroma orthonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final

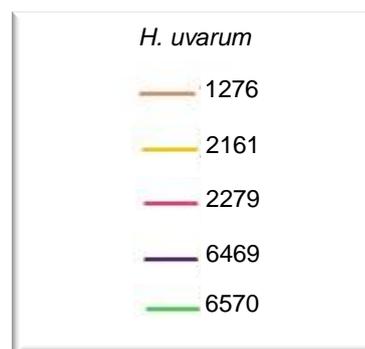


Figura 3.31: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *H. uvarum*.

Outras diferenças aromáticas foram observadas para alguns dos fermentados. Os fermentados obtidos pelo isolado TN65.70 caracterizaram-se por uma intensidade elevada para os descritores bergamota, frutos secos no aroma orthonasal, mas no retronasal apenas sobressaiu para o aroma compota. Já os fermentados obtidos pelo isolado TN64.69 destacaram-se com aromas a esteva e bergamota para o aroma orthonasal, enquanto que para o aroma de boca para além do já referido nomeadamente o acetato de etilo também se detectou o descritor frutos silvestres. Nos fermentados do isolado TN22.79 para além do acetato de etilo em ambos os aromas foi detectado maçã no aroma orthonasal e o defeito a oxidado para o aroma de boca. O aroma a ácido acético característico desta levedura foi detectado nos fermentados obtidos pelos isolados TN21.61 e TN64.69 por dois provadores. Segundo o que vem descrito na literatura a espécie *H.*

uvarum é tipicamente caracterizada pela elevada produção de ácido acético, acetato de etilo e acetaldeído, verificado também nos resultados obtidos.

Na caracterização final do sabor observou-se valores médios elevados para os parâmetros macieza, complexidade, doce, revelando-se no entanto fermentados pouco equilibrados, mas ainda assim com uma qualidade intermédia.

Os fermentados obtidos pelos isolados da espécie *I. orientalis* caracterizaram-se pelo aroma intenso a acetato de etilo tanto no aroma orthonasal como retronasal (Figura 3.32).

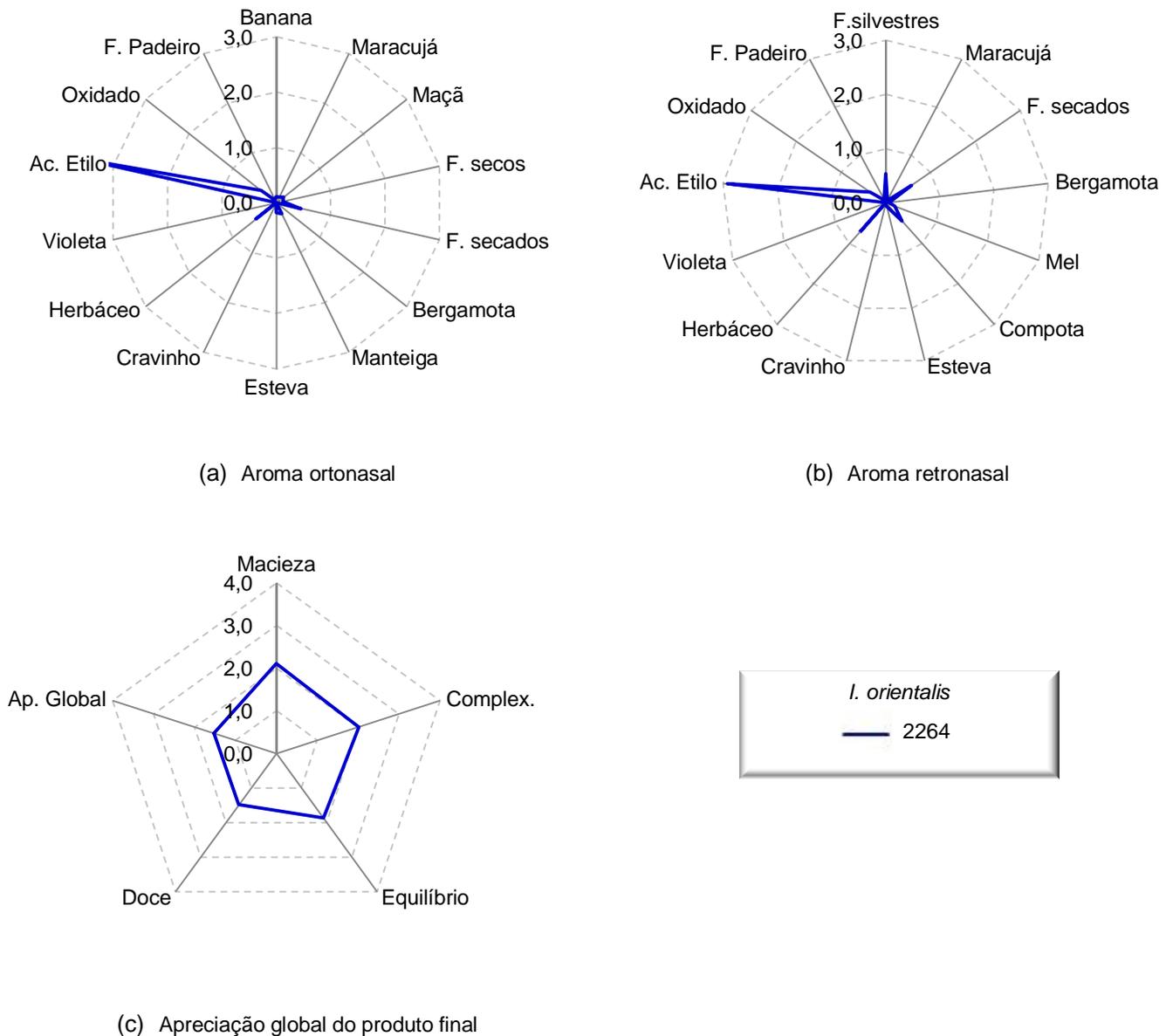


Figura 3.32: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *I. orientalis*.

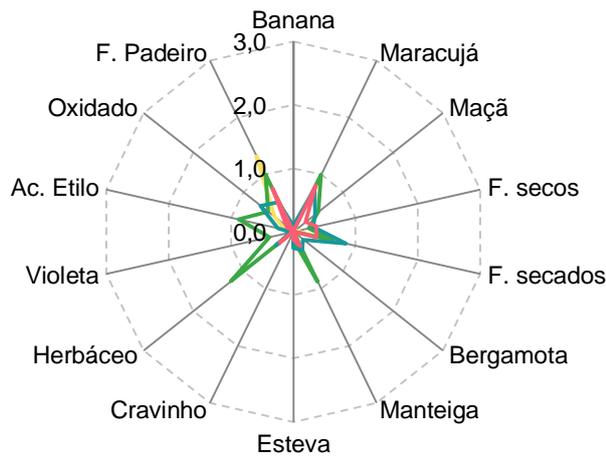
De todos os fermentados, os desta espécie apresentaram valores médios mais elevados para este descritor. Possivelmente por este facto, os restantes aromas detectados apresentaram uma

intensidade menor como o descritor herbáceo, esteva e frutos secados para o aroma ortonasal e frutos silvestres, frutos secados, herbáceo e compota para o aroma retronasal. Quatro provadores detectaram ainda a presença do aroma a ácido acético tanto no aroma ortonasal como retronasal, que pode ser explicado pelos valores elevados obtidos na acidez volátil. De todos os fermentados, o isolado da espécie *I. orientalis* produziu fermentados com uma qualidade muito baixa, reflectindo-se num fermentado pouco equilibrado, com valores médios baixos para a macieza, doce e complexidade. No entanto segundo Ugliano e Henschke (2009) em fermentações sequenciais com *S. cerevisiae* pode produzir uma intensidade elevada para notas frutadas.

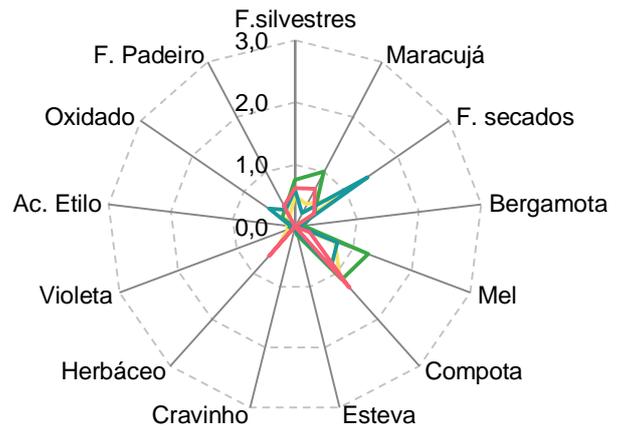
Os fermentados obtidos pelos isolados da espécie *I. terricola* apresentaram um aroma muito característico a maracujá para o aroma ortonasal e retronasal assim como a compota para este último, reflectindo-se numa intensidade elevada, comparativamente com os restantes fermentados (Figura 3.33). Uma intensidade aromática intermédia foi encontrada para os descritores manteiga e fermento de padeiro para o aroma ortonasal assim como os descritores fermento de padeiro e mel para o aroma de boca. Outros descritores caracterizaram os fermentados, no entanto com uma intensidade menor como os descritores frutos secados, herbáceo, acetato de etilo e oxidado no aroma ortonasal. No aroma retronasal uma diversidade aromática também foi observada através dos descritores frutos silvestres, frutos secados, bergamota, esteva e violeta.

Dos quatro isolados, verificou-se que os fermentados obtidos pelo isolado TN12.72 distinguiram-se nitidamente para a maioria dos descritores em ambos os aromas. Já os fermentados obtido pelo isolado TN11.70 destacaram-se para o fermento de padeiro no aroma ortonasal. Em relação aos fermentados obtidos pelo isolado TN23.68 destacou-se para a compota e herbáceo no aroma de boca. Outros descritores foram mencionados por alguns provadores como o aroma a pútrido, queijo, sulfídrico, uvas podres, suor de cavalo, manga, fumo, borracha e cozido em ambos os aromas.

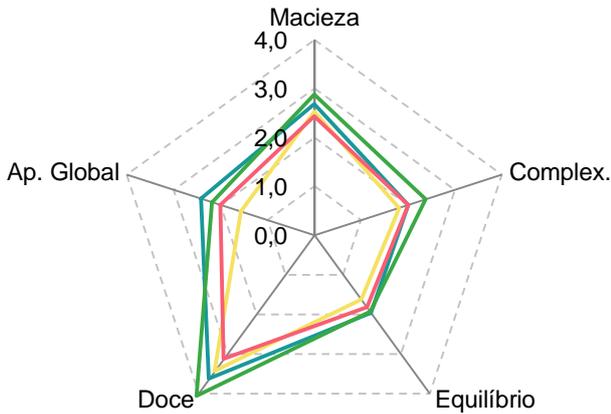
Os fermentados foram caracterizados com macieza, elevada intensidade para o doce, embora menos equilibrados e com menor complexidade. Na apreciação global os fermentados evidenciaram valores médios finais mais baixos. Na literatura esta espécie em fermentações puras confere aromas elevados a acetato de etilo e acetaldeído, aromas, que foram detectados na maioria dos fermentados dos isolados desta espécie (Ugliano e Henschke, 2009).



(a) Aroma orthonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final

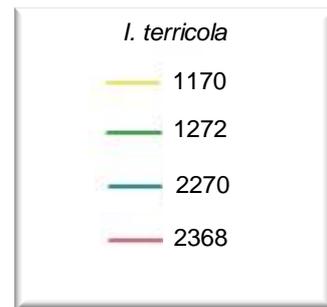
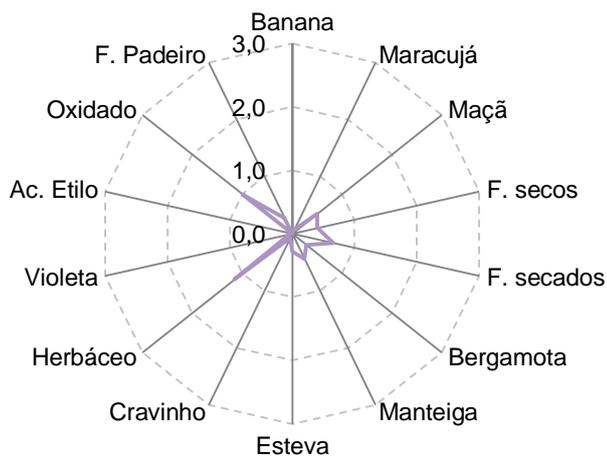
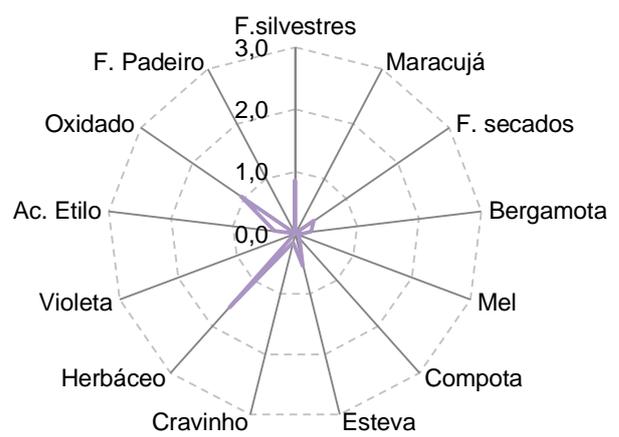


Figura 3.33: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *I. terricola*.

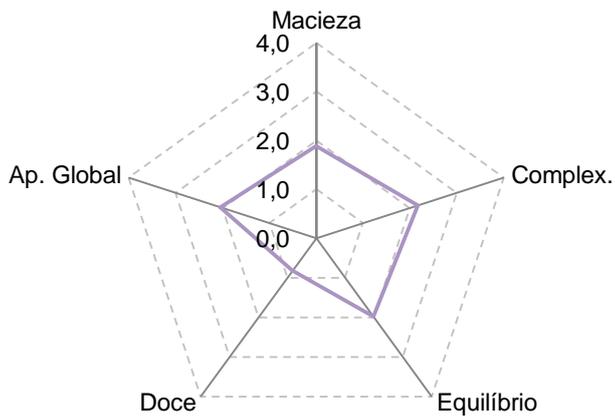
Observou-se um efeito altamente significativo da espécie, *Z. bailii* nos fermentados, para os descritores herbáceo em ambos os aromas, assim como para o descritor esteva e cravinho no aroma retronasal (Figura 3.34). Os fermentados evidenciaram também, intensidade moderada para os descritores manteiga, oxidado e maçã no aroma orthonasal e também o defeito a oxidado no aroma retronasal. Com intensidade menor foram ainda detectados para o aroma orthonasal os descritores frutos secos, frutos secados e bergamota, assim como os frutos silvestres e frutos secados para o aroma de boca.



(a) Aroma orthonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final

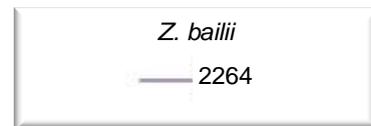
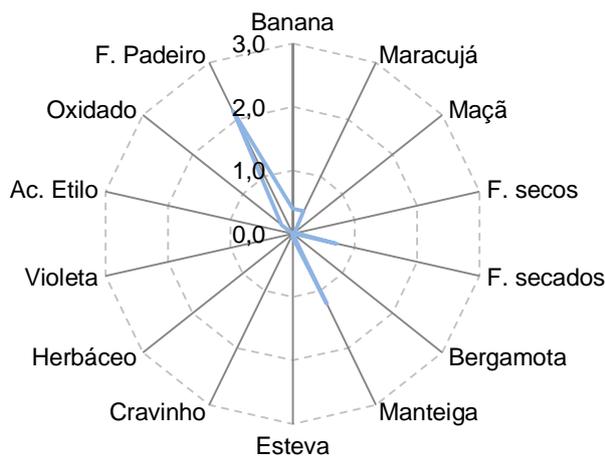


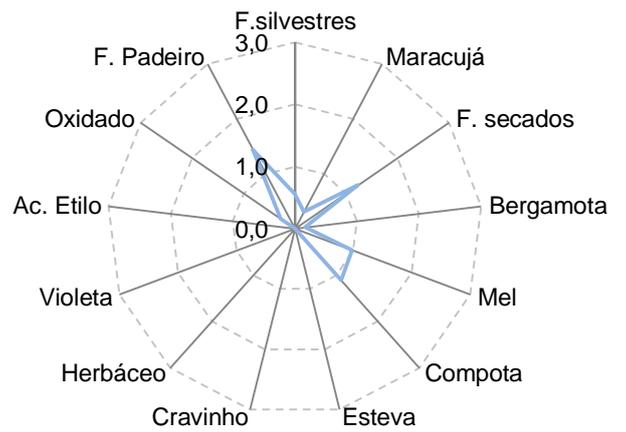
Figura 3.34: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *Z. bailii*.

O aroma a mofo foi detectado por três provadores, quer por via orthonasal quer retronasal. Os fermentados foram caracterizados com pouca complexidade e equilíbrio, assim como valores médios baixos para a macieza e pouca intensidade para o doce, apresentando uma qualidade intermédia.

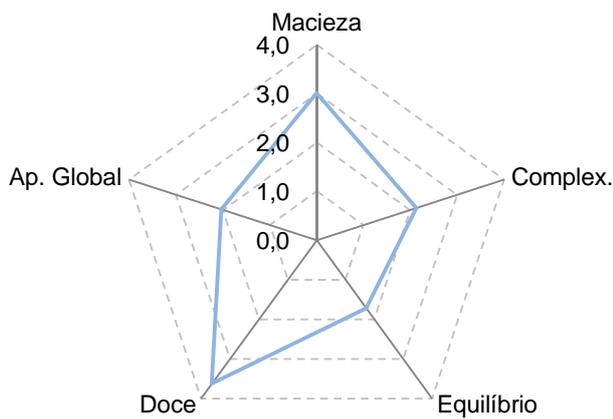
De todos os isolados, os isolados da espécie *Zygoascus hellenicus* apresentaram fermentados com um aroma a banana no aroma orthonasal (Figura 3.35).



(a) Aroma orthonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final

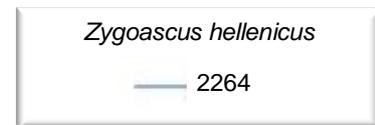
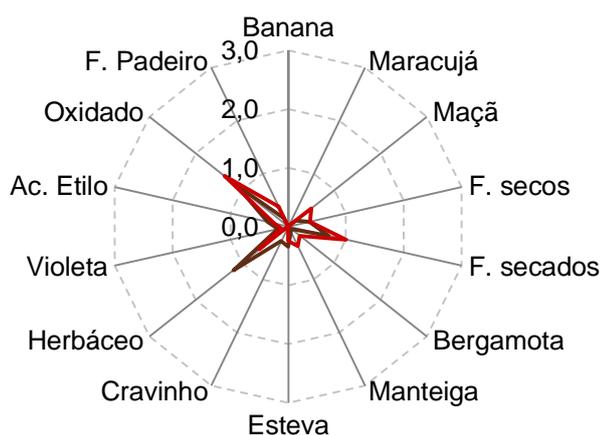


Figura 3.35: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *Zygoascus hellenicus*.

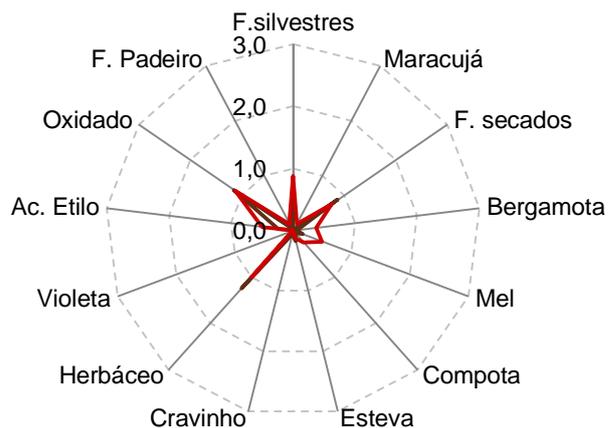
Para além disso, observou-se que a intensidade para os descritores manteiga e fermento de padeiro para o aroma orthonasal foi a mais elevada comparativamente com os outros fermentados. O mesmo também se constatou para o mel, compota e fermento de padeiro mas para o aroma de boca, embora a compota tenha sido detectada também com intensidade elevada noutro fermentado. Com menor intensidade evidenciaram-se os descritores frutos secados para o aroma orthonasal, assim como os frutos silvestres para o aroma retronasal. O aroma maracujá foi detectado com uma intensidade superior apenas no aroma retronasal. Dois provadores ainda caracterizaram estes fermentados com um aroma a queijo. De todos os fermentados, este distinguiu-se pelos valores médios elevados para a macieza e doce. No

entanto foi aquele que se revelou menos equilibrado, mas com valores intermédios para a complexidade, apresentando na apreciação global uma qualidade intermédia.

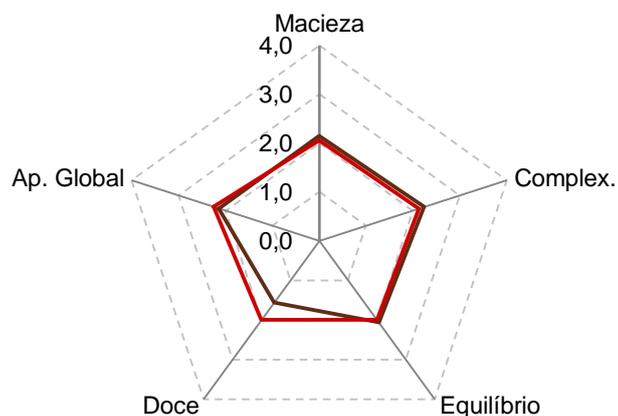
Os fermentados obtidos pelos isolados da espécie *Z. bisporus* apresentaram uma intensidade muito elevada para os descritores herbáceo e oxidado em ambos os aromas (Figura 3.36). Com intensidade intermédia foram encontrados uma variedade de descritores como os frutos secados, bergamota e esteva no aroma orthonasal.



(a) Aroma orthonasal



(b) Aroma retronasal



(c) Apreciação global do produto final



Figura 3.36: Perfil sensorial dos fermentados obtidos pelos isolados da espécie *Z. bisporus*

No aroma retronasal foram os descritores frutos silvestres, mel, e frutos secados. Verificou-se que existiram algumas diferenças aromáticas nos fermentados dos isolados TN11.71 e TN11.62,

este último com maior diversidade aromática, enquanto que, os fermentados do isolado TN11.71 se destacaram apenas para os descritores herbáceo em ambos os aromas, cravinho no aroma orthonasal e oxidado no aroma de boca. Foram ainda associados alguns aromas com um carácter menos positivo como borracha, flor, pútrido, ácido acético, sulfídrico, tinta e coentros, em ambos os aromas. Com a excepção da borracha que foi detectada por dois provadores os restantes descritores foram identificados respectivamente por um provador diferente. No final os fermentados foram caracterizados com alguma macieza, complexidade, equilíbrio e intensidade para o doce. Apesar de não ter uma diversidade aromática positiva os fermentados foram classificados com uma média final intermédia, revelando uma qualidade aceitável.

4. Conclusões

A vinha pode ser uma importante fonte de leveduras de interesse enológico, por esta razão, o presente estudo incidiu na caracterização da biota de leveduras presentes em uvas da casta Touriga Nacional, avaliando também características enológicas importantes que possam influenciar o aroma e sabor do vinho.

A análise dos perfis de restrição do segmento NL1-LR6 do gene da subunidade 26S do rRNA, obtidos para os diferentes isolados, permitiu discriminar 15 espécies de entre os 570 isolados identificados. A biblioteca de PRL do INIA-Dois Portos utilizada para a identificação dos isolados com base nesta análise revelou-se uma ferramenta prática e fiável para a generalidade das espécies encontradas. Os isolados cujos perfis de restrição que não tiveram correspondência com os da biblioteca de PRL foram sequenciados, correspondendo a 6 espécies. Para as espécies *H. uvarum* e *H. guilliermondii* foi necessário a adição de um teste de crescimento a 37 °C à qual *H. uvarum* não consegue crescer. Alguns dos perfis de restrição, assim como os isolados diferenciados por teste de temperatura foram confirmados através de sequenciação, observando-se uma boa correspondência da identificação.

Nas vinhas de Dois Portos, Palhacana e Montemor-o-Novo a diversidade de espécies detectadas foi diferente. Constatou-se uma maior biodiversidade de espécies para a vinha de Dois Portos. Para a vinha de Palhacana foi encontrado um maior número de espécies, mas a grande maioria dos isolados pertencia apenas a uma espécie e a biodiversidade foi menor. Devido à perda de viabilidade dos isolados das 48 horas da vinha de Montemor-o-Novo apenas foi estimada a biodiversidade das amostras obtidas no tempo inicial, sendo a biodiversidade mais baixa comparativamente com as restantes amostras.

Para as amostras de Dois Portos e de Palhacana observou-se uma maior diversidade de espécies para o tempo de 48 horas. A espécie mais detectada foi *H. uvarum*, sendo detectada em todas as vinhas seguida por *A. pullulans*, *H. guilliermondii*, *C. zemplinina*, *I. terricola* e *Z. bailii*. As espécies *C. diversa*, *C. railenensis*, *P. kluveri* var *kluveri*, *H. opuntiae*, *I. occidentalis*, *I. orientalis*, *C. californica*, *Cryptococcus albidus*, *P. membranifaciens* e *R. babjevae* foram apenas encontradas numa das vinhas.

Após a identificação foram seleccionados isolados de espécies diferentes de uvas em plena fermentação (perda de peso de 70 g/l) para caracterização enológica, tendo sido avaliados os perfis de fermentação, a formação de espuma assim como as características químicas e sensoriais obtidas para cada fermentado em cultura pura. Observou-se alguma variabilidade na espessura da espuma formada pelos isolados da mesma espécie. A comparação com a formação de espuma da levedura de referência LSA mostrou que esta produção foi idêntica.

Os isolados da espécie *C. diversa* apresentaram um perfil de fermentação com perda de peso relativamente rápida, no entanto, observou-se um teor elevado para os açúcares redutores demonstrando que esta espécie não conseguiu completar o processo fermentativo. Teores mais elevados foram também encontrados para acidez volátil, ácido málico, frutose e glicerol. Foi detectada fraca produção de H₂S. Em relação às características sensoriais os fermentados diferenciaram-se para os descritores frutos secos para o aroma ortonasal e frutos silvestres e compota ao nível do aroma de boca. Caracterizaram-se também pelos aromas a frutos secados em ambos os aromas e a mel apenas no aroma de boca. O facto de esta espécie ainda ter açúcares por fermentar, pode explicar o doce que caracterizou estes fermentados. Ainda assim apresentou macieza, complexidade, destacando-se pela sua qualidade.

Em relação ao perfil de fermentação dos isolados da espécie *C. zemplinina* observou-se uma rápida perda de peso comparativamente com os restantes, associando-se valores mais baixos para os açúcares redutores. Verificou-se também um consumo quase total da frutose e ainda alguma glucose por fermentar o que vem ao encontro do seu carácter frutofílico. Os fermentados ainda se destacaram para a produção elevada de glicerol e teor alcoólico. Na produção de H₂S existiu alguma variabilidade entre os isolados desta espécie com produção fraca, média e elevada. No entanto, foi no perfil sensorial que os fermentados desta espécie se evidenciaram com aromas associados à casta Touriga Nacional, nomeadamente a bergamota, esteva, violeta e frutos secados para o aroma ortonasal. No aroma de boca foram os descritores frutos secados e herbáceos que se destacaram. Globalmente foram os fermentados com melhor apreciação global.

Os isolados do género *Hanseniaspora* apresentaram perfis de fermentação idênticos. Apesar da elevada velocidade de fermentação constatou-se que não conseguiram fermentar todo o açúcar presente no mosto evidenciando valores muito elevados para a glucose e frutose. Para além disso detectaram-se valores elevados para a acidez volátil e acidez total associados a este género. Todas as espécies deste género apresentaram fraca a média produção de H₂S. Relativamente ao perfil sensorial os fermentados obtidos destacaram-se com o defeito a acetato de etilo, confirmando o que vem descrito na literatura (Ugliano e Henschke, 2009). Também se distinguiram os descritores frutos secados e oxidado em ambos os aromas e frutos silvestres no aroma de boca. Possivelmente devido ao defeito de aroma os fermentados foram caracterizados com baixa qualidade.

O perfil de fermentação da espécie *I. orientalis* revelou rápida perda de peso a qual foi muito elevada, tendo-se obtido valores baixos para os açúcares redutores, assim como para a glucose. Para além disso os fermentados exibiram um teor alcoólico elevado. Em relação à produção de H₂S foi um dos isolados que mais produziu este composto não tendo sido referido na análise sensorial. De todos os fermentados estes foram considerados os mais fracos qualitativamente.

De todas as espécies, observou-se para *I. terricola* uma baixa velocidade de fermentação, não conseguindo completar o processo fermentativo, o que se constatou também pelos valores muito

elevados de açúcares ainda presentes no fermentado e muito baixo teor alcoólico. Esta espécie foi caracterizada por média a elevada produção de H₂S e sensorialmente foram detectados aromas a sulfídrico, pútrido e uvas podres pelos provadores. No entanto, os aromas que mais distinguiram estes fermentados foram o descritor maracujá em ambos os aromas e compota no aroma de boca. Na apreciação global estes fermentados foram classificados com uma qualidade intermédia.

Relativamente à espécie *Z. bailii* o perfil de fermentação foi acelerado, com elevada perda de peso, correspondendo o mais elevado teor alcoólico e valores mais baixos para os açúcares redutores e frutose, reflectindo a capacidade desta espécie para a metabolização dos açúcares presentes no mosto e confirmando o seu carácter frutofílico. Caracterizou-se ainda com elevada acidez total. A produção de H₂S foi negativa. Nas características aromáticas, os fermentados destacaram-se nos descritores herbáceo em ambos os aromas e esteva e cravinho no aroma retronasal, sendo avaliados com uma qualidade intermédia.

Os isolados da espécie *Zygoascus hellenicus* apresentaram um perfil de fermentação muito lento. Também para esta espécie se verificou valores elevados dos açúcares redutores e para os seus constituintes, confirmando a não fermentação total dos açúcares. Os fermentados desta espécie apresentaram teores muito reduzidos para o grau alcoólico, acidez total e acidez volátil. A produção de H₂S foi negativa. De todos os fermentados, estes destacaram-se com elevada intensidade para o descritor manteiga e fermento de padeiro para o aroma ortonasal e mel, maracujá, compota, fermento de padeiro e frutos secados para o aroma de boca. Apesar de se revelarem menos equilibrados, apresentaram complexidade no sabor e uma qualidade intermédia.

A espécie *Z. bisporus* apresentou uma velocidade de fermentação relativamente elevada. Observou-se valores mais elevados para a acidez volátil, acidez total e teor alcoólico e mais reduzidos para os açúcares redutores e para frutose, indiciando um consumo preferencial deste açúcar. Esta espécie também não se revelou produtora de H₂S, embora na análise sensorial fosse referido aroma a pútrido. Sensorialmente destacou-se para o descritor cravinho no aroma ortonasal, herbáceo e oxidado em ambos os aromas. Foram detectados também os aromas maçã, frutos secos e secados no aroma ortonasal e frutos silvestres, compota, mel e oxidado no aroma de boca. Apesar de não se revelar muito aromático os fermentados obtidos pelos isolados de *Z. bisporus* revelaram uma qualidade aceitável.

Os fermentados dos isolados da espécie *C. zemplinina*, revelaram-se os mais aromáticos, com maior complexidade, macieza e apesar dos parâmetros corpo e persistência não terem efeito significativo da espécie, foram os que apresentaram valores médios mais elevados. Estes fermentados destacaram-se por evidenciarem os aromas característicos associados da casta Touriga Nacional. Será por isso importante, futuramente, testar os isolados da espécie *C. zemplinina* em cultura mista com *S. cerevisiae* em uvas da casta Touriga Nacional.

5. Referências Bibliográficas

Amaral, J.D., 1994. O Grande Livro do Vinho. *Círculo de Leitores*.

Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B., 2010. Effect of puré and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur. Food Res. Technol.*, **231**, 215-224.

Baleiras-Couto, M., Vogels, J.T.W.E., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J., van der Vossen, J.M.B.M., 1995. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. *J. App. Bacteriol.*, **79**, 525-535.

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

Barata, A., González, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A. e Loureiro, V. 2008. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 1008-1017.

Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D., 1990. *Yeasts: Characteristics and identification*. 2ª ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Beh, A.L., Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., Heard, G.M., 2006. Evaluation of molecular methods for the analysis of yeast in foods and beverages. *In: Advances in food mycology*, Volume 571 69-106.

Brites, J., Pedroso, V., 2000. Castas Recomendadas da Região do Dão. Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral, Centro de Estudos Vitivinícolas do Dão, pp 23.

Cadez, N., Poot, G. A., Raspor, P., Smith, M. Th., 2003. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov., and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1671-1680.

Caldeira, I., 2004. O aroma de aguardentes vónicas envelhecidas em madeira. Importância da tecnologia de tanoaria. Tese de Doutoramento. Instituto Superior de Agronomia, U.T.L., Lisboa.

Caldeira, I., Canas, S.S., Costa, S., Carvalho, E., Belchior, A.P., 1999. Formação de uma câmara de prova organoléptica de aguardentes velhas e selecção de descritores sensoriais. *Ciência Téc. Vitiv.*, **14**, 21-30.

Capece, A., Romaniello, R., Poeta, C., Siesto, G., Massari, C., Pietrafesa, R., Romano, P., 2011. Control of inoculated fermentations in wine cellars by mitochondrial DNA analysis of starter yeast. *Ann. Microbiol.*, **61**, 49-56.

Capece, A., Salzano, G., Romano, P., 2003. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *Int. J. Food Microbiol.*, **84**, 33-39.

Charoenchai, C., Fleet, G., Henschke, P., Todd, B., 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes *Aust. J. Grape and Wine Res.* **3**, 2-8.

Ciani M e Maccarelli F (1998) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 199–203.

Ciani, M., Comitini, F., 2011. *Non-Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol.*, **61**, 25-32.

Clarke, R.J., Bakker, J., 2004. *Wine Flavour Chemistry*. Blackwell, Publishing.

Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F., 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, **98**, 301-308.

Combina, M. Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.*, **99**, 237-243.

Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D., Valero, E., 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int. J. Food Microbiol.*, **145**, 132-139.

Costa, A. (2007). Caracterização molecular da biota de leveduras de uvas da casta Touriga Nacional. Relatório final de estágio de licenciatura. Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior Agrária, Bragança.

Curvelo-Garcia, A.S., 1988. Controlo de Qualidade dos Vinhos – Química Enológica – Métodos Analíticos. Instituto da Vinha e do Vinho.

Curvelo-Garcia, A.S., Godinho, M.C., 1988. Le dosage colorimétrique en flux continu des sucres réducteurs dans les vins. *Ciência Téc. Vitiv.*, **7**, 5-10.

De Benedictis, M., Blevé, G., Grieco, F., Tristezza, M., Tufariello, M., Grieco, F., 2010. An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures *Antonie v. Leeuwenhoek*, **99**, 189-200.

de Freitas, V. A. P., Ramalho, P.S., Azevedo, Z., Macedo, A., 1999. Identification of Some Volatile Descriptors of the Rock-Rose-Like Aroma of Fortified Red Wines from Douro Demarcated Region. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4327-4331.

Dizzy, M., Bisson, L.F., 2000. Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51**, 155–167.

Domizio, P., Romani, C., Comitini, F., Gobbi, M., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Potential spoilage non-*Saccharomyces* yeast in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol.*, **61**, 137-144.

Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int. J. Microbiol.*, **147**, 170-180.

Drumonde-Neves, J., Lima, M.T., Schuller, D., 2010. The biogeography of fermentative yeast populations from the vineyards of the Azores archipelago. In: XVIII Jornados de Biologia de Leveduras “*Nicolau van Uden*”.

Duarte, F. L., 2000. Perfis electroforéticos de isoenzimas na diferenciação de leveduras de interesse enológico. Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, Departamento de Biologia, Braga.

Duarte, F. L., Pais, C., Spencer-Martins, I., Leão, C., 1999. Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 1907-1913.

- Eiras-Dias, J., Faustino, R., Clímaco, P., Fernandes, P., Cruz, A., Cunha, J., Veloso, M., de Castro, R., 2011. Catálogo das Castas para Vinho Cultivadas em Portugal. Volume 1. Instituto da Vinha e do Vinho, Touriga Nacional.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 329-337.
- Falco da Costa, 2004. Caracterização do aroma de vinhos da *Vitis vinifera* L. var. Touriga Nacional. Tese de Doutorado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Falqué, E., Ferreira, A.C., Hogg, T., Guedes-Pinho, P., 2004. Determination of aromatic descriptors of Touriga Nacional wines by sensory descriptive analysis. *Flavour and Fragrance Journal*, **19**, 298-302.
- Fell, J.W., Statzell-Tallman, A., 1998. Descriptions of teleomorphic basidiomycetous genera and species. 86. *Rhodosporidium* Banno. In: *The yeasts, a taxonomic study*, 4^a ed. (Kurtzman, C.P.; Fell, J. W. eds) 67-68, Elsevier, Amsterdão.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A., 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1351-1371.
- Fernández, M., Úbeda, J.F., Briones, A.I., 2000. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *Int. J. Food Microbiol.*, **59**, 29-36.
- Fernández-Espinar, M.T., Martorell, P., de Llanos, R., Querol, A., Querol, A., 2006. Molecular methods to identify and characterize yeast in foods and beverages. In: *The Yeast Handbook – Yeast in Food and Beverages* (Querol, A., Fleet, F.T., eds), Heidelberg:Springer-Verlag, pp 55-82.
- Fleet, G. H., 2003. Yeast interactions and wine flavor. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 11-22.
- Fleet, G. H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.*, **8**, 979–995.
- Fleet, G.H., 1993. The microorganisms of winemaking— isolation enumeration and identification. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp 1-27.
- Ganga, M., Martínez, C., 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 76-83.
- García, V., Vásquez, H., Fonseca, F., Manzanares, P., Viana, F., Martínez, C., Ganga, M. A., 2010. Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. *Revista Argentina de Microbiología*, **42**, 226-229.
- Guedes de Pinho, P., Falqué, E., Castro, M., Oliveira e Silva, H., Machado, B., Silva Ferreira, A. C., 2007. Further Insights into the Floral Character of Touriga Nacional Wines. *J. Food Sci.*, **72**, 396-401.
- 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.
- Harrigan, W.F., 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*, 3^a ed., Academic Press.
- Hierro, N., González, A., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res.*, **6**, 102-111.
- Jackson, R. A., 2002. *Wine Tasting: A Professional Handbook*. Academic Press, San Diego, CA.

Jolly, N., Augustyn, O., Pretorius, I., 2003. The use of *Candida pulcherrima* in Combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of Chenin blanc Wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **24**, 63-69.

Jolly, N., Augustyn, O., Pretorius, I., 2006. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **27**, 15-39.

Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie v. Leeuwenhoek*, **73**, 331-371.

Kurtzman, C.P., 1994. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, **10**, 1727-1740.

Kurtzman, C.P., 1998. Descriptions of teleomorphic ascomycetous genera and species. 42. *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. In: *The yeasts, a taxonomic study*, 4^a ed. (Kurtzman, C.P.; Fell, J. W. eds) 273-352, Elsevier, Amesterdão.

Kurtzman, C.P., Blanz, P.A., 1998. Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships. In: *The Yeasts, a taxonomic study*, 4^a ed. (Kurtzman, C.P., Fell, J.W. eds) 49-54, Elsevier, Amesterdão.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (eds.), 1998. *The Yeasts, a taxonomic study*. 4^aed., Elsevier, Amesterdão.

Kutyna, D. R., Varela, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Stanley, G. A., 2010. Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 293-302.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma – A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **21**, 97-129.

Loureiro, V., e Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeast in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 23-50.

Magyar, I., Tóth, T., 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.*, **28**, 94-100.

Malfeito-Ferreira, M., 2010. Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. *Ann. Microbiol.*, **61**, 95-102.

Manzanares, P., Vallés, S., Viana, F., 2011. Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Winemaking Process. In: *Molecular Wine Microbiology*, (Carrascosa, A.V., Munoz, R., González, R. eds), 85-105, Elsevier, Amesterdão.

Marques Gomes, J.V., Babo, M.F.S., Guimarães, A., F., 1962. Selecção e emprego de leveduras seleccionadas na Região dos Vinhos Verdes. *Estudos Notas e Relatórios*, **5**, 11-38.

Martínez, J., Toledano, F., Millán, C., Ortega, J., 1990. Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from 'Pedro Ximenez' grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food Microbiol.*, **7**, 217-225.

Martínez-Rodríguez, A., Carrascosa, A.V., Barcenilla, J.M, Pozo-Bayón, M.A., Polo, M.C., 2001. Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiol.*, **18**, 183-191.

Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Lage, P., Mendes-Faia, A., 2011. The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality. *Ciência Téc. Vitiv.*, **26**, 17-32.

- Mendes-Ferreira, A., Clímaco, M.C., Mendes- Faia, A., 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma componentes – a preliminary study. *J. Appl. Microbiol.*, **91**, 67-71.
- Meyer, S.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 1998. Descriptions of anamorphic ascomycetous genera and species. 64. *Candida* Berkhout. In: *The yeasts, a taxonomic study*, 4^a ed. (Kurtzman, C.P.; Fell, J. W. eds) 454-573, Elsevier, Amesterdão.
- Moreia, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J.A., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2011. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control.*, **22**, 662-667.
- Moreira, N., Guedes de Pinho, P., Vasconcelos, I., 2004. Method for analysis of heavy sulphur compounds using gas chromatography with flame photometric detection. *Analytica Chimica Acta*, **513**, 183-189.
- Moreira, N., Mendes, F., de Pinho, R., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *Int. J. Food Microbiol.*, **124**, 231-238.
- Moreno, C.E., 2001. Métodos para medir la biodiversidad: M&T – Manuales y Tesis SEA, vol.1, Zaragoza, Espanha, 84 pp.
- Mortimer, R., Polsinelli, M, 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.*, **150**, 199-204.
- Naes, T., Risvik, E., 1996. *Multivariate Analysis of Data in Sensory Science*. Elsevier Science, vol16.
- Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E., Nychas, G.J.E., 2007. Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentattions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6705-6713.
- Ocón, E., Gutiérrez, A. R., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., 2010. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiol.*, **27**, 1023-1027.
- Pais, A. 2010. Vinificação de uvas afectadas por podridão ácida. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, U.T.L., Lisboa.
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.*, **4**, 865-877.
- Pretorius, I., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, **16**, 675-729.
- Pretorius, I., Van Der Westhuizen, T. J., and Augustyn, O. P. H., 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **20**, 61-75.
- Rainieri, S., Pretorius, I.S., 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.*, **50**, 15-31.
- Ramos, P. (2007). Caracterização da zimobiota associada a algumas castas portuguesas. Trabalho de fim de curso de licenciatura. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, Caparica.

Raspor, P., Milek, D., Polanc, J., Mozina, S., Cadez, N., 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int. J. Food Microbiol.*, **109**, 97-102.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud, A., 2006. *The Handbook of Enology – The Microbiology of Wine and Vinifications*, 2^a ed., Vol. 1.

Rojas, V., Gil, J.V., Pinaga, F., Manzanares, P., 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 181-188.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003a. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 169-180.

Romano, P., Granchi, L., Caruso, M., Borra, G., Palla, G., Fiore, C., Ganucci, D., Caligiani, A., Brandolini, V., 2003b. The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**, 163-168.

Rose A. H., Harrison J. S. (Eds). 1987. *The Yeasts*, Vol. I, 2^a Ed., Academic Press, London.

Saez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.E., Sangorrín, M., 2011. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiol.*, **28**, 503-509.

Sampaio, J.P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F.L., Pais, C., Fonseca, Á., Fell, J.W., 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 687-697.

San Romão, M.V., Belchior, A.P., Carneiro, L.C., 1982. Alguns elementos para a caracterização enológica da microflora levuriana da região do Oeste. *Ciência Téc. Vitiv.*, **1** (2), 83-100.

Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, **26**, 1135-1145.

Silva, J. J. I., 2003. Ocorrência e diversidade de leveduras no filoplano de plantas seleccionadas do parquet natural da Serra da Arrábida. Tese de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Caparica.

Sipiczki, M., 2004. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *J. Basic Microbiol.* **44**, 471-479.

Smith, M.Th., 1998. Descriptions of teleomorphic ascomycetous genera and species. 34. *Hanseniaspora* Zikes. In: *The yeasts, a taxonomic study*, 4^a ed. (Kurtzman, C.P.; Fell, J. W. eds) 214-220, Elsevier, Amesterdão.

Soden, A., Francis, I., Oakey, H. and Henschke, P., 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **6**, 21–30.

Soleas, G. J., Diamandis, E. P. and Goldberg, D. M., 1997. Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **11**, 287–313.

Strauss, M., Jolly, N., Lambrechts, M., van Rensburg, P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 182-190.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **11**, 139-173.

Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., 2007. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 954-960.

- Ugliano, M., Henschke, P.A., 2009. Yeasts and Wine Flavour. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*, (Moreno-Arribas, M.V., Polo, C., Polo, M.C. eds.), 314-374, Springer, Madrid.
- Tofalo, R., Schirone, M, Telera, G. C., Manetta, A. C., Corsetti, A., Suzzi, G., 2010. Influence of organic viticulture on non-*Saccharomyces* wine yeast populations. *Ann. Microbiol.*, **61**, 57-66.
- Towner, K. J., Cockayne, A., 1993. *Molecular methods for microbial identification and typing*. Chapman & Hall, Londres.
- van Keulen, H., Lindmark, D.G., Zeman, K.E., Gerlosky, W., 2003. Yeast present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie v. Leeuwenhoek*, **83**, 149-154.
- van Zyl, J.A., Du Plessis, L.D.W., 1961. The Microbiology of South African Winemaking. Part 1. The Yeast Occurring in Vineyards Must and Wines. *South Afr. J. Agric. Sci.*, **4**, 393-403.
- var der Vossen, J.M., Hofstra, H., 1996. DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *Int. J. Food Microbiol.*, **33**, 35-49.
- Viana, F., Gil, J., Genoves, S., Valles, S., Manzanares, P., 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.*, **25**, 778-785.
- Vilanova, M., Zamuz, S., Tardáguila, J., Masa, A., 2008. Descriptive analysis of wines from *Vitis vinifera* cv. Albarino. *J. Sci. Food Agric.*, **88**, 819-823.
- Wu, Z.W., Robert V., Bai, F.Y., 2006. Genetic diversity of the *Pichia membranifaciens* revealed from rRNA gene sequencing and electrophoretic karyotyping, and the proposal of *Candida californica* comb. nov. *FEMS Yeast Res.*, **6**, 305-311.
- Yamazaki, M., Kurtzman, C.P., Sugiyama, J., 1998. Ultrastructural and molecular properties used for yeast classification. 7. Electrophoretic comparisons of enzymes. In: *The Yeasts, a taxonomic study*, 4^a ed. (Kurtzman, C.P., Fell, J.W. eds) 49-54, Elsevier, Amesterdão.
- Zanol, G., Baleiras-Couto, M., Duarte, F., 2010. Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. *Ciência Téc. Vitiv.*, **25**, 75-85.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int. J. Food Microbiol.*, **125**, 197-203.

Anexo I – Meios de cultura e soluções

Meio de cultura

Meio YPD

Extrato de levedura	5 g/l (Cultimed)
Bacto-Peptona	10g/l (Cultimed)
Glucose	20 g/l (Panreac)
Agar	20 g/l (Difco)

Soluções para extracção de DNA, PCR e visualização de bandas

Tampão Lise

Tris	50 mM (Sigma - Aldrich)
NaCl	250 mM (Sigma - Aldrich)
EDTA	50 mM (Sigma – Aldrich)
SDS	0,3 % (p/v) (Sigma – Aldrich)
Ajustar a pH 8.	

Acetato de sódio

Acetato de sódio	3M, pH 5.2 (Sigma – Aldrich)
------------------	------------------------------

Tampão TE

Tris	10 mM (Sigma – Aldrich)
EDTA	1 mM
Ajustar a pH 8.	

TBE 5 x (Merck)

Tris Borato	0,45 M
EDTA	0,01 M
pH 8.3	

Brometo de etídio (Merck)

Brometo de etídio	0,5 µg/ml
-------------------	-----------

Marcador 1 kb DNA Ladder, MBI Fermentas

Marcador preparado a partir de seis plasmídeos diferentes contendo sequências genômicas de pUC, fago λ e levedura, os quais são individualmente digeridos com endonucleases de restrição adequadas. O tamanho dos fragmentos está compreendido entre 250 a 10000 pb. Concentração de 0,5 $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$, fornecido em solução de armazenamento (*Storage Buffer*) com a composição: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) e 1 mM EDTA.

Marcador 100 bp Ladder, MBI Fermentas

Marcador preparado a partir do plasmídeo pME-80J3 DNA contendo sequências genômicas de pUC, fago λ e levedura. O tamanho dos fragmentos está compreendido entre 100 a 1000 pb. Concentração de 0,1 $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$, fornecido em solução de aplicação (gel *Loading buffer*) com a constituição: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, 0,015 % azul de bromofenol, 0,015 % xileno cianol FF e 10 % de glicerol

Marcador Lambda DNA /HindIII, MBI, Fermentas

Este marcador é pré-misturado com um tampão de armazenamento e preparado de modo a obter uma concentração de DNA total de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e pode ser aplicado directamente sobre um gel de agarose. O tamanho dos fragmentos está compreendido entre 125 a 23130 pb. A constituição do tampão de armazenamento: 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03 % de azul de bromofenol, 0,03 % cianol xileno FF, 60 % glicerol e 60 mM de EDTA. Para a sua utilização o fabricante recomenda um aquecimento durante 5 minutos a 65 °C e colocado em gel por 3 minutos.

Tampão de digestão das enzimas de restrição, 10 x***Apal* (MBI, Fermentas)**

Constituição: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl_2 e 0,1 mg/ml BSA. Incubação a 37 °C.

***HinfI* (MBI, Fermentas)**

Constituição: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl_2 , 100 mM KCl e 0,1 mg/ml BSA. Incubar a 37 °C.

***MseI* (MBI, Fermentas)**

Constituição: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl_2 , 100 mM KCl e 0,1 mg/ml BSA. Incubar a 65 °C.

Enzima Taq polimerase (MBI Fermentas, 5U/ μ l)

A enzima é fornecida num tampão de armazenamento (*Storage Buffer*) com a composição: 20 mM; Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0,5 % Nonidet P40, 0,5 % Tween 20 e 50 % glicerol.

Tampão PCR (MBI Fermentas)

Tampão PCR 10 x com KCl: 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, 0,8 % Nonidet P40.

Composição e preparação de Loading Dye 6x

Composição: 10 mM Tris/HCl, 0,03 % de azul bromofenol, 0,03 % de xileno cianol, 60 % glicerol e 60 mM EDTA. Preparou-se 10 ml de Loading Dye 6 x, adicionando todos os reagentes em balão aferido de 10 ml e perfazendo o volume final com SUPW.

Preparação de agarose

Levou-se à ebulição a mistura da solução de TBE 0,5 x com a agarose (Invitrogen) no microondas (Panasonic) até que a solução ficasse completamente transparente e não se observassem partículas em suspensão. Deixou-se arrefecer a solução à temperatura ambiente e verteu-se o líquido num molde apropriado, o qual já tinha encaixado o pente que determinada os poços existentes no gel. A sua polimerização demorou aproximadamente 30 minutos, onde foi mergulhado posteriormente na solução de TBE 0,5 x, presente na tina de electroforese.

Quantificação do DNA

Tabela I.1: Preparação das concentrações do marcador λ DNA / HindIII.

		Concentrações			
		50 ng	100 ng	200 ng	300 ng
Preparação λ DNA	Marcador	0,5 μ l	1,0 μ l	2,0 μ l	3,0 μ l
	Loading Dye 6 x	2,0 μ l	2,0 μ l	2,0 μ l	2,0 μ l
	SUPW	7,5 μ l	7,0 μ l	6,0 μ l	5,0 μ l

Tabela I.2: Preparação das amostras de DNA purificado.

Preparação amostra	DNA	1,0 μ l
	Loading Dye 6 x	2,0 μ l
	SUPW	7,0 μ l

Soluções utilizadas na caracterização enológica

Solução utilizada na preparação do pré-inóculo

Solução diluição

Cloreto de sódio	8,5 g/l (Sigma – Aldrich)
Triptona	1,0 g/l (Cultimed)

Solução Saturada de Acetato de Chumbo utilizada para a produção de H₂S

Acetato de chumbo (AnalaR) 60 g /100 ml de água.

Soluções utilizadas na análise sensorial

Solução hidroalcolica a 12 % (v/v)

Solução preparada a partir de etanol absoluto, com uma pureza de 99,5 %. Preparou-se 2 L desta solução medindo-se 241,2 ml de etanol e perfazendo o volume final com água destilada.

Preparação das soluções de aroma

Preparou-se cada um dos aromas em copos de 250 ml contendo 100 ml de solução hidroalcolica a 12 % (Tabela I.3). Deixou-se este preparado durante 1 hora mas aromas como a madeira, tipo laranja, amêndoa deixou-se pelo menos 24 horas em solução. Transferiu-se no final para frascos de 100 ml com tampa e armazenados a 4 °C até à sua utilização.

Tabela I.3: Aromas e respectiva preparação em solução hidroalcoólica a 12 % (v/v).

Descritor	Preparação
Chocolate	Chocolate em pó
Esteva	Maceração do ramo da planta
Manteiga	Manteiga meio gorda
Tipo laranja	Maceração de casca de tangerina
Passas de uva	Maceração de passas de uvas
Herbáceo	Maceração de espinafres
Compota	Junção de doce de tomate com doce de abóbora
Mentol	Vick vaporub
Caramelo	Caramelo líquido
Maçã	Refresco em pó com aroma a maçã
Noz	Maceração de fruto seco de noz
Eucalipto	Maceração de folhas de eucalipto
Maracujá	Refresco em pó com aroma a maracujá
Bergamota	Chá de bergamota
Pimenta branca	Pimenta branca em grão
Rosa e violeta	Chá de rosa e violetas
Passas de figo	Maceração de passas de figo
Banana	Acetato de isoamilo
Mel	Mel caseiro
Cravinho	Cravinho em grão
Frutos vermelhos	Sumo de frutos vermelhos
Madeira	Raspas de madeira de carvalho americano de queima ligeira
Amêndoa	Maceração de fruto seco de amêndoa
Oxidado	Gota de acetaldeído

Escala estática de intensidade odorante

Esta escala é constituída por uma série soluções aquosas de 1-butanol (AnalaR) (não tóxico, odor distinto, não sendo desagradável) de concentração crescente em progressão geométrica, em que cada solução difere da seguinte por um factor de dois.

Com base no trabalho de Falco da Costa, (2004) seleccionou-se 5 intensidades odorantes referentes às concentrações de 20, 80, 320, 1280 e 5120 ppm. Estas soluções foram preparadas antes de cada sessão de prova em água destilada inodora e fornecidas aos provadores individualmente, sendo apresentadas em frascos de vidro e inodoros.

Anexo II – Descrição do ensaio

Fotografias da vinha

Este estudo contempla isolados obtidos a partir de uvas da casta Touriga Nacional do ano de 2007. As uvas foram colhidas em três regiões distintas nomeadamente Dois Portos, Palhacana e Montemor-o-Novo (Figura II.1, II.2 e II.3).



Figura II.1: Localização das amostras TN11 e TN12 na vinha da região de Dois Portos.

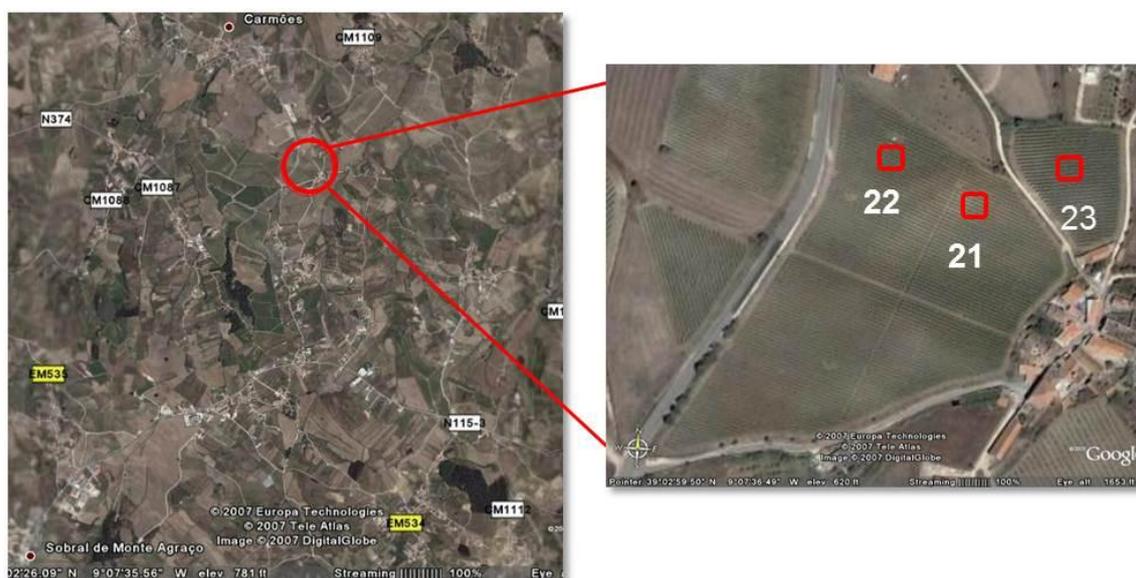


Figura II.2: Localização das amostras TN21, TN22 e TN23 na vinha da região de Palhacana.



Figura II.3: Localização das amostras TN61, TN62, TN64, TN65 e TN66 na vinha da região de Montemor-o-Novo.

Recolha das amostras e fermentação

Foram colhidas, em condições de assepsia aproximadamente 2 kg de uva da casta Touriga Nacional das localizações assinaladas nas figuras II.1, II.2 e II.3. As uvas colhidas foram colocadas directamente em sacos estéreis (Sterile Sampling Bags – VWR internacional) e postas numa geleira térmica transportada a baixa temperatura.

No laboratório, as uvas foram esmagadas manualmente dentro dos respectivos sacos, mantendo sempre as condições de assepsia através de uma câmara de fluxo laminar (Câmara de fluxo laminar: FluFrance). O líquido resultante do esmagamento das uvas foi transferido para frascos esterilizados de 500 ml (Duran ou Simax) e colocados em estufa a 25 °C (Fitoclima: 750E, Aralab). A fermentação foi monitorizada através de pesagens diárias dos frascos para avaliar a quantidade de CO₂ perdido.

Isolamento

Procedeu-se à recolha imediatamente das amostras (0 horas), às 48 horas após o esmagamento e assim que a perda de dióxido de carbono atingiu 70 g/L. Após a realização de diluições seriadas, fez-se a inoculação das amostras por espalhamento à superfície com vareta de vidro. Foram realizados plaqueamentos, em duplicado, em meio sólido YPD [extracto de levedura 0,5 % (p/v); peptona 1,0 % (p/v); glucose 2,0 % (p/v); adicionado 2,0 % (p/v) de agar] com 0,01 % (p/v) de cloranfenicol (Sigma), um inibidor de bactérias e 0,02 % (p/v) de difenilo (BDH), um inibidor de fungos. Para cada amostragem isolaram-se 30 colónias de leveduras por placa, tendo em conta o aspecto macromorfológico, isto é, pelo menos uma colónia diferente e as restantes colónias isoladas aleatoriamente. Foi realizada a purificação da cultura obtida através de placas de isolamento em meio sólido YPD. Cada isolado obtido foi conservado numa solução de glicerol a 30 % (v/v) e guardados a -80 °C.

Anexo III – Identificação dos isolados

Tabela III.1: Identificação dos isolados das amostras TN61 e TN62 das 0 horas, com base na biblioteca de PRL.

TN61	Identificação	% Sem.	Observações	TN62	Identificação	% Sem.	Observações
1	<i>A. pullulans</i>	83,3 %	1=2=3=4	1	Perdeu viabilidade	-	
2	<i>A. pullulans</i>	71,4 %	1=2=3=4	2	<i>A. pullulans</i>	60,0 %	2=5=20=23=19
3	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	1=2=3=4	3	Perdeu viabilidade	-	
4	<i>A. pullulans</i>		1=2=3=4	4	Perdeu viabilidade	-	
5	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	5=22=24	5	<i>A. pullulans</i>	60,0 %	2=5=20=23=19
6	<i>A. pullulans</i>	85,7 %		6	<i>H. uvarum</i>		6=8=10
7	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	7=10	7	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	7=26
8	<i>A. pullulans</i>	92,3 %		8	<i>H. uvarum</i>		6=8=10
9	Perdeu viabilidade	-		9	Perdeu viabilidade	-	
10	<i>A. pullulans</i>		7=10	10	<i>A. pullulans</i>	85,7 %	6=8=10
11	<i>A. pullulans</i>		11=12=14=19=20=21=23	11	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	11=12
12	<i>A. pullulans</i>		11=12=14=19=20=21=23	12	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	11=12
13	<i>A. pullulans</i>		13=16	13	<i>A. pullulans</i>		13=15=17=18
14	<i>A. pullulans</i>	76,9 %		14	Perdeu viabilidade	-	
15	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	15=17	15	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	13=15=17=18
16	<i>A. pullulans</i>	76,9 %		16	Perdeu viabilidade	-	
17	<i>A. pullulans</i>		15=17	17	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	13=15=17=18
18	<i>A. pullulans</i>	92,3 %		18	<i>A. pullulans</i>		13=15=17=18
19	<i>A. pullulans</i>	92,3 %		19	<i>A. pullulans</i>		2=5=20=23=19
20	<i>A. pullulans</i>	92,3 %		20	<i>A. pullulans</i>		2=5=20=23=19
21	<i>A. pullulans</i>		11=12=14=19=20=21=23	21	Perdeu viabilidade	-	
22	<i>A. pullulans</i>		5=22=24	22	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	22=24
23	<i>A. pullulans</i>		11=12=14=19=20=21=23	23	<i>A. pullulans</i>		2=5=20=23=19
24	<i>A. pullulans</i>		5=22=24	24	<i>A. pullulans</i>		22=24
25	Perdeu viabilidade	-		25	<i>A. pullulans</i>		25=27=28=29
26	Perdeu viabilidade	-		26	<i>A. pullulans</i>		7=26
27	Perdeu viabilidade	-		27	<i>A. pullulans</i>		25=27=28=29
28	<i>A. pullulans</i>	85,7 %	28=29	28	<i>A. pullulans</i>		25=27=28=29
29	<i>A. pullulans</i>		28=29	29	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	
30	<i>Cryptococcus albidus</i>	82,3 %		30	<i>A. pullulans</i>	85,7 %	

Tabela: III.2: Identificação dos isolados da amostra TN63 e TN64 das 0 horas, com base na biblioteca de PRL.

TN63	Identificação	% Sem.	Observações	TN64 ¹	Identificação	% Sem.	Observações
1	<i>A. pullulans</i>	92,3 %		1	<i>A. pullulans</i>		1=4=5
2	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	2=3	2	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	
3	<i>A. pullulans</i>		2=3	3	<i>A. pullulans</i>		3=7
4	<i>A. pullulans</i>		4=10	4	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	1=4=5
5	<i>A. pullulans</i>	83,3 %		5	<i>A. pullulans</i>		1=4=5
6	<i>A. pullulans</i>	92,3 %		6	<i>H. guilliermondii</i>	100,0 %	
7	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	7=8=9	7	<i>A. pullulans</i>	85,7 %	3=7
8	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	7=8=9	8	<i>A. pullulans</i>	85,7 %	8=13=9=14=15=18
9	<i>A. pullulans</i>		7=8=9	9	<i>A. pullulans</i>		8=13=9=14=15=18
10	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	4=10	10	<i>A. pullulans</i>		10=11=12=16
11	<i>A. pullulans</i>	92,3 %		11	<i>A. pullulans</i>		10=11=12=16
12	<i>A. pullulans</i>	92,3 %		12	<i>A. pullulans</i>		10=11=12=16
13	<i>A. pullulans</i>		13=15=16=17=18	13	<i>A. pullulans</i>		8=13=9=14=15=18
14	Perdeu viabilidade	-		14	<i>A. pullulans</i>		8=13=9=14=15=18
15	<i>A. pullulans</i>		13=15=16=17=18	15	<i>A. pullulans</i>		8=13=9=14=15=18
16	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	13=15=16=17=18	16	<i>A. pullulans</i>		10=11=12=16
17	<i>A. pullulans</i>		13=15=16=17=18	17	<i>A. pullulans</i>	83,3 %	
18	<i>A. pullulans</i>		13=15=16=17=18	18	<i>A. pullulans</i>		8=13=9=14=15=18
19	<i>A. pullulans</i>	85,7 %	19=21=23=24	19	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	
20	Perdeu viabilidade		Não existe				
21	<i>A. pullulans</i>		19=21=23=24				
22	Perdeu viabilidade		Não existe				
23	<i>A. pullulans</i>		19=21=23=24				
24	<i>A. pullulans</i>		19=21=23=24				
25	<i>A. pullulans</i>	85,7 %	25=26=27				
26	<i>A. pullulans</i>		25=26=27				
27	<i>A. pullulans</i>		25=26=27				
28	<i>A. pullulans</i>	80,0 %	28=30				
29	<i>A. pullulans</i>	85,7 %					
30	<i>A. pullulans</i>		28=30				

¹ Os restantes isolados perderam viabilidade.

Tabela III.3: Identificação dos isolados da amostra TN65 e TN66 das 0 horas, com base na biblioteca de PRL.

TN65	Identificação	% Sem.	Observações	TN66	Identificação	% Sem.	Observações
1	<i>A. pullulans</i>	93,3 %		1	<i>H. uvarum</i>	100,0 %	
2	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	2=3=6=11=12=20	2	<i>A. pullulans</i>	83,3 %	
3	<i>A. pullulans</i>	85,7 %	2=3=6=11=12=20	3	<i>H. uvarum</i>	100,0 %	
	<i>uccus flasvescens</i>	86,7 %		4	<i>H. guilliermondii</i>	100,0 %	
	<i>ins</i>	92,3 %		5	<i>H. guilliermondii</i>	100,0 %	
	<i>ins</i>	80,0 %	2=3=6=11=12=20	6	<i>H. guilliermondii</i>	100,0 %	
	<i>ins</i>	80,0 %	7=8=9	7	<i>H. guilliermondii</i>	100,0 %	
8	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	7=8=9	8	<i>A. pullulans</i>	83,3 %	
9	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	7=8=9	9	<i>H. guilliermondii</i>	100,0 %	
10	<i>A. pullulans</i>	66,7 %		10	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	
11	<i>A. pullulans</i>	71,4 %	2=3=6=11=12=20	11	<i>H. guilliermondii</i>		11=23
12	<i>A. pullulans</i>	85,7 %	2=3=6=11=12=20	12	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	
13	<i>A. pullulans</i>	71,4 %		13	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	
14	Perdeu viabilidade	-		14	<i>H. uvarum</i>	100,0 %	
15	<i>A. pullulans</i>	93,3 %		15	<i>H. uvarum</i>	100,0 %	
16	<i>A. pullulans</i>		13=16=17	16	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	
17	<i>A. pullulans</i>	83,3 %		17	<i>H. uvarum</i>	100,0 %	
18	Perdeu viabilidade	-		18	<i>H. uvarum</i>	100,0 %	
19	<i>A. pullulans</i>	71,4 %		19	<i>H. guilliermondii</i>	100,0 %	
20	<i>A. pullulans</i>	71,4 %	2=3=6=11=12=20	20	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	
21	Perdeu viabilidade			21	<i>H. uvarum</i>	100,0 %	
22	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	22=24=25=29	22	<i>A. pullulans</i>	71,4 %	
23	Perdeu viabilidade	-	Não existe	23	<i>H. guilliermondii</i>	100,0 %	
24	<i>A. pullulans</i>	80,0 %	22=24=25=29	24	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	
25	<i>A. pullulans</i>	80,0 %	22=24=25=29	25	<i>A. pullulans</i>	25=30	
26	<i>A. pullulans</i>		26=27	26	<i>A. pullulans</i>	83,3 %	
27	<i>A. pullulans</i>	70,6 %	26=27	27	<i>I. terricola</i>	85,7 %	
28	<i>A. pullulans</i>	70,6 %		28	<i>A. pullulans</i>	92,3 %	
29	<i>A. pullulans</i>		22=24=25=29	29	<i>I. terricola</i>	85,7 %	
30	Perdeu viabilidade	-		30	<i>A. pullulans</i>	76,9 %	

Anexo IV – Caracterização enológica

Análise físico-química do mosto de uvas de Touriga Nacional

Tabela V.1: Análise físico-química do mosto de uvas da casta TN.

Amostra (Mosto)	Grau Brix (% m/m)	Açúcares (g/L)	Massa volúmica (g/cm ³)	Grau provável (% v/v)	pH	Acidez total (g/L ác. tart.)
TN	22,2	217,7	1,094	12,8	3,24	4,0

Preparação do mosto de Touriga Nacional

O mosto TN foi centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspred) e filtrado por papel de filtro (Whatman 18,5 cm, 40 Ashless) para remoção de sólidos em suspensão. Prepararam-se balões de *erlenmeyer* de 100 ml (Linex Boro 3,3) com 50 ml de mosto TN e levou-se a esterilizar em autoclave (Uni88) a 100 °C durante 30 minutos (Figura V.1).



Figura IV.1: Preparação do mosto de TN.

Estudo preliminar do pré-inóculo

Foram ensaiados isolados para otimizar as condições de obtenção de um inóculo idêntico para adicionar a todas as fermentações das massas vínicas de TN, as quais deveriam ser iniciadas com uma população de aproximadamente 10^6 cel/ml. Avaliou-se 8 isolados pertencentes às espécies *Z. bisporus*, *C. diversa*, *Zygoascus hellenicus*, *I. terricola*, *C. zemplinina*, *H. guilliermondii* e *H. uvarum*. Utilizou-se a densidade óptica (D.O.; $\lambda=640$ nm), contagem de células em câmara de Neubauer e contagem em placa com meio de cultura para a avaliação da densidade celular, por ser este último o que melhor permite determinar o número de células viáveis, mas cujos resultados não são imediatos. Pretendia-se obter um pré-inóculo com mais de 10^8 cel/ml de modo a que o volume a adicionar não ultrapassasse 1 % (v/v) do volume do mosto. A cada balão de mosto TN (anexo IV) foi adicionado o volume necessário de uma suspensão de massa celular em solução de diluição (anexo I) dos isolados previamente cultivados em meio YPD durante 48 horas, para obter uma suspensão com uma D.O. de 0,1 ($\lambda=640$ nm, espectrofotómetro: Cary 100 Bio UV-Visible). Os balões foram colocados em estufa a temperatura controlada (25 °C) (Fitoclima: Aralab) e com agitação (100 rpm, Agitador: Agitor B 300 E). Oito horas após a inoculação de cada um dos isolados efectuaram-se medições de DO. Perto da concentração celular pretendida realizou-se medição da D.O. e paralelamente contagens celulares em câmara de Neubauer e inoculação em meio YPD por espalhamento à superfície, após diluições seriadas de cada um dos isolados. As respectivas placas foram incubadas em estufa a 25 °C durante 48-72 horas.

A inoculação de cada isolado foi realizada em mosto TN com uma suspensão celular com uma D.O. de 0,1 (Figura IV2 a IV8). Em cada figura pode-se observar a evolução da D.O. e os resultados das contagens em câmara e contagens em placa correspondentes. O volume de inóculo a adicionar nas massas vínicas de TN foi assim estimado nos valores das contagens em câmara de Neubauer e ajustado com base nas correspondências verificadas com as contagens em placa.

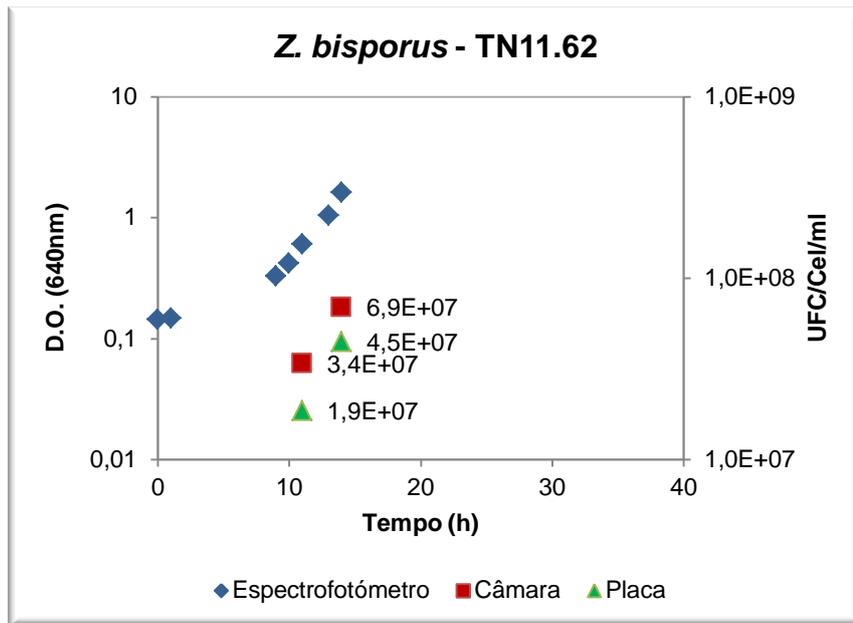


Figura IV.2: Valores de D.O. (◆; 640nm) obtidos ao longo do tempo e respectivas contagens em câmara de Neubauer (■) e por cultura em placa (▲). Isolado: TN11.62 – *Z. bisporus*.

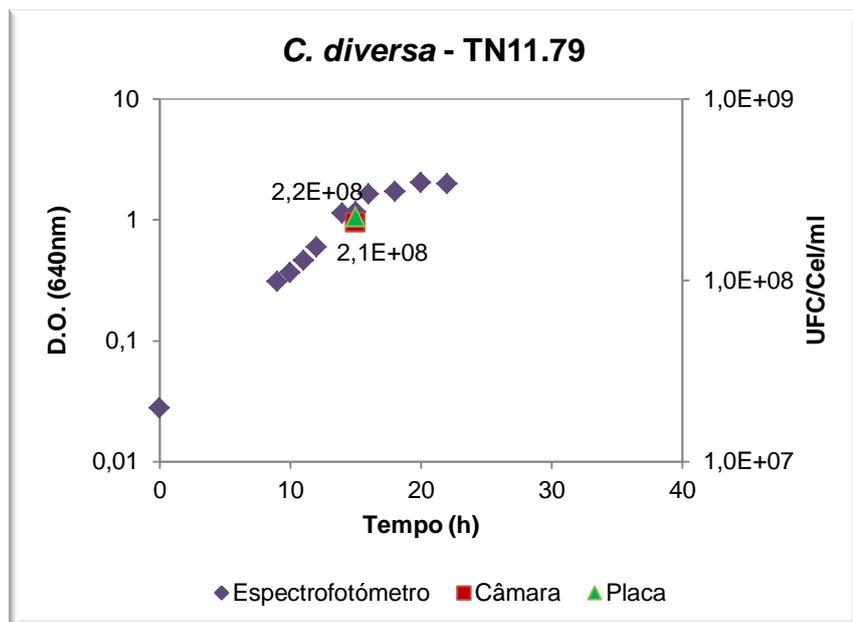


Figura IV.3: Valores de D.O. (◆; 640nm) obtidos ao longo do tempo e respectivas contagens em câmara de Neubauer (■) e por cultura em placa (▲). Isolado: TN11.79 – *C. diversa*.

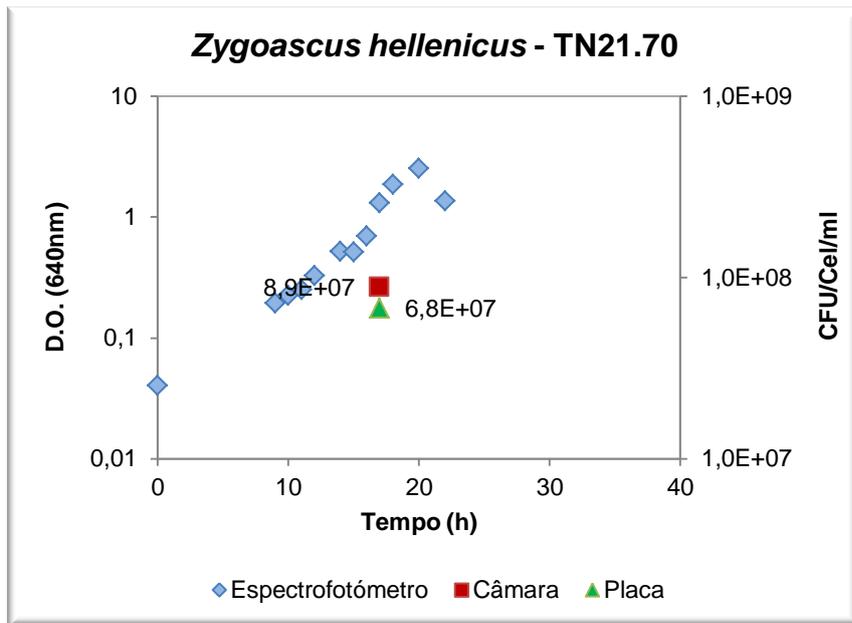


Figura IV.4: Valores de D.O. (◆ 640nm) obtidos ao longo do tempo e respectivas contagens em câmara de Neubauer (■) e por cultura em placa (▲). Isolado: TN21.70 - *Zygoascus hellenicus*.

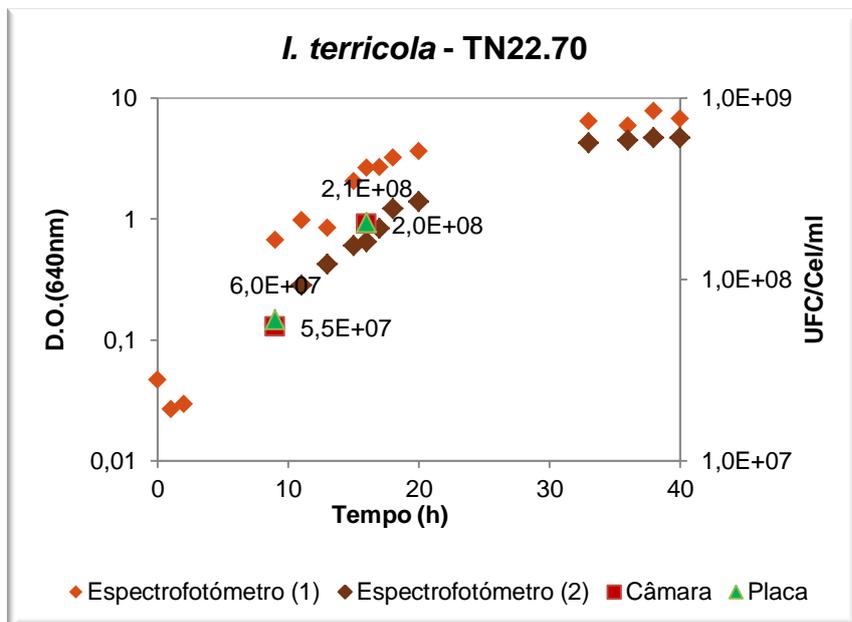


Figura IV.5: Valores de D.O. (Espectrofotômetro (1) - ◆; Espectrofotômetro (2) - ◆; 640nm) obtidos ao longo do tempo e respectivas contagens em câmara de Neubauer (■) e por cultura em placa (▲). Isolado: TN22.70 - *I. terricola*.

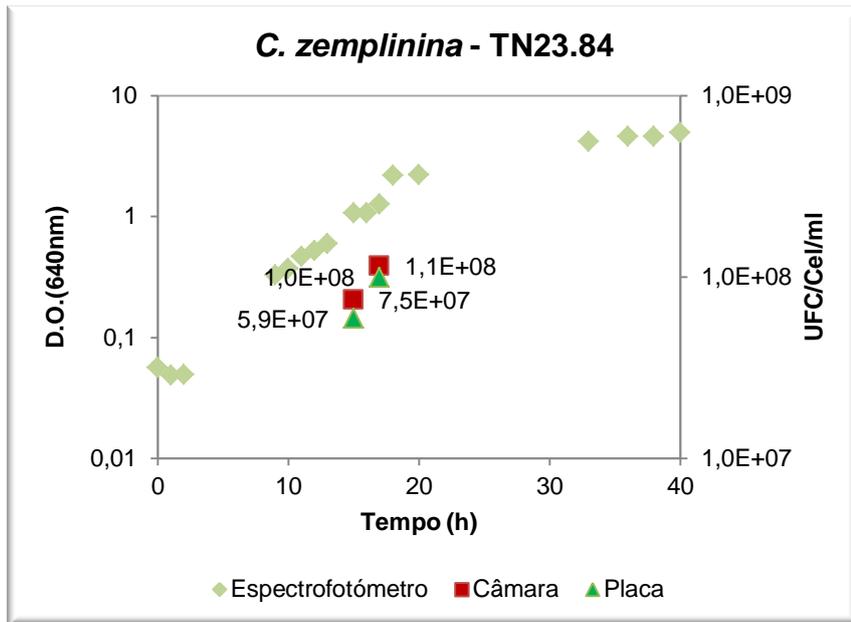


Figura IV.6: Valores de D.O. (◆; 640nm) obtidos ao longo do tempo e respectivas contagens em câmara de Neubauer (■) e por cultura em placa (▲). Isolado: TN23.84 – *C. zemplinina*.

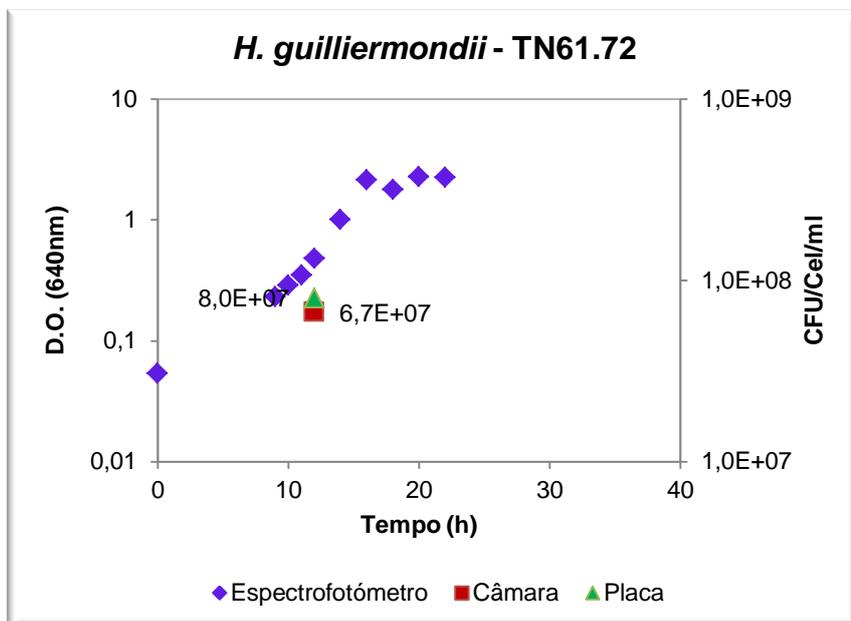


Figura IV.7: Valores de D.O. (◆; 640nm) obtidos ao longo do tempo e respectivas contagens em câmara de Neubauer (■) e por cultura em placa (▲). Isolado: TN61.72 – *H. guilliermondii*.

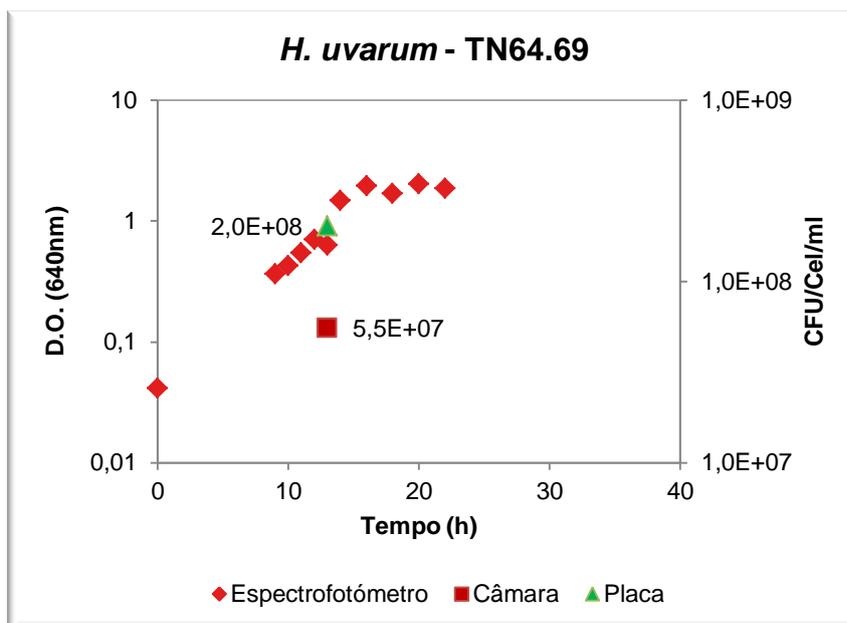


Figura IV.8: Valores de D.O. (◆; 640nm) obtidos ao longo do tempo em mosto de TN e respectivas contagens em câmara de Neubauer (■) e por cultura em placa (▲). Isolado: TN64.69 – *H. uvarum*.

Densidade celular dos isolados nas massas vínicas TN

Na tabela IV2 apresentam-se os resultados dos valores do número de células por mililitro de mosto nas massas vínicas correspondentes a cada um dos isolados. Estes valores foram calculados a partir das contagens em placa das UFC existentes no pré-inóculo.

Tabela IV.2: Resultados do cálculo do número de UFC/ml de mosto das massas vínicas TN.

Vinha	Dois Portos		Palhacana		Montemor-o-Novo	
	Isolados	x10 ⁶ cel/ml	Isolados	x10 ⁶ cel/ml	Isolados	x10 ⁶ cel/ml
<i>C. diversa</i>	TN11.79 (1)	1,0				
	TN11.79 (2)	1,3				
<i>C. zemplinina</i>	TN11.74 (1)	1,1	TN21.90 (1)	0,9		
	TN11.74 (2)	1,1	TN21.90 (2)	1,1		
	TN12.68 (1)	1,2	TN23.84 (1)	1,1		
	TN12.68 (2)	1,2	TN23.84 (2)	0,7		
<i>H. guillermondii</i>					TN61.72 (1)	1,0
					TN61.72 (2)	1,7
					TN62.75 (1)	0,6
					TN62.75 (2)	0,8
					TN66.80 (1)	1,1
<i>H. uvarum</i>	TN12.76 (1)	0,9	TN21.61 (1)	0,7	TN64.69 (1)	0,7
			TN21.61 (2)	1,1	TN64.69 (2)	1,0
	TN12.76 (2)	1,4	TN22.79 (1)	0,8	TN65.70 (1)	0,9
			TN22.79 (2)	0,7	TN65.70 (2)	1,2
<i>H. opuntiae</i>			TN22.78 (1)	0,6		
			TN22.78 (2)	0,3		
<i>I. orientalis</i>			TN22.64 (1)	0,7		
			TN22.64 (2)	0,8		
<i>I. terricola</i>			TN22.70 (1)	1,2		
			TN22.70 (2)	1,2		
	TN12.72 (2)	1,0	TN23.68 (2)	0,7		
<i>Z. bailii</i>			TN22.71 (1)	(*)		
			TN22.71 (2)	(*)		
<i>Zygoascus hellenicus</i>			TN21.70 (1)	0,8		
			TN21.70 (2)	0,7		
<i>Z. bisporus</i>	TN11.62 (1)	0,9				
	TN11.71 (1)	0,8				
	TN11.71 (2)	1,0				

(*) Isolado onde não foi possível homogeneizar a suspensão celular devido à floculação das células.

Tabela IV.3: Resultados da análise físico-química dos fermentados obtidos pelos diferentes isolados.

Espécie	Isolado	AcT_B	AcV_B	pHB	CorB	IPT	AçB	MáIB	LácB	TAV	Glucose	Frutose	Glicerol
<i>C. diversa</i>	TN1179	6,48	1,09	3,41	1,04	44,90	100,90	2,70	0,60	8,03	21,13	69,75	12,65
<i>C. diversa</i>	TN1179	6,51	1,08	3,40	1,04	49,23	106,10	2,90	0,70	7,57	23,20	72,21	13,58
<i>C. zemplinina</i>	TN1174	6,29	0,58	3,36	1,09	46,06	37,10	2,30	0,60	10,79	33,81	1,35	13,03
<i>C. zemplinina</i>	TN1174	6,36	0,61	3,33	1,22	45,03	33,70	2,40	0,70	11,02	29,63	1,30	12,76
<i>C. zemplinina</i>	TN1268	6,10	0,90	3,38	1,20	51,12	55,80	2,30	0,60	9,66	51,81	1,74	14,08
<i>C. zemplinina</i>	TN1268	6,25	0,78	3,37	1,14	49,14	53,90	2,20	0,60	9,83	49,34	1,82	13,77
<i>C. zemplinina</i>	TN2190	6,47	0,74	3,34	1,07	49,40	30,80	2,40	0,50	11,16	26,94	1,43	13,00
<i>C. zemplinina</i>	TN2190	5,96	0,72	3,38	1,01	44,87	37,60	2,40	0,40	10,80	32,65	1,36	12,63
<i>C. zemplinina</i>	TN2384	6,06	0,65	3,42	1,11	42,54	43,30	2,10	0,20	10,36	39,84	1,71	13,49
<i>C. zemplinina</i>	TN2384	6,21	0,68	3,35	1,05	45,59	55,40	2,30	0,20	9,70	48,77	1,76	13,97
LSA	LSA	5,95	0,78	3,47	1,07	46,43	1,20	2,10	0,10	12,79	0,25	0,81	4,17
<i>H. guilliermondii</i>	TN6172	5,93	0,87	3,37	0,95	42,80	91,60	2,50	0,20	8,10	62,28	23,38	11,28
<i>H. guilliermondii</i>	TN6172	5,95	0,72	3,42	1,04	50,18	96,80	2,70	0,20	7,71	64,20	25,96	11,97
<i>H. guilliermondii</i>	TN6275	6,08	0,99	3,38	0,93	41,25	96,00	2,60	0,20	7,95	61,94	27,98	9,10
<i>H. guilliermondii</i>	TN6275	5,68	0,93	3,43	0,94	44,14	96,20	2,70	0,20	7,93	63,33	25,22	9,09
<i>H. guilliermondii</i>	TN6680	5,83	0,72	3,45	0,93	43,73	78,20	2,50	0,10	8,76	55,74	13,44	11,70
<i>H. guilliermondii</i>	TN6680	5,91	0,72	3,39	0,96	45,10	81,40	2,60	0,20	8,57	57,55	16,60	12,26
<i>H. uvarum</i>	TN1276	5,91	0,86	3,41	0,89	44,58	128,60	2,50	0,50	6,11	70,54	49,40	12,17
<i>H. uvarum</i>	TN1276	5,91	0,83	3,42	0,88	43,81	132,50	2,60	0,50	5,93	71,33	51,93	12,26
<i>H. uvarum</i>	TN2161	5,93	1,11	3,41	0,90	42,03	129,00	2,50	0,40	6,68	66,28	46,92	12,59
<i>H. uvarum</i>	TN2161	5,87	0,99	3,44	0,88	41,67	131,30	2,60	0,50	6,43	67,38	48,55	12,66
<i>H. uvarum</i>	TN2279	5,46	0,80	3,43	0,11	40,05	128,90	2,30	0,60	6,53	69,81	47,18	11,79
<i>H. uvarum</i>	TN2279	5,45	0,78	3,42	0,11	42,16	132,60	2,30	0,30	6,19	70,43	50,26	12,06
<i>H. uvarum</i>	TN6469	5,61	0,90	3,42	0,85	39,17	139,00	2,40	0,10	5,98	69,89	56,01	11,21
<i>H. uvarum</i>	TN6469	5,57	0,75	3,42	1,02	48,61	145,90	2,50	0,30	5,57	72,77	58,81	12,01
<i>H. uvarum</i>	TN6570	5,68	0,96	3,46	0,99	39,63	133,30	2,40	0,20	6,34	67,77	51,36	10,91
<i>H. uvarum</i>	TN6570	5,64	0,78	3,43	1,04	48,44	138,50	2,40	0,20	6,19	68,47	52,38	11,68
<i>H. opuntiae</i>	TN2278	6,25	1,05	3,42	0,93	48,23	104,00	2,50	0,50	7,31	64,46	35,09	10,19
<i>H. opuntiae</i>	TN2278	5,83	1,61	3,42	0,85	45,65	103,80	2,40	0,50	7,29	65,90	36,10	10,15

Tabela IV.4: (Cont.) Resultados da análise físico-química dos fermentados obtidos pelos diferentes isolados.

Espécie	Isolado	AcT_B	AcV_B	pHB	CorB	IPT	AçB	MálB	LácB	TAV	Glucose	Frutose	Glicerol
<i>I. orientalis</i>	TN2264	6,25	1,11	3,47	1,05	47,27	42,50	2,80	0,70	10,85	2,55	35,44	7,63
<i>I. orientalis</i>	TN2264	6,17	1,08	3,41	1,03	41,82	38,50	2,70	0,60	10,93	1,68	31,38	7,74
<i>I. terricola</i>	TN1170	4,39	0,33	3,47	0,84	43,96	188,40	1,40	0,70	4,23	63,42	95,29	13,52
<i>I. terricola</i>	TN1170	4,58	0,41	3,46	0,90	49,72	159,90	1,40	0,70	3,72	70,22	98,19	13,89
<i>I. terricola</i>	TN1272	5,11	0,35	3,47	0,86	41,75	181,60	1,70	0,60	4,21	62,19	96,17	13,77
<i>I. terricola</i>	TN2270	5,15	0,54	3,46	0,92	42,58	149,20	1,70	0,60	5,96	40,57	83,43	12,87
<i>I. terricola</i>	TN2270	5,68	0,47	3,53	0,93	45,94	146,90	1,70	0,60	5,86	41,73	84,33	13,03
<i>I. terricola</i>	TN2368	4,92	0,41	3,47	0,77	42,89	135,60	1,50	0,30	5,78	42,60	84,99	13,33
<i>Z. bailii</i>	TN2271	7,20	0,68	3,45	1,10	42,75	28,70	1,70	0,60	11,31	22,97	2,31	5,45
<i>Z. bailii</i>	TN2271	7,20	0,69	3,42	0,98	39,27	26,70	1,70	0,50	11,39	23,22	2,02	5,09
<i>Zygoascus hellenicus</i>	TN2170	5,54	0,30	3,38	0,94	46,76	190,90	2,50	0,60	3,82	56,67	109,20	14,17
<i>Zygoascus hellenicus</i>	TN2170	4,89	0,23	3,43	0,80	43,21	167,80	2,20	0,50	4,55	43,24	103,63	13,64
<i>Z. bisporus</i>	TN1162	8,11	1,05	3,28	1,12	41,31	74,60	2,60	0,50	8,67	67,12	3,02	10,89
<i>Z. bisporus</i>	TN1171	7,92	1,11	3,32	0,96	43,26	76,70	2,30	0,50	8,59	64,64	3,21	11,12
<i>Z. bisporus</i>	TN1171	7,35	0,99	3,32	1,03	42,47	77,10	2,40	0,50	8,69	66,13	3,15	10,88

Produção de H₂S

Apresenta-se de seguida as fotografias do teste de produção de H₂S ao fim de 6 dias. Também se apresenta as fotografias dos isolados que apresentaram alteração ao fim do 30^o dia de inoculação.

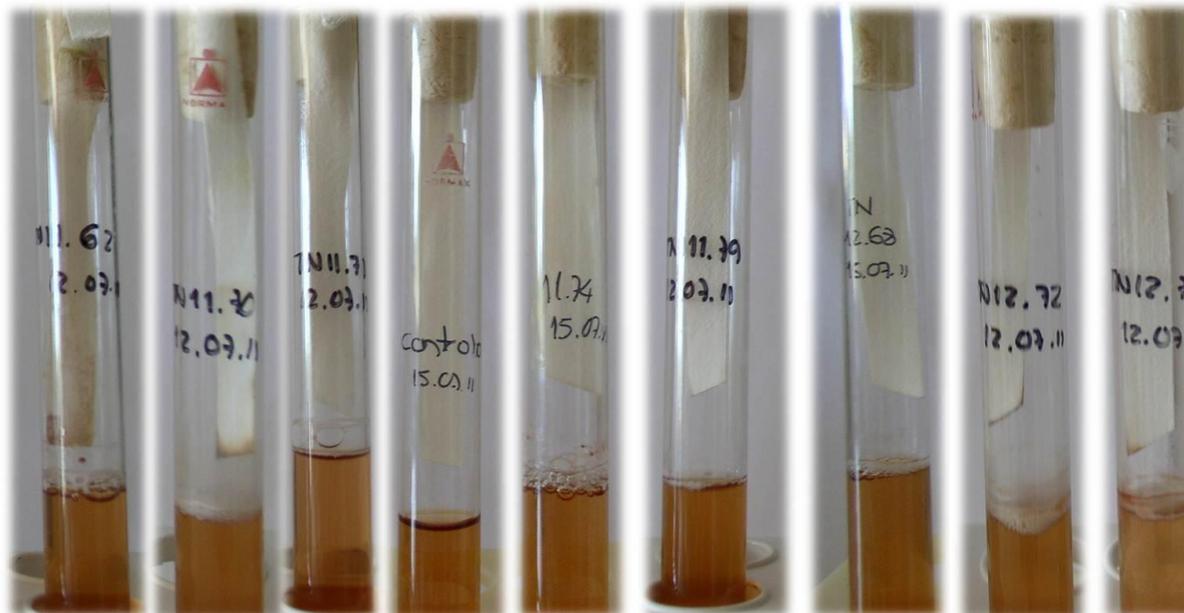


Figura IV.9: Fotografias referentes à produção de H₂S e respectivos controlos ao fim de seis dias de inoculação em mosto de TN dos isolados TN11.62 - *Z. bisporus*; TN11.70 - *I. terricola*; TN11.71 - *Z. bisporus*; Controlo - Mosto TN; TN11.74 - *C. zemplinina*, TN11.79 - *C. diversa*; TN12.72 - *I. terricola*; TN12.68 - *C. zemplinina*; TN12.76 - *H. uvarum*.

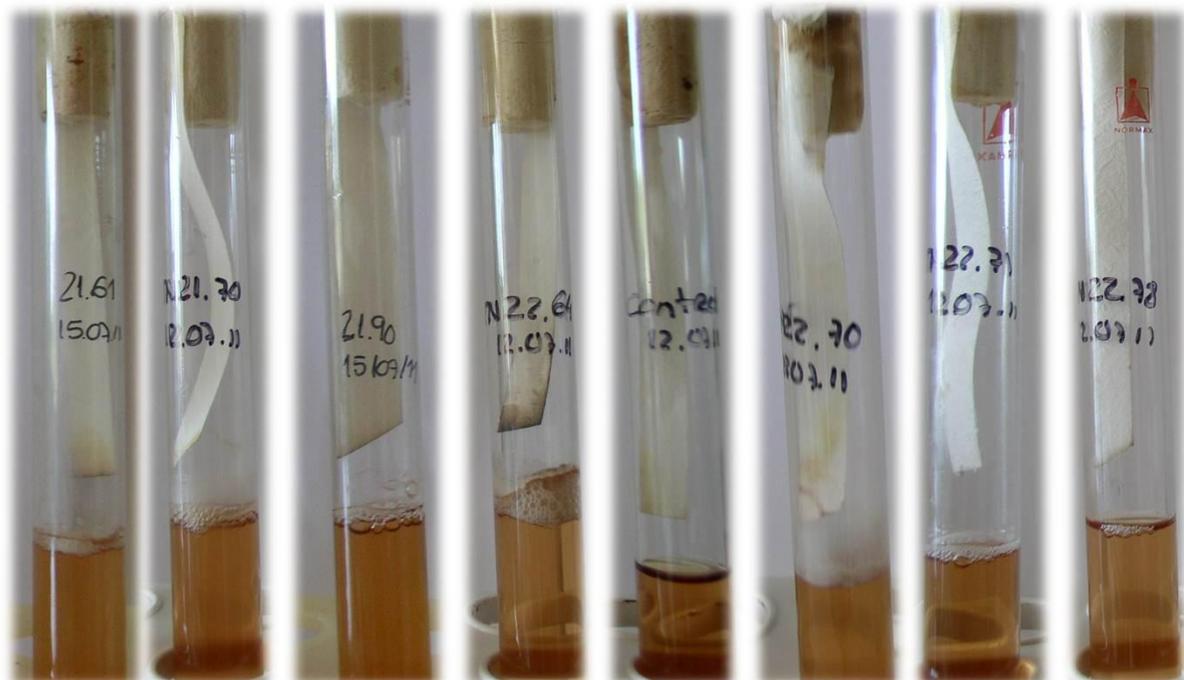


Figura IV.10: Fotografias referentes à produção de H₂S e respectivos controlos ao fim de seis dias de inoculação em mosto de TN dos isolados: TN21.61 - *H. uvarum*; TN21.70 - *Zygoascus hellenicus*; TN21.90 - *C. zemplinina*; TN22.64 - *I. orientalis*; Controlo - Mosto TN; TN22.70 - *I. terricola*; TN22.71 - *Z. baillii*; TN22.78 - *H. opuntiae*.

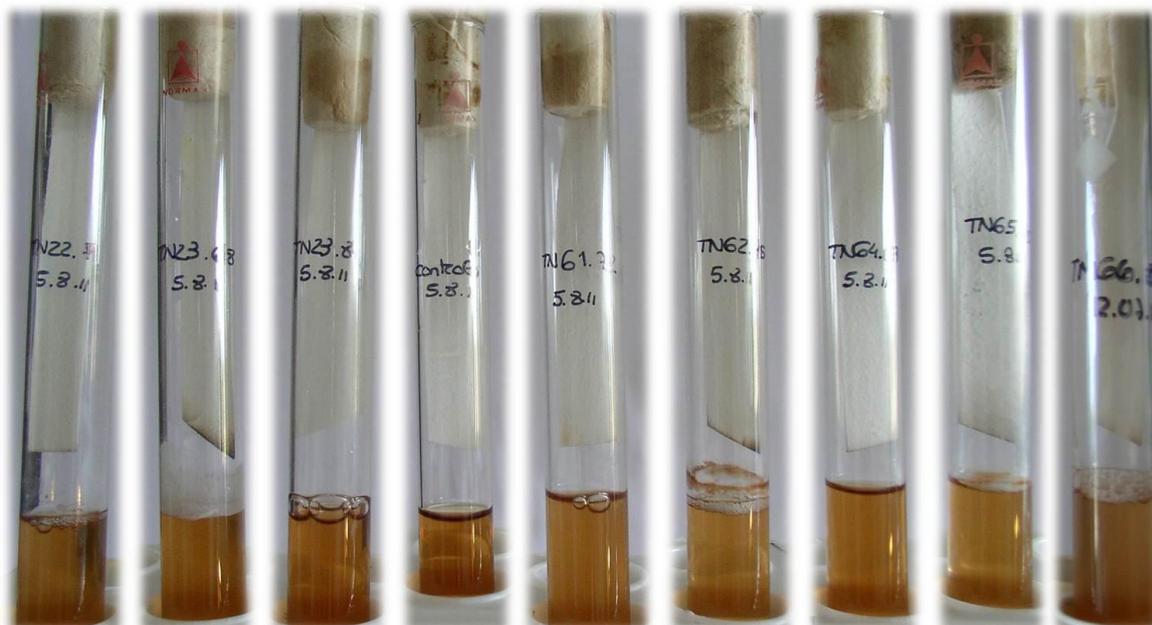


Figura IV.11: Fotografias referentes à produção de H_2S e respectivos controles ao fim de seis dias de inoculação em mosto de TN dos isolados: TN22.79 – *H. uvarum*; TN23.68 – *I. terricola*; TN23.84 – *C. zemplinina*; Controlo – Mosto TN; TN61.72 – *H. guilliermondii*; TN62.75 – *H. guilliermondii*; TN64.69 – *H. uvarum*; TN65.70 – *H. uvarum*; TN66.80 – *H. guilliermondii*.

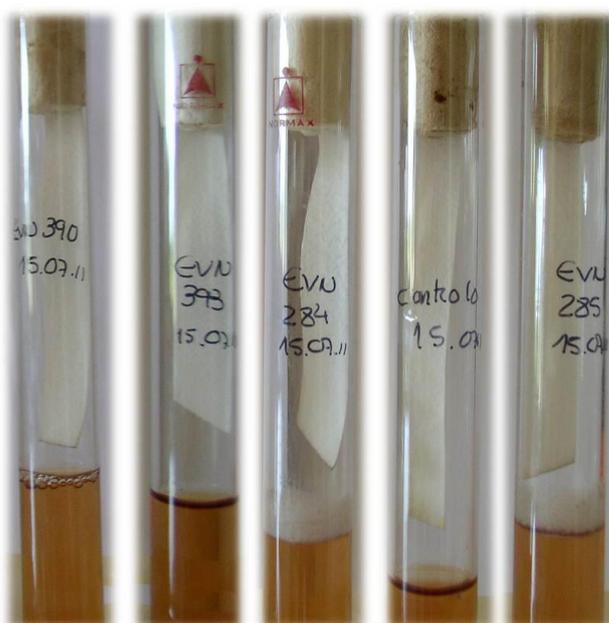


Figura IV.12: Fotografias referentes à produção de H_2S e respectivos controles ao fim de seis dias de inoculação em mosto de TN das espécies provenientes da colecção de leveduras do INIA-Dois Portos nomeadamente EVN 390 – *H. guilliermondii*; EVN 393 – *H. uvarum*; EVN 284 – *P. membranifaciens*; Controlo – Mosto TN; EVN 285 – *P. membranifaciens*.

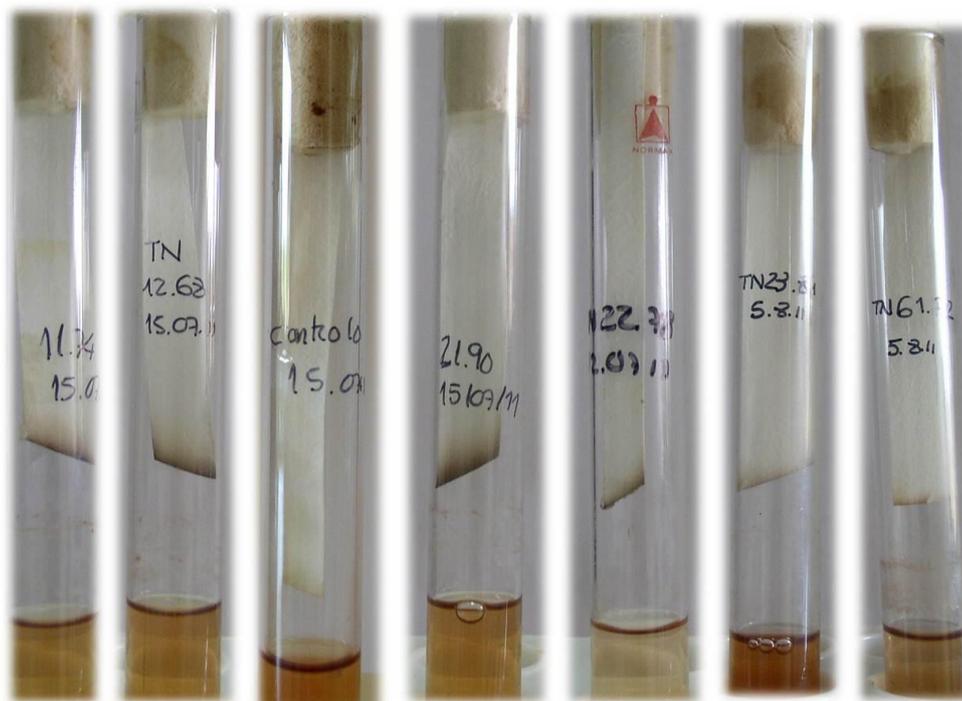


Figura IV.13: Fotografias referentes à produção de H₂S e respectivos controlos ao fim de trinta dias de inoculação em mosto de TN dos isolados: TN11.74 – *C. zemplinina*; TN12.68 – *C. zemplinina*; Controlo – Mosto TN; TN21.90 – *C. zemplinina*, TN22.78 – *H. opuntiae*; TN23.84 – *C. zemplinina*; e TN61.72 – *H. guilliermondii*.

Anexo V - Análise sensorial

Ficha de prova

Prova no âmbito do trabalho “Estudos moleculares e enológicos da biota de leveduras de uvas da casta Touriga Nacional”

Exercício prático – Percepção de aromas

Nome _____ Data _____

Agite cada frasco com a tampa colocada, depois retire a tampa e avalie o(s) aroma(s) detectados e anote as suas impressões. Cada frasco contém uma substância ou extracto odorante em solução.

Identificação do frasco	Aroma detectado

Vire sff.

Figura V.1: Ficha de prova.

Nome: _____		Data: _____	
Descritores	Vinhos		
Aroma Ortonasal (0-5):			
Frutos silvestres			
Tipo laranja			
Banana			
Maracujá			
Maçã			
Frutos secos (noz, amêndoa,...)			
Frutos secados (figos, passas,...)			
Bergamota			
Mel			
Caramelo			
Compota			
Chocolate			
Manteiga			
Esteva			
Eucalipto			
Mentol			
Cravinho			
Herbáceo			
Violetas			
Acetato de etilo			
Oxidado			
Fermento de padeiro			
Aroma Retronasal (0-5):			
Frutos silvestres			
Tipo laranja			
Banana			
Maracujá			
Maçã			
Frutos secos (noz, amêndoa,...)			
Frutos secados (figos, passas,...)			
Bergamota			
Mel			
Caramelo			
Compota			
Chocolate			
Manteiga			
Esteva			
Eucalipto			
Mentol			
Cravinho			
Herbáceo			
Violetas			
Acetato de etilo			
Oxidado			
Fermento de padeiro			
Sabor (0-5):			
Corpo			
Macieza			
Complexidade			
Persistência			
Equilíbrio			
Doce			
Apreciação Global (0-5):			

Figura V.2: Ficha de prova.

Delineamento das amostras

Em cada uma das sessões de prova os vinhos foram submetidos a um delineamento do tipo quadrado latino. Segue-se um esquema utilizado para a disposição dos copos entre 8 vinhos e 10 provadores.

Tabela V.1: Delineamento dos fermentados para cada provador nas sessões de prova.

Provador	Disposição dos copos de 8 vinhos							
	1	1	2	8	3	7	4	6
2	2	3	1	4	8	5	7	6
3	3	4	2	5	1	6	8	7
4	4	5	3	6	2	7	1	8
5	5	6	4	7	3	8	2	1
6	6	7	5	8	4	1	3	2
7	7	8	6	1	5	2	4	3
8	8	1	7	3	6	2	5	4
9	5	2	8	4	7	3	6	1
10	6	3	5	4	8	1	7	2

Tabela V.2: Resultados médios obtidos nas diferentes sessões de prova para cada fermentado correspondente ao aroma ortonasal.

Espécie	Isolado	OrFruSil	OrTLar	OrBan	OrMar	OrMaç	OrFsec	OrFsecad	OrBerg	OrMel	OrCar	OrComp	OrChoc	OrMant	OrEst	OrEuc	OrMent	OrCrav	OrHerb	OrViol	OrAcEt	OrOxid	OrFerm
<i>C. diversa</i>	1179	1,364	0,273	0,091	0,091	0,727	0,727	1,364	0,273	0,364	0,000	1,000	0,273	0,091	0,455	0,182	0,273	0,000	0,091	0,091	0,182	1,136	0,091
<i>C. diversa</i>	1179	1,071	0,143	0,000	0,143	0,571	0,714	0,929	0,000	0,143	0,000	0,357	0,143	0,000	0,143	0,000	0,143	0,143	1,000	0,000	0,000	0,500	0,357
<i>C. zemplinina</i>	1174	1,722	0,444	0,000	0,000	0,556	0,778	0,778	0,444	0,778	0,444	0,778	0,000	0,111	0,333	0,333	0,667	0,333	0,444	0,778	0,111	1,000	0,000
<i>C. zemplinina</i>	1174	1,000	0,000	0,000	0,125	0,250	0,625	1,188	0,375	0,500	0,313	0,125	0,125	0,125	0,500	0,250	0,250	0,375	0,250	0,188	0,125	1,000	0,000
<i>C. zemplinina</i>	1268	1,778	0,778	0,000	0,000	0,556	0,333	0,889	0,556	0,667	0,000	0,556	0,111	0,111	0,667	0,111	0,222	0,222	0,222	0,444	0,222	0,889	0,000
<i>C. zemplinina</i>	1268	1,000	0,625	0,000	0,000	0,750	0,500	1,000	0,625	0,500	0,000	1,000	0,125	0,000	0,250	0,000	0,125	0,000	0,500	0,250	0,125	1,250	0,000
<i>C. zemplinina</i>	2190	1,636	0,364	0,000	0,000	0,727	0,909	1,318	0,636	0,091	0,364	0,545	0,091	0,000	0,818	0,273	0,545	0,364	0,273	0,455	0,273	0,727	0,000
<i>C. zemplinina</i>	2190	1,000	0,250	0,000	0,000	0,375	0,813	1,063	0,438	0,250	0,750	0,500	0,000	0,000	0,500	0,250	0,500	0,125	0,125	0,125	0,375	0,625	0,250
<i>C. zemplinina</i>	2384	1,875	0,125	0,250	0,125	0,625	0,875	1,625	1,000	1,000	0,125	0,250	0,250	0,000	0,625	0,000	0,375	0,250	0,125	0,125	0,125	0,500	0,250
<i>C. zemplinina</i>	2384	1,125	0,375	0,250	0,000	0,375	0,875	1,000	0,625	0,125	0,125	0,875	0,000	0,125	1,000	0,375	0,000	0,000	0,500	0,500	0,500	0,500	0,000
<i>H. guilliermondii</i>	6172	0,455	0,182	0,000	0,000	0,091	0,091	0,636	0,000	0,273	0,000	0,545	0,182	0,000	0,273	0,273	0,182	0,091	0,091	0,000	3,909	0,409	0,091
<i>H. guilliermondii</i>	6172	0,500	0,250	0,000	0,000	0,125	0,000	1,000	0,000	0,500	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,250	0,250	0,000	0,250	0,000	3,125	1,000	0,125
<i>H. guilliermondii</i>	6275	1,136	0,273	0,000	0,000	0,091	0,273	1,091	0,000	0,091	0,364	0,909	0,091	0,000	0,182	0,091	0,545	0,000	0,182	0,091	3,227	0,500	0,091
<i>H. guilliermondii</i>	6275	0,857	0,429	0,286	0,143	0,000	0,143	1,357	0,429	0,286	0,000	0,429	0,143	0,000	0,286	0,000	0,000	0,000	0,143	0,143	1,643	0,071	0,000
<i>H. guilliermondii</i>	6680	1,375	0,500	0,250	0,000	0,250	0,375	1,000	0,000	0,625	0,250	0,625	0,125	0,000	0,375	0,250	0,375	0,000	0,250	0,000	2,750	0,625	0,000
<i>H. guilliermondii</i>	6680	0,750	0,250	0,000	0,000	0,125	0,125	1,000	0,125	0,500	0,375	0,125	0,000	0,000	0,125	0,000	0,125	0,000	0,000	0,125	2,500	0,938	0,250
<i>H. opuntiae</i>	2278	1,000	0,250	0,000	0,000	0,125	0,125	1,500	0,125	0,625	0,250	0,750	0,000	0,000	0,375	0,125	0,000	0,000	0,563	0,000	1,750	0,500	0,000
<i>H. opuntiae</i>	2278	1,125	0,250	0,000	0,000	0,250	0,313	0,938	0,125	0,000	0,000	0,250	0,125	0,000	0,250	0,000	0,375	0,000	0,375	0,000	2,063	0,750	0,000
<i>H. uvarum</i>	1276	0,778	0,222	0,000	0,000	0,111	0,556	1,778	0,222	0,889	0,667	0,556	0,222	0,111	0,222	0,111	0,111	0,000	0,111	0,111	1,000	0,556	0,333
<i>H. uvarum</i>	1276	0,714	0,429	0,000	0,000	0,000	0,286	1,714	0,143	0,429	0,000	0,286	0,143	0,000	0,286	0,143	0,000	0,000	0,714	0,000	1,714	0,286	0,000
<i>H. uvarum</i>	2161	0,773	0,182	0,000	0,000	0,273	0,455	1,000	0,000	0,273	0,273	0,364	0,091	0,091	0,091	0,364	0,273	0,182	0,182	0,000	2,818	0,364	0,000
<i>H. uvarum</i>	2161	1,786	0,286	0,286	0,000	0,000	0,500	1,429	0,143	0,286	0,000	0,143	0,000	0,000	0,286	0,000	0,286	0,000	0,143	0,000	1,143	0,000	0,000
<i>H. uvarum</i>	2279	1,091	0,091	0,000	0,000	0,636	0,364	1,273	0,182	0,364	0,182	0,455	0,000	0,000	0,091	0,182	0,091	0,000	0,091	0,182	2,955	0,455	0,000
<i>H. uvarum</i>	2279	1,000	0,250	0,000	0,000	0,250	0,875	1,125	0,125	0,188	0,125	0,438	0,000	0,000	0,125	0,250	0,250	0,000	0,000	0,000	1,875	0,688	0,125
<i>H. uvarum</i>	6469	1,625	0,250	0,000	0,000	0,125	0,250	1,125	0,500	0,500	0,000	0,625	0,000	0,000	0,750	0,000	0,375	0,000	0,625	0,000	2,438	0,375	0,250
<i>H. uvarum</i>	6469	0,929	0,429	0,000	0,000	0,000	0,000	1,071	0,000	0,429	0,000	0,571	0,000	0,000	0,214	0,000	0,143	0,000	0,286	0,000	2,071	0,286	0,000
<i>H. uvarum</i>	6570	0,875	0,125	0,000	0,000	0,125	0,500	1,250	0,375	0,375	0,000	0,625	0,000	0,000	0,250	0,000	0,625	0,000	0,625	0,375	2,375	0,625	0,000
<i>H. uvarum</i>	6570	1,813	0,375	0,000	0,000	0,250	0,750	1,000	0,438	0,125	0,375	0,500	0,000	0,000	0,188	0,125	0,000	0,000	0,125	0,000	1,188	0,375	0,000

Tabela V.4: Resultados médios obtidos nas diferentes sessões de prova para cada fermentado correspondente ao aroma retronasal.

Espécie	Isolado	ReFruSil	ReTLar	ReBan	ReMar	ReMaç	ReFsec	ReFsecad	ReBerg	ReMel	ReCar	ReComp	ReChoc	ReMant	ReEst	ReEuc	ReMent	ReCrav	ReHerb	ReViol	ReAcEt	ReOxid	ReFerm
<i>C. diversa</i>	1179	1,455	0,273	0,000	0,000	0,455	0,545	1,364	0,182	0,955	0,636	1,455	0,000	0,091	0,182	0,091	0,091	0,000	0,091	0,000	0,273	0,500	0,000
<i>C. diversa</i>	1179	1,143	0,143	0,000	0,000	0,429	0,857	1,500	0,000	0,286	0,000	0,786	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,286	0,000	0,000	0,143	0,000
<i>C. zemplinina</i>	1174	1,111	0,444	0,000	0,000	0,333	0,667	1,000	0,556	0,444	0,222	0,222	0,000	0,000	0,556	0,000	0,111	0,000	1,111	0,000	0,222	0,667	0,000
<i>C. zemplinina</i>	1174	0,750	0,375	0,000	0,000	0,375	1,125	0,625	0,750	0,375	0,000	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,250	0,250	0,750	0,125	0,125	1,000	0,125
<i>C. zemplinina</i>	1268	1,111	0,889	0,000	0,000	0,333	0,444	0,667	0,444	0,667	0,000	0,222	0,000	0,222	0,444	0,111	0,111	0,000	0,889	0,222	0,333	0,889	0,000
<i>C. zemplinina</i>	1268	1,375	0,250	0,000	0,000	0,375	0,625	0,875	0,563	0,250	0,125	0,125	0,000	0,000	0,375	0,000	0,250	0,000	0,875	0,125	0,563	0,625	0,125
<i>C. zemplinina</i>	2190	1,000	0,182	0,000	0,000	0,545	0,091	0,727	0,545	0,273	0,091	0,455	0,091	0,091	0,318	0,182	0,455	0,273	1,273	0,273	0,364	0,500	0,000
<i>C. zemplinina</i>	2190	0,625	0,250	0,000	0,000	0,125	0,750	0,500	0,625	0,125	0,125	0,375	0,000	0,000	0,500	0,000	0,125	0,125	0,500	0,250	0,250	0,375	0,250
<i>C. zemplinina</i>	2384	1,250	0,625	0,000	0,000	0,625	0,125	1,125	0,500	1,125	0,250	0,750	0,000	0,000	0,250	0,375	0,500	0,125	0,875	0,125	0,000	0,250	0,000
<i>C. zemplinina</i>	2384	1,375	0,500	0,000	0,000	0,875	0,625	0,250	0,500	0,250	0,250	0,125	0,000	0,125	0,750	0,125	0,125	0,125	0,500	0,000	0,250	0,625	0,000
<i>H. guilliermondii</i>	6172	0,591	0,273	0,000	0,000	0,091	0,182	0,727	0,000	0,636	0,455	0,364	0,182	0,091	0,364	0,000	0,364	0,000	0,182	0,000	2,545	0,818	0,000
<i>H. guilliermondii</i>	6172	0,875	0,250	0,000	0,000	0,000	0,125	1,125	0,000	0,625	0,000	0,500	0,000	0,125	0,000	0,000	0,125	0,000	0,250	0,000	2,375	0,875	0,000
<i>H. guilliermondii</i>	6275	0,818	0,182	0,000	0,000	0,455	0,273	1,364	0,000	0,545	0,364	0,455	0,273	0,091	0,273	0,000	0,273	0,000	0,273	0,091	1,591	0,727	0,000
<i>H. guilliermondii</i>	6275	0,786	0,286	0,286	0,143	0,000	0,714	1,286	0,429	0,643	0,000	0,429	0,000	0,143	0,214	0,214	0,000	0,000	0,286	0,000	0,714	0,000	0,000
<i>H. guilliermondii</i>	6680	1,125	0,625	0,000	0,000	0,375	0,375	1,375	0,000	0,625	0,625	0,750	0,125	0,000	0,250	0,375	0,125	0,000	0,500	0,000	2,125	0,375	0,000
<i>H. guilliermondii</i>	6680	0,750	0,625	0,000	0,000	0,000	0,750	0,875	0,250	0,500	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,250	0,000	0,750	0,125	1,625	0,500	0,125
<i>H. opuntiae</i>	2278	0,875	0,500	0,000	0,000	0,000	0,250	1,125	0,000	0,875	0,000	0,500	0,000	0,125	0,125	0,000	0,250	0,000	0,500	0,000	1,250	0,625	0,375
<i>H. opuntiae</i>	2278	0,875	0,250	0,000	0,000	0,125	0,250	1,313	0,125	0,125	0,125	0,188	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,313	0,000	1,750	0,500	0,000
<i>H. uvarum</i>	1276	0,444	0,333	0,111	0,000	0,333	0,667	1,500	0,667	1,111	0,444	0,889	0,000	0,333	0,333	0,000	0,333	0,000	0,444	0,000	0,222	0,333	0,222
<i>H. uvarum</i>	1276	0,857	0,143	0,000	0,000	0,000	0,714	2,286	0,143	0,571	0,000	0,786	0,000	0,000	0,429	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,857	0,286	0,000
<i>H. uvarum</i>	2161	1,000	0,273	0,000	0,136	0,545	0,545	1,000	0,000	0,727	0,091	0,545	0,091	0,091	0,000	0,000	0,273	0,000	0,091	0,000	1,182	0,545	0,000
<i>H. uvarum</i>	2161	1,643	0,286	0,429	0,000	0,000	0,857	1,571	0,143	0,429	0,000	0,571	0,000	0,000	0,429	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
<i>H. uvarum</i>	2279	0,909	0,182	0,000	0,000	0,273	0,273	1,182	0,091	0,864	0,182	0,545	0,091	0,091	0,091	0,000	0,273	0,000	0,273	0,091	2,000	0,545	0,000
<i>H. uvarum</i>	2279	0,571	0,250	0,000	0,000	0,250	0,375	1,125	0,125	0,125	0,250	1,125	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,000	0,250	0,000	1,063	0,500	0,000
<i>H. uvarum</i>	6469	1,625	0,500	0,000	0,000	0,250	0,500	1,938	0,125	0,750	0,250	1,125	0,000	0,000	0,250	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	2,125	0,500	0,000
<i>H. uvarum</i>	6469	1,214	0,429	0,000	0,000	0,000	0,143	1,429	0,000	0,571	0,000	0,571	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,143	0,000	1,357	0,143	0,000
<i>H. uvarum</i>	6570	0,875	0,750	0,000	0,125	0,125	0,250	1,875	0,500	0,625	0,500	1,000	0,125	0,000	0,250	0,250	0,500	0,000	0,250	0,000	1,625	0,625	0,000
<i>H. uvarum</i>	6570	1,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,250	1,000	0,125	0,375	0,250	1,000	0,000	0,125	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,125	0,250	0,000

Tabela V.6: Resultados médios, obtidos nas diferentes sessões de prova para cada fermentado correspondente à caracterização do sabor e apreciação global.

Espécie	Isolado	Corp	Macie	Complex	Persist	Equil	Doce	Aagl
<i>C. diversa</i>	1179	2,591	3,045	2,636	2,773	2,227	3,636	2,545
<i>C. diversa</i>	1179	2,429	2,429	2,214	2,429	2,071	2,571	2,571
<i>C. zemplinina</i>	1174	2,722	2,444	2,722	2,944	2,556	1,556	2,889
<i>C. zemplinina</i>	1174	2,438	1,938	2,063	2,500	2,000	1,438	2,313
<i>C. zemplinina</i>	1268	2,889	2,167	2,444	2,722	2,222	1,778	2,500
<i>C. zemplinina</i>	1268	2,813	2,188	2,500	2,750	2,125	1,750	2,500
<i>C. zemplinina</i>	2190	2,682	2,182	2,545	2,727	2,182	1,682	2,773
<i>C. zemplinina</i>	2190	2,625	1,938	2,313	2,688	2,375	0,750	2,938
<i>C. zemplinina</i>	2384	2,750	2,313	2,688	2,750	2,375	1,813	3,000
<i>C. zemplinina</i>	2384	2,563	2,063	2,625	2,563	2,313	1,563	2,625
<i>H. guilliermondii</i>	6172	2,409	2,682	2,000	2,636	1,727	2,636	1,727
<i>H. guilliermondii</i>	6172	2,250	2,188	1,875	2,500	1,563	2,500	1,688
<i>H. guilliermondii</i>	6275	2,364	2,455	1,818	2,682	1,818	2,955	1,818
<i>H. guilliermondii</i>	6275	2,500	2,429	2,286	2,429	2,071	2,429	2,214
<i>H. guilliermondii</i>	6680	2,500	2,625	2,500	3,000	2,000	3,063	2,375
<i>H. guilliermondii</i>	6680	2,188	2,125	2,063	2,500	1,688	2,125	2,188
<i>H. opuntiae</i>	2278	2,563	2,375	1,938	2,438	1,875	2,813	2,000
<i>H. opuntiae</i>	2278	2,375	2,313	2,250	2,313	2,000	2,688	1,938
<i>H. uvarum</i>	1276	2,833	2,778	2,556	2,722	2,167	3,389	2,444
<i>H. uvarum</i>	1276	2,071	2,714	2,143	2,357	1,786	3,143	2,143
<i>H. uvarum</i>	2161	2,545	2,773	2,273	2,545	1,682	3,364	1,955
<i>H. uvarum</i>	2161	2,429	2,929	2,214	2,214	2,143	3,000	2,500
<i>H. uvarum</i>	2279	2,318	2,818	2,045	2,455	1,864	3,182	1,864
<i>H. uvarum</i>	2279	2,438	2,500	1,875	2,313	1,813	3,000	2,188
<i>H. uvarum</i>	6469	2,375	3,125	2,500	2,375	1,938	3,688	2,500
<i>H. uvarum</i>	6469	2,286	2,786	2,143	2,429	1,857	3,214	2,071
<i>H. uvarum</i>	6570	2,750	3,250	2,563	2,813	2,188	3,313	2,625
<i>H. uvarum</i>	6570	2,500	2,438	2,125	2,375	1,688	2,438	2,438
<i>I. orientalis</i>	2264	2,278	2,278	1,778	2,278	2,000	1,833	1,556
<i>I. orientalis</i>	2264	2,625	1,938	2,250	2,813	1,750	1,125	1,500
<i>I. terricola</i>	1170	1,938	2,438	1,563	2,125	1,563	3,500	1,500
<i>I. terricola</i>	1170	2,188	2,625	2,063	2,250	1,688	3,375	1,625
<i>I. terricola</i>	1272	2,563	2,875	2,375	2,750	1,938	4,063	2,188
<i>I. terricola</i>	2270	2,591	3,045	2,136	2,773	2,045	3,773	2,455
<i>I. terricola</i>	2270	2,250	2,313	1,875	2,250	1,875	3,500	2,375
<i>I. terricola</i>	2368	2,313	2,438	2,000	2,313	1,813	3,125	2,000
LSA	LSA	2,357	1,857	1,857	2,429	2,000	0,643	2,000
LSA	LSA	2,625	1,625	1,938	2,563	1,813	0,500	2,063
<i>Z. bailii</i>	2271	2,500	1,833	2,333	2,778	2,111	0,778	2,167
<i>Z. bailii</i>	2271	2,286	1,929	2,000	2,286	1,857	0,857	1,929
<i>Z. bisporus</i>	1162	2,438	2,063	2,125	2,625	2,000	2,000	2,250
<i>Z. bisporus</i>	1171	2,444	2,056	2,111	2,611	2,056	1,611	2,111
<i>Z. bisporus</i>	1171	2,625	2,250	2,375	2,625	2,063	1,500	2,188
<i>Z. hellenicus</i>	2170	2,667	2,944	2,111	2,556	1,722	3,556	2,222
<i>Z. hellenicus</i>	2170	2,214	3,071	2,143	2,286	1,714	3,714	1,857