



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

**Estudo comparativo do comportamento de leveduras vínicas
livres e imobilizadas na fermentação alcoólica de mosto -
dinâmica de populações envolvidas**

Catarina Isabel Grenho Estêvão

Orientador(es) | Ana Teresa Caldeira

Évora 2019



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

**Estudo comparativo do comportamento de leveduras vínicas
livres e imobilizadas na fermentação alcoólica de mosto -
dinâmica de populações envolvidas**

Catarina Isabel Grenho Estêvão

Orientador(es) | Ana Teresa Caldeira

Évora 2019



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | João Manuel Mota Barroso (Universidade de Évora)
- Vogal | Maria João Pires de Bastos Cabrita (Universidade de Évora)
- Vogal-orientador | Ana Teresa Caldeira (Universidade de Évora)

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo comparar o desempenho fermentativo de estirpes de leveduras vínicas quando utilizadas em sistema celular livre ou imobilizadas em diferentes suportes (alginato de cálcio, loofa e tufo vulcânico), recorrendo a microvinificações à escala laboratorial de mosto sintético e mosto de uva. Todos os sistemas de imobilização mostraram capacidade para conduzir a fermentação alcoólica dos mostos, obtendo-se taxas de consumo de glucose e produção de etanol compatíveis com as obtidas para as mesmas estirpes em sistema livre.

A dinâmica das comunidades microbianas durante a fermentação alcoólica do mosto de uva foi monitorizada através de sequenciação massiva de nova geração (NGS). Este estudo demonstrou a existência de diferenças claras entre as populações que dominam as fermentações espontâneas e as fermentações induzidas pela inoculação de leveduras, e verificou-se que a inoculação de leveduras livres também origina dinâmicas populacionais diferentes da utilização de sistemas de leveduras imobilizadas.

Palavras-chave: leveduras vínicas; inoculação; imobilização; fermentação alcoólica; mosto

ABSTRACT

Comparative study of the behavior of free and immobilized yeasts during alcoholic fermentation of must - the dynamics of involved population

This study aims to compare the fermentative performance of wine yeast strains when used in a free cell system or immobilized on different supports (calcium alginate, loofah and volcanic tuff), using laboratory scale microvinification of synthetic and grape must. All immobilization systems showed the ability to conduct the alcoholic fermentation of musts, obtaining glucose consumption and ethanol production rates compatible with those obtained for the same strains in free cells system.

The dynamics of microbial communities during alcoholic fermentation of grape must was monitored through new generation high-throughput sequencing (NGS). This study demonstrated the existence of clear differences between the populations that dominate spontaneous fermentation and the fermentations induced by yeast inoculation, and it was found that the inoculation of free yeast also originates different populational dynamics than the use of immobilized yeast systems.

Keywords: wine yeasts; inoculation; immobilization; alcoholic fermentation; must

ÍNDICES

1. ÍNDICE GERAL

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índices.....	vii
1. Índice Geral.....	vii
2. Índice de Figuras.....	ix
3. Índice de Tabelas.....	xi
4. Abreviaturas e Unidades.....	xii
4.1 Abreviaturas.....	xii
4.2 Unidades.....	xii
Nota Prévia.....	1
Introdução.....	2
1. Vinho – Evolução do Conhecimento.....	2
2. Processo de Produção de Vinho.....	4
3. Bioquímica da Fermentação Alcoólica.....	6
3.1 Glicólise.....	9
3.2 Fermentação Alcoólica.....	11
4. Ciclo de Crescimento das Leveduras.....	11
5. Microbiologia da Fermentação Alcoólica.....	13
6. Imobilização de Leveduras.....	17
6.1 Métodos de Imobilização.....	18
6.2 Suportes de Imobilização.....	21
Materiais e Métodos.....	25
1. Seleção e Preparação de Leveduras.....	25
2. Ensaio com Leveduras em Sistema Livre.....	26
2.1 Preparação de Suspensões Celulares.....	26
2.2 Culturas Com Arejamento.....	26
2.3 Culturas Sem Arejamento.....	26
2.4 Monitorização do Crescimento das Culturas.....	27

2.5	Monitorização do Consumo de Glucose.....	27
2.6	Monitorização da Produção de Etanol.....	27
3.	Imobilização de Leveduras.....	28
3.1	Imobilização em Alginato de Cálcio.....	28
3.2	Imobilização em Loofa.....	29
3.3	Imobilização em Tufo Vulcânico.....	30
4.	Ensaio com Leveduras Imobilizadas.....	32
4.1	Culturas Sem Arejamento.....	32
4.2	Monitorização do Consumo de Glucose e da Produção de Etanol.....	32
5.	Ensaio de Microvinificação em Mosto de Uva.....	32
5.1	Fermentação com Leveduras em Sistema Livre.....	33
5.2	Fermentação com Leveduras Imobilizadas.....	33
5.3	Fermentação Espontânea.....	33
5.4	Recolha de Amostras.....	33
5.5	Monitorização do Consumo de Glucose e da Produção de Etanol.....	34
5.6	Evolução das Comunidades Microbianas.....	34
5.6.1	Extração e Quantificação de DNA.....	36
5.6.2	Amplificação do DNA Extraído – PCR Amplicon.....	36
5.6.3	Pré-Index PCR.....	37
5.6.4	Indexação e Preparação de Biblioteca de DNA.....	38
5.6.5	Sequenciação e Processamento de Dados.....	39
	Resultados e Discussão.....	40
1.	Ensaio com Leveduras em Sistema Livre.....	40
1.1	Culturas Com Arejamento.....	40
1.2	Culturas Sem Arejamento.....	43
2.	Ensaio com Leveduras Imobilizadas.....	46
2.1	Culturas Sem Arejamento.....	46
3.	Ensaio de Microvinificação em Mosto de Uva.....	56
3.1	Culturas Sem Arejamento.....	56
3.2	Dinâmica de Populações.....	58
3.2.1	Análise Metagenómica das Amostras.....	60
	Considerações Finais.....	64
	Referências Bibliográficas.....	65
	Anexos.....	70

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de produção de vinho. Adaptado de (R. Jackson, 2008).....	5
Figura 2. Estrutura da molécula de ATP. (Ribereau-Gayon et al., 2006).....	7
Figura 3. Reação simplificada da fermentação alcoólica. (Z. Genisheva et al., 2014; Zamora, 2009).....	7
Figura 4. Vias metabólicas da glicólise e fermentação alcoólica. (Ribereau-Gayon et al., 2006).....	8
Figura 5. Reação global da glicólise. (Shuler & Kargi, 1992).....	10
Figura 6. Biossíntese de moléculas derivadas da glicólise. (Aranda et al., 2011).....	10
Figura 7. Curva de crescimento das leveduras: a. fase de latência; b. fase exponencial; c. fase estacionária; d. fase de declínio. Adaptado de (Zamora, 2009).....	12
Figura 8. Ciclo de crescimento das leveduras e cinéticas de fermentação em mosto com alto teor de açúcar. (R. S. Jackson, 2008).....	13
Figura 9. Métodos de imobilização celular: a) agregação celular; b) fixação a uma superfície; c) contenção mecânica atrás de uma barreira; c) aprisionamento numa matriz porosa. Adaptado de (Moreno-García et al., 2018).....	19
Figura 10. Esponja de loofa (<i>Luffa cylindrica</i>).....	23
Figura 11. Imobilização de leveduras em alginato de cálcio.....	29
Figura 12. Imobilização de leveduras em loofa.....	30
Figura 13. Imobilização de leveduras em tufo vulcânico.....	31
Figura 14. Princípio de sequenciação de DNA. Adaptado de (Ansorge, 2009).....	35
Figura 15. Curvas de crescimento e perfis de consumo de glucose das diferentes estirpes de levedura: a) <i>S. cerevisiae</i> A; b) <i>S. cerevisiae</i> B; c) <i>S. cerevisiae</i> C; d) <i>S. bayanus</i> ; e) Preparado comercial A; f) Preparado comercial B.....	42
Figura 16. Princípio do kit enzimático “Ethanol, UV method” da NZYTech.....	44
Figura 17. Curvas de crescimento, perfis de consumo de glucose e de produção de etanol das diferentes estirpes de levedura: a) <i>S. cerevisiae</i> A; b) <i>S. cerevisiae</i> B; c) <i>S. cerevisiae</i> C; d) <i>S. bayanus</i> ; e) Preparado comercial A; f) Preparado comercial B.....	45

Figura 18. Perfis de consumo de glicose e de produção de etanol de <i>S. cerevisiae</i> A imobilizada em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.....	47
Figura 19. Perfis de consumo de glicose e de produção de etanol de <i>S. cerevisiae</i> B imobilizada em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.....	48
Figura 20. Perfis de consumo de glicose e de produção de etanol de <i>S. cerevisiae</i> C imobilizada em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.....	49
Figura 21. Perfis de consumo de glicose e de produção de etanol de <i>S. bayanus</i> imobilizada em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.....	50
Figura 22. Perfis de consumo de glicose e de produção de etanol do Preparado comercial A imobilizado em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.....	51
Figura 23. Perfis de consumo de glicose e de produção de etanol do Preparado comercial B imobilizado em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.....	53
Figura 24. Perfis de consumo de glicose e de produção de etanol da a) Fermentação espontânea e do Preparado comercial B em b) Sistema livre e imobilizado em c) Alginato de Cálcio, d) Loofa e e) Tufo vulcânico.....	57
Figura 25. Eletroforetograma do PCR Amplicon.....	59
Figura 26. Abundância relativa dos 20 microrganismos majoritários em função do tempo de cultura.....	60
Figura 27. Análise de componentes principais.....	61
Figura 28. Abundância relativa das 30 espécies majoritárias.....	62
Figura 29. Reta de calibração utilizada no doseamento de glúcidos redutores.....	72

3. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Procedimento para microplaca do kit enzimático “Ethanol, UV method” da NZYTech.....	28
Tabela 2. Primers para eucariotas para NGS.....	37
Tabela 3. Taxa específica de crescimento, Tempo de geração e Taxa volumétrica de consumo de glucose das diferentes estirpes de levedura em culturas líquidas de meio YPD.....	43
Tabela 4. Taxa específica de crescimento, Tempo de geração, Taxa volumétrica de consumo de glucose e Taxa volumétrica de produção de etanol das diferentes estirpes de levedura em culturas líquidas de mosto sintético.....	46
Tabela 5. Taxa volumétrica de consumo de glucose das diferentes estirpes de levedura em cada um dos suportes de imobilização em comparação com a sua taxa volumétrica em sistema livre.....	54
Tabela 6. Taxa volumétrica de produção de etanol das diferentes estirpes de levedura em cada um dos suportes de imobilização em comparação com a sua taxa volumétrica em sistema livre.....	55
Tabela 7. Taxa volumétrica de consumo de glucose e Taxa volumétrica de produção de etanol da Fermentação espontânea e do Preparado comercial B em sistema livre e imobilizado nos diferentes suportes.....	58

4. ABREVIATURAS E UNIDADES

4.1 ABREVIATURAS

- Abs – Absorvância
- DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico
- HTS – *High-throughput sequencing*
- NGS – *New generation sequencing*
- PCR – *Polymerase chain reaction*
- YNB – *Yeast nitrogen base*
- YPD – *Yeast extract peptone dextrose*

4.2 UNIDADES

- bp – *Base pair* (par de bases)
- °C – Graus Celcius
- g – Grama
- h – Hora
- kcal – Quilocaloria
- L – Litro
- M – Molar
- mg – Miligrama
- min – Minuto
- mL – Mililitro
- mol – Mole
- nM – Nanomolar
- nm – Nanometro
- pM – Picomolar
- rpm – Rotações por minuto
- U – Unidade de atividade enzimática
- UFC – Unidade formadora de colónias
- V – Volt
- µL – Microlitro
- µM – Micromolar
- % (p/v) – Percentagem peso/volume

NOTA PRÉVIA

A imobilização de leveduras tem sido encarada como uma tecnologia que pretende revolucionar a indústria da produção de vinho num futuro próximo. Contudo, apesar de já terem sido estudados e caracterizados vários métodos e aplicações enológicas, hoje em dia a utilização de leveduras imobilizadas em escala industrial nas adegas vai pouco além da aplicação na segunda fermentação da produção de espumantes.

Com este trabalho pretende-se contribuir para a evolução do conhecimento acerca deste tipo de tecnologia e potenciar as vantagens associadas à sua utilização, tendo em vista a otimização futura de processos enológicos em grande escala e a consequente melhoria da qualidade dos produtos comercializados.

Este trabalho teve como objetivos comparar, recorrendo a microvinificações à escala laboratorial, o desempenho fermentativo de diversas estirpes de leveduras, incluindo preparados de leveduras secas ativas disponíveis no mercado, quando utilizadas em sistema celular livre ou imobilizadas em diferentes suportes. Procurou-se utilizar métodos de imobilização simples, cuja aplicação à escala industrial seja facilmente exequível, e suportes que fossem compatíveis com o processo de produção de vinho e cumprissem os pré-requisitos necessários para o efeito. Pretendeu-se também estudar e comparar o desenvolvimento das populações microbianas envolvidas na fermentação alcoólica do mosto de uvas, quando se recorre à inoculação de leveduras livres ou imobilizadas face a uma fermentação espontânea, conduzida exclusivamente pelos microrganismos que se encontram nas uvas.

INTRODUÇÃO

1. VINHO – EVOLUÇÃO DO CONHECIMENTO

O vinho é uma bebida com mais de 8000 anos de história (Grainger & Tattersall, 2007; R. Jackson, 2008). Conhecido e difundido por todo o mundo, a importância do vinho marcou as civilizações antigas e continua a marcar o presente (Z. Genisheva, Teixeira, & Oliveira, 2014).

“Nenhuma outra bebida é discutida, adorada ou criticada da mesma forma que o vinho” (Grainger & Tattersall, 2007). De entre todas as bebidas existentes, o vinho é provavelmente aquela que mais estudos e publicações inspirou (Ribereau-Gayon, Dubourdieu, Doneche, & Lonvaud, 2006).

A nível mundial, existe uma grande diversidade no estilo e qualidade dos vinhos produzidos, o que promove constante discussão e desacordo tanto entre *experts* como entre os mais comuns consumidores. A popularidade do vinho de um determinado produtor, região ou país varia de acordo com a percepção de estilo, qualidade, moda e valor por parte dos consumidores e dos *media*. Se as necessidades e desejos do consumidor não forem devidamente atendidos, este não permanecerá leal a esse produto (Grainger & Tattersall, 2007).

Alguns autores acreditam que, com os avanços tecnológicos e com o aumento do domínio sobre os processos, as características distintivas de um vinho, resultantes de diferenças varietais, regionais e estilísticas, tornar-se-ão mais discerníveis e controláveis (R. Jackson, 2008). Contudo, outros afirmam que, nas últimas décadas, como consequência da globalização e consolidação dos produtores, parece assistir-se uma padronização dos estilos dos vinhos que, embora não afete a sua qualidade, constitui uma ameaça à diversidade existente (Ciani, Comitini, Mannazzu, & Domizio, 2010; Grainger & Tattersall, 2007).

De acordo com o Artigo nº2 do Decreto-Lei nº35846/46 de 02/09/1946, denomina-se “mosto” o sumo de uva não fermentado proveniente de uvas frescas, e o vinho é o produto resultante da fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas ou do seu mosto, produzido segundo os processos tecnológicos admitidos por lei.

A transformação do mosto em vinho envolve um processo microbiológico complexo, onde as leveduras têm um papel fundamental na condução da fermentação alcoólica, transformando os açúcares das uvas em etanol, dióxido de carbono e outros produtos secundários (Aranda, Matallana, & Olmo, 2011; Cappello, Zapparoli, Logrieco, & Bartowsky, 2017; Ciani & Comitini, 2015; Ciani et al., 2010; García, Esteve-Zarzoso, & Arroyo, 2016; González-Royo et al., 2015; Maturano et al., 2012; Zamora, 2009).

Esta transformação pode ser um fenómeno espontâneo, uma vez que aquilo que é necessário para que esta ocorra já se encontra presente nas uvas. A sua polpa é rica em açúcar e as leveduras encontram-se na pruína que envolve o exterior das películas; ao esmagar as uvas, a polpa fica exposta a este complexo microbiano que, dependendo das suas características e da composição da comunidade, se vai desenvolver espontaneamente (Grainger & Tattersall, 2007; Moreno-Arribas & Polo, 2009). Sem qualquer controlo, este sistema evoluiria até um produto que dificilmente alcançaria a qualidade exigida para ser consumido e agradar ao consumidor. É por esse motivo que a perícia do enólogo é indispensável. Esta baseia-se no conhecimento, a nível científico, dos fenómenos que constituem este processo, ou seja, na enologia (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

A enologia teve origem na observação e no empirismo e evoluiu muito em função dos avanços nos campos científicos da química, bioquímica e microbiologia, que atualmente não dispensa (Ciani et al., 2010; R. Jackson, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2009; Ribereau-Gayon et al., 2006). Estas ciências começaram a ser utilizadas para interpretar as observações dos produtores já desde o século XIX, e agora constituem as fundações sobre as quais foram estabelecidas as regras básicas para a vinificação e o envelhecimento de vinhos (R. Jackson, 2008; Moreno-Arribas & Polo, 2009; Ribereau-Gayon et al., 2006). Em primeiro lugar procurou-se evitar os defeitos e alterações mais prejudiciais à qualidade de um vinho. Durante a década de 1860, Louis Pasteur desenvolveu uma investigação que permitiu solucionar várias “doenças” do vinho, a qual se tornou a base para a compreensão dos processos fermentativos. Posteriormente, o conhecimento tornou-se mais preciso e confiável, e permitiu aperfeiçoar a perícia da produção de vinhos até aos altos padrões atuais (Mateo & Maicas, 2016; Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Com o avanço no conhecimento acerca do que ocorre nos processos de vinificação, é possível, hoje em dia, compreender as reações bioquímicas catalisadas por enzimas de leveduras e bactérias, que ocorrem simultaneamente a reações químicas entre moléculas que já se encontram presentes no mosto, moléculas extraídas dos sólidos da uva ao longo da fermentação, moléculas derivadas do metabolismo e moléculas extraídas da madeira (no caso desta ser

utilizada). O tipo e intensidade de reações que ocorrem são muitas vezes influenciadas pelos parâmetros de temperatura e oxigénio dissolvido. O controlo destes parâmetros nas diferentes operações enológicas confere ao produtor grande controlo sobre a qualidade final de um vinho (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

É pela complexidade das reações de ocorrem em simultâneo durante a vinificação que investigadores de várias áreas aliam esforços. Por exemplo, atualmente a análise sensorial é utilizada no laboratório em conjunto com métodos químicos na deteção de moléculas presentes nos vinhos, e técnicas de genómica são utilizadas em estudos sobre leveduras e bactérias com intuito de conhecer e tirar partido da biodiversidade de espécies que estão envolvidas nos processos fermentativos (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE VINHO

Para a produção de vinho, é necessário considerar sempre a fase de viticultura (a produção das uvas) e a fase de vinificação (a transformação das uvas em vinho) (Grainger & Tattersall, 2007). Hoje em dia, a produção de vinho está dependente da capacidade dos produtores para fazerem as escolhas mais adequadas a partir do grande conjunto de opções disponíveis para a realização de cada uma das etapas do processo (R. Jackson, 2008). Todas as decisões e operações realizadas, tanto na vinha como na adega, irão refletir-se no estilo e qualidade do produto final. O objetivo é, de um modo geral, obter o maior controlo sobre o custo, rendimento e qualidade em todos os processos. Para os produtores, para além dos fatores geográficos, geológicos, históricos, legais, financeiros e comerciais, os fatores relacionados com a mão de obra (sobretudo a disponibilidade e o custo) são os que mais condicionam a estrutura das operações e, conseqüentemente, as decisões tomadas (Grainger & Tattersall, 2007).

Não existem, porém, decisões completamente certas ou erradas. As características das uvas variam todos os anos e cabe ao enólogo escolher de entre as técnicas disponíveis, ponderando as vantagens e limitações de cada uma, aquela que lhe parece mais adequada às circunstâncias do momento (R. Jackson, 2008). Por este motivo, não existe uma abordagem única e inquestionável para a produção de vinho (Grainger & Tattersall, 2007).

O processo de vinificação mais comum atualmente pode, então, ser dividido em várias etapas, como exemplificado no esquema da *Figura 1*, começando pela preparação do mosto, na qual, de um modo geral, as uvas são separadas dos engaços e outros resíduos, e esmagadas. Nesta fase é habitual recorrer à adição de dióxido de enxofre para evitar oxidações do mosto e o desenvolvimento indesejado de microrganismos contaminantes.

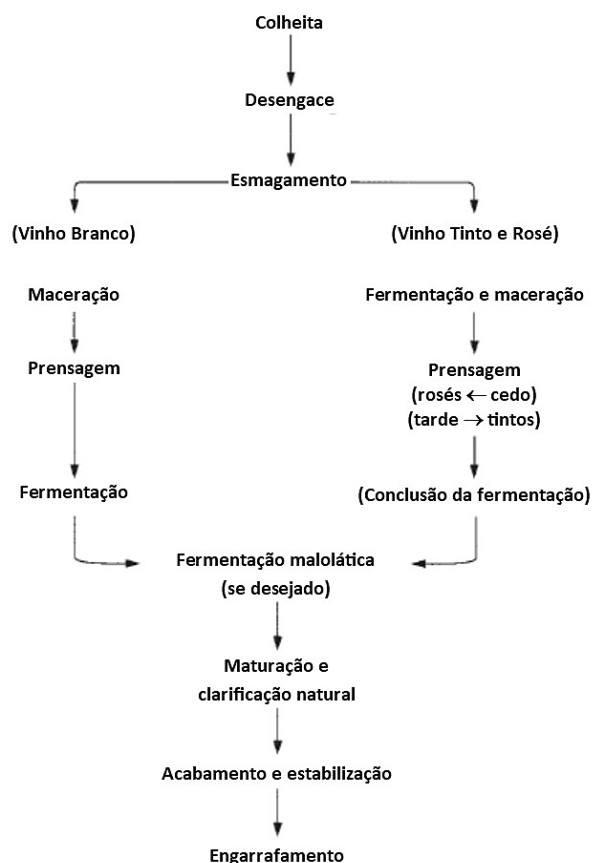


Figura 1. Diagrama de produção de vinho. Adaptado de (R. Jackson, 2008)

Dependendo das características das uvas e do tipo de vinho pretendido, pode recorrer-se a macerações mais ou menos prolongadas para extração de compostos das películas para o sumo, o que é frequente nos vinhos tintos e rosés, e as uvas podem também ser prensadas e o seu sumo ser submetido a clarificação (com ou sem adição de enzimas pectinases para acelerar a sedimentação das partículas), o que é frequente ocorrer no caso dos vinhos brancos e rosés. A acidez do mosto necessita muitas vezes de ser ajustada, pelo que se recorre geralmente à adição de ácido tartárico para a aumentar ou carbonato de cálcio para a diminuir (Z. Genisheva et al., 2014; R. Jackson, 2008).

A fase seguinte consiste na fermentação alcoólica, onde o açúcar do mosto é convertido em etanol, e pode ter início espontaneamente pelo desenvolvimento das leveduras indígenas presentes nas películas, ou ser induzida pela inoculação de *starters* de leveduras comerciais selecionadas (Z. Genisheva et al., 2014; R. Jackson, 2008). A fermentação alcoólica nos vinhos tintos ocorre geralmente em conjunto com maceração, cuja duração depende da variedade da uva e do tipo de vinho pretendido (Z. Genisheva et al., 2014). Uma vez completa esta fase, se for desejado, o vinho pode ser submetido a uma fermentação malolática, em que o ácido málico é convertido em ácido láctico por ação de bactérias lácticas (R. Jackson, 2008).

Para preparar o vinho para ser comercializado e consumido, este passa ainda por processos de estabilização e, caso se pretenda, envelhecimento, e, por fim, é engarrafado e embalado (Z. Genisheva et al., 2014).

Dependendo do tipo de vinho, em alguns casos todo este processo pode demorar apenas uns meses a ser concluído, noutros pode levar anos ou até décadas (Grainger & Tattersall, 2007).

3. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

As leveduras obtêm a energia necessária ao seu desenvolvimento através da degradação de nutrientes orgânicos. A energia produzida por reações de degradação (reações catabólicas) é transferida para a cadeia de reações de síntese (reações anabólicas). A energia fornecida pela degradação de substratos é parcialmente convertida em energia livre que pode ser utilizada para a biossíntese e para o transporte ativo de metabolitos. Em sistemas biológicos, a energia livre é armazenada e transportada principalmente através de moléculas de ATP (adenosina trifosfato). Esta molécula, que se encontra representada na *Figura 2*, é rica em energia porque contém duas ligações fosfato altamente energéticas.

A hidrólise de ATP em ADP (adenosina difosfato) liberta uma grande quantidade de energia livre (7,3kcal/mol). O crescimento das leveduras está diretamente relacionado com a quantidade de ATP fornecido pelas vias metabólicas utilizadas para degradar os substratos (Ribereau-Gayon et al., 2006; Shuler & Kargi, 1992).

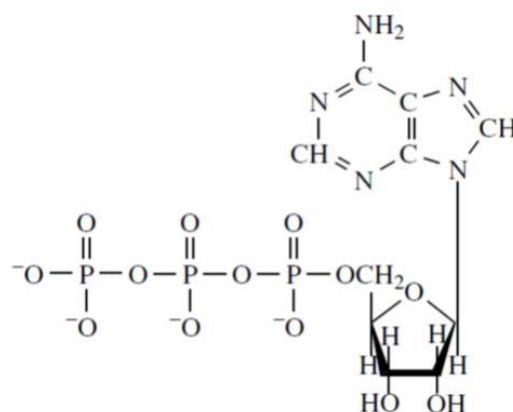


Figura 2. Estrutura da molécula de ATP. (Ribereau-Gayon et al., 2006)

O principal processo metabólico que ocorre durante a produção de vinho é a fermentação alcoólica. Esta via catabólica envolve a transformação anaeróbica dos açúcares fermentáveis presentes no mosto, principalmente glucose e frutose, em etanol e dióxido de carbono (Aranda et al., 2011). Este processo ocorre no citoplasma das células e pode ser expresso pela reação simplificada da *Figura 3* (Z. Genisheva et al., 2014; Zamora, 2009).

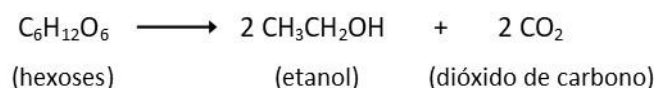


Figura 3. Reação simplificada da fermentação alcoólica. (Z. Genisheva et al., 2014; Zamora, 2009)

Contudo, a fermentação alcoólica é um processo bastante mais complexo. Simultaneamente a esta reação geral, ocorrem muitas outras reações químicas e bioquímicas que resultam na produção de vários compostos que vão contribuir para as propriedades organoléticas do vinho. Estas substâncias, produzidas em pequenas quantidades, pertencem às mais diversas famílias químicas como ácidos orgânicos, álcoois superiores, aldeídos ácidos gordos voláteis, esteres etílicos e acetatos. Sem a produção destes compostos o vinho teria muito pouco interesse organolético (Aranda et al., 2011; Z. Genisheva et al., 2014; Zamora, 2009). A *Figura 4* esquematiza o conjunto de reações que compõem este processo.

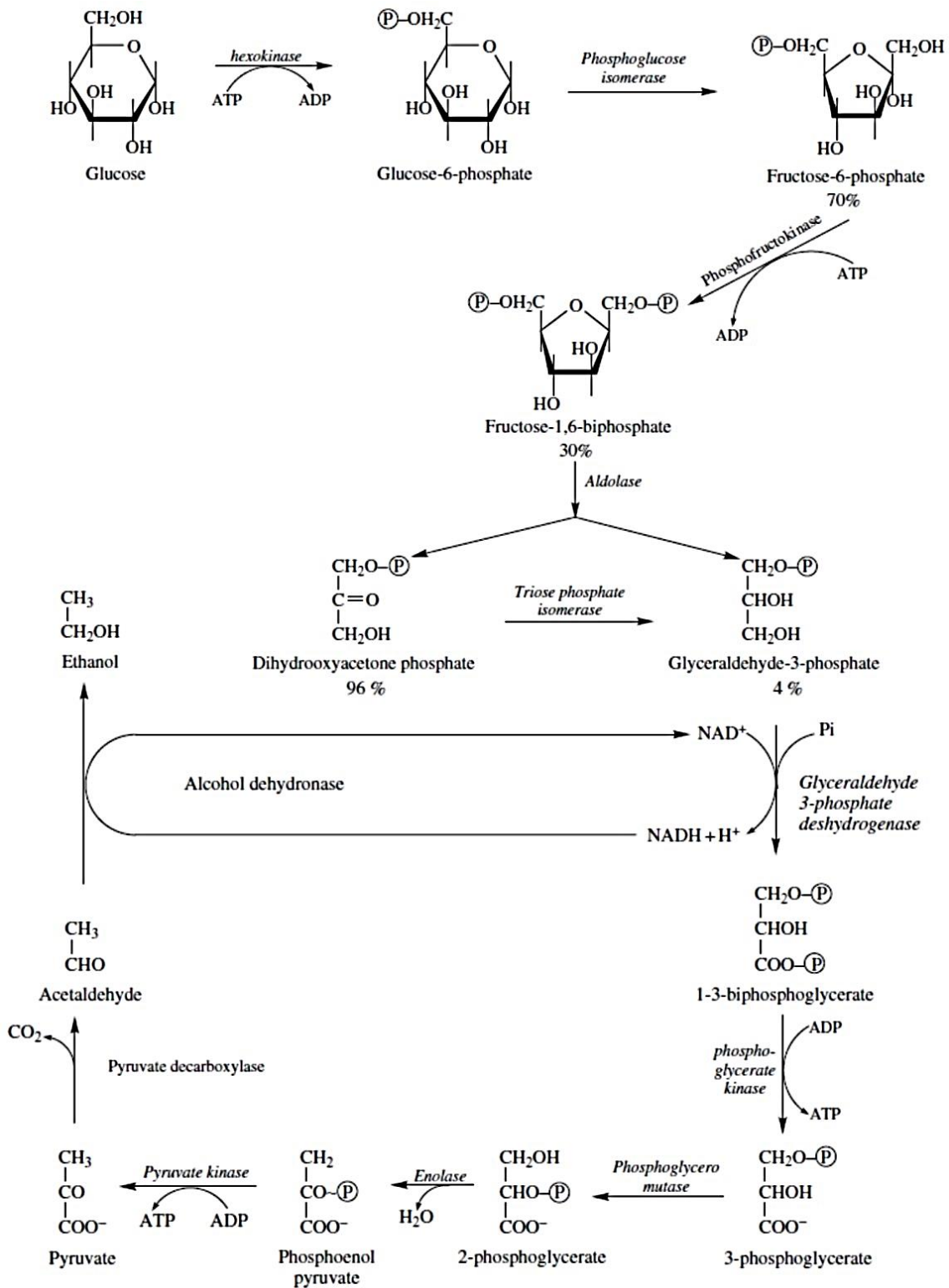


Figura 4. Vias metabólicas da glicólise e fermentação alcoólica. (Ribereau-Gayon et al., 2006)

3.1 GLICÓLISE

A conversão dos açúcares do mosto em etanol envolve, em primeiro lugar, a glicólise. Para a maioria dos organismos, incluindo as leveduras, esta via metabólica representa o principal processo inicial do catabolismo dos carboidratos. Este processo consiste numa sequência de reações que resultam na transformação das hexoses (glucose e frutose) em piruvato, com libertação de energia na forma de ATP (Aranda et al., 2011; R. S. Jackson, 2008; Ribereau-Gayon et al., 2006; Zamora, 2009).

O transporte das hexoses através da membrana para o interior das células pode ocorrer por difusão facilitada. Como a concentração de açúcar no interior das células é menor que a concentração no mosto, este sistema de transporte não requer energia (Ribereau-Gayon et al., 2006; Zamora, 2009).

A primeira reação da glicólise consiste na fosforilação da glucose e frutose pela ação de enzimas chamadas hexocinases, formando, respetivamente, glucose-6-fosfato e frutose-6-fosfato. Esta reação requer o consumo de ATP, mas permite preservar o gradiente de concentração de hexoses, favorecendo o transporte dos açúcares para o interior da célula. A enzima fosfoglucose isomerase converte a glucose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, que sofre uma segunda fosforilação pela ação da fosfofrutocinase, dando origem a frutose-1,6-difosfato. Esta reação também requer o consumo de ATP.

De seguida, a enzima aldolase catalisa a clivagem da frutose-1,6-difosfato em duas triose-fosfato: gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato. Esta última é rapidamente convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela ação da triose fosfato isomerase. Assim, considera-se que uma molécula de glucose leva à formação de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato é então transformado em 1,3-difosfoglicerato. Esta reação é catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e envolve a oxidação e fosforilação do substrato, com transferência de dois eletrões para uma molécula de NAD^+ que passa a NADH.

Seguidamente, a fosfoglicerato-cinase catalisa a transformação do 1,3-difosfoglicerato em 3-fosfoglicerato e o grupo fosfato resultante é transferido para uma molécula de ADP formando ATP. O 3-fosfoglicerato é convertido, pela ação da fosfoglicerato-mutase, em 2-fosfoglicerato que, por sua vez, é desidratado pela ação da enolase, dando origem a fosfoenolpiruvato. Este é, então, desfosforilado pela enzima piruvato-cinase e o grupo fosfato é transferido para uma molécula de ADP, resultando na formação de ATP e piruvato, que é

o produto final da glicólise (Aranda et al., 2011; Ribereau-Gayon et al., 2006; Shuler & Kargi, 1992; Zamora, 2009).

Fazendo um balanço geral da glicólise, cada molécula de hexose dá origem a duas moléculas de piruvato e a quatro de ATP, mas como duas destas são consumidas numa fase inicial, considera-se que há um ganho energético de duas moléculas de ATP por molécula de hexose metabolizada (Ribereau-Gayon et al., 2006; Zamora, 2009). A glicólise pode ser resumida pela reação global representada na *Figura 5*.



Figura 5. Reação global da glicólise. (Shuler & Kargi, 1992)

A glicólise não está apenas envolvida na produção de energia para as leveduras. Esta via metabólica está também relacionada com a produção de metabolitos envolvidos na biossíntese de moléculas importantes para as células, como se encontra esquematizado na *Figura 6* (Aranda et al., 2011).

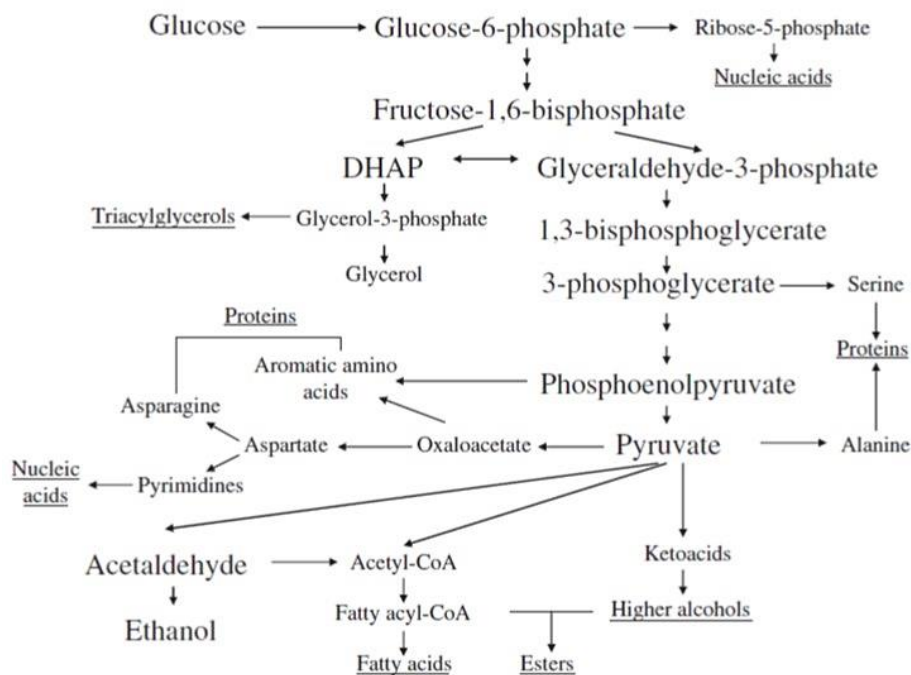


Figura 6. Biossíntese de moléculas derivadas da glicólise. (Aranda et al., 2011)

3.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O piruvato produzido pela glicólise pode ser utilizado em várias vias metabólicas, contudo, para restabelecerem o seu potencial redox e garantirem a continuação da glicólise, as células devem reoxidar o NADH a NAD⁺. Leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* tendem a direcionar o piruvato para a produção de etanol, permitindo regenerar o NAD⁺ através de duas reações adicionais que constituem a fermentação alcoólica (Aranda et al., 2011; Ribereau-Gayon et al., 2006; Zamora, 2009).

Na primeira reação, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído pela ação da piruvato-descarboxilase, resultando na libertação de CO₂. Esta enzima requer pirofosfato de tiamina e magnésio como cofatores. Na segunda reação, a álcool-desidrogenase catalisa a redução do acetaldeído a etanol, numa reação que envolve a oxidação do NADH a NAD⁺ (Aranda et al., 2011; Ribereau-Gayon et al., 2006; Zamora, 2009).

Os produtos finais de fermentação alcoólica (etanol e dióxido de carbono) são, então, transportados para o exterior da célula por difusão simples (Zamora, 2009).

4. CICLO DE CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS

Ao longo da fermentação, as leveduras metabolizam os açúcares e nutrientes presentes no mosto para obter energia e aumentar a sua população. A *Figura 7* demonstra o ciclo de crescimento típico das leveduras sob condições *standard*. Este padrão de crescimento é geralmente dividido em quatro fases: fase de latência (ou lag), fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio (R. S. Jackson, 2008; Zamora, 2009).

Durante as primeiras horas de fermentação, as leveduras atravessam um período de adaptação ao novo ambiente chamado de fase de latência. Nesta fase a sua população mantém-se relativamente constante. Uma vez adaptadas, as leveduras começam a multiplicar-se e a sua população aumenta rapidamente até atingir o seu valor máximo. É a chamada fase exponencial. Este período é altamente influenciado pela temperatura, oxigénio e pela concentração de nutrientes no meio. Quando as condições se começam a tornar desfavoráveis, pela existência de alguma deficiência nutricional e pelos metabolitos tóxicos que

se começam a acumular, a taxa de divisão celular das leveduras diminui e aproxima-se da taxa de células que morrem, mantendo a população num número praticamente constante. Considera-se que nesta altura a cultura entrou na fase estacionária. As condições nutricionais continuam a deteriorar-se e, eventualmente, a falta de nutrientes e o aumento da concentração de etanol e de outras substâncias tóxicas para as leveduras, acabam por levar à diminuição gradual da população, que entra na chamada fase de declínio. Porque as células morrem a um ritmo mais elevado do que se duplicam, as células viáveis não são substituídas e a população acaba por se extinguir (R. S. Jackson, 2008; Zamora, 2009).

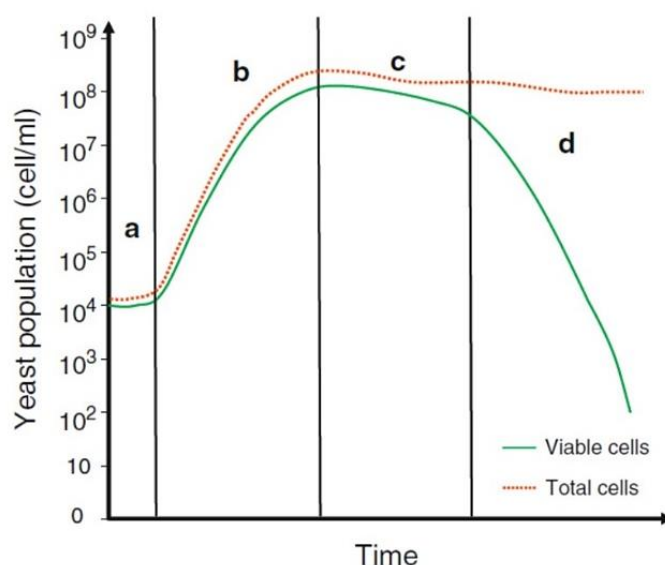


Figura 7. Curva de crescimento das leveduras: a. fase de latência; b. fase exponencial; c. fase estacionária; d. fase de declínio. *Adaptado de (Zamora, 2009)*

Apesar de manter um padrão semelhante à *Figura 7*, a curva de crescimento das leveduras em mosto pode sofrer algumas variações. A *Figura 8* representa o crescimento de leveduras em mosto de uva com um alto teor de açúcar, o consumo dos açúcares e a produção de etanol (R. S. Jackson, 2008).

Para que a fermentação alcoólica seja bem-sucedida, é necessário manter a população de leveduras viáveis num nível suficiente para permitir o consumo da totalidade dos açúcares fermentáveis, evitando o risco de paragens de fermentação ou fermentações lentas (Zamora, 2009).

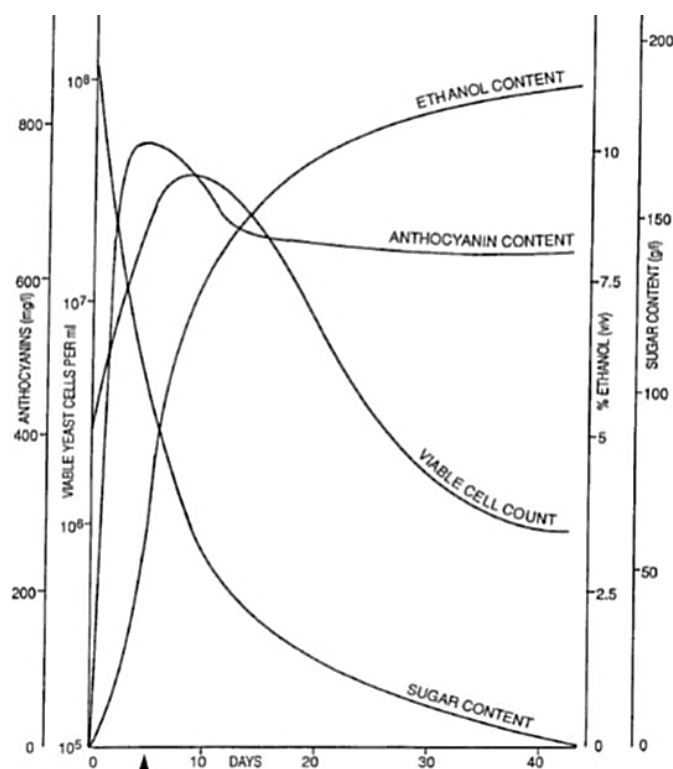


Figura 8. Ciclo de crescimento das leveduras e cinéticas de fermentação em mosto com alto teor de açúcar. (R. S. Jackson, 2008)

5. MICROBIOLOGIA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Como referido anteriormente, o vinho resulta de complexas interações microbianas entre leveduras, bactérias e fungos filamentosos, apesar do papel central das leveduras na fermentação alcoólica. (Aranda et al., 2011; Cappello et al., 2017; Drozd, Makarewicz, & Tuszyński, 2013; Maturano et al., 2012)

Quando se trata de enologia, a *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura mais notória (Claus, 2019; García et al., 2016; R. S. Jackson, 2008; Maturano et al., 2012). Esta levedura aparece não só ligada à produção de vinho, mas também representa um papel fundamental na produção de cerveja e pão, e as suas estirpes laboratoriais são utilizadas em estudos nas áreas da genética, bioquímica e biologia molecular (R. S. Jackson, 2008; Pérez-Ortín & García-Martínez, 2011).

Em uvas saudáveis, a presença de *S. cerevisiae* e outras espécies do género *Saccharomyces* é raramente detetada e, quando estão presentes, aparecem apenas em pequena quantidade. Contudo, espécies de outros géneros de

leveduras são frequentemente encontradas nas uvas, folhas e caules, como por exemplo espécies de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* ou *Torulaspota* (Aranda et al., 2011; Capozzi, Garofalo, Chiriatti, Grieco, & Spano, 2015; Z. Genisheva et al., 2014; R. S. Jackson, 2008; Manzanares, Vallés, & Viana, 2011; Mateo & Maicas, 2016). Quando as uvas de encontram doentes ou danificadas, a quantidade de células de *S. cerevisiae* encontrada é geralmente superior. No entanto, nestas circunstâncias, são geralmente detetados outros microrganismos, em números significativos, que raramente se encontram em uvas saudáveis. É o caso de fungos filamentosos, como *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Plasmopara* e *Uncinula*, e bactérias acéticas (R. S. Jackson, 2008).

Para além do estado sanitário das uvas, a biodiversidade e quantidade de organismos presentes nas uvas depende outros fatores como o nível de maturação, os tratamentos antifúngicos, as condições climáticas e as práticas culturais. Também o contacto das uvas durante a colheita, transporte e manuseamento na adega influenciam a diversidade de microrganismos presentes no início da fermentação alcoólica (Aranda et al., 2011; González-Royo et al., 2015; R. S. Jackson, 2008; Manzanares et al., 2011; Zamora, 2009). Desta forma, no início do processo de vinificação, várias espécies podem estar presentes no mosto e participar na fermentação influenciando, positiva ou negativamente, a composição e a qualidade final do vinho (Ciani et al., 2016; Z. Genisheva et al., 2014; Mateo & Maicas, 2016; Tello, Cordero-Bueso, Aporta, Cabellos, & Arroyo, 2012; Zamora, 2009).

No caso das fermentações alcoólicas espontâneas há uma sucessão de organismos que prevalecem ao longo do processo. Numa primeira fase a fermentação é dominada por leveduras dos géneros *Hanseniaspora* e *Candida*, que vão sendo substituídos por *Pichia* e *Metschnikowia*, que predominam numa fase intermédia. Na fase final, a levedura predominante é a *Saccharomyces cerevisiae*, muitas vezes sendo a única espécie detetada no final da fermentação (Andorra, Monteiro, Esteve-Zarzoso, Albergaria, & Mas, 2011; Aranda et al., 2011; Capozzi et al., 2015; Ciani & Comitini, 2015; Ciani et al., 2010; Z. Genisheva et al., 2014; González-Royo et al., 2015; R. S. Jackson, 2008; Manzanares et al., 2011; Mateo & Maicas, 2016; Tello et al., 2012; Zamora, 2009).

O ambiente altamente osmótico e a elevada acidez do mosto restringirem logo, à partida, o crescimento de grande parte dos microrganismos presentes, mas o domínio de *S. cerevisiae* em relação a outras leveduras não-*Saccharomyces* é atribuída a vários fatores relacionados com a competição por nutrientes e produção de compostos tóxicos. Destes fatores, o mais evidente parece ser a maior resistência de *S. cerevisiae* à elevada concentração de etanol produzida durante a fermentação. Para além do etanol, outros metabolitos

podem exercer uma pressão seletiva sobre as populações, por exemplo, a produção de ácidos gordos de cadeia média e de quantidades elevadas de ácido acético podem inibir o crescimento de algumas espécies. O rápido desenvolvimento de condições anaeróbicas é outro fator que limita o crescimento de leveduras que, comparativamente a *S. cerevisiae*, têm baixa tolerância à reduzida disponibilidade de oxigênio. Em adição a estes fatores inerentes aos processos fermentativos, a comum adição de dióxido de enxofre aos mostos tem um forte efeito seletivo no desenvolvimento dos microrganismos, favorecendo a predominância de *S. cerevisiae* que é mais resistente do que a maioria das espécies (Andorra et al., 2011; Aranda et al., 2011; Ciani & Comitini, 2015; Ciani et al., 2010; Z. Genisheva et al., 2014; R. S. Jackson, 2008; Zamora, 2009).

Ainda assim, acredita-se que as leveduras não-*Saccharomyces* constituem um importante fator de diversidade às fermentações e têm a potencialidade de influenciar as propriedades organolépticas de um vinho em proporção à sua abundância relativa durante a sua fermentação. Na realidade, as leveduras indígenas têm a capacidade de produzir perfis sensoriais dificilmente replicáveis. Desta forma, algumas adegas optam por utilizar fermentações alcoólicas espontâneas pois acreditam que conferem maior complexidade aos seus produtos. As fermentações espontâneas permitem acentuar a singularidade muito procurada na comercialização de vinhos *premium*, que é frequentemente associada ao *terroir* (Capozzi et al., 2015; Ciani & Comitini, 2015; Comitini, Capece, Ciani, & Romano, 2017; González-Royo et al., 2015; R. S. Jackson, 2008; Mateo & Maicas, 2016; Maturano et al., 2012; Tello et al., 2012; Ugliano & Henschke, 2009; Zamora, 2009).

Por outro lado, a natureza imprevisível das interações microbianas acarreta o risco do aparecimento de odores ou sabores desagradáveis. A presença de leveduras como *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Brettanomyces* durante a fermentação pode dar origem a alguns defeitos no vinho. As fermentações espontâneas também tendem a apresentar períodos de latência mais prolongados tornando-se mais suscetíveis a possíveis perturbações. Por estes motivos, a maioria das adegas onde a consistência das marcas e produtos é essencial, recorre à inoculação dos mostos com *starters* de leveduras secas ativas para garantir que a fermentação alcoólica ocorre de forma previsível e reprodutível (Aranda et al., 2011; Comitini et al., 2017; González-Royo et al., 2015; R. S. Jackson, 2008; Manzanares et al., 2011; Tello et al., 2012; Zamora, 2009).

Quando o mosto é inoculado com uma levedura selecionada, a flora nativa das uvas parece ter pouco impacto na produção de vinho (Ciani & Comitini, 2015; R. S. Jackson, 2008; Mateo & Maicas, 2016). Porém, nos casos em que o mosto é proveniente de uvas doentes, as populações significativamente alteradas

são capazes de afetar a fermentação, mesmo quando se recorre à inoculação. Por vezes, mesmo em uvas saudáveis, outras leveduras podem estar presentes em concentrações tão altas quanto aquelas das leveduras inoculadas e podem permanecer viáveis, mantendo ou aumentando a sua concentração durante a fermentação (Ciani et al., 2016, 2010; R. S. Jackson, 2008).

A inoculação de estirpes selecionadas, geralmente de *Saccharomyces cerevisiae*, foi introduzida com o objetivo de assegurar o rápido arranque da fermentação e a obtenção de vinhos com as características de qualidade e sabor desejáveis (Aranda et al., 2011; Ciani & Comitini, 2015; R. S. Jackson, 2008; Ugliano & Henschke, 2009).

A caracterização das espécies de *Saccharomyces* permitiu selecionar estirpes que são menos suscetíveis de dar origem a sabores indesejáveis e que permitem realçar os diferentes atributos de um vinho. Existem estirpes de *S. cerevisiae* disponíveis no mercado adequadas para a maioria das situações: desde estirpes que promovem a libertação do aroma varietal das uvas, estirpes que dão origem a atributos sensoriais específicos ou estirpes que têm um carácter aromaticamente neutro, estirpes reconhecidas pela baixa produção de compostos como ácido acético, ácido sulfídrico ou ureia, pela elevada velocidade de fermentação, pela capacidade de sintetizar ou degradar ácido málico ou láctico, pela capacidade de aumentar a concentração de glicerol ou pela capacidade de retomar fermentações paradas, estirpes indicadas para a produção de determinados estilos de vinho e até estirpes regionais indicadas para a produção de vinhos típicos (R. S. Jackson, 2008; Ugliano & Henschke, 2009).

Esta variabilidade genética e metabólica confere aos produtores a capacidade de modular os seus vinhos consoante as características pretendidas. Ainda assim, a procura de uma maior diversidade de sabores e da criação de produtos únicos tem despertado interesse na utilização de *multi-starters* com estirpes selecionadas de leveduras não-*Saccharomyces* e de *S. cerevisiae* na fermentação alcoólica (Aranda et al., 2011; Canonico, Comitini, Oro, & Ciani, 2016; Ciani et al., 2016, 2010; Ciani & Comitini, 2015; Claus, 2019; González-Royo et al., 2015; R. S. Jackson, 2008; Mateo & Maicas, 2016; Ugliano & Henschke, 2009). Esta alternativa à fermentação espontânea ou à típica inoculação de *S. cerevisiae* parece ser um compromisso que permite diminuir as diferenças individuais, características das fermentações espontâneas, conferindo aos vinhos produzidos um carácter mais uniforme mas igualmente complexo e distintivo (Ciani et al., 2010; González-Royo et al., 2015; R. S. Jackson, 2008).

Acredita-se que ao inocular leveduras não-*Saccharomyces* com estirpes de *S. cerevisiae* as suas atividades metabólicas negativas podem não se expressar ou podem ser modificadas pelas atividades metabólicas das estirpes de *S.*

cerevisiae. Várias publicações já mostraram o impacto da inoculação de culturas mistas, através de co-inoculação ou por inoculação sequencial, no teor de etanol, produção de metabolitos, atividades enzimáticas, sabor e perfil aromático do vinho, que vai depender das estirpes selecionadas e da estratégia de inoculação utilizada (Canónico et al., 2016; Ciani et al., 2010; García et al., 2016; Manzanares et al., 2011; Mateo & Maicas, 2016).

6. IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS

O interesse em melhorar o desempenho e a produtividade dos processos fermentativos tem levado à adoção de novas metodologias na produção de vinho. É este o caso da utilização de leveduras imobilizadas (Z. Genisheva et al., 2014).

A imobilização celular é definida como o confinamento físico de células intactas e biologicamente ativas num espaço restrito. Esta tecnologia já é utilizada em diversos processos fermentativos, desde produção de bioetanol, produção de vinagre, produção de cidra, cerveja e vinho. Na produção de vinho, estes sistemas de imobilização celular podem ser utilizados tanto na fermentação alcoólica como na fermentação malolática, e também na produção de espumantes (Z. Genisheva et al., 2014; Zlatina Genisheva, Macedo, Mussatto, Teixeira, & Oliveira, 2012; Moreno-García, García-Martínez, Mauricio, & Moreno, 2018).

Em comparação com a inoculação de leveduras livres, a utilização de leveduras imobilizadas na fermentação alcoólica apresenta várias vantagens económicas e tecnológicas (Zlatina Genisheva et al., 2012; Zlatina Genisheva, Vilanova, Mussatto, Teixeira, & Oliveira, 2014; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015).

A utilização de sistemas de imobilização permite obter maiores densidades celulares, o que possibilita atingir taxas volumétricas mais elevadas, aumentando a produtividade e acelerando o processo de fermentação (Divies & Cachon, 2005; Elakkiya, Prabhakaran, & Thirumarimurugan, 2016; Z. Genisheva et al., 2014; Zlatina Genisheva et al., 2012, 2014; Mohd Azhar et al., 2017; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015; Shuler & Kargi, 1992). A imobilização também confere às células uma maior proteção contra stresses mecânicos e aumenta a sua tolerância a substâncias inibitórias (como etanol, ácido acético ou dióxido de enxofre) e a baixas temperaturas de fermentação (Divies & Cachon, 2005;

Elakkiya et al., 2016; Z. Genisheva et al., 2014; Zlatina Genisheva et al., 2012, 2014; R. Jackson, 2008; Mohd Azhar et al., 2017; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015; Shuler & Kargi, 1992). Outra vantagem é que, com os sistemas de imobilização, torna-se mais fácil remover a matéria microbiana dos depósitos, e ainda existe a possibilidade de reutilização da biomassa imobilizada que tem a capacidade de regenerar a sua atividade celular mesmo após o armazenamento (Divies & Cachon, 2005; Elakkiya et al., 2016; Z. Genisheva et al., 2014; Zlatina Genisheva et al., 2012, 2014; Moreno-García et al., 2018; Shuler & Kargi, 1992).

Estas vantagens possibilitam não só melhorar a qualidade do produto final, mas também diminuir os requisitos de mão de obra e o tempo despendido durante a fermentação, o que se pode refletir numa redução dos custos de produção do vinho (Divies & Cachon, 2005; Z. Genisheva et al., 2014; Moreno-García et al., 2018).

As maiores desvantagens associadas à utilização de sistemas imobilizados estão relacionadas com o aumento da turbidez do vinho devido a um crescimento celular excessivo, a perda de estabilidade ou rutura da matriz de imobilização, a perda de atividade celular em utilizações prolongadas ou dificuldades na difusão de nutrientes e produtos (Divies & Cachon, 2005; Z. Genisheva et al., 2014; Shuler & Kargi, 1992).

Apesar dos inúmeros estudos que a apresentam como possível solução para alguns dos problemas dos processos fermentativos e que demonstram muitos outros benefícios, a utilização de leveduras imobilizadas ainda é pouco aplicada ao nível industrial da produção de vinho. Isto pode dever-se a várias razões relacionadas com a falta de exequibilidade de alguns métodos em grande escala, com a ineficiência na aderência das leveduras a alguns dos suportes utilizados, com o elevado investimento económico necessário para integrar esta tecnologia nas práticas tradicionais sem retorno garantido, com falta de publicidade a leveduras imobilizadas e com o conhecimento limitado dos produtores acerca da utilização de leveduras imobilizadas e suas vantagens (Moreno-García et al., 2018).

6.1 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

As leveduras podem ser imobilizadas através de diferentes métodos. Estes métodos de imobilização são geralmente divididos em quatro categorias: fixação a uma superfície, aprisionamento numa matriz porosa, agregação celular

(floculação) e contenção mecânica atrás de uma barreira (*Figura 9*) (Covizzi, Giese, Gomes, Dekker, & Silva, 2007; Divies & Cachon, 2005; Z. Genisheva et al., 2014; Zlatina Genisheva et al., 2012, 2014; Mohd Azhar et al., 2017; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015).

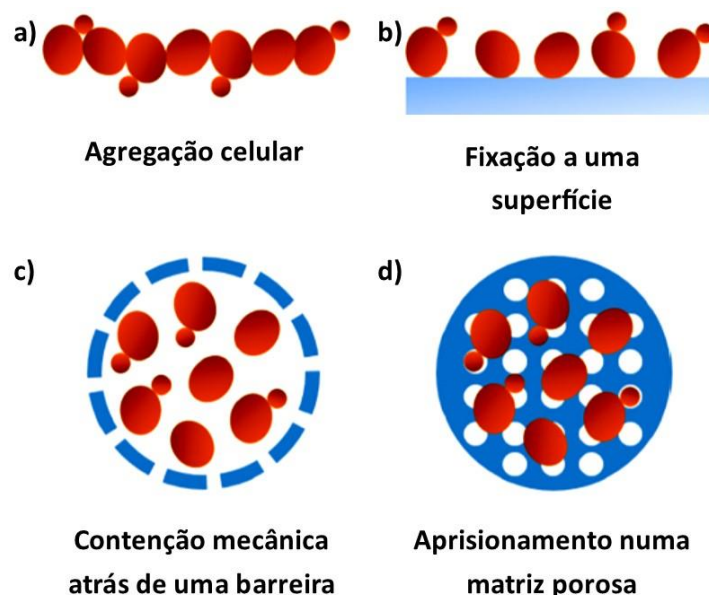


Figura 9. Métodos de imobilização celular: a) agregação celular; b) fixação a uma superfície; c) contenção mecânica atrás de uma barreira; d) aprisionamento numa matriz porosa. *Adaptado de (Moreno-García et al., 2018)*

A fixação das células a uma superfície pode ocorrer por adsorção natural, pela ação de forças electrostáticas, ou por ligações covalentes com agentes intermediários. A fixação das células a um suporte através da criação de ligações covalentes com um agente intermediário não é atualmente utilizada, pois alguns destes agentes são tóxicos para as leveduras, reduzindo a sua atividade e viabilidade, sendo por isso um método desadequado. Contudo, a adsorção de células a diferentes superfícies é um processo que ocorre espontaneamente. A adsorção natural não requer a utilização de compostos tóxicos que perturbem a viabilidade celular. Este tipo de imobilização é muito utilizado por ser um método de simples execução e devido ao custo reduzido dos materiais utilizados. A força e intensidade das ligações entre o suporte utilizado e as leveduras varia de sistema para sistema, em função da natureza do suporte, da fisiologia celular e das condições ambientais. Uma desvantagem desta técnica é não existir nenhuma barreira entre o meio líquido e as células imobilizadas, pelo que estas podem ser facilmente separadas do suporte e apesar desta desvantagem ser compensada com o crescimento de novas células, este está limitado à área

superficial do suporte. As principais vantagens da adsorção em relação a outros tipos de imobilização são o facto de apresentar uma boa transferência de oxigénio e de produtos de fermentação, e o facto de não haver limitações no aumento de escala dos sistemas (Z. Genisheva et al., 2014; Mohd Azhar et al., 2017; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015).

O aprisionamento das leveduras numa matriz porosa pode ser realizado por diferentes abordagens, nas quais as células são incorporadas na matriz de um polímero mais ou menos rígido. O objetivo é impedir a difusão das células, permitindo que os nutrientes e metabolitos passem através dos poros da matriz, possibilitando o crescimento e a manutenção da atividade celular. Os polímeros utilizados podem ter origem sintética (poliacrilamida, poliuretano, entre outros) ou podem ser de origem natural, feitos a partir de proteínas (gelatina, colagénio, etc.) ou polissacarídeos (celulose, alginato, agar, carragenina, etc.). Esta técnica tem várias desvantagens associadas: pode ser dispendiosa, demorada e de curta vida, com limitações de difusão de nutrientes, metabolitos e oxigénio, instabilidade química e/ou mecânica dos suportes, desprendimento das células e limitação da divisão celular (Divies & Cachon, 2005; Elakkiya et al., 2016; Z. Genisheva et al., 2014; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015).

A agregação celular ou floculação é um processo que pode ocorrer naturalmente ou através da utilização de agentes floculantes artificiais. Algumas espécies de leveduras apresentam a capacidade de formar agregados de forma inata, de forma a permitir a cooperação celular para tirar partido de todos os recursos disponíveis e melhorar a resistência contra stresses ambientais e mecânicos, aumentando as suas hipóteses de sobrevivência. A floculação de leveduras é um método atrativo devido à sua simplicidade e baixos custos associados, mas o seu sucesso está dependente de vários fatores que se devem ter em atenção: composição do meio, oxigénio dissolvido, pH, condições de fermentação (a nível de temperatura e agitação), estirpe selecionada, idade das células, entre outros (Elakkiya et al., 2016; Z. Genisheva et al., 2014; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015).

A contenção mecânica das células atrás de uma barreira pode ser obtida por vários métodos, sendo o mais comum a microencapsulação das células no interior de uma membrana semipermeável. Apesar do crescimento celular estar restringido pela dimensão das microcápsulas, esta técnica permite obter concentrações celulares muito altas e, por isso, as membranas utilizadas devem ser permeáveis aos nutrientes e produtos da fermentação, e devem ser mecanicamente resistentes. As principais desvantagens deste método, para além do custo elevado, estão relacionadas com as limitações de transferência de massa através da membrana e com a possibilidade de obstrução dos poros da membrana causada pelo crescimento celular (Elakkiya et al., 2016; Z. Genisheva

et al., 2014; Mohd Azhar et al., 2017; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015).

6.2 SUPORTES DE IMOBILIZAÇÃO

Na imobilização de leveduras para a produção de vinho, um critério muito importante a ter em conta é a seleção do suporte de imobilização. O material que irá servir de suporte deve ser selecionado em função do método de imobilização e das condições em que vai ser utilizado, e pode ser utilizado na sua forma original ou ser submetido a algum tratamento que modifique a superfície em contacto com as células. Tratando-se de uma indústria alimentar, na escolha do suporte devem-se considerar as regras de segurança alimentar e a facilidade de aceitação por parte dos consumidores, pelo que existe cada vez mais interesse na utilização de materiais naturais e próximos da dieta humana (Z. Genisheva et al., 2014; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015).

Para seleccionar um suporte adequado, este deve cumprir os seguintes pré-requisitos: deve ser abundante e barato; deve ser apropriado para a aplicação na indústria alimentar (não pode ser tóxico); não pode interferir negativamente na qualidade do produto final; deve suportar uma elevada carga celular; deve apresentar uma elevada resistência e estabilidade química e mecânica; deve ter capacidade de regeneração; deve ser esterilizável; deve permitir o acesso das células ao oxigénio e nutrientes, e a excreção de produtos e metabolitos; deve permitir a manutenção da viabilidade celular e da atividade metabólica; deve ser fácil de manusear; deve possibilitar uma fácil remoção ou separação do meio; e deve ser facilmente aplicável numa escala industrial (Z. Genisheva et al., 2014; Zlatina Genisheva et al., 2012, 2014; Mohd Azhar et al., 2017; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015).

Os materiais para suportes de imobilização são muitas vezes divididos em orgânicos e inorgânicos de acordo com a sua composição química. Os suportes inorgânicos são apelativos devido ao seu preço reduzido, à sua abundância na natureza e possibilidade de reutilização. Apesar de já terem sido propostos vários suportes inorgânicos, como é o caso de kissiris (um mineral vulcânico), γ -alumina, cerâmica porosa, vidro poroso, espuma de poliuretano, entre outros, estes são por vezes considerados inadequados para a produção de vinho pois podem libertar resíduos minerais que ficam presentes no produto final (Z. Genisheva et al., 2014; Zlatina Genisheva et al., 2012; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015).

Desta forma, os suportes orgânicos de origem natural têm recebido cada vez mais atenção, pois representam um baixo custo, uma vez que necessitam de muito pouco ou nenhum pré-tratamento, encontram-se em grande quantidade na natureza, são apropriados para a aplicação na indústria alimentar e são facilmente aceites pelos consumidores. A imobilização de leveduras por adsorção natural a pedaços de fruta é uma das estratégias mais utilizadas: já foi estudada a utilização de pedaços de maçã, marmelo, pera, melancia, figo, laranja, películas de uva e passas. Outro tipo de material muito utilizado como suporte de imobilização é o material celulósico deslenhificado por ter um baixo valor de mercado, ser resistente ao etanol e não libertar contaminantes para o vinho. Para além destes materiais, os polissacarídeos originários de fontes renováveis como algas, plantas ou estirpes microbianas específicas são uma alternativa à utilização de polímeros sintéticos, sendo geralmente considerados mais rentáveis. Dois dos polissacarídeos mais utilizados para a imobilização de leveduras são o alginato e a carragenina que facilmente se transformam numa matriz sob a forma de gel altamente flexível e não tóxico, que permite a transferência de substratos e produtos, e protege as células de substâncias inibitórias (Z. Genisheva et al., 2014; Zlatina Genisheva et al., 2012, 2014; Moreno-García et al., 2018; Nedović et al., 2015; Shuler & Kargi, 1992).

Existem também novos conceitos de imobilização onde não é necessária a utilização de um suporte externo. É o caso da co-imobilização de leveduras e alguns fungos filamentosos (como *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp.) através da adesão das leveduras aos micélios dos fungos, que funcionam como matriz de imobilização, cumprindo vários dos pré-requisitos apontados (são abundantes, baratos, resistentes, armazenáveis durante longos períodos, etc.), eliminando a necessidade de suportes externos, diminuindo assim o custo final do processo. O contacto entre as células de levedura e as hifas leva à morte do fungo, dando origem a um suporte inerte e estável que pode ser reutilizado. Este sistema permite minimizar as alterações ao metabolismo e viabilidade das leveduras e permite a difusão de nutrientes e produtos através da estrutura porosa formada pelas hifas (García-Martínez, Peinado, Moreno, García-García, & Mauricio, 2011; Moreno-García et al., 2018).

Para a realização deste trabalho foram selecionados três tipos de suporte diferentes para a imobilização de leveduras: alginato de cálcio, esponja de loofa e tufo vulcânico.

Os alginatos são polissacarídeos naturais extraídos de algas castanhas (classe *Phaeophyceae*); diferentes espécies de algas castanhas produzem alginatos de composição diferentes. Após algum processamento, os alginatos encontram-

se disponíveis na forma de alginatos de sódio hidrossolúveis. Quando o alginato de sódio é misturado com cátions bivalentes como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} ou Fe^{2+} , ocorre a formação de um gel por substituição dos íons de sódio. Para a polimerização, o Ca^{2+} é o cátion mais utilizado devido à sua baixa toxicidade. Estes polímeros são muito utilizados como matrizes de imobilização por não serem tóxicos, e serem biocompatíveis e biodegradáveis. A composição dos alginatos, a sua estrutura molecular e a cinética da formação dos géis influenciam a estabilidade, a resistência mecânica, a permeabilidade e a capacidade de biodegradação deste material (Ciani et al., 2010; Drichoutis, Nerantzis, & Liouni, 2007; Guisan, 2006; Margaritis & Kilonzo, 2006).

A esponja de loofa (*Figura 10*) é um material orgânico natural, composto essencialmente por celulose (50%), hemicelulose (30%) e lenhina (10%), obtido a partir do fruto da planta *Luffa cylindrica*. É considerada um suporte de imobilização celular promissor: para além do seu baixo custo e abundância, estas esponjas são leves, resistentes, quimicamente estáveis e não tóxicas, são capazes de permanecer inalteradas sob várias condições de pH e são resistentes a temperaturas elevadas que permitem a sua autoclavagem; a elevada porosidade e vasta área superficial das suas fibras tornam-nas indicadas para a adsorção de leveduras (Nuanpeng, Thanonkeo, Klanrit, & Thanonkeo, 2018; Phisalaphong, Budiraharjo, Bangrak, Mongkolkajit, & Limtong, 2007).



Figura 10. Esponja de loofa (*Luffa cylindrica*)

O tufo vulcânico é um material natural, formado a partir do material ejetado durante as erupções vulcânicas, que se deposita nas imediações e é compactado e cimentado em rochas, constituindo um material muito abundante que se encontra disponível por todo o mundo. Este tipo de rocha pode apresentar uma

grande variedade de cores, composição, granulagem, classificação e textura. É geralmente constituído por uma matriz composta por materiais argilosos ou limosos finos, provenientes de cinzas, onde se encontram incorporadas partículas de areia, cristais e fragmentos de rocha de vários tamanhos; a disposição destes componentes de diferentes dimensões dá origem a um amplo espectro de porosidades. A sua abundância e disponibilidade em várias regiões, a sua elevada porosidade e área superficial específica, e o seu baixo custo tornam o tufo vulcânico um interessante suporte para a imobilização de células (A. Barahim, A. Al-Akhaly, & R. Shamsan, 2018; Ni et al., 2012; Sekomo, Rousseau, & Lens, 2012; Wedekind, López-Doncel, Dohrmann, Kocher, & Siegesmund, 2013).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DE LEVEDURAS

Para a realização deste trabalho foram selecionadas quatro estirpes de leveduras vínicas: três estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, que identificámos de A, B e C, e uma estirpe de *Saccharomyces bayanus*.

Para manutenção das estirpes, cada uma destas leveduras foi inoculada em rampas de meio YPD sólido (composição: 20 g/L de agar, 20 g/L de D-glucose, 10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona). As rampas foram incubadas a 30°C durante 72h e posteriormente armazenadas a 4°C. Ao longo do tempo de ensaio, estes microrganismos foram repicados regularmente.

Para cada uma destas estirpes prepararam-se também células liofilizadas a partir de culturas líquidas de meio YPD (composição: 20 g/L de D-glucose, 10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona). Estas culturas foram realizadas em erlenmeyers de 250mL, estéreis, com 100mL de meio, inoculadas com aproximadamente 10^7 UFC/mL. As culturas foram incubadas durante 48h a 30°C com agitação orbital de 100rpm e a biomassa foi recuperada e liofilizada.

Assim, após as 48 horas de incubação, os caldos de cultura foram centrifugados, em tubos de 50mL, a 6000g durante 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e cada pellet foi, por sua vez, ressuspendido em 10mL de soro fisiológico estéril. Estas suspensões foram transferidas para copos de 20mL com tampa, estéreis, e foram colocadas na ultracongeladora a -80°C e posteriormente colocadas a liofilizar, num liofilizador de bancada “LyoQuest” da Telstar durante 72h.

Para além destas estirpes, foram também adquiridos dois preparados de leveduras secas ativas disponíveis no mercado, a que designámos “preparado comercial A” e “preparado comercial B”.

2. ENSAIOS COM LEVEDURAS EM SISTEMA LIVRE

2.1 PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES CELULARES

Prepararam-se suspensões celulares das leveduras *S. cerevisiae* A, B e C e de *S. bayanus* por arrastamento da biomassa de uma rampa para 10mL de soro fisiológico estéril, garantindo uma concentração de células de aproximadamente 2×10^8 UFC/mL. As concentrações celulares das suspensões foram determinadas por contagem de células ao microscópio eletrônico utilizando uma câmara de contagem de Neubauer melhorada.

Foram também preparadas suspensões dos preparados comerciais A e B, reidratando 200mg de preparado em 10mL de soro fisiológico estéril a 37°C, garantindo igualmente uma concentração celular de aproximadamente 2×10^8 UFC/mL.

2.2 CULTURAS COM AREJAMENTO

As culturas com arejamento foram realizadas, em triplicado, em erlenmeyers de 250mL, estéreis, através da inoculação de 100mL de meio YPD líquido com 2mL das suspensões celulares correspondentes, e foram incubadas com agitação orbital de 100rpm a 30°C durante 72 horas. Ao longo deste tempo foram recolhidas amostras periodicamente, a partir do momento da incubação.

2.3 CULTURAS SEM AREJAMENTO

As culturas sem arejamento foram realizadas, em triplicado, em erlenmeyers de 250mL selados, para evitar a entrada de oxigénio, através da inoculação de 100mL de mosto sintético (composição: 160 g/L de D-glucose, 6,7 g/L de YNB, 5 g/L de ácido tartárico a pH 3,5) com 2mL das suspensões celulares correspondentes, e foram incubadas a 30°C durante 168 horas sem agitação. Ao longo deste tempo foram recolhidas amostras periodicamente, a partir do momento da incubação.

2.4 MONITORIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CULTURAS

O crescimento das culturas foi monitorizado por espectrometria de absorção molecular, através da leitura da absorvância de cada uma das amostras a 600nm logo após a recolha.

2.5 MONITORIZAÇÃO DO CONSUMO DE GLUCOSE

As amostras foram centrifugadas a 8000g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para quantificação da glucose pelo método do DNS.

Os ensaios foram realizados adicionando, num tubo, 250µL da amostra e 250µL de reagente de DNS, e colocando os tubos a 100°C durante 5 minutos, ao fim dos quais se colocaram imediatamente os tubos em gelo, para parar a reação, adicionando 2,5mL de água destilada. O doseamento foi então efetuado por espectrometria de absorção molecular, através da leitura da absorvância das soluções a 540nm, recorrendo a uma reta de calibração na qual se utilizaram soluções padrão de glucose com concentrações de 100 a 1000 mg/L.

2.6 MONITORIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL

Efetuuou-se a quantificação de etanol em cada uma das amostras utilizando o kit enzimático da NZYTech “Ethanol, UV method”. Este kit é constituído por 5 soluções:

- Solução 1. Tampão de pirofosfato de potássio (15mL, 1,5 M, pH 9,0) e azida de sódio (0,02% p/v) como conservante.
- Solução 2. NAD⁺ (155mg) que se deve dissolver em 12,4mL de água destilada.
- Solução 3. Aldeído desidrogenase (AIDH, EC 1.2.1.3; 75U/mL) em 3,2M de sulfato de amónio (1,3mL).
- Solução 4. Álcool desidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1; 167U/mL) em 3,2M de sulfato de amónio (1,3mL).
- Solução 5. Solução padrão de etanol (5mL, 5,0mg/mL). Este padrão deve ser usado quando existirem dúvidas sobre a exatidão do método. Para tal devem-se diluir 0,5mL para 50mL de água destilada.

Para esta quantificação seguiu-se o procedimento alternativo para microplacas de 96 poços indicado pelo fabricante (*Tabela 1*).

Tabela 1. Procedimento para microplaca do kit enzimático “Ethanol, UV method” da NZYTech.

Pipetar em cada poço (µL)	Branco	Amostra	Padrão
Água destilada	210	200	200
Amostra	-	10	-
Solução padrão (Solução 5)	-	-	10
Solução 1	20	20	20
Solução 2	20	20	20
Solução 3	2	2	2
Agitar, medir a absorvância das soluções a 340nm (A1) após 2min			
Solução 4	2	2	2
Agitar, medir a absorvância das soluções a 340nm (A2) no final da reação (≈5min, se necessário continuar a ler a absorvância a intervalos de 1min até ao fim da reação)			

3. IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURAS

Cada uma das estirpes de leveduras selecionadas foram imobilizadas em três tipos de suporte diferentes: alginato de cálcio, loofa e tufo vulcânico.

3.1 IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO DE CÁLCIO

Para a imobilização em alginato de cálcio foram preparadas suspensões celulares de cada uma das leveduras *S. cerevisiae* A, B e C, e *S. bayanus* misturando cerca de 200mg de biomassa liofilizada em 6mL de solução de alginato de sódio estéril a 2,5% (p/v). O mesmo foi efetuado para os preparados comerciais A e B, suspendendo cerca de 200mg de preparado em 6mL da solução de alginato. Cada uma das suspensões foi, por sua vez, adicionada gota a gota a 100mL de solução de cloreto de cálcio estéril a 2% (p/v), em agitação, onde permaneceram 30 minutos, para dar origem a esferas resultantes da polimerização do alginato de cálcio. De seguida, as esferas foram removidas

por filtração, lavadas com água destilada estéril e divididas em duas bolsas de polipropileno esterilizadas (Figura 11).



Figura 11. Imobilização de leveduras em alginato de cálcio.

3.2 IMOBILIZAÇÃO EM LOOFA

Para a imobilização em loofa foram preparadas suspensões celulares de cada uma das leveduras *S. cerevisiae* A, B e C, e *S. bayanus* misturando cerca de 200mg de biomassa liofilizada em 6mL de solução de alginato de sódio estéril a 2,5% (p/v). O mesmo foi efetuado para os preparados comerciais A e B, suspendendo cerca de 200mg de preparado em 6mL da solução de alginato.

Cada uma das suspensões foi por sua vez adicionada a cerca de 1,2g de loofa cortada em pequenos pedaços, num tubo Falcon de 15mL estéril. Os tubos foram colocados em agitação durante 3 horas, de forma a que todos os fragmentos de loofa ficassem em contacto com a suspensão. De seguida, as frações de loofa foram divididas em duas bolsas, estas foram mergulhadas em 100mL de solução de cloreto de cálcio estéril a 2% (p/v) durante 30 minutos e posteriormente lavadas com água destilada estéril (*Figura 12*).

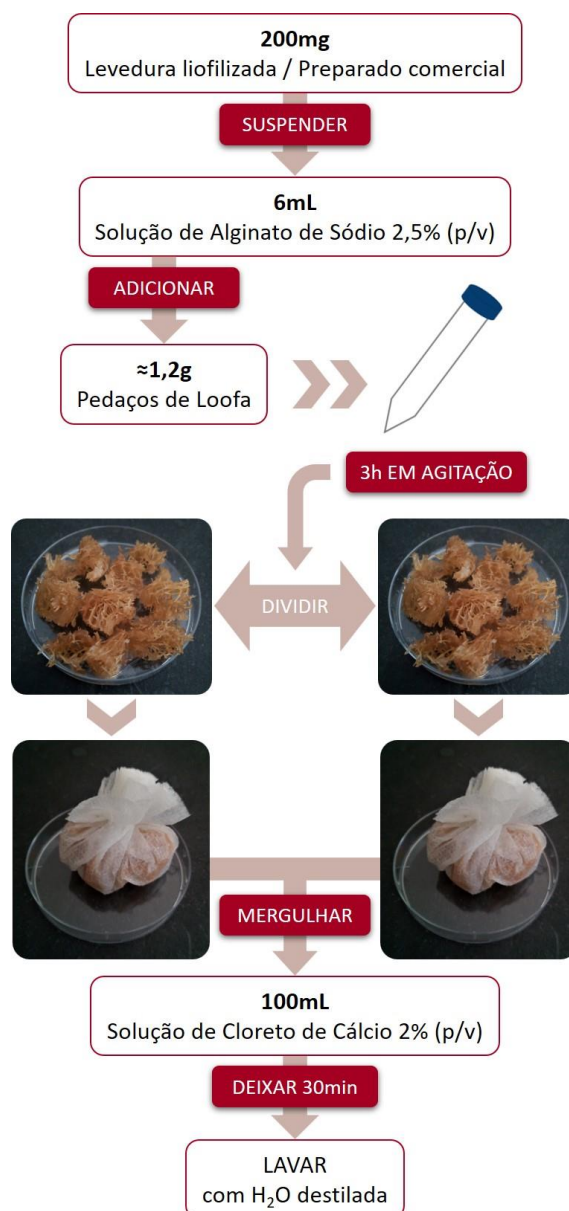


Figura 12. Imobilização de leveduras em loofa.

3.3 IMOBILIZAÇÃO EM TUFO VULCÂNICO

Para a imobilização em tufo vulcânico foram preparadas suspensões celulares de cada uma das leveduras *S. cerevisiae* A, B e C, e *S. bayanus* misturando cerca de 200mg de biomassa liofilizada em 6mL de solução de alginato de sódio estéril a 2,5% (p/v). O mesmo foi efetuado para os preparados comerciais A e B, suspendendo cerca de 200mg de preparado em 6mL da solução de alginato. Cada uma das suspensões foi por sua vez adicionada a cerca de 9g de tufo vulcânico finamente partido, num copo estéril com tampa, e colocada em agitação durante 3 horas. De seguida, o tufo foi dividido em duas bolsas, estas foram mergulhadas em 100mL de solução de cloreto de cálcio estéril a 2% (p/v) durante 30 minutos e posteriormente lavadas com água destilada estéril (Figura 13).

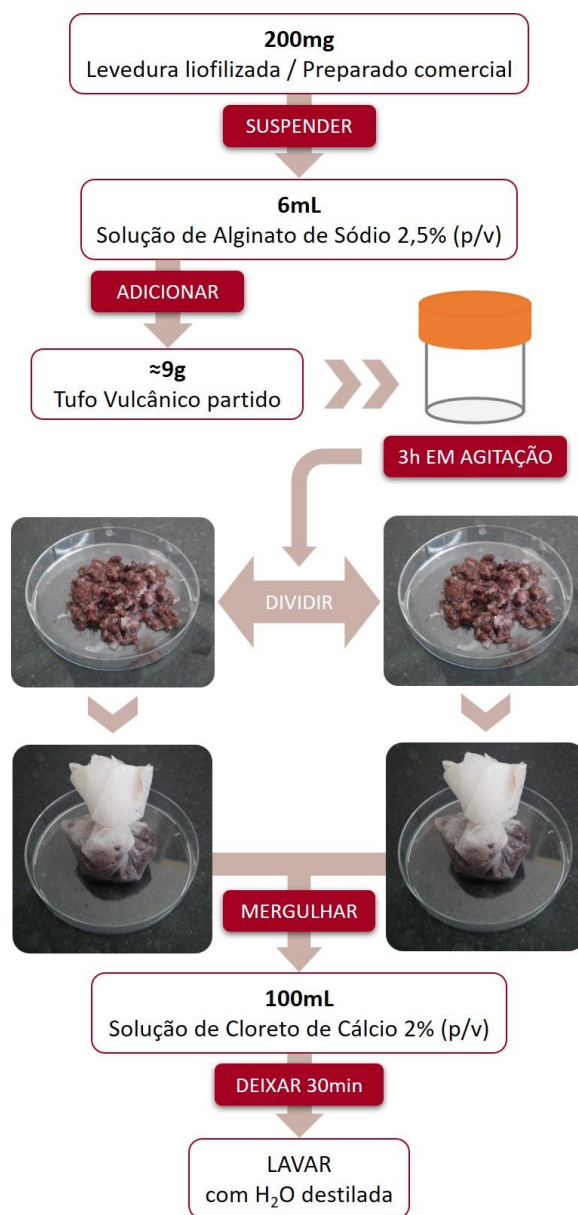


Figura 13. Imobilização de leveduras em tufo vulcânico.

4. ENSAIOS COM LEVEDURAS IMOBILIZADAS

4.1 CULTURAS SEM AREJAMENTO

Os três sistemas de imobilização foram testados através da realização de culturas sem arejamento e sem agitação em mosto sintético.

Estas foram efetuadas em duplicado, em erlenmeyers de 250mL selados, para evitar a entrada de oxigênio, através da inoculação de 100mL de mosto com uma bolsa contendo a respetiva levedura imobilizada, e foram incubadas a 30°C durante 168 horas sem agitação. Ao longo deste tempo foram recolhidas amostras periodicamente, começando logo no momento da incubação.

4.2 MONITORIZAÇÃO DO CONSUMO DE GLUCOSE E DA PRODUÇÃO DE ETANOL

As amostras recolhidas foram centrifugadas a 8000g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para quantificação de glucose e de etanol.

A quantificação da glucose efetuou-se utilizando o método do DNS, como descrito em 2.5, e a quantificação de etanol efetuou-se utilizando o kit enzimático da NZYTech “Ethanol, UV method”, seguindo o procedimento descrito em 2.6.

5. ENSAIOS DE MICROVINIFICAÇÃO EM MOSTO DE UVA

Foram realizados ensaios de microvinificação, utilizando mosto proveniente do esmagamento de uvas brancas frescas, incluindo as películas e grainhas. Para a realização destes ensaios foi selecionado o preparado comercial B, que foi testado em sistema livre e imobilizado nos três tipos de suporte: esferas de alginato, loofa e tufo vulcânico.

5.1 FERMENTAÇÃO COM LEVEDURAS EM SISTEMA LIVRE

Foi preparada uma suspensão reidratando 200mg de preparado comercial B em 6mL de soro fisiológico estéril a 37°C. As culturas foram realizadas em duplicado, em erlenmeyers de 250mL selados para evitar a entrada de oxigênio, através da inoculação de 100mL de mosto de uva com 3mL da suspensão celular, e foram incubados a 30°C durante 168 horas sem agitação.

5.2 FERMENTAÇÃO COM LEVEDURAS IMOBILIZADAS

Para cada um dos sistemas de imobilização, as culturas foram realizadas em duplicado, em erlenmeyers de 250mL selados para evitar a entrada de oxigênio, através da inoculação de 100mL de mosto de uva com uma bolsa contendo as leveduras imobilizadas no respectivo suporte, e foram incubados a 30°C durante 168 horas sem agitação.

5.3 FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Foi também testada a realização de uma fermentação espontânea, tirando partido dos microrganismos presentes nas próprias uvas. Estas culturas foram realizadas em duplicado, em erlenmeyers de 250mL selados para evitar a entrada de oxigênio, colocando apenas os 100mL de mosto de uva em cada um e incubando a 30°C durante 168 horas sem agitação.

5.4 RECOLHA DE AMOSTRAS

Para todos os sistemas, ao longo do tempo de incubação foram recolhidas amostras em duplicado, periodicamente, começando logo no momento da incubação. De cada par de amostras, uma foi utilizada para quantificação de glucose e de etanol e a outra foi utilizada para estudo da dinâmica das populações.

5.5 MONITORIZAÇÃO DO CONSUMO DE GLUCOSE E DA PRODUÇÃO DE ETANOL

As amostras recolhidas para o efeito foram centrifugadas a 8000g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para quantificação de glúcidos redutores e de etanol.

A quantificação dos glúcidos redutores efetuou-se utilizando o método do DNS, como descrito em 2.5, e a quantificação de etanol efetuou-se utilizando o kit enzimático da NZYTech “Ethanol, UV method”, seguindo o procedimento descrito em 2.6.

5.6 EVOLUÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

O estudo da evolução das comunidades microbianas foi efetuado através de HTS (*high-throughput sequencing*). Para tal foi utilizado o sistema de NGS MiSeq® da Illumina.

A abordagem de sequenciação baseou-se no princípio esquematizado na *Figura 14*:

- numa primeira fase é necessário que o DNA passe por etapas de fragmentação e ligação de adaptadores, antes da biblioteca ser aplicada a uma *flow cell* (*Figura 14I*);
- depois de aplicados, os fragmentos de DNA ligam-se à *flow cell* através dos adaptadores, formam uma estrutura em forma de ponte e são amplificados num processo isotérmico, criando um *cluster* de fragmentos idênticos que são posteriormente desnaturados para que ocorra o *annealing* de *primers* de sequenciação (*Figura 14II*);
- o DNA é então submetido a um processo de sequenciação por síntese através da utilização de nucleótidos marcados com fluorescência na posição 3' que permite distinguir as diferentes bases, e a sequência de nucleótidos de cada *cluster* é deduzida a partir da leitura resultante da sucessiva adição de nucleótidos (*Figura 14III*) (Ansorge, 2009; Buermans & den Dunnen, 2014; Voelkerding, Dames, & Durtschi, 2009).

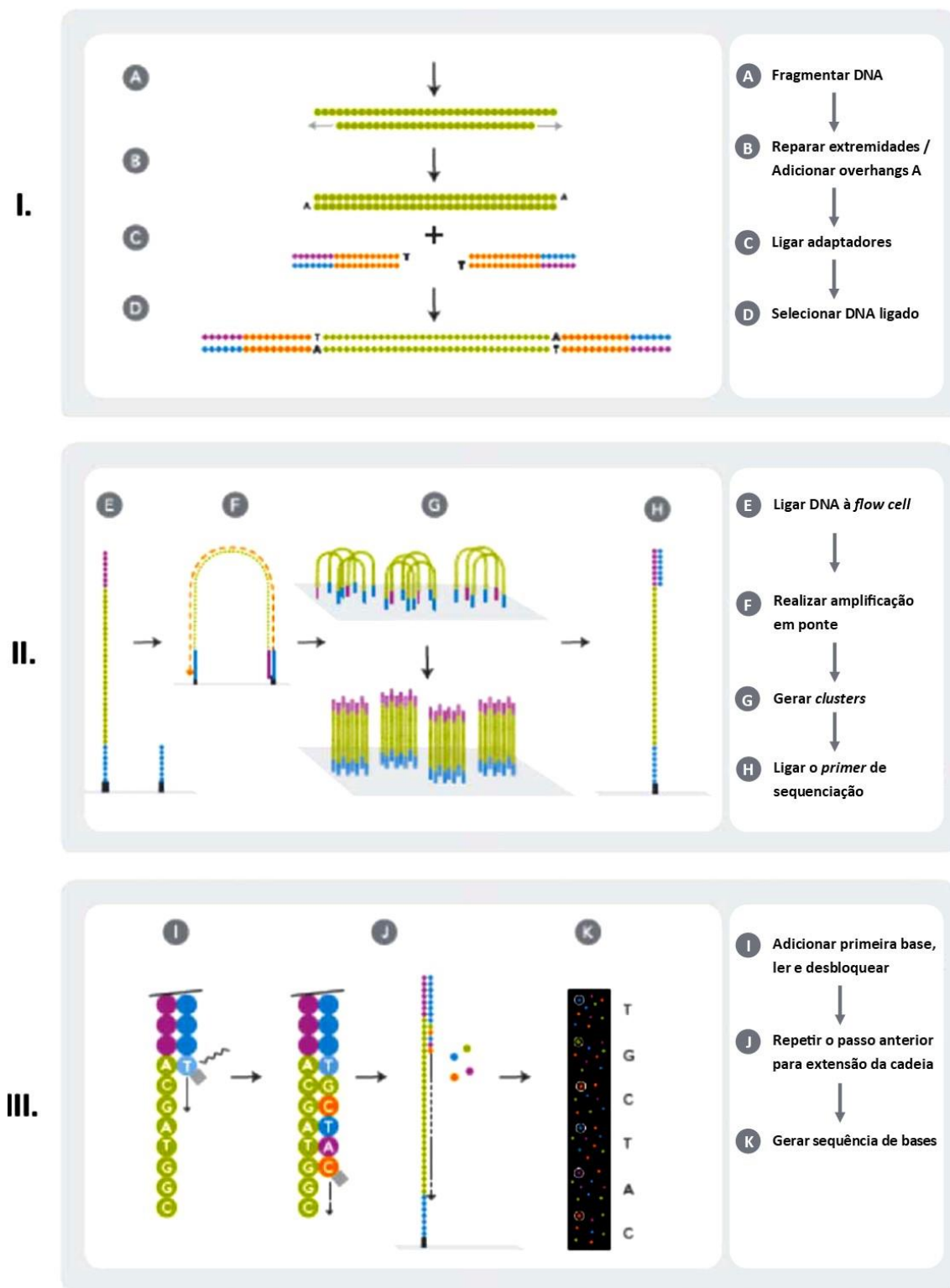


Figura 14. Princípio de sequenciação de DNA. Adaptado de (Ansorge, 2009)

5.6.1 Extração e Quantificação de DNA

Das amostras recolhidas selecionaram-se, para estudo da dinâmica das populações, as que foram retiradas no momento da incubação das culturas (0h), após 24 horas de cultura, após 48 horas de cultura e ao fim de 168 horas de cultura.

Antes da extração, estas amostras foram centrifugadas a 10 000g durante 5min a 4°C, o sobrenadante foi decantado e o *pellet* foi ressuspenso em 200mL de soro fisiológico estéril.

A extração do DNA foi efetuada a partir destas suspensões, recorrendo-se à utilização do “E.Z.N.A.® Stool DNA Kit” da Omega.

De seguida, o DNA extraído de cada amostra foi quantificado por espetrofluorimetria, no equipamento “Quantus Fluorometer”, utilizando o kit “QuantiFluor® ONE dsDNA” da Promega.

5.6.2 Amplificação do DNA Extraído – PCR Amplicon

O DNA extraído foi amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para tal, foi preparada, para cada amostra, uma mistura reacional com a seguinte composição: 10µL de “MyTaq™ HS Mix” da Biorline, 6,5µL de H₂O RNase-free, 5µL de DNA metagenómico e 3,5µL de um *pool* de *primers* a 10µM (6 *forward* e 1 *reverse*, descritos na *Tabela 2*). Foi também preparado um “branco” para servir de controlo negativo, que consiste na mesma mistura reacional onde os 5µL de DNA foram substituídos por 5µL de H₂O RNase-free.

As reações de PCR foram conduzidas num termociclador de acordo com o seguinte programa de amplificação:

- 1) Reação inicial de desnaturação a 95°C durante 1 minuto
- 2) 35 ciclos com:
 - a) Desnaturação a 95°C durante 15 segundos
 - b) *Annealing* a 55°C durante 15 segundos
 - c) Extensão a 72°C durante 10 segundos
- 3) Reação final de extensão a 72°C durante 2 minutos

Após a amplificação as amostras foram armazenadas a 4°C.

Tabela 2. Primers para eucariotas para NGS.

ID	Primer
ITS3NGS1_F	CATCGATGAAGAACGCAG
ITS3NGS2_F	CAACGATGAAGAACGCAG
ITS3NGS3_F	CACCGATGAAGAACGCAG
ITS3NGS4_F	CATCGATGAAGAACGTAG
ITS3NGS5_F	CATCGATGAAGAACGTGG
ITS3NGS10_F	CATCGATGAAGAACGCTG
ITS3NGS001_R	TCCTSCGCTTATTGATATGC

5.6.2.1 Análise e Purificação dos Produtos de PCR

Para verificar o sucesso da amplificação e a integridade dos produtos de PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 2% com corante “GreenSafe Premium” da NZYTech.

As amostras foram preparadas misturando 5µL do produto de PCR com 2µL de “6x NZYDNA loading dye” da NZYTech, e foram aplicadas no gel. O mesmo foi efetuado para o marcador de DNA utilizado como comparação, misturando 5µL do marcador “NZYDNA Ladder V” da NZYTech, com 2µL de corante. A corrida eletroforética foi então efetuada a 90V e, posteriormente, a revelação dos géis foi realizada num transiluminador da Bio-Rad.

Uma vez verificada a amplificação dos produtos de PCR, estes foram purificados através da utilização de *beads* magnéticas “Mag-Bind® Total Pure NGS” da Omega, em microplacas de 96 poços.

5.6.3 Pré-Index PCR

Para a adição de *overhangs* às cadeias de DNA foi preparada, para cada amostra, uma mistura reacional com a seguinte composição: 10µL de “MyTaq™ HS Mix” da Biorline, 6,5µL de H₂O RNase-*free*, 5µL de produto de PCR Amplicon e 3,5µL de um *pool* de *primers* com *overhangs* a 2,5µM (6 *forward* e 1 *reverse*, descritos na *Tabela 2*). Foi igualmente preparado um “branco” para servir de controlo negativo, que consiste na mesma mistura reacional onde os 5µL de produto de PCR foram substituídos por 5µL de H₂O RNase-*free*.

As reações de PCR foram conduzidas num termociclador de acordo com o seguinte programa de amplificação:

- 1) Reação inicial de desnaturação a 95°C durante 1 minuto
- 2) 8 ciclos com:
 - a) Desnaturação a 95°C durante 15 segundos
 - b) *Annealing* a 55°C durante 15 segundos
 - c) Extensão a 72°C durante 10 segundos
- 3) Reação final de extensão a 72°C durante 2 minutos

Após a amplificação as amostras foram armazenadas a 4°C.

A verificação da integridade e posterior purificação dos produtos do pré-Index PCR foram realizadas tal como descrito em **5.6.2.1**.

5.6.4 Indexação e Preparação de Biblioteca de DNA

Posteriormente, foi realizada a indexação das amostras.

Assim foi preparada, para cada amostra, uma mistura reacional com a seguinte composição: 25µL de “MyTaq™ HS Mix” da Bioline, 10µL de H₂O RNase-free, 5µL de produto do pré-Index PCR, 5µL de um *primer* Nextera XT Index Primer 1 (N7xx) e 5µL de um *primer* Nextera XT Index Primer 2 (S5xx).

As reações de PCR foram conduzidas num termociclador de acordo com o seguinte programa de amplificação:

- 1) Reação inicial de desnaturação a 95°C durante 3 minutos
- 2) 8 ciclos com:
 - a) Desnaturação a 95°C durante 30 segundos
 - b) *Annealing* a 55°C durante 30 segundos
 - c) Extensão a 72°C durante 30 segundos
- 3) Reação final de extensão a 72°C durante 5 minutos

Após a amplificação as amostras foram armazenadas a 4°C.

Os produtos do Index PCR foram purificados através da utilização de *beads* magnéticas “Mag-Bind® Total Pure NGS” da Omega, em placa de 96 poços.

Posteriormente, quantificou-se o DNA presente nas amostras purificadas por espetrofluorimetria, no equipamento “Quantus Fluorometer”, recorrendo ao kit “QuantiFluor® ONE dsDNA” da Promega.

As amostras foram normalizadas para uma concentração de 4nM e a biblioteca de DNA foi posteriormente desnaturada e diluída para uma concentração final de 10pM.

5.6.5 Sequenciação e Processamento de Dados

A sequenciação foi realizada utilizando o “MiSeq Reagent Kit V2 (2 x 250pb)” utilizando como controlo o PhiX 20% da Illumina, no sistema de sequenciação Illumina MiSeq®, por intermédio do software “MiSeq Control”.

As sequências obtidas foram processadas e analisadas na plataforma “BaseSpace” da Illumina. Para visualização quantitativa dos dados e análise de componentes principais utilizou-se o software “Calypso” (Zakrzewski et al., 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ENSAIOS COM LEVEDURAS EM SISTEMA LIVRE

1.1 CULTURAS COM AREJAMENTO

A fim de caracterizar as estirpes de levedura e determinar a sua taxa específica de crescimento, tempo de geração e taxa volumétrica de consumo de glucose, foram efetuadas culturas em meio YPD líquido, com arejamento e agitação orbital para promover o crescimento.

O crescimento das culturas foi monitorizado através da leitura da absorvância de cada uma das amostras a 600nm, contra um branco de meio YPD líquido estéril, logo após a recolha.

Estes valores foram utilizados para traçar o perfil de crescimento das culturas e a sua curva de crescimento de acordo com a *equação (1)*:

$$f = a \times e^{(-e^{(b-c \times x)})} \quad (1)$$

Nesta equação, “a” corresponde ao logaritmo do número de ciclos de crescimento, “b” corresponde à taxa de crescimento ao longo do tempo, “c” corresponde ao tempo necessário para atingir a taxa de crescimento máxima e “e” corresponde ao número Neperiano.

Estes parâmetros permitem calcular a taxa específica de crescimento (*equação (2)*) e o tempo de geração (*equação (3)*) da seguinte forma:

$$\text{taxa específica de crescimento} = \frac{c \times a}{e} \quad (2)$$

$$\text{tempo de geração} = \frac{\ln(2)}{\text{taxa específica de crescimento}} \quad (3)$$

Para monitorizar o consumo de substrato pelas leveduras ao longo do tempo de cultura, efetuou-se a quantificação da glucose em cada uma das amostras utilizando o método do DNS.

Este método permite fazer o doseamento de glúcidos com poder redutor. Baseia-se na redução alcalina do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, sendo os grupos carbonilo do açúcar oxidados a carboxilo.

O doseamento foi efetuado por espectrometria de absorção molecular a 540nm, recorrendo a uma reta de calibração.

Assim, as curvas de crescimento e o perfil de consumo de glucose de cada uma das estirpes de levedura em estudo encontram-se representadas na *Figura 15*: o gráfico *a)* corresponde a *S. cerevisiae* A, o gráfico *b)* corresponde a *S. cerevisiae* B, o gráfico *c)* corresponde a *S. cerevisiae* C, o gráfico *d)* corresponde a *S. bayanus*, o gráfico *e)* corresponde ao preparado comercial A e o gráfico *f)* corresponde ao preparado comercial B.

Comparando os gráficos é possível perceber que estas leveduras apresentam perfis de crescimento bastante diferentes.

É possível constatar que a estirpe de levedura *S. cerevisiae* C (*Figura 15 c)*) apresenta uma fase de latência mais pronunciada. Por outro lado, *S. bayanus* (*Figura 15 d)*) é a levedura que aparenta ter menor crescimento.

As restantes leveduras começam a desenvolver-se logo nas primeiras horas de cultura, com a *S. cerevisiae* B (*Figura 15 b)*) e o preparado comercial B (*Figura 15 f)*) a demonstrarem fases de crescimento exponencial mais prolongadas, atingindo valores de absorvância superiores.

Analisando os perfis de consumo de glucose, é possível verificar que, com exceção das culturas de *S. cerevisiae* C (*Figura 15 c)*) e da *S. bayanus* (*Figura 15 d)*), quase todo o consumo ocorre numa fase inicial do crescimento, durante as primeiras 24 horas de cultura. No entanto, apenas as culturas dos preparados comerciais A e B (*Figura 15 e)*) e *f)*) conseguiram consumir todo o substrato disponível no período monitorizado, enquanto as restantes apresentam alguns glúcidos residuais ao fim do tempo de incubação, que no caso de *S. bayanus* ultrapassam os 5g/L.

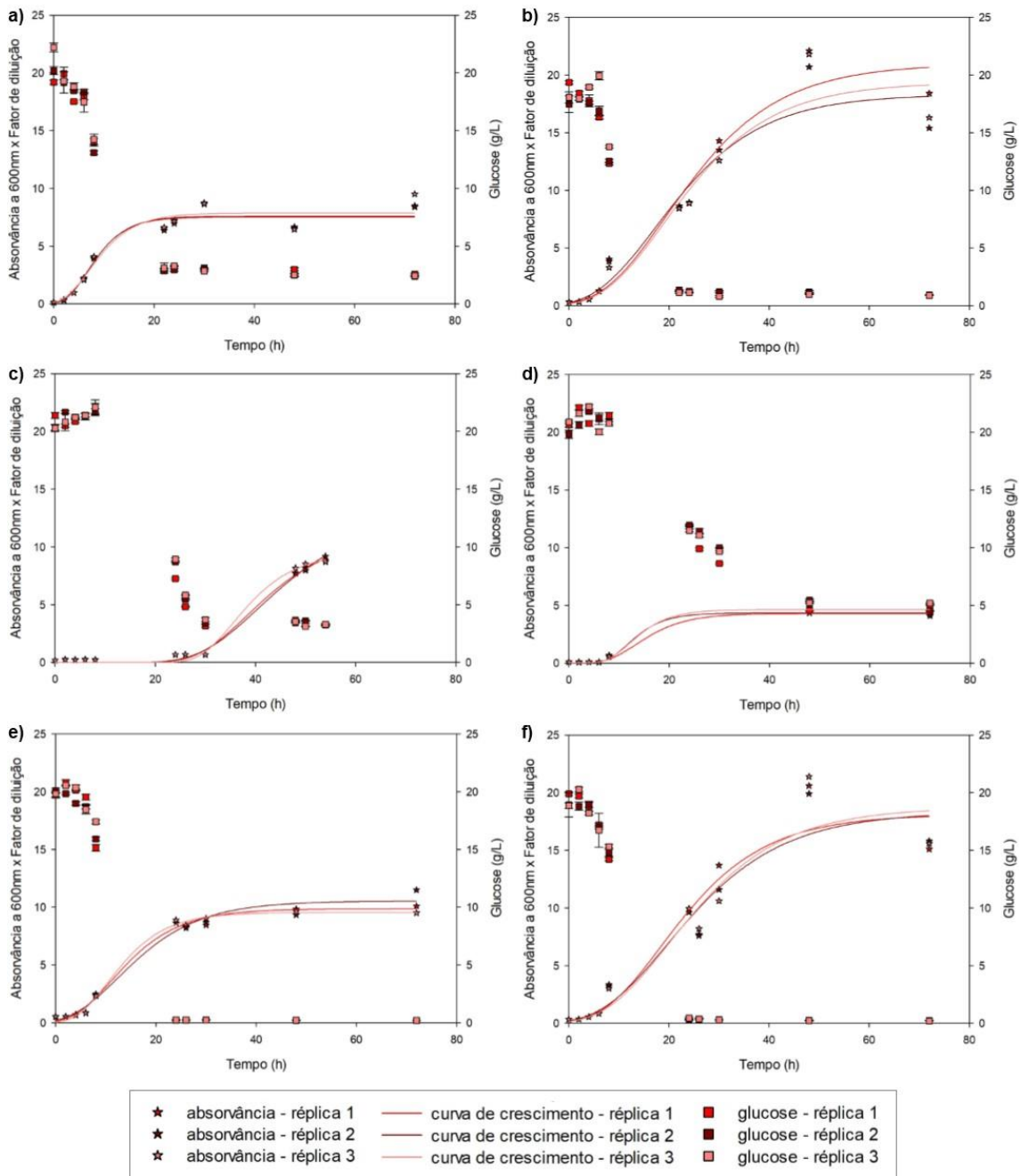


Figura 15. Curvas de crescimento e perfis de consumo de glucose das diferentes estirpes de levedura: a) *S. cerevisiae* A; b) *S. cerevisiae* B; c) *S. cerevisiae* C; d) *S. bayanus*; e) Preparado comercial A; f) Preparado comercial B.

A partir das curvas de crescimento determinaram-se as taxas específicas de crescimento e o tempo de geração de cada uma das estirpes de levedura em estudo, e a partir dos perfis de consumo de glucose determinaram-se também as respectivas taxas volumétricas de consumo de glucose (*Tabela 3*).

Tabela 3. Taxa específica de crescimento, Tempo de geração e Taxa volumétrica de consumo de glucose das diferentes estirpes de levedura em culturas líquidas de meio YPD.

CULTURA	Taxa Específica de Crescimento (h^{-1})	Tempo de Geração (h)	Taxa Volumétrica de Consumo de Glucose ($gl^{-1}h^{-1}$)
<i>S. cerevisiae</i> A	0,63	1,10	0,80
<i>S. cerevisiae</i> B	0,59	1,17	0,89
<i>S. cerevisiae</i> C	0,44	1,57	0,80
<i>S. bayanus</i>	0,35	1,97	0,41
Preparado comercial A	0,49	1,42	0,95
Preparado comercial B	0,55	1,27	0,90

A levedura *S. cerevisiae* A é a que apresenta a taxa específica de crescimento mais elevada e, conseqüentemente, o menor tempo de geração.

S. bayanus é o microrganismo que apresenta a menor taxa específica de crescimento e o maior tempo de geração, e apresenta também a menor taxa volumétrica de consumo de glucose, significativamente mais baixa que as restantes.

Os preparados comerciais apresentam taxas de consumo mais elevadas que as restantes estirpes de levedura. O preparado comercial A, comparativamente ao preparado comercial B, apesar de apresentar maior taxa volumétrica de consumo de glucose, apresenta uma taxa específica de crescimento inferior e, conseqüentemente, um tempo de geração mais elevado.

1.2 CULTURAS SEM AREJAMENTO

A fim de avaliar o desempenho fermentativo das estirpes de levedura selecionadas em sistema celular livre, foram efetuadas culturas sem arejamento e sem agitação em mosto sintético. Nestas culturas foi avaliado não só o crescimento e o consumo de glucose pelas leveduras, mas também a produção de etanol ao longo do tempo.

O crescimento das culturas foi monitorizado através da leitura da absorvância de cada uma das amostras a 600nm, contra um branco de mosto sintético estéril, e estes valores foram utilizados para obter as curvas de crescimento de cada estirpe e, para monitorizar o consumo de substrato ao longo do tempo

de cultura, efetuou-se a quantificação da glucose em cada uma das amostras utilizando o método do DNS, tal como descrito em 1.1.

Para monitorizar a produção de etanol ao longo do tempo de cultura, efetuou-se a sua quantificação em cada uma das amostras utilizando o kit enzimático da NZYTech “Ethanol, UV method”, indicado para a determinação de etanol em géneros alimentícios.

O princípio deste método baseia-se na determinação, por espectrometria a 340nm, da quantidade de NADH formado a partir das reações representadas na *Figura 16*, que corresponde ao dobro da quantidade de etanol presente no volume de amostra.

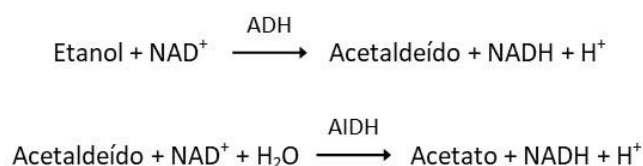


Figura 16. Princípio do kit enzimático “Ethanol, UV method” da NZYTech

As curvas de crescimento e os perfis de consumo de glucose e de produção de etanol de cada uma das estirpes de levedura em estudo encontram-se apresentadas na *Figura 17*: o gráfico *a)* representa *S. cerevisiae* A, o gráfico *b)* representa *S. cerevisiae* B, o gráfico *c)* representa *S. cerevisiae* C, o gráfico *d)* representa *S. bayanus*, o gráfico *e)* representa o preparado comercial A e o gráfico *f)* representa o preparado comercial B.

Nestas condições, as estirpes de levedura em estudo apresentam perfis de crescimento, consumo de glucose e produção de etanol semelhantes entre si, com a exceção de *S. bayanus* (*Figura 17 d)*). Esta apresenta uma fase de latência muito superior às restantes e ao fim das 168 horas de incubação produziu uma quantidade de etanol significativamente inferior às outras leveduras em estudo.

Enquanto *S. bayanus*, às 48h de cultura, ainda tinha uma disponibilidade de glucose acima de 90%, as restantes estirpes em estudo já tinham consumido mais de 50% do substrato presente no meio (*Figura 17 a), b), c), e) e f)*). Às 144h de cultura, todas as leveduras já tinham consumido mais de 99,5% da glucose, mesmo assim, entre as 144h e as 168h ainda se verificou produção de etanol em todos os casos estudados. Ao fim deste tempo, a concentração de etanol produzido pela cultura de *S. bayanus* era de 8,5 g/L, aproximadamente, enquanto as restantes culturas atingiram concentrações de etanol de cerca de 30 g/L.

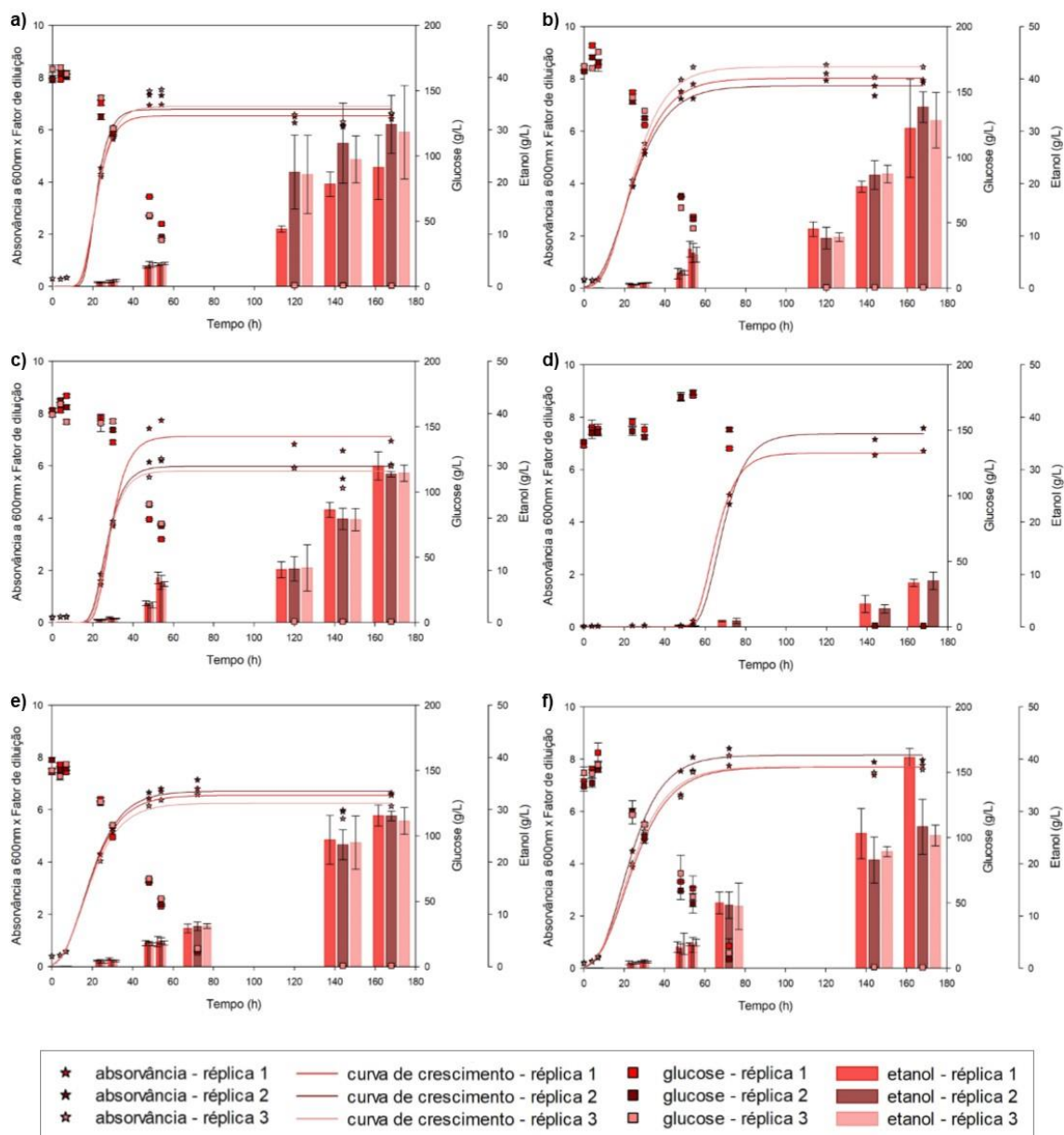


Figura 17. Curvas de crescimento, perfis de consumo de glucose e de produção de etanol das diferentes estirpes de levedura: a) *S. cerevisiae* A; b) *S. cerevisiae* B; c) *S. cerevisiae* C; d) *S. bayanus*; e) Preparado comercial A; f) Preparado comercial B.

A partir das curvas de crescimento determinaram-se as taxas específicas de crescimento e o tempo de geração de cada uma das estirpes de levedura em estudo e, a partir dos perfis de consumo de glucose e de produção de etanol, determinaram-se também as taxas volumétricas de consumo de glucose e de produção de etanol, respetivamente (*Tabela 4*).

Tabela 4. Taxa específica de crescimento, Tempo de geração, Taxa volumétrica de consumo de glucose e Taxa volumétrica de produção de etanol das diferentes estirpes de levedura em culturas líquidas de mosto sintético.

CULTURA	Taxa Específica de Crescimento (h ⁻¹)	Tempo de Geração (h)	Taxa Volumétrica de Consumo de Glucose (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Taxa Volumétrica de Produção de Etanol (g ^L - ¹ h ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i> A	0,51	1,37	2,69	0,20
<i>S. cerevisiae</i> B	0,27	2,60	2,75	0,19
<i>S. cerevisiae</i> C	0,42	1,66	2,13	0,17
<i>S. bayanus</i>	0,34	2,03	1,63	0,06
Preparado comercial A	0,23	2,91	2,22	0,20
Preparado comercial B	0,24	2,84	2,21	0,21

Tal como nas culturas com arejamento, a levedura *S. cerevisiae* A é a que apresenta a taxa específica de crescimento mais elevada e o menor tempo de geração. No entanto, nestas condições, a menor taxa específica de crescimento corresponde ao preparado comercial A que, como consequência, apresenta o maior tempo de geração.

Quanto às taxas volumétricas de consumo de glucose e produção de etanol, destaca-se novamente a *S. bayanus* com valores significativamente mais baixos que as restantes. No que toca ao consumo de glucose, a levedura *S. cerevisiae* B apresenta a taxa mais elevada, e quanto à produção de etanol é o preparado comercial B que apresenta a maior taxa.

2. ENSAIOS COM LEVEDURAS IMOBILIZADAS

2.1 CULTURAS SEM AREJAMENTO

A fim de avaliar o desempenho fermentativo das estirpes de levedura selecionadas em sistemas de imobilização, foram efetuadas culturas sem arejamento e sem agitação em mosto sintético. Na imobilização de cada estirpe

foram testados três tipos de suporte diferentes, que foram comparados em termos de consumo de glucose e produção de etanol.

Para monitorizar o consumo de substrato ao longo do tempo, efetuou-se a quantificação da glucose em cada uma das amostras utilizando o método do DNS, tal como descrito em 1.1, e para monitorizar a produção de etanol ao longo do tempo de cultura, efetuou-se a sua quantificação em cada uma das amostras utilizando o kit enzimático da NZYTech “Ethanol, UV method”, tal como descrito em 1.2. Com estes resultados construíram-se os respetivos perfis.

Na *Figura 18* encontram-se representados os perfis de consumo de glucose e de produção de etanol da estirpe de levedura *S. cerevisiae A* imobilizada nos diferentes suportes: alginato de cálcio (*Figura 18 a*), loofa (*Figura 18 b*) e tufo vulcânico (*Figura 18 c*).

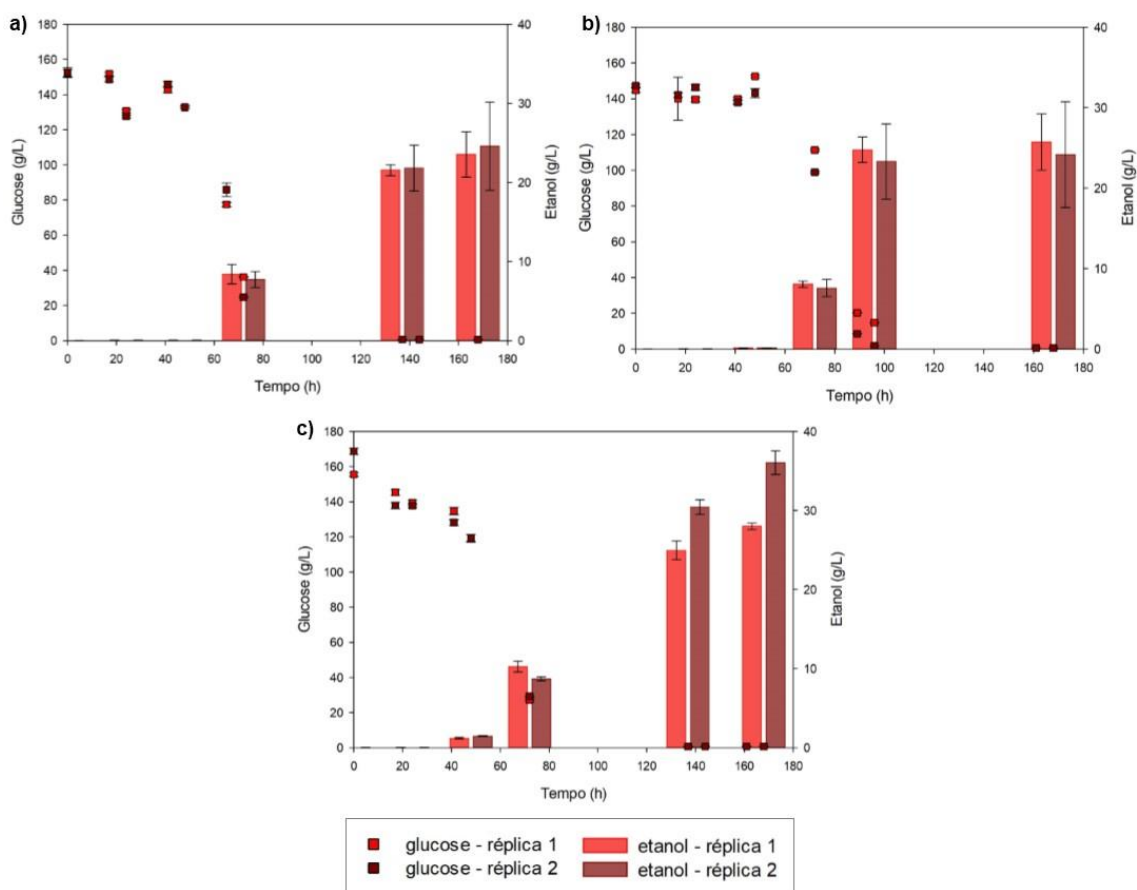


Figura 18. Perfis de consumo de glucose e de produção de etanol de *S. cerevisiae A* imobilizada em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.

Através da análise do perfil de consumo de glucose, é possível verificar que as leveduras imobilizadas em loofa demoram mais tempo a iniciar o consumo

comparativamente aos restantes sistemas de imobilização: às 72 horas de cultura ainda só tinha consumido cerca de 30% da glucose do mosto enquanto as leveduras imobilizadas em esferas de alginato e tufo vulcânico já tinham consumido mais de 80% do substrato disponível. Relativamente ao perfil de produção de etanol, é possível verificar que a imobilização em tufo vulcânico permitiu obter valores de concentração de etanol de cerca de 35g/L, superiores aos restantes sistemas de imobilização que atingiram concentrações de etanol de cerca de 25g/L, quando expostos às mesmas condições de fermentação.

Os perfis de consumo de glucose e de produção de etanol da estirpe de levedura *S. cerevisiae* B imobilizada nos diferentes suportes, encontram-se representados na *Figura 19*.

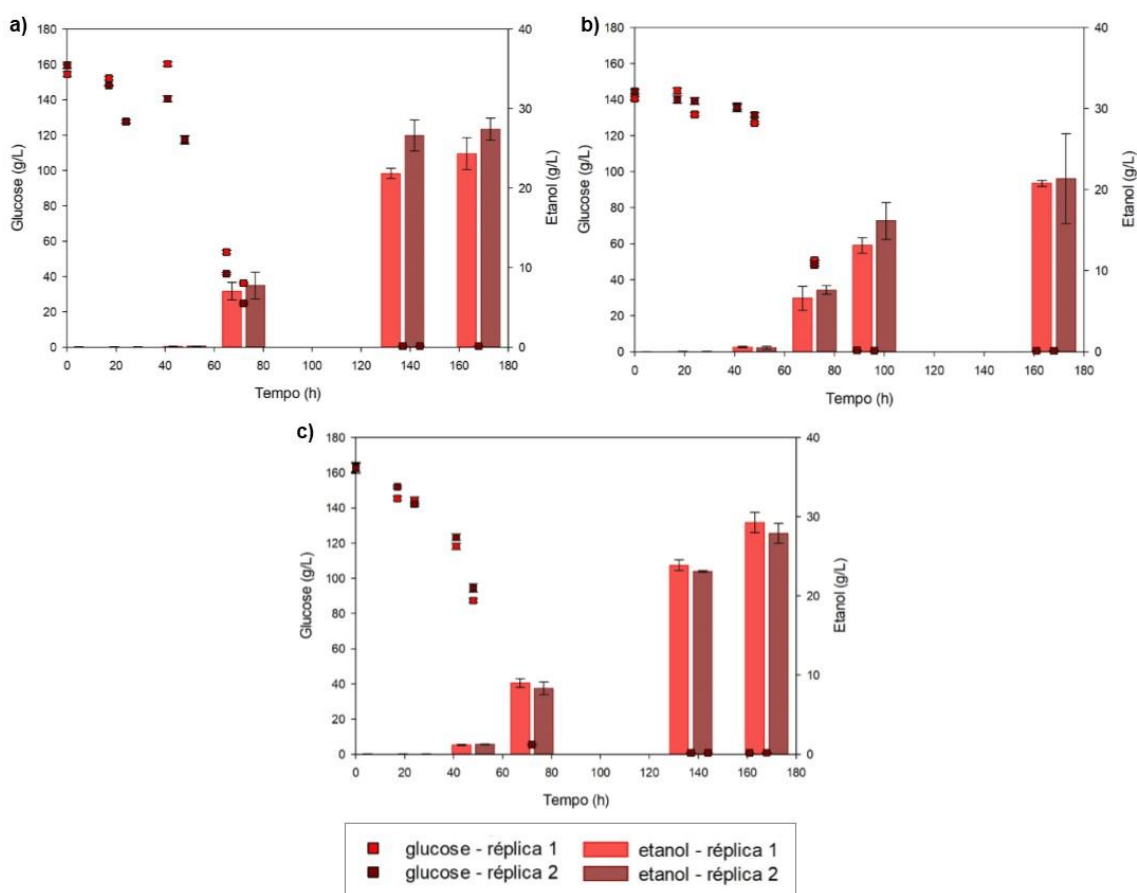


Figura 19. Perfis de consumo de glucose e de produção de etanol de *S. cerevisiae* B imobilizada em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.

A análise dos perfis de consumo de glucose mostra que, tal como no caso anterior, as leveduras imobilizadas em loofa (*Figura 19 b*), comparativamente aos restantes sistemas de imobilização, demoram mais tempo a iniciar o consumo de substrato: às 48 horas de cultura ainda não tinha sido consumida

10% da glucose total disponível no mosto, enquanto as leveduras imobilizadas em esferas de alginato (*Figura 19 a*) já tinham consumido cerca de 30% deste substrato e aquelas imobilizadas em tufo vulcânico já tinham consumido mais de 40% da glucose (*Figura 19 c*). Quanto à produção de etanol, pode verificar-se que esta levedura obteve os menores valores de concentração de etanol quando imobilizada em loofa, cerca de 20g/L, enquanto que a imobilização em esferas de alginato e em tufo vulcânico permitiram atingir concentrações mais elevadas, ligeiramente abaixo de 30g/L.

Na *Figura 20* encontram-se representados os perfis de consumo de glucose e de produção de etanol da estirpe de levedura *S. cerevisiae* C imobilizada nos três diferentes suportes.

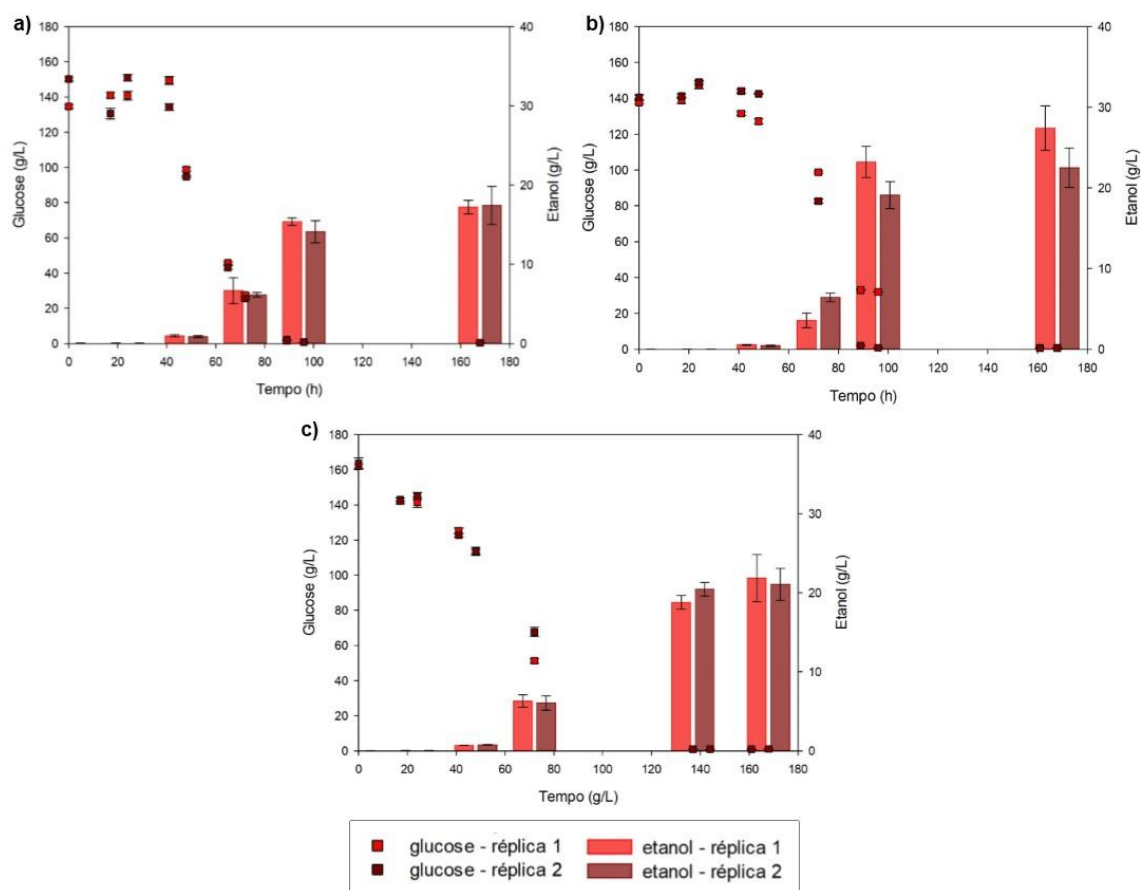


Figura 20. Perfis de consumo de glucose e de produção de etanol de *S. cerevisiae* C imobilizada em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.

Analisando os perfis de consumo de glucose, é possível verificar que, quando imobilizada em tufo vulcânico (*Figura 20 c*), esta estirpe começa a consumir a glucose logo a partir das primeiras horas de cultura, mas quando imobilizada em alginato de cálcio (*Figura 20 a*) ou em loofa (*Figura 20 b*) demora mais

tempo a iniciar o consumo. Contudo, após 48 horas de incubação, as leveduras imobilizadas em loofa já tinham consumido uma maior quantidade de glucose (cerca de 40% da glucose total) do que as leveduras imobilizadas em tufo (cerca de 30%) ou aquelas imobilizadas em alginato (que a essa altura só tinham consumido cerca de 5% da glucose). Relativamente aos perfis de produção de etanol, nestas condições de fermentação, ao contrário das estirpes de *S. cerevisiae* A e B, esta estirpe apresenta uma maior produção de etanol quando imobilizada em loofa, atingindo uma concentração de etanol superior a 22g/L ao fim das 168 horas de incubação, e quando imobilizada em esferas de alginato apresenta a menor produção, obtendo uma concentração de etanol de cerca de 17g/L.

Os perfis de consumo de glucose e de produção de etanol da estirpe de levedura *S. bayanus* imobilizada nos três diferentes suportes encontram-se representados na *Figura 21*.

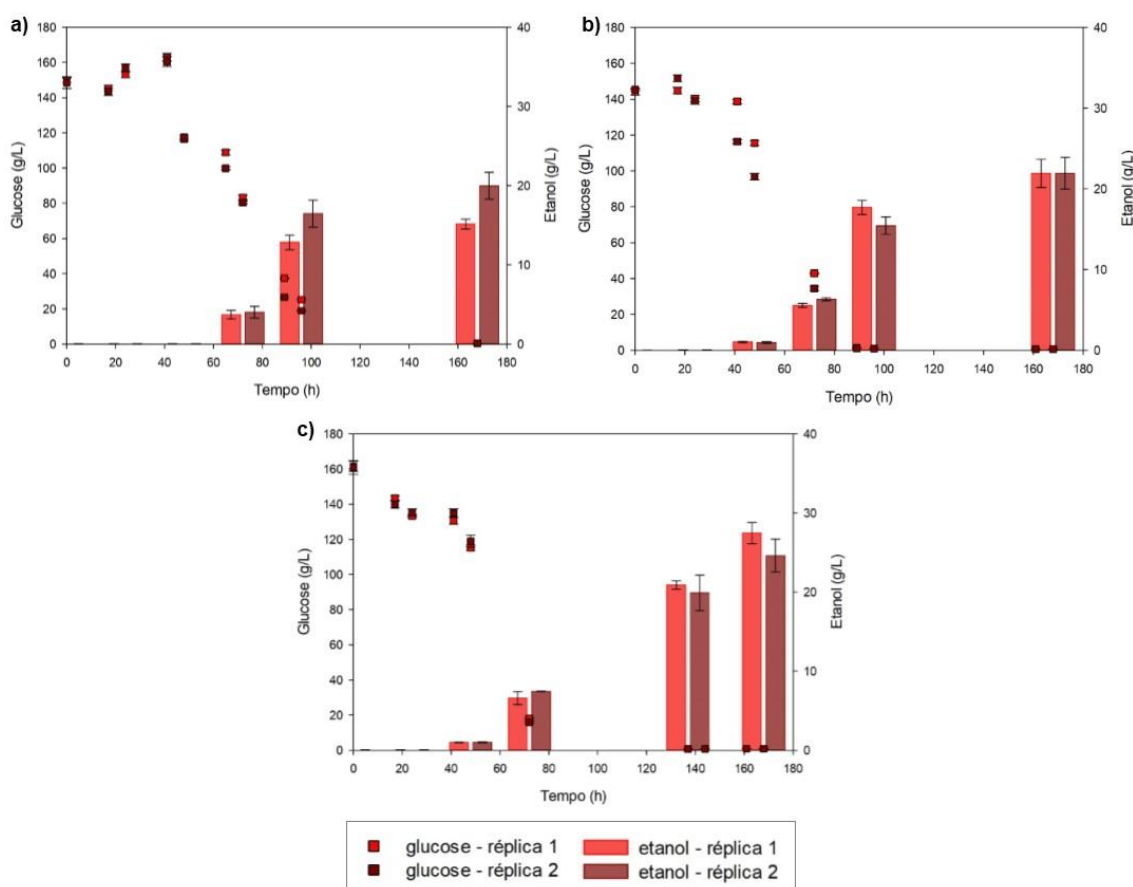


Figura 21. Perfis de consumo de glucose e de produção de etanol de *S. bayanus* imobilizada em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.

Para esta estirpe, a utilização dos três sistemas de imobilização deu origem a perfis de consumo de glucose semelhantes. Contudo, os perfis de produção de etanol apresentam algumas diferenças. Quando imobilizada em esferas de alginato (*Figura 21 a*), esta levedura demora mais tempo a iniciar a produção de etanol do que quando imobilizada em loofa (*Figura 21 b*) ou em tufo vulcânico (*Figura 21 c*): após 48 horas de incubação as culturas onde se utilizou as leveduras imobilizadas em alginato ainda não apresentavam produção de etanol, enquanto as restantes apresentavam uma concentração de etanol de aproximadamente 1g/L. Ao fim das 168 horas de incubação, as culturas correspondentes à imobilização em alginato de cálcio apresentavam os menores valores de concentração de etanol, inferiores a 20g/L, enquanto as correspondentes à imobilização em tufo vulcânico apresentavam a maior produção, com concentrações de etanol superiores a 25g/L.

Na *Figura 22* encontram-se representados os perfis de consumo de glucose e de produção de etanol do **preparado comercial A** imobilizado nos diferentes suportes.

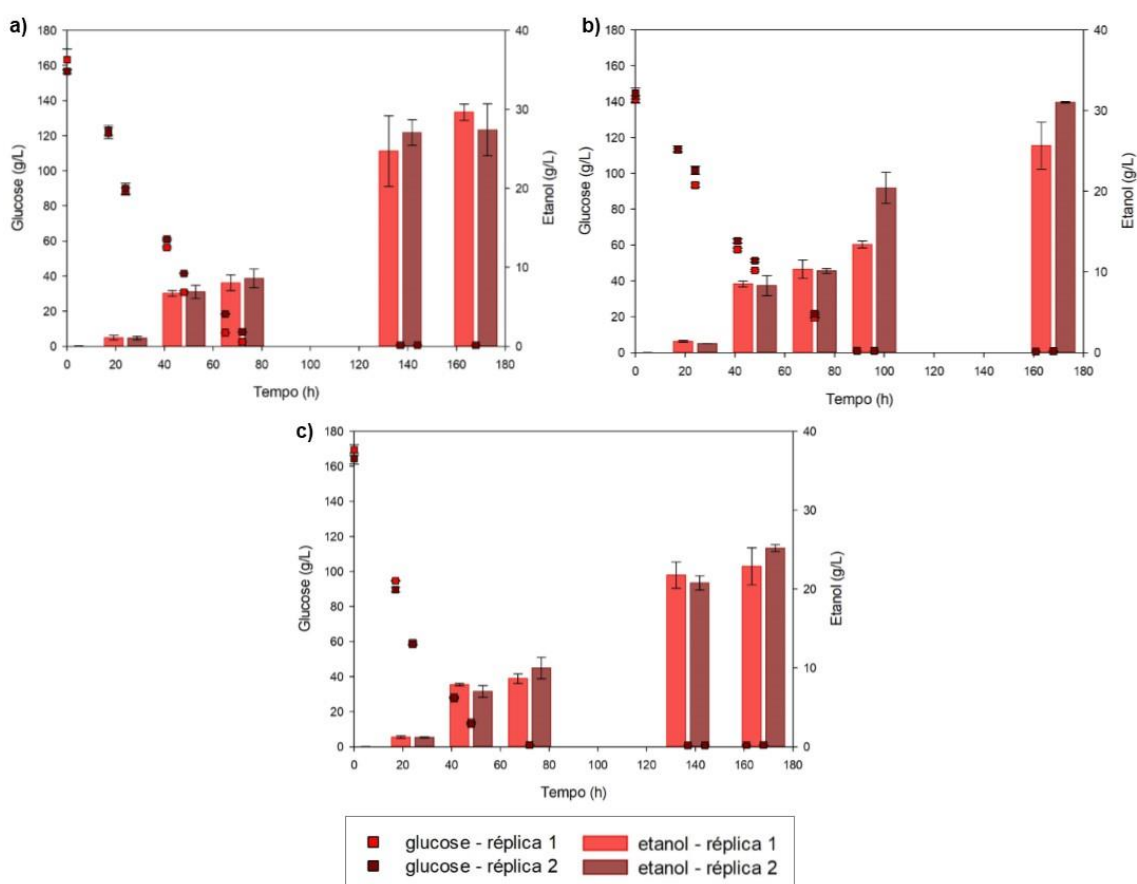


Figura 22. Perfis de consumo de glucose e de produção de etanol do Preparado comercial A imobilizado em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.

Os perfis de consumo de glucose obtidos para esta estirpe demonstram que as leveduras começam a consumir a glucose logo nas primeiras horas de incubação, independentemente do sistema de imobilização utilizado. Após 24 horas de cultura, as leveduras imobilizadas em esferas de alginato de cálcio já tinham consumido cerca de 45% da glucose disponível (*Figura 22 a*), as leveduras imobilizadas em loofa já tinham consumido aproximadamente 30% (*Figura 22 b*) e as leveduras imobilizadas em tufo vulcânico já tinham consumido mais de 60% da glucose (*Figura 22 c*). Ao fim de 72 horas de incubação, todos os sistemas já tinham consumido mais de 85% da glucose que lhes tinha sido disponibilizada. No que respeita aos perfis de produção de etanol, a imobilização desta levedura, quando realizada em esferas de alginato de cálcio e loofa, obteve resultados semelhantes, atingindo concentrações de etanol de cerca de 30g/L ao fim das 168 horas de fermentação. Já a imobilização em tufo vulcânico apresenta uma produção de etanol ligeiramente inferior aos restantes sistemas de imobilização, com uma concentração de cerca de 25g/L no final do período de incubação.

Na *Figura 23* encontram-se representados os perfis de consumo de glucose e de produção de etanol do **preparado comercial B** imobilizado nos diferentes suportes.

Tal como se observou para o preparado comercial A, os perfis de consumo de glucose obtidos para esta estirpe indicam que o consumo teve início logo nas primeiras horas de incubação, independentemente do sistema de imobilização utilizado. Após 24 horas de cultura, as leveduras imobilizadas em esferas de alginato de cálcio já tinham consumido cerca de 60% da glucose disponível (*Figura 23 a*), as leveduras imobilizadas em loofa já tinham consumido aproximadamente 50% (*Figura 23 b*) e as leveduras imobilizadas em tufo vulcânico já tinham consumido mais de 65% da glucose (*Figura 23 c*), e ao fim de 72 horas já todos os sistemas tinham consumido a totalidade da glucose que lhes tinha sido disponibilizada. Quanto aos perfis de produção de etanol, a imobilização desta levedura, quando realizada em esferas de alginato de cálcio e loofa, também obteve resultados semelhantes, com concentrações de etanol ligeiramente inferiores a 30g/L ao fim das 168 horas de fermentação. No entanto, ao contrário do observado para o preparado comercial A, a imobilização em tufo vulcânico apresenta uma produção de etanol ligeiramente superior aos restantes sistemas de imobilização, atingindo concentrações de cerca de 34g/L no final do período de incubação.

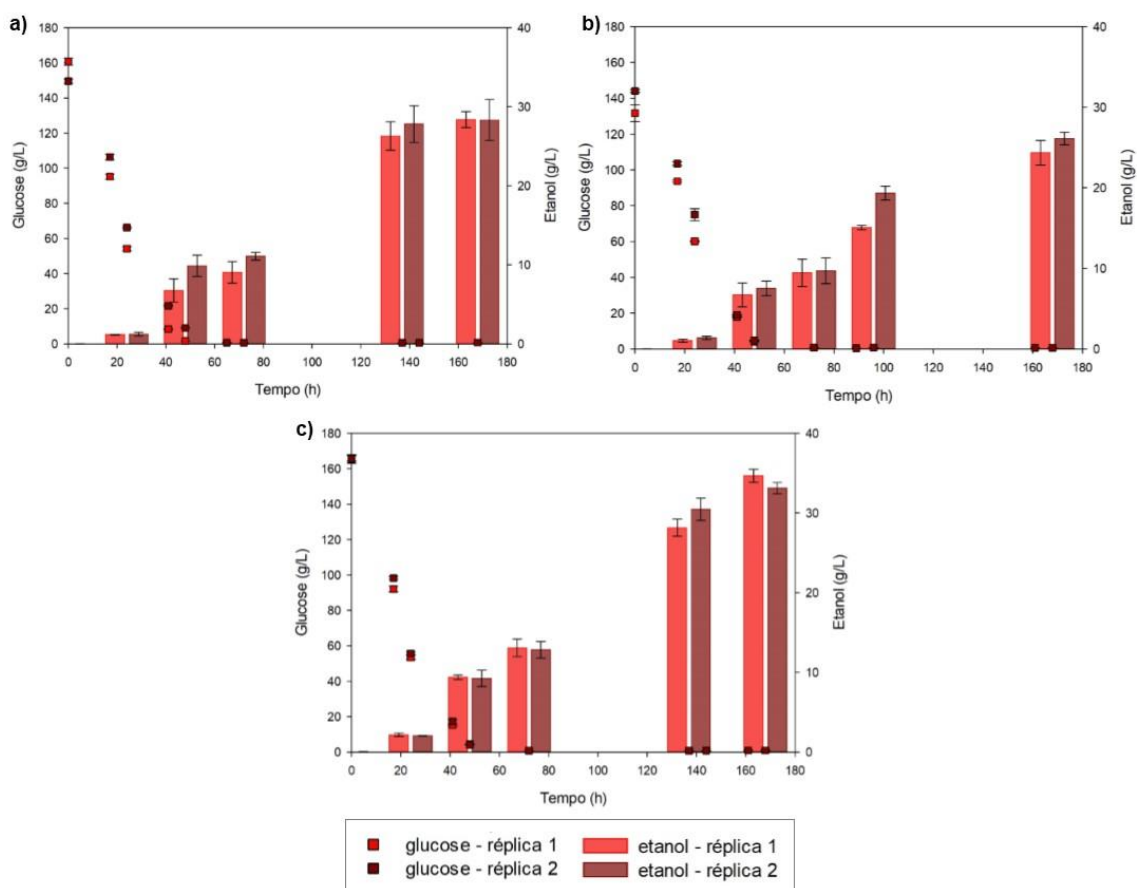


Figura 23. Perfis de consumo de glucose e de produção de etanol do Preparado comercial B imobilizado em: a) Alginato de Cálcio; b) Loofa; c) Tufo vulcânico.

Pela observação destas figuras, é possível verificar que, de um modo geral, a utilização dos diferentes suportes estudados não resultou em diferenças consideráveis a nível de consumo de glucose e produção de etanol, quando utilizados nestas condições de fermentação.

Todos os sistemas de imobilização testados permitiram às leveduras consumir a totalidade do substrato fornecido. Relativamente à produção de etanol, as variações observadas na utilização dos diferentes suportes, para além de não serem significativas, não são consistentes em todas as estirpes avaliadas, e nenhum dos suportes se destacou nem positiva, nem negativamente.

É possível observar através da análise destas figuras que o consumo de glucose e produção de etanol começa mais cedo na fermentação conduzida pelos preparados comerciais imobilizados (*Figuras 22 e 23*): às 24h de incubação, estas culturas tinham consumido uma maior proporção de glucose do que as restantes (*Figuras 18 a 21*) e já apresentavam concentrações de etanol superiores a 1 g/L, enquanto as culturas correspondente às restantes leveduras imobilizadas apresentavam concentrações inferiores a 0,05 g/L.

Estes perfis de consumo de glucose e produção de etanol obtidos com a utilização dos sistemas de imobilização não são muito diferentes dos obtidos com a utilização de leveduras em sistema livre, indicando que o processo de imobilização não afeta o desempenho fermentativo das leveduras.

A partir dos perfis obtidos determinaram-se as taxas volumétricas de consumo de glucose de cada estirpe de levedura em estudo em cada um dos suportes de imobilização. Estas encontram-se na *Tabela 5* em comparação com a taxa volumétrica da respetiva estirpe em sistema livre.

Tabela 5. Taxa volumétrica de consumo de glucose das diferentes estirpes de levedura em cada um dos suportes de imobilização em comparação com a sua taxa volumétrica em sistema livre.

CULTURA	Taxa Volumétrica de Consumo de Glucose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)			
	Alginato de Cálcio	Loofa	Tufo Vulcânico	Sistema Livre
<i>S. cerevisiae</i> A	3,52	2,65	1,98	2,69
<i>S. cerevisiae</i> B	3,92	2,71	2,61	2,75
<i>S. cerevisiae</i> C	2,86	2,41	1,53	2,13
<i>S. bayanus</i>	2,38	2,18	2,14	1,63
Preparado comercial A	2,18	1,77	3,11	2,22
Preparado comercial B	3,21	2,88	3,36	2,21

Quando se recorreu à imobilização das leveduras liofilizadas (*S. cerevisiae* A, B e C e *S. bayanus*), o suporte que permitiu obter taxas volumétricas de consumo de glucose mais elevadas foram as esferas de alginato de cálcio, enquanto a imobilização em tufo vulcânico obteve as taxas mais baixas. Por outro lado, quando se recorreu à imobilização das leveduras secas ativas dos preparados comerciais A e B, o tufo vulcânico foi o suporte de imobilização que permitiu obter as taxas volumétricas mais elevadas, enquanto a imobilização em loofa obteve as taxas mais baixas.

Pode verificar-se ainda que, para todas as estirpes estudadas, pelo menos um dos sistemas de imobilização permitiu obter uma taxa volumétrica de consumo de glucose superior à obtida com a mesma estirpe em sistema livre.

Da mesma forma, foram determinadas as taxas volumétricas de produção de etanol. Estas são apresentadas na *Tabela 6* em comparação com a taxa volumétrica de cada uma das estirpes avaliadas em sistema livre.

Tabela 6. Taxa volumétrica de produção de etanol das diferentes estirpes de levedura em cada um dos suportes de imobilização em comparação com a sua taxa volumétrica em sistema livre.

CULTURA	Taxa Volumétrica de Produção de Etanol (gl ⁻¹ h ⁻¹)			
	Alginato de Cálcio	Loofa	Tufo Vulcânico	Sistema Livre
<i>S. cerevisiae</i> A	0,20	0,19	0,26	0,20
<i>S. cerevisiae</i> B	0,22	0,16	0,21	0,19
<i>S. cerevisiae</i> C	0,13	0,21	0,20	0,17
<i>S. bayanus</i>	0,15	0,17	0,18	0,06
Preparado comercial A	0,20	0,18	0,19	0,20
Preparado comercial B	0,20	0,17	0,22	0,21

S. cerevisiae A, *S. bayanus* e o preparado comercial B permitiram obter as taxas de produção de etanol mais elevadas quando imobilizadas em tufo vulcânico; *S. cerevisiae* B e o preparado comercial A permitiram obter as taxas mais altas quando imobilizados em esferas de alginato; *S. cerevisiae* C foi a única levedura em que se obteve a taxa de produção de etanol mais elevada quando imobilizada em loofa.

De facto, a imobilização em loofa resultou nas taxas volumétricas de produção de etanol mais baixas para as leveduras *S. cerevisiae* A e B e para ambos os preparados comerciais. Já com *S. cerevisiae* C e *S. bayanus* obtiveram-se as taxas mais baixas quando imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Tal como se verificou para o consumo de glucose, para todas as estirpes de levedura estudadas, pelo menos um dos sistemas de imobilização permitiu obter uma taxa volumétrica de produção de etanol superior à obtida com a mesma levedura em sistema livre.

3. ENSAIOS DE MICROVINIFICAÇÃO EM MOSTO DE UVA

3.1 CULTURAS SEM AREJAMENTO

A fim de reproduzir de forma mais exata as condições de fermentação alcoólica da produção de vinho, foram realizados ensaios de fermentação, sem arejamento e sem agitação, utilizando mosto proveniente do esmagamento de uvas brancas frescas, incluindo as películas e grainhas. Para a realização destes ensaios foi selecionado o preparado comercial B, que foi testado em sistema livre e imobilizado nos três tipos de suporte: esferas de alginato, loofa e tufo vulcânico. Adicionalmente, foi testada a realização de uma fermentação espontânea, através da incubação do mosto não inoculado, de forma a promover o desenvolvimento de microrganismos que se encontrassem nas uvas.

Tal como realizado para as culturas descritas anteriormente, monitorizou-se o consumo de glúcidos redutores e a produção de etanol ao longo das 168 horas de cultura, e os respetivos perfis foram construídos.

Na *Figura 24* encontram-se representados os perfis de consumo de glúcidos redutores e de produção de etanol da fermentação espontânea (*Figura 24 a*) e do preparado comercial B quando utilizado em sistema livre (*Figura 24 b*) e imobilizado em esferas de alginato (*Figura 24 c*), loofa (*Figura 24 d*) e tufo vulcânico (*Figura 24 e*) na fermentação alcoólica de mosto de uvas.

Observando os gráficos, é possível verificar que apenas a fermentação espontânea (*Figura 24 a*), que não foi inoculada, apresenta um perfil um pouco diferente das restantes culturas, necessitando de mais tempo para consumir toda a glucose (verificou-se que, após 72 horas de incubação, apenas tinham sido consumidos 73% dos glúcidos redutores presentes no mosto, enquanto que para as restantes culturas já tinham sido consumidos mais de 98%) e para começar a produzir etanol (às 24 horas de incubação a fermentação espontânea ainda apresentava concentrações de etanol inferior a 0,1g/L, enquanto as restantes culturas já apresentavam concentrações de cerca de 1g/L).

Contudo, ao fim das 168 horas de incubação, quer a fermentação espontânea, quer a cultura em sistema livre, quer as culturas com os sistemas de imobilização permitiram obter valores de concentração de etanol aproximados, de cerca de 14-15g/L.

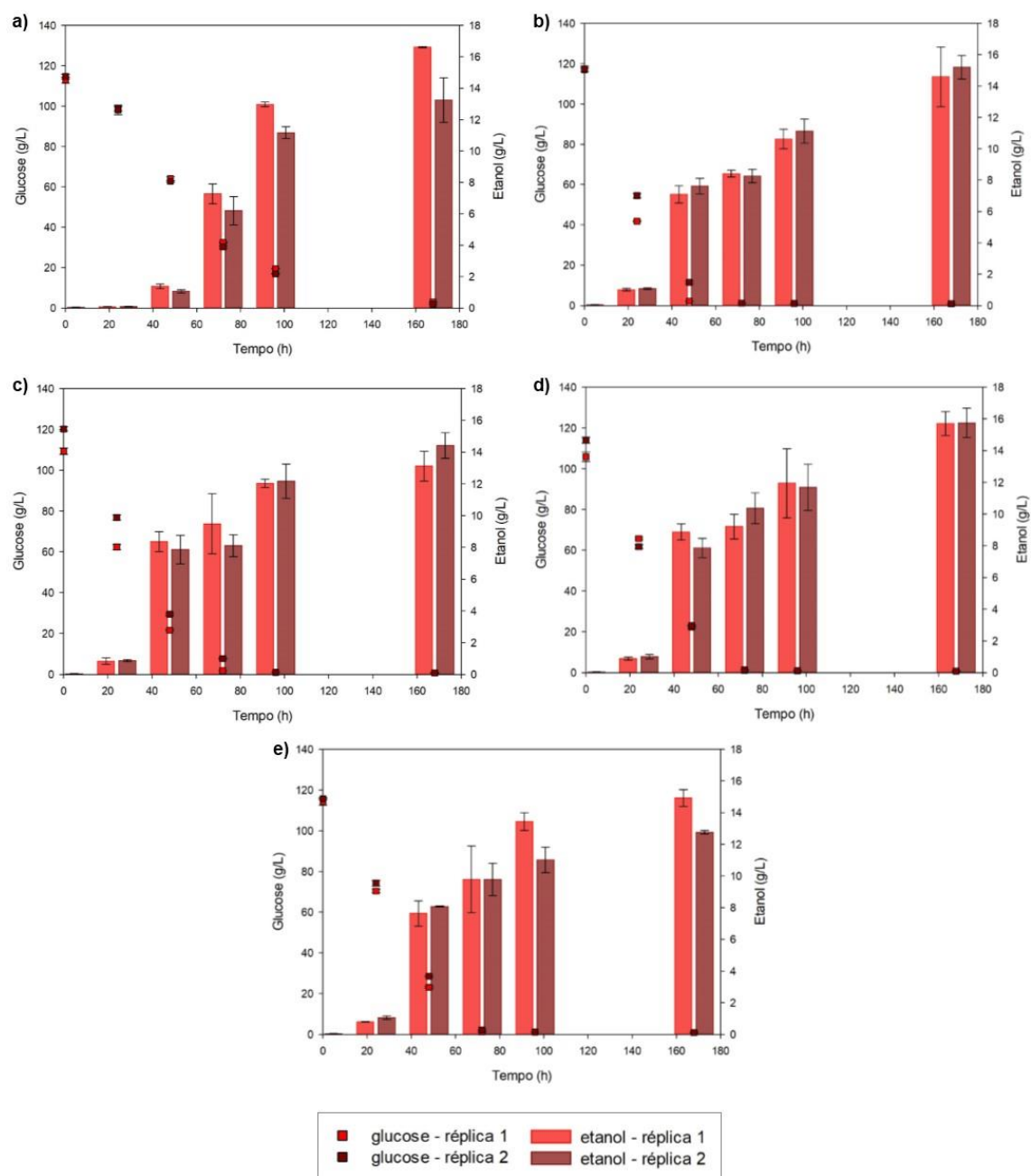


Figura 24. Perfis de consumo de glucose e de produção de etanol da a) Fermentação espontânea e do Preparado comercial B em b) Sistema livre e imobilizado em c) Alginato de Cálcio, d) Loofa e e) Tufo vulcânico.

Como anteriormente, determinaram-se as taxas volumétricas de consumo de glucose e de produção de etanol para cada uma das culturas (Tabela 7).

Tabela 7. Taxa volumétrica de consumo de glucose e Taxa volumétrica de produção de etanol da Fermentação espontânea e do Preparado comercial B em sistema livre e imobilizado nos diferentes suportes.

CULTURA	Taxa Volumétrica de Consumo de Glucose (g ^L ⁻¹ h ⁻¹)	Taxa Volumétrica de Produção de Etanol (g ^L ⁻¹ h ⁻¹)
Fermentação Espontânea	1,08	0,13
Sistema Livre	1,62	0,12
Imobilização em Alginato de Cálcio	1,56	0,13
Imobilização em Loofa	1,53	0,13
Imobilização em Tufo Vulcânico	1,61	0,14

Analisando a tabela verifica-se que, quanto à taxa volumétrica de consumo de glucose, a fermentação espontânea apresenta uma taxa mais baixa. Relativamente aos sistemas de imobilização, os três apresentam valores muito semelhantes, com a imobilização em tufo vulcânico a aproximar-se mais da taxa de consumo de glucose do sistema livre.

Quanto à taxa volumétrica de produção de etanol, a fermentação espontânea já não se distingue das restantes culturas. Relativamente aos sistemas de imobilização, os três apresentam valores muito aproximados, todos superiores à fermentação em sistema livre, com a imobilização em tufo vulcânico a apresentar a maior taxa de produção de etanol.

Estes resultados, tal como os obtidos na fermentação de mosto sintético, parecem comprovar que a imobilização não compromete as capacidades fermentativas das leveduras e ainda permite melhorar o seu desempenho face à utilização de *starters* de leveduras em sistema livre.

3.2 DINÂMICA DE POPULAÇÕES

De um modo geral, os processos fermentativos que constituem a produção de vinho envolvem o crescimento de diversas populações microbianas que influenciam diretamente o produto final. De forma a controlar estes processos e, conseqüentemente, gerir a qualidade do vinho produzido, existe um grande interesse em caracterizar a ecologia microbiana da fermentação (Teresa Fernández-Espinar, Llopis, Querol, & Barrio, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, para estudar a dinâmica das populações envolvidas na fermentação alcoólica do mosto de uva, recorreu-se a uma análise metagenômica das amostras através de *high-throughput sequencing*. Este tipo de análise permite obter a sequenciação dos vários microrganismos presentes numa amostra, identificando a comunidade microbiana presente e avaliando sua abundância relativa (Jagadeesan et al., 2019; Voelkerding et al., 2009).

Assim, foram selecionadas as amostras retiradas às 0h, 24h, 48h e 168h de fermentação de todas as culturas realizadas em mosto de uva. O DNA dos microrganismos presentes nestas amostras foi extraído e posteriormente amplificado por PCR utilizando *primers* para eucariotas.

A amplificação do DNA extraído permitiu obter o eletroforetograma apresentado na *Figura 25*. Através da sua análise pode observar-se a amplificação das amostras com bandas na zona dos 400 bp, indicando a presença de DNA.

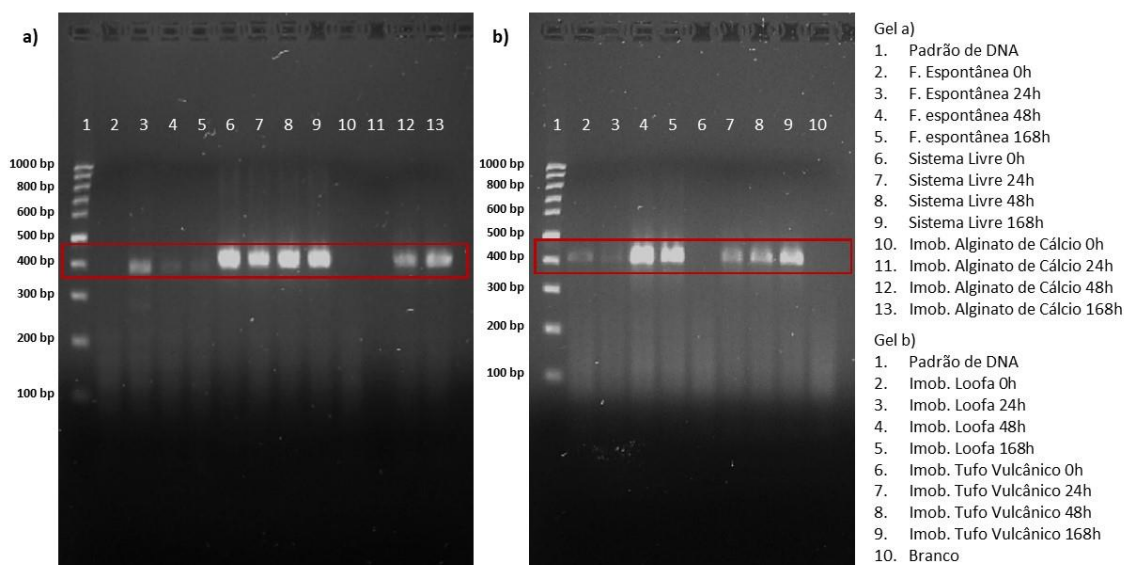


Figura 25. Eletroforetograma do PCR Amplicon

Observando os géis pode verificar-se mais especificamente que as amostras referentes à fermentação espontânea (2. a 5. do *gel a*) da *Figura 25*) apresentam bandas mais ténues quando comparadas com as restantes amostras, onde se recorreu à inoculação de leveduras, indiciando menor quantidade de microrganismos no mosto.

3.2.1 Análise Metagenômica das Amostras

Os resultados da sequenciação do DNA das amostras estudadas permitiram identificar vários gêneros e espécies de microrganismos eucariotas presentes e ter uma percepção da sua abundância relativa. Assim é possível avaliar as populações de cada amostra e compará-las entre si para compreender como estas evoluem ao longo da fermentação do mosto em cada uma das situações estudadas.

A *Figura 26* mostra a abundância relativa dos 20 microrganismos maioritários. A primeira coluna da figura corresponde à amostra da fermentação espontânea retirada no momento da incubação (0h) e, por isso, representa os microrganismos presentes no mosto das uvas. Estes incluem apenas uma pequena percentagem relativa de *Saccharomyces cerevisiae* e apresentam maior proporção de *Hanseniaspora uvarum*, *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus penicillioides*, *Penicillium astrolabium*, *Botrytis caroliniana* entre outros microrganismos.

Uma vez que o mesmo mosto foi utilizado em todas as culturas, esta população encontra-se presente no início da fermentação em todos os sistemas. A *Figura 26* evidencia as semelhanças entre esta coluna (microrganismos presentes no mosto das uvas) e as colunas das 0h referentes à utilização dos sistemas de imobilização. A coluna correspondente às 0h de fermentação conduzida por leveduras em sistema livre, mostra um perfil bastante diferente destes, com maior proporção de *Saccharomyces cerevisiae* resultante da inoculação.

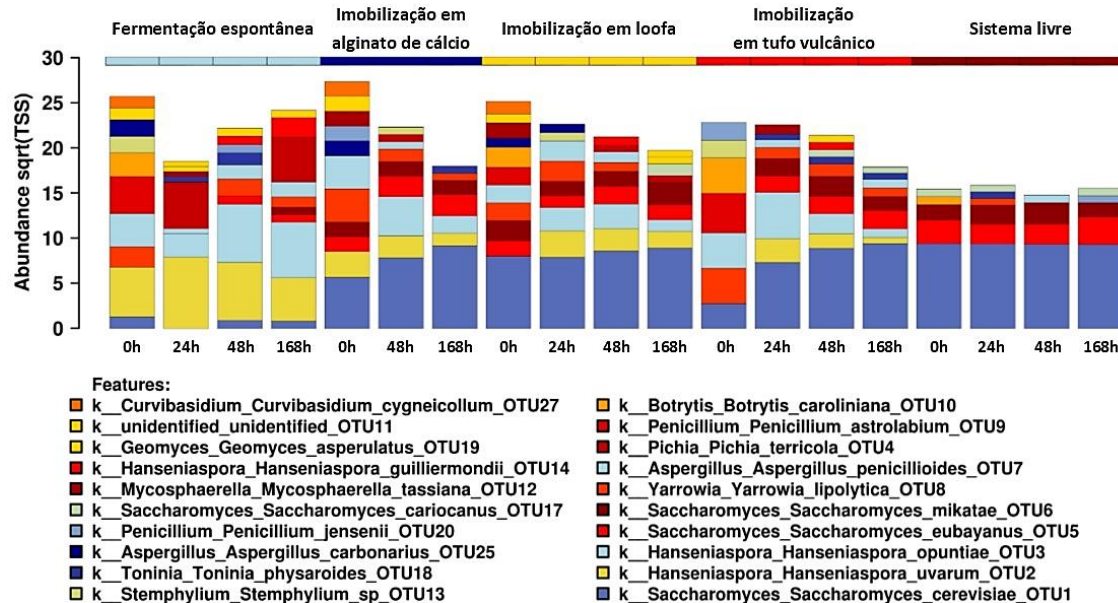


Figura 26. Abundância relativa dos 20 microrganismos maioritários em função do tempo de cultura.

De facto, através da análise da abundância relativa em função do tempo de cultura (*Figura 26*), é possível verificar que a fermentação espontânea é dominada pelo desenvolvimento de outras leveduras que não a *S. cerevisiae*, como *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae* e *Pichia terricola*.

As culturas onde se utilizaram os inóculos de leveduras imobilizadas demonstram um domínio de *S. cerevisiae* que aumenta ao longo do tempo de incubação. Também se verifica o aumento da proporção de outras espécies do género *Saccharomyces* enquanto os restantes microrganismos parecem diminuir em proporção e diversidade.

No que respeita à cultura onde se recorreu à inoculação de leveduras em sistema livre, estas amostras apresentam uma menor diversidade de microrganismos.

Os resultados de NGS permitiram uma análise de componentes principais (*Figura 27*) que permite discriminar as amostras referentes às 0h (*c*), (*d*), (*e*) e (*f*) do conjunto das amostras das 24, 48 e 168h da fermentação espontânea (grupo *a*) e do conjunto das amostras correspondentes à adição de *starters*, em sistema livre com ou em sistemas de imobilização (grupo *b*) no que respeita às espécies presentes nas diferentes amostras.

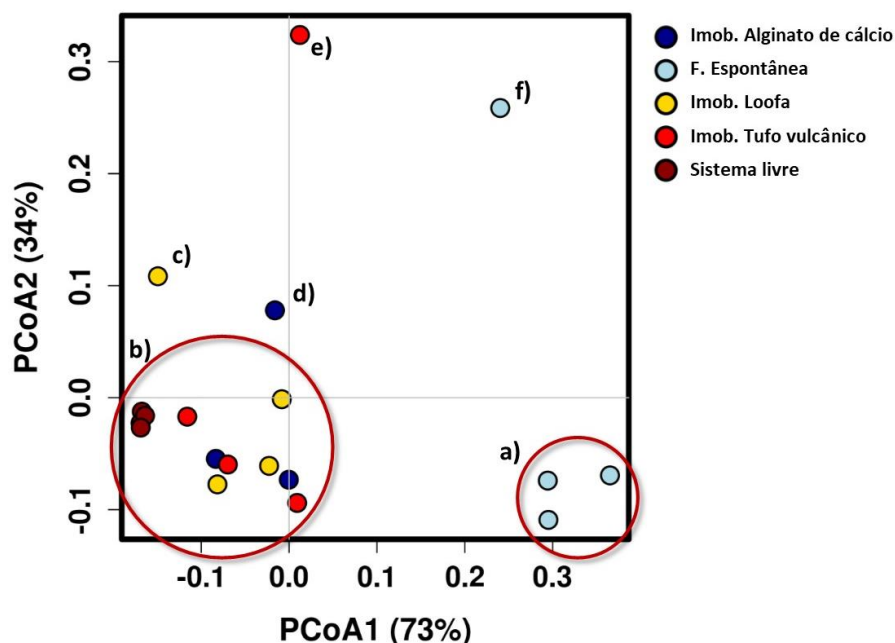


Figura 27. Análise de componentes principais.

Por outro lado, o dendrograma da *Figura 28* evidencia também que é possível agrupar as diferentes amostras em três *clusters* principais (I, II e III). Esses agrupamentos e a respectiva abundância relativa das espécies maioritárias presentes nas amostras permite verificar que o *cluster I* inclui as amostras relativas às 0h da fermentação espontânea e dos três sistemas de imobilização, o *cluster II* agrupa as amostras correspondentes às 24, 48 e 168h da fermentação espontânea, e o terceiro, *cluster III*, agrupa as restantes amostras, correspondentes às inoculações com leveduras livres ou imobilizadas.

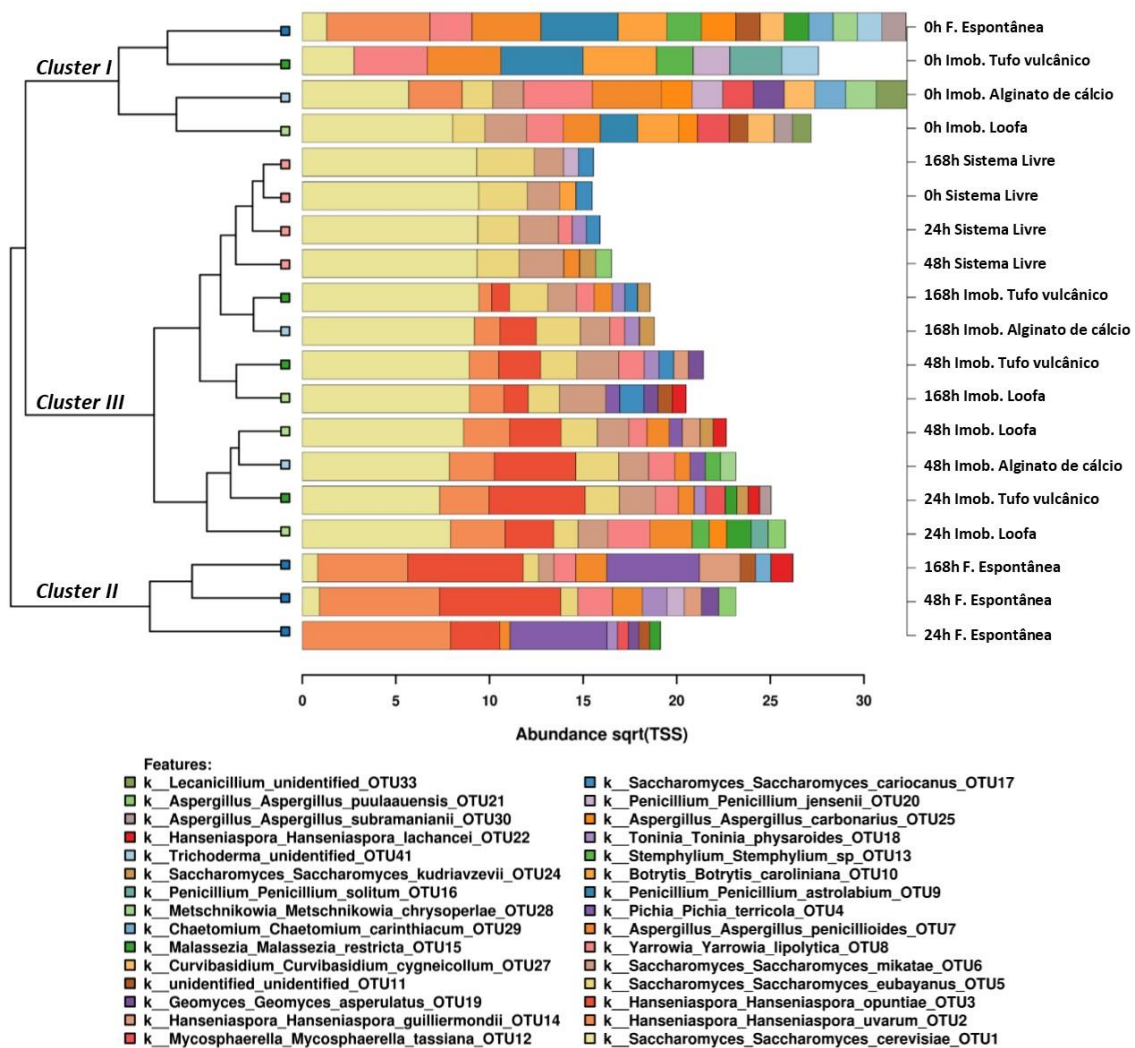


Figura 28. Abundância relativa das 30 espécies maioritárias.

As amostras compreendidas no primeiro conjunto referido apresentam populações semelhantes pois, como já foi apontado anteriormente, representam a população de microrganismos presentes nas uvas que deram origem ao mosto utilizado em todas as culturas.

As amostras correspondentes às 24, 48 e 168h da fermentação espontânea apresentam populações diferentes, comprovando que a adição de *starters* de *S. cerevisiae*, quer em sistemas livres ou em sistemas de imobilização, afetam claramente o desenvolvimento da flora nativa dos mostos.

Com esta análise foi ainda possível distinguir, dentro do grupo III, as amostras referentes à utilização do inóculo em sistema livre que, ao contrário das restantes, apresentam uma diversidade de microrganismos mais reduzida (principalmente no que respeita a espécies não-*Saccharomyces*) e não demonstram o desenvolvimento de leveduras do género *Hanseniaspora* que é possível observar nas amostras relativas à utilização dos sistemas de leveduras imobilizadas.

É possível então concluir que a utilização de *starters* de leveduras imobilizadas promovem dinâmicas populacionais diferentes das fermentações espontâneas, mas também diferentes da utilização *starters* de leveduras livres. Todavia, entre os diferentes suportes testados não se verificou nenhuma distinção clara na forma como as populações evoluem ao longo da fermentação.

Estes resultados mostram que a utilização de *starters* de leveduras imobilizadas nestes suportes, na fermentação de mosto de uva, possibilita o desenvolvimento de leveduras autóctones e pode ser uma opção vantajosa para os produtores também a nível da qualidade organolética dos vinhos produzidos, apresentando uma oportunidade para produzir vinhos com perfis mais complexos, que são encarados como resultado do desenvolvimento de um conjunto de estirpes de leveduras indígenas, exclusivos das fermentações espontâneas, mas sem ocorrer o risco de paragem de fermentação devido ao domínio de uma estirpe fermentativa inoculada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos tempos tem-se verificado um interesse crescente no desenvolvimento de sistemas de imobilização celular com aplicações enológicas. Neste trabalho foram desenvolvidos três sistemas de imobilização de leveduras que foram testados na fermentação alcoólica de mosto sintético e de mosto de uva.

Todos os sistemas de imobilização mostraram capacidade para conduzir esta fermentação e permitiram um desempenho fermentativo com taxas volumétricas de consumo de glucose e produção de etanol semelhantes ou superiores às obtidas com a utilização das mesmas estirpes em sistema de inoculação livre.

O impacto que a utilização de leveduras imobilizadas exerceu na evolução das populações microbianas presentes durante a fermentação alcoólica do mosto de uva, comparativamente à inoculação de leveduras livre e a fermentações espontâneas permitiu demonstrar a existência de diferenças claras entre as populações que dominam as fermentações espontâneas e as fermentações induzidas pela inoculação de leveduras. A utilização de *starters* de leveduras em sistema imobilizado origina também dinâmicas microbianas diferentes das obtidas com a utilização de células livres, permitindo maior abundância relativa de estirpes indígenas, o que pode representar uma alternativa tecnológica interessante para produtores que não querem perder a oportunidade de produzir vinhos com perfis mais complexos, associados a leveduras presentes nas uvas, sem a imprevisibilidade e o risco de paragem de fermentação associados às fermentações espontâneas.

Seria interessante ainda, na continuidade deste trabalho, avaliar a capacidade de reutilização destes sistemas imobilizados e associá-los com a capacidade de regeneração da atividade microbiana após armazenamento, assim como estudar o impacto da sua utilização na composição mineral e na clarificação do vinho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Barahim, A., A. Al-Akhaly, I., & R. Shamsan, I. (2018). Engineering Properties of Volcanic Tuff from the Western Part of Yemen. *Sultan Qaboos University Journal for Science [SQUJS]*, 22(2), 81. <https://doi.org/10.24200/squjs.vol22iss2pp81-88>
- Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., & Mas, A. (2011). Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiology*, 28(8), 1483–1491. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.009>
- Ansorge, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 25(4), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.12.009>
- Aranda, A., Matallana, E., & Olmo, M. del. (2011). *Saccharomyces* Yeasts I: Primary Fermentation. In *Molecular Wine Microbiology* (pp. 1–31). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10001-3>
- Buermans, H. P. J., & den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Canonico, L., Comitini, F., Oro, L., & Ciani, M. (2016). Sequential fermentation with selected immobilized non-*Saccharomyces* yeast for reduction of ethanol content in wine. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 278. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00278>
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., & Spano, G. (2015, December 1). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*. Urban & Fischer. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>
- Cappello, M. S., Zapparoli, G., Logrieco, A., & Bartowsky, E. J. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.025>
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 555. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>
- Ciani, M., & Comitini, F. (2015, February 1). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science*. Elsevier.

- <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.07.001>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, *10*(2), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Claus, H. (2019, February 12). Wine fermentation. *Fermentation*, *5*(1), 19. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010019>
- Comitini, F., Capece, A., Ciani, M., & Romano, P. (2017, February 1). New insights on the use of wine yeasts. *Current Opinion in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.005>
- Covizzi, L. G., Giese, E. C., Gomes, E., Dekker, R. F. H., & Silva, R. Da. (2007). Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, *28*(2), 143. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2007v28n2p143>
- Divies, C., & Cachon, R. (2005). Wine Production by Immobilised Cell Systems. In *Applications of cell immobilisation biotechnology* (pp. 285–293). https://doi.org/10.1007/1-4020-3363-x_17
- Drichoutis, P., Nerantzis, E. T., & Liouni, M. (2007). Continuous production of wine in a tower fermentor using entrapped yeast cells in double layer alginate – chitosan beads. *E-Journal of Science & Technology*, 51–60. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/Continuous-production-of-wine-in-a-tower-fermentor-Drichoutis-Nerantzis/39c0e0d2b5c351f9c77165a72f931db4033c3c35>
- Drozd, I., Makarewicz, M., & Tuszyński, T. (2013). Isolation and identification of microorganisms including lactic acid bacteria and their use in microbial deacidification of wines from domestic vineyards. *Polish Journal of Microbiology*, *62*(3), 331–334. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24459842>
- Elakkiya, M., Prabhakaran, D., & Thirumarimurugan, M. (2016). Methods of Cell Immobilization and Its Applications. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, *5*(4), 5429–5433. <https://doi.org/10.15680/IJRSET.2016.0504175>
- García-Martínez, T., Peinado, R. A., Moreno, J., García-García, I., & Mauricio, J. C. (2011). Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading to the immobilization of yeast. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *86*(6), 812–817. <https://doi.org/10.1002/jctb.2593>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., & Arroyo, T. (2016). Non-Saccharomyces Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production. In *Grape and Wine Biotechnology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64957>

- Genisheva, Z., Teixeira, J. A., & Oliveira, J. M. (2014, November 1). Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.009>
- Genisheva, Zlatina, Macedo, S., Mussatto, S. I., Teixeira, J. A., & Oliveira, J. M. (2012). Production of white wine by *saccharomyces cerevisiae* immobilized on grape pomace. *Journal of the Institute of Brewing*, *118*(2), 163–173. <https://doi.org/10.1002/jib.29>
- Genisheva, Zlatina, Vilanova, M., Mussatto, S. I., Teixeira, J. A., & Oliveira, J. M. (2014). Consecutive alcoholic fermentations of white grape musts with yeasts immobilized on grape skins - Effect of biocatalyst storage and SO₂ concentration on wine characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(2P1), 1114–1122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.046>
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zaroso, B., Mas, A., ... Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*, *240*(5), 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>
- Grainger, K., & Tattersall, H. (2007). *Wine Production: Vine To Bottle*. (K. Grainger & H. Tattersall, Eds.), *Wine Production: Vine To Bottle*. Oxford, UK: K. Grainger & H. Tattersall 2005. <https://doi.org/10.1002/9780470995600>
- Guisan, J. M. (2006). *Immobilization of Enzymes and Cells*. (J. M. Guisan, Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells* (Vol. 22). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9>
- Jackson, R. (2008). *Wine Science*. *Wine Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373646-8.X5001-X>
- Jackson, R. S. (2008). Fermentation. In *Wine Science* (pp. 332–417). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012373646-8.50010-X>
- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M. W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., ... Grant, K. (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiology*, *79*, 96–115. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.005>
- Manzanares, P., Vallés, S., & Viana, F. (2011). Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Winemaking Process. In *Molecular Wine Microbiology* (pp. 85–110). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10004-9>
- Margaritis, A., & Kilonzo, P. M. (2006). Production of Ethanol Using Immobilised Cell Bioreactor Systems. In *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology* (pp. 375–405). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/1-4020-3363-x_22

- Mateo, J. J., & Maicas, S. (2016). Application of non β -saccharomyces yeasts to wine β -making process. *Fermentation*, *2*(3), 14. <https://doi.org/10.3390/fermentation2030014>
- Maturano, Y. P., Rodríguez Assaf, L. A., Toro, M. E., Nally, M. C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L. I., ... Vazquez, F. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *155*(1-2), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015>
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *10*, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine chemistry and biochemistry*. (M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo, Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., & Moreno, J. (2018). Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: Actual trends and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *9*(FEB), 241. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00241>
- Nedović, V., Gibson, B., Mantzouridou, T. F., Bugarski, B., Djordjević, V., Kalušević, A., ... Yilmaztekin, M. (2015). Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *Yeast*, *32*(1), 173-216. <https://doi.org/10.1002/yea.3042>
- Ni, H., Xiong, Z., Ye, T., Zhang, Z., Ma, X., & Li, L. (2012). Biosorption of copper(II) from aqueous solutions using volcanic rock matrix-immobilized *Pseudomonas putida* cells with surface-displayed cyanobacterial metallothioneins. *Chemical Engineering Journal*, *204-205*, 264-271. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.029>
- Nuanpeng, S., Thanonkeo, S., Klanrit, P., & Thanonkeo, P. (2018). Ethanol production from sweet sorghum by *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 immobilized on alginate-loofah matrices. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*, 140-150. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.011>
- Pérez-Ortín, J. E., & García-Martínez, J. (2011). Genomic and Proteomic Analysis of Wine Yeasts. In *Molecular Wine Microbiology* (pp. 143-168). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10006-2>
- Phisalaphong, M., Budiraharjo, R., Bangrak, P., Mongkolkajit, J., & Limtong, S. (2007). Alginate-loofa as carrier matrix for ethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *104*(3), 214-217. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.214>
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook*

- of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications: Second Edition. Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications: Second Edition* (Vol. 1). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470010363>
- Sekomo, C. B., Rousseau, D. P. L., & Lens, P. N. L. (2012). Use of Gisenyi volcanic rock for adsorptive removal of Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) from wastewater. *Water, Air, and Soil Pollution*, *223*(2), 533–547. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-0880-z>
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (1992). *Bioprocess engineering: Basic concepts. Bioprocess engineering: Basic concepts* (Vol. 22). Prentice Hall. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(92\)90106-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(92)90106-2)
- Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2012). Genetic diversity in commercial wineries: Effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, *112*(2), 316–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x>
- Teresa Fernández-Espinar, M., Llopis, S., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Molecular Identification and Characterization of Wine Yeasts. In *Molecular Wine Microbiology* (pp. 111–141). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10005-0>
- Ugliano, M., & Henschke, P. A. (2009). Yeasts and wine flavour. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 313–392). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_17
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>
- Wedekind, W., López-Doncel, R., Dohrmann, R., Kocher, M., & Siegesmund, S. (2013). Weathering of volcanic tuff rocks caused by moisture expansion. *Environmental Earth Sciences*, *69*(4), 1203–1224. <https://doi.org/10.1007/s12665-012-2158-1>
- Zakrzewski, M., Proietti, C., Ellis, J. J., Hasan, S., Brion, M. J., Berger, B., & Krause, L. (2017). Calypso: A user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome-environment interactions. *Bioinformatics*, *33*(5), 782–783. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw725>
- Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 3–26). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_1

ANEXOS

ANEXO I

Composição dos Meios de Cultura

A. Meio YPD líquido

- 20 g/L de D-glucose
- 10 g/L de extrato de levedura
- 10 g/L de peptona

B. Meio YPD sólido

- 20 g/L de D-glucose
- 20 g/L de agar
- 10 g/L de extrato de levedura
- 10 g/L de peptona

C. Mosto sintético

- 160 g/L de D-glucose
 - 6,7 g/L de YNB
 - 5 g/L de ácido tartárico
- a pH 3,5

ANEXO II

Reta de calibração para doseamento de glúcidos redutores segundo o método do DNS

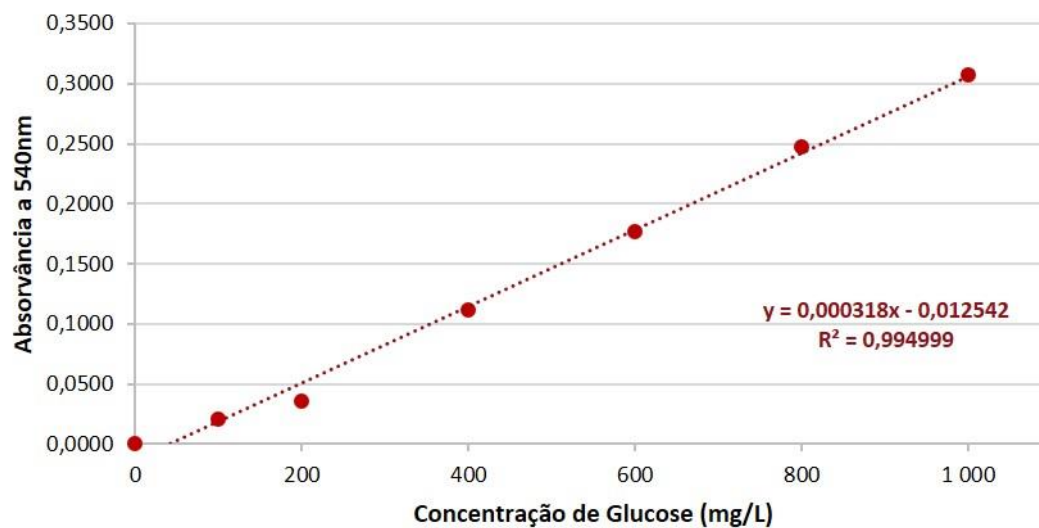


Figura 29. Reta de calibração utilizada no doseamento de glúcidos redutores.