

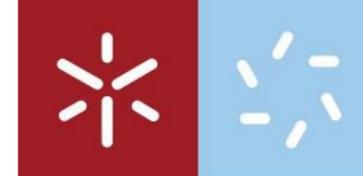
Estudos de fenómica em estirpes de levedura *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* nativas do bago de uva (*Vitis vinifera* L.) com vista à seleção de culturas *starter* para produção de vinho regional



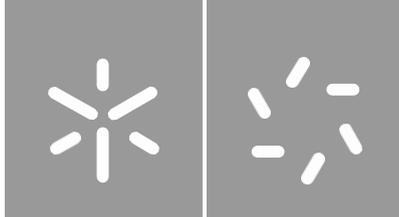
Gonçalo Nogueira Marques

**Estudos de fenómica em estirpes de levedura *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* nativas do bago de uva (*Vitis vinifera* L.) com vista à seleção de culturas *starter* para produção de vinho regional**

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências







**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Gonçalo Nogueira Marques

**Estudos de fenómica em estirpes de levedura  
*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* nativas do bago de  
uva (*Vitis vinifera* L.) com vista à seleção de culturas  
*starter* para produção de vinho regional**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e  
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação do(a)

**Doutora Viviana Maria Varajão Martins**

**Doutor Richard Maykel Gonçalves Breia**

Outubro 2023

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do Repositório da Universidade do Minho.

### ***Licença concedida aos utilizadores deste trabalho***



**Atribuição-NãoComercial-Compartilhalgal CC BY-  
NC-SA**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

## **AGRADECIMENTOS**

No momento de conclusão desta dissertação, chega o momento de mostrar a minha gratidão para todos que me apoiaram a tornar este trabalho uma realidade.

Quero começar por agradecer especialmente aos meus orientadores, à Doutora Viviana e ao Doutor Richard, por toda a disponibilidade, acompanhamento, aconselhamento e apoio. Ao Professor Doutor Hernâni Gerós, agradeço a oportunidade de realizar este projeto e a sua orientação ao longo do ano. Quero também agradecer ao pessoal do laboratório de Biotecnologia vegetal, por toda a simpatia, companhia e cafés ao almoço.

Quero agradecer especialmente também à minha família, em especial à minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, por tudo e a todos os meus amigos mais próximos.

Obrigado a todos!

## **APOIO FINANCEIRO**



Este trabalho foi apoiado pelo “Contrato-Programa” UIDB/04050/2020 financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, FCT I.P. O trabalho contou ainda com o apoio da FCT, CCDR-N (Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Norte de Portugal) e Fundos Europeus (FEDER/POCI/COMPETE2020) através do projeto GrapeMicrobiota (PTDC /BAA- AGR/2691/2020). Este trabalho beneficiou do apoio da empresa Sogevinus, S.A e do laboratório colaborativo CoLAB VINES & WINES: ADVID - Associação para o Desenvolvimento da Viticultura Duriense.

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

# **Estudos de fenómica em estirpes de levedura *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* nativas do bago de uva (*Vitis vinifera* L.) com vista à seleção de culturas *starter* para produção de vinho regional**

## **RESUMO**

A crescente universalização da produção de vinho tem restringido o contributo do *terroir* nos vinhos regionais, levando à perda progressiva da tipicidade. Os microrganismos são a principal força motriz na produção do vinho, conduzindo a fermentação e originando uma série de metabolitos aromáticos. O bago de uva alberga um ecossistema microbiano rico que inclui leveduras fermentativas, bactérias e fungos filamentosos. O presente estudo teve como objetivo a exploração do potencial de leveduras *Saccharomyces* e non-*Saccharomyces* nativas de bagos de uva da Quinta de S. Luiz, na região portuguesa DOC Douro, para a produção de vinhos que expressem as características do seu *terroir*. A tolerância de 15 isolados microbianos a fatores de stresse abiótico foi avaliada, incluindo a etanol, sulfato de cobre, dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), stresse oxidativo e osmótico. As estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram maior tolerância ao etanol e ao SO<sub>2</sub>, enquanto que as leveduras não-*Saccharomyces* apresentaram maior tolerância ao stresse osmótico e ao sulfato de cobre. O crescimento e potencial fermentativo das estirpes foi avaliado em meio sintético, através da monitorização da taxa específica de crescimento, consumo de glucose e produção de etanol, ácido acético e glicerol. Todas as estirpes de *S. cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans* e *Metschnikowia pulcherrima* apresentaram produção destes solutos, enquanto que *Torulaspora delbrueckii* não produziu glicerol mas produziu maior quantidade de ácido acético. Foram então conduzidas fermentações sequenciais com leveduras não-*Saccharomyces* + *Saccharomyces* em mosto natural obtido de bagos das castas Sousão, Touriga Nacional e Viosinho. *M. pulcherrima* mostrou baixa capacidade fermentativa devido à sua elevada sensibilidade ao SO<sub>2</sub> adicionado aos mostos. Os vinhos produzidos unicamente com estirpes de *S. cerevisiae* apresentaram menores níveis de acidez do que os vinhos produzidos por fermentação sequencial, enquanto que o efeito da casta foi muito evidente nos níveis de fenólicos e antocianinas totais dos vinhos. Os resultados são muito relevantes no contexto de desafios atuais na viticultura duriense, incluindo a crescente desacidificação dos vinhos. As estirpes nativas selecionadas no presente trabalho foram utilizadas como *culturas starter* em fermentações à escala piloto realizadas na adega da Quinta de S. Luiz, e o aroma dos vinhos será avaliado por técnicas de GC-MS e por um painel de provadores especializado. O presente trabalho contribuiu substancialmente para os objetivos do projeto FCT em curso GrapeMicrobiota (PTDC/BAA-AGR/2691/2020).

**Palavras-chave:** Acidez do vinho; Dióxido de enxofre; Fermentação sequencial; Stresse abiótico; *Torulaspora delbrueckii*.

# **Phenomic studies with native strains of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts from grape berries (*Vitis vinifera* L.) for the selection of starter cultures for regional wine production**

## ***ABSTRACT***

The increasing universalization in wine production has been restricting the imprint of terroir in regional wines, resulting in progressive loss of typicity. Microbes are the main driving force in wine production, conducting fermentation and originating a myriad of aromatic metabolites. The grape berry hosts a rich microbial ecosystem that includes fermentative yeasts, bacteria and filamentous fungi. The present study thus aimed at exploring the potential of native *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts isolated from grape berries of Quinta de S. Luiz, in the Portuguese Douro wine region, to produce wines that reflect their terroir. The tolerance of 15 yeast isolates to abiotic stress factors including ethanol, copper sulphate, sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>), oxidative stress, and osmotic stress was initially assessed. *Saccharomyces cerevisiae* strains showed greater tolerance to ethanol and SO<sub>2</sub>, while the non-*Saccharomyces* yeasts exhibited higher tolerance to osmotic stress and copper sulphate. The growth and fermentative potential of the strains was assessed in synthetic medium, through monitoring of specific growth rates, glucose consumption, and production of ethanol, acetic acid and glycerol. All strains of *S. cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans* and *Metschnikowia pulcherrima* displayed ability to produce these solutes, while *Torulaspota delbrueckii* did not produce glycerol but demonstrated a greater production of acetic acid. Sequential fermentations with non-*Saccharomyces* + *Saccharomyces* yeasts were conducted in natural musts from the cultivars Sousão, Touriga Nacional and Viosinho. *M. pulcherrima* displayed low fermentative ability due to its high sensitivity to SO<sub>2</sub> added in the musts. Wines produced solely with *S. cerevisiae* strains had lower acidity levels than wines resulting from sequential fermentations, while the cultivar effect was very evident in the levels of total phenolics and anthocyanins of the wines. Results are highly relevant in the context of ongoing challenges in Douro viticulture, including the increasing deacidification of wines. The native yeasts strains selected in this work were used as starter cultures in fermentations at pilot-scale conducted at Quinta de S. Luiz winery, and the wine aroma profile will be evaluated by techniques of GC-MS, and by a panel of wine tasting specialists. The present work contributed greatly for the goals of the ongoing FCT project GrapeMicrobiota (PTDC/BAA-AGR/2691/2020).

**Keywords:** Abiotic stress; Sequential fermentation; Sulphur dioxide; *Torulaspota delbrueckii*; Wine acidity

# ÍNDICE

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
APOIO FINANCEIRO	ii
	
DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. Introdução.....	1
1.1. Impacto económico da videira e do vinho.....	1
1.2. O bago de uva: Desenvolvimento e solutos chave.....	2
1.3. A microbiota do bago e os fatores que modelam a sua biodiversidade.....	4
1.4. Relevância da microbiota para produção de vinho.....	8
1.5. Objetivos.....	13
2. Material e Métodos.....	13
2.1. Estirpes de levedura e condições de cultivo.....	13
2.2. Avaliação da resistência dos isolados a fatores de stresse abiótico.....	14
2.3. Curvas de crescimento e avaliação do potencial fermentativo.....	14
2.4. Microvinificações.....	15
2.5. Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	15
2.5.1. Açúcares redutores.....	15
2.5.2. Acidez titulável e pH.....	16
2.5.3. Fenólicos totais.....	16
2.5.4. Antocianinas totais.....	16
2.5.5. Análise estatística.....	17
3. Resultados.....	17
3.1. Estirpes de leveduras nativas do bago de uva utilizadas no presente trabalho.....	17
3.2. Avaliação da tolerância dos isolados a fatores de stresse abiótico.....	18
3.3. Perfil de crescimento e potencial fermentativo de isolados selecionados em meio definido.....	20
3.4. Fermentações sequenciais com isolados selecionados em mosto natural.....	23
3.5. Parâmetros bioquímicos dos mostos e vinhos.....	25

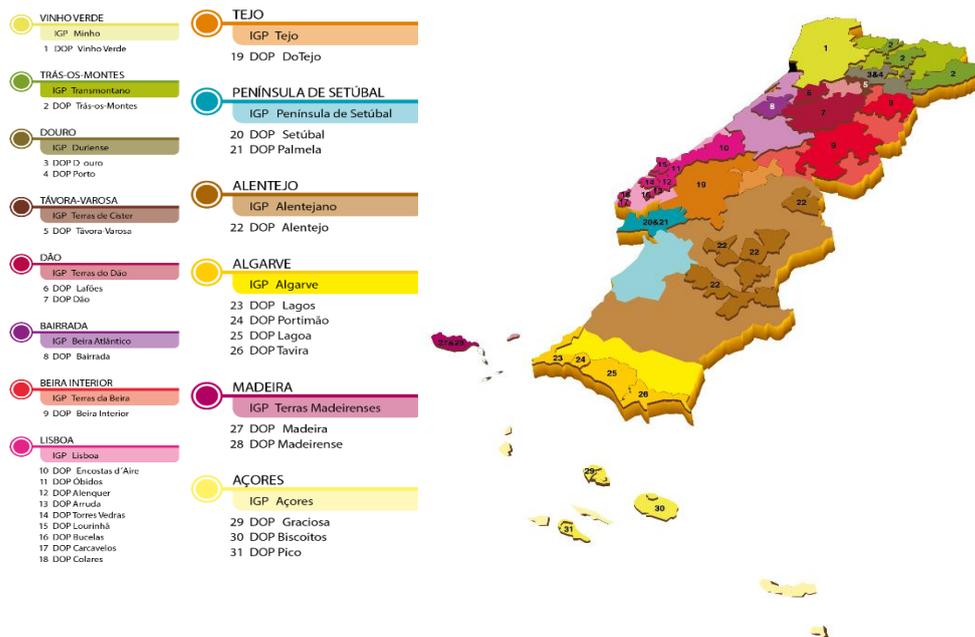
4.	Discussão de resultados .....	27
4.1.	As leveduras nativas do bago de uva apresentam diferente suscetibilidade a fatores de stresse abiótico .....	27
4.2.	Estirpes nativas <i>Saccharomyces</i> e não- <i>Saccharomyces</i> apresentam diferentes níveis de produção de etanol, ácido acético e glicerol .....	30
4.3.	As estirpes utilizadas nas fermentações sequenciais e a casta são fatores determinantes na acidez e no conteúdo em fenólicos do vinho .....	32
5.	Conclusão e perspectivas futuras .....	34
6.	Referências .....	35

# 1. Introdução

## 1.1. Impacto económico da videira e do vinho

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma planta lenhosa perene cujos frutos, as uvas, têm um papel importante na alimentação e na produção de vinho desde a sua domesticação há 8000 anos. É a terceira cultura hortícola mais valiosa, com mais de 7 milhões de hectares cultivados em todo o mundo (Cantu & M. Andrew Walker, 2019; International Organisation of Vine and Wine, 2022). Em Portugal, o vinho tem sido, historicamente, um dos produtos exportados mais importantes, assumindo cada vez mais um lugar de relevo no panorama agrícola nacional, devido à dimensão económica, ambiental, tecnológica e social (Panzone & Simões, 2009). De acordo com o Instituto da Vinha e do Vinho (IVV) e da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), em 2022, Portugal possuía aproximadamente 191 mil hectares de vinha cultivada, posicionando-se como o 9º país do mundo com maior área, e produziu cerca de 6.8 milhões de hectolitros, sendo o 10º país com maior produção a nível mundial (Instituto da Vinha e do Vinho, I.P., 2023a; Instituto da Vinha e do Vinho, I.P., 2023b; International Organization of Vine and Wine, 2023).

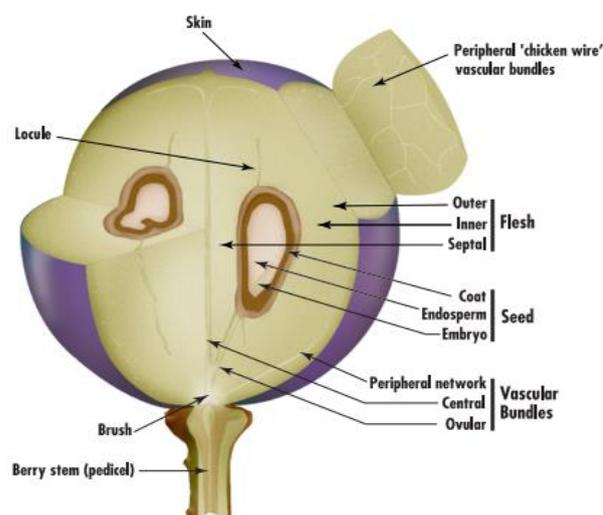
Em Portugal existem 14 regiões de denominação de origem controlada (DOC) da produção de vinho (**Figura 1**). A Região Demarcada do Douro (RDD) é uma das mais antigas regiões reguladas de produção de vinho no mundo, sendo classificada desde 2001 como Património Mundial pela UNESCO, devido à sua longa tradição que resultou numa paisagem cultural de beleza singular, refletindo a sua evolução tecnológica, social e económica (Fraga et al., 2017; UNESCO World Heritage, 2001). Esta região, maior do que qualquer outra região vitivinícola do país, abrange 22.7% da área total de vinhas em 2022 e contribui com 21% de todo o vinho português (Instituto Da Vinha E Do Vinho, I.P., 2023a, Instituto Da Vinha E Do Vinho, I.P., 2023b). Com o seu *terroir* próprio e único, a economia local baseia-se principalmente na produção de vinho, incluindo o famoso Vinho do Porto, além de outros vinhos de alta qualidade (Fraga et al., 2017; Lourenço-Gomes et al., 2015).



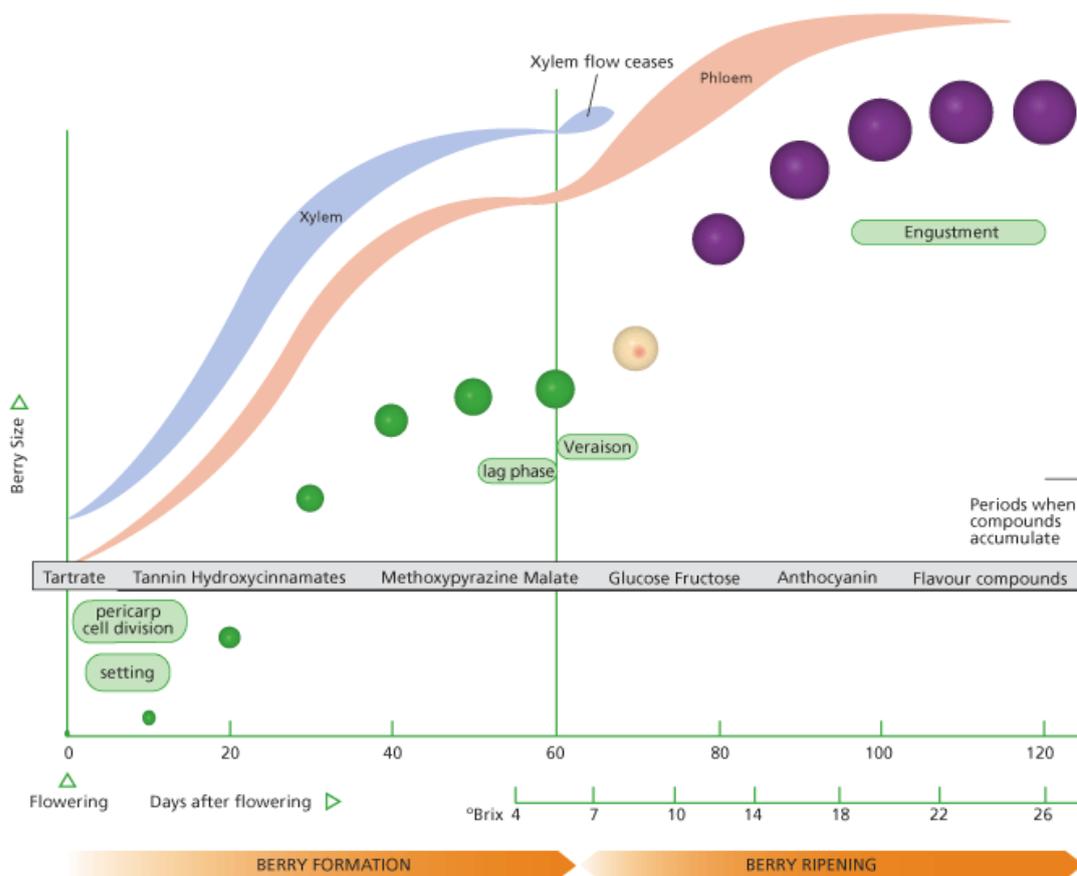
**Figura 1** - Mapa vitivinícola de Portugal (adaptado de Instituto da Vinha e do Vinho, I.P., (2018))

## 1.2. O bago de uva: Desenvolvimento e solutos chave

O bago de uva é composto por três tipos de tecido: a película, a polpa e as sementes (**Figura 2**) (Ollat et al., 2002; Conde et al., 2007; Kennedy, 2014; Gonzalez-Barreiro et al., 2015). Cada um destes tecidos diferem na sua composição, contribuindo de maneiras diferentes para a composição dos vinhos (Ollat et al., 2002; Kennedy, 2014; Gonzalez-Barreiro et al., 2015). À medida que o bago de uva se desenvolve, ocorrem modificações no seu tamanho, composição, cor, textura, sabor e suscetibilidade a patógenos. Durante o processo de desenvolvimento, o bago da uva apresenta um padrão de crescimento duplo sigmoidal, separado por uma fase de latência.



**Figura 2** - Estrutura do bago de uva (adaptado de Kennedy, 2014).



**Figura 3** - Diagrama apresenta o tamanho relativo e a cor dos bagos em intervalos de 10 dias (d), após a floração. Estão também representados os períodos em que os compostos se acumulam, o nível de °brix, e a indicação do fluxo de seiva do xilema e floema no bago (adaptado de Kennedy, 2014).

O primeiro período de crescimento ocorre a partir da floração e dura cerca de 60 dias (d), sendo nesta fase formado o bago e os embriões da semente (Possner & Kliewer, 1985). Durante este período, diversos solutos são acumulados, sendo o ácido tartárico e o ácido málico os mais abundantes (Conde et al., 2007; Kennedy, 2014). Esses ácidos conferem acidez ao vinho, tornando-se elementos essenciais para a sua qualidade (Kennedy, 2014; Gonzalez-Barreiro et al., 2015). O ácido hidroxicinâmico (precursor de compostos fenólicos) também é acumulado nesta fase, maioritariamente na polpa e película dos bagos, bem como os taninos (importantes para a estabilidade, especialmente do vinho tinto), principalmente na película e sementes (Romeyer et al., 1983; Licker et al., 1998). É também neste período que outros compostos como minerais, aminoácidos, micronutrientes e compostos aromáticos se acumulam (Kennedy, 2014; Gonzalez-Barreiro et al., 2015).

Na maioria das castas, a primeira fase de crescimento é seguida pela fase de latência que marca o fim do período herbáceo do fruto (Conde et al., 2007; Ali et al., 2011). Após essa pausa, inicia-se a segunda fase de crescimento, chamada de fase pintor (Kennedy, 2002; Conde et al., 2007). Durante essa fase, o bago de uva torna-se mais mole e a sua cor modifica-se (Kennedy, 2002; Conde et al., 2007; Ali et al., 2011). Os bagos

passam de um estado pequeno, duro, ácido e com baixo teor de açúcares, para um estado em que duplicam o tamanho, e se tornam mais macios, doces, menos ácidos e com cores mais pronunciadas (Kennedy, 2002; Conde et al., 2007; Ali et al., 2011). Nesta fase, ocorre um aumento do fluxo de açúcares para o bago (Conde et al., 2007; Ali et al., 2011). A sacarose produzida nas folhas durante a fotossíntese é transportada para o bago e hidrolisada em glucose e frutose (Kennedy, 2002). Além da acumulação de açúcares, também ocorre a produção de metabolitos secundários (Kennedy, 2002). É durante esta fase de desenvolvimento que nas películas das castas tintas ocorre a síntese de antocianinas, compostos que conferem as cores vermelha a roxa (Kennedy, 2002). É igualmente nesta fase de desenvolvimento que a maioria dos componentes aromáticos das uvas, assim como terpenóides e precursores de compostos aromáticos são sintetizados (Kennedy, 2002; Gonzalez-Barreiro et al., 2015).

No final do amadurecimento, muitos dos solutos acumulados na primeira etapa ainda estão presentes, porém em concentrações menores devido ao aumento do volume do bago e do seu teor em água (Kennedy, 2002; Conde et al., 2007; Gonzalez-Barreiro et al., 2015). Outros solutos são reduzidos tal como o ácido málico, que é metabolizado e utilizado como fonte de energia durante esta fase (Kennedy, 2002; Conde et al., 2007). A concentração de taninos também é diminuída, sendo estes oxidados quando se fixam na película do bago (Kennedy, 2002; Conde et al., 2007; Gonzalez-Barreiro et al., 2015).

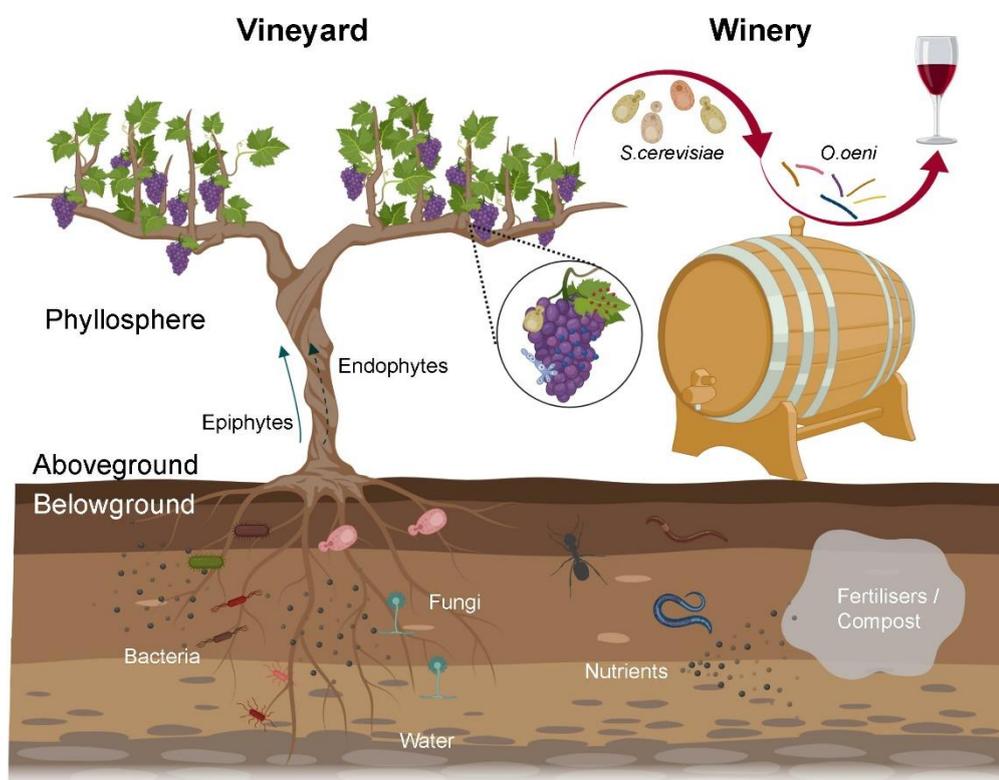
Em geral, o sabor obtido das uvas é resultado da relação entre ácidos e açúcares, bem como da síntese de compostos aromáticos, ou dos seus precursores, que ocorrem nesta fase (Ali et al., 2011). Desta forma, embora a primeira fase de desenvolvimento do bago contribua significativamente para a qualidade do produto final, é nesta segunda fase que ocorre uma acumulação massiva de compostos de interesse, sendo a glucose e a frutose os mais importantes (Conde et al., 2007).

### **1.3. A microbiota do bago e os fatores que modelam a sua biodiversidade**

A ecologia microbiana pode ser definida como a ciência que explora a diversidade, distribuição e abundância de microrganismos, as suas interações e o efeito que eles têm nos ecossistemas (Sven Erik Jorgensen & Fath, 2008).

A videira constitui um ecossistema complexo e dinâmico que inclui fungos filamentosos, leveduras e bactérias que desempenham um papel importante na qualidade do fruto e do vinho (**Figura 4**) (Liu et al.2019; Ding et al., 2021). Esta microbiota pode ser neutra, benéfica ou indesejável para os bagos, uma vez que o seu equilíbrio através da competição por espaço e nutrientes assegura o vigor e qualidade do fruto e reflete ainda o *terroir* de uma região vitivinícola específica (Ding et al., 2023). A diversidade biogeoquímica dos solos em que as videiras crescem, abrigam uma microbiota igualmente diversa que afeta as culturas moldando o aroma, sabor e

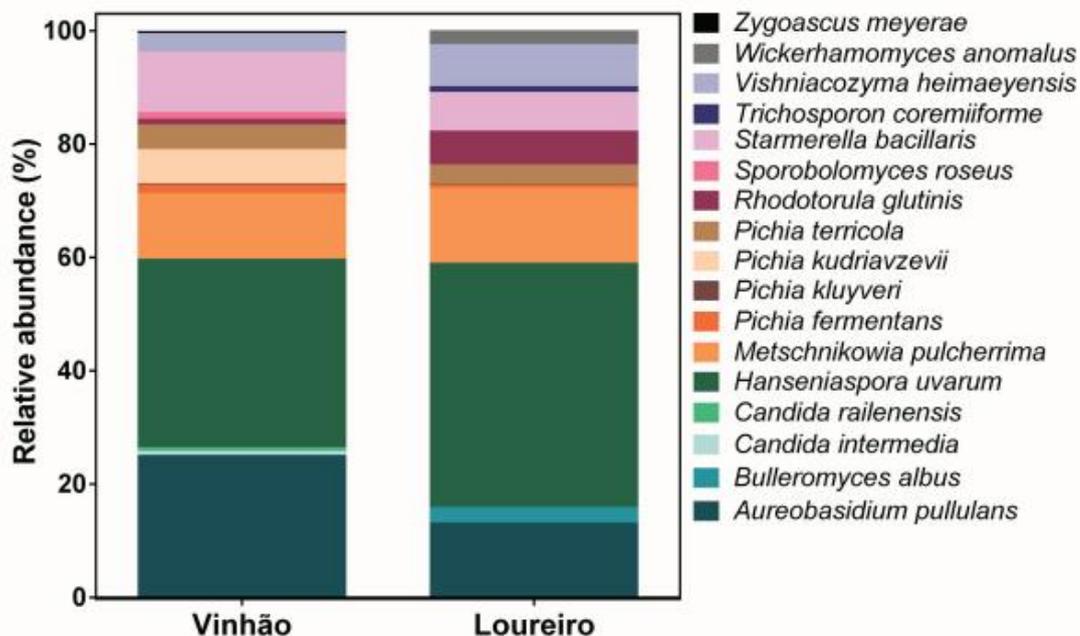
qualidade do vinho. Os microorganismos podem estabelecer-se na filosfera das plantas por contacto físico ou através da rizosfera, pela superfície (epífitos) ou internamente (endófitos) (**Figura 4**) (Liu et al.2019).



**Figura 4** - Microbiota relacionada com o vinho desde a videira até à adega (adaptado de Liu et al.2019).

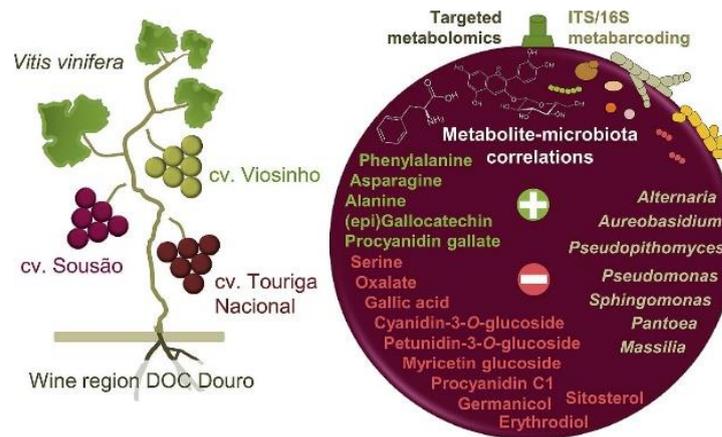
Nos últimos anos, muitos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar as populações de leveduras na superfície dos bagos. Muitas espécies de leveduras do bago são passíveis de cultivar em laboratório (**Figura 5**), permitindo a sua utilização em diversas aplicações biotecnológicas (Martins et al., 2022). As populações de leveduras estão compreendidas entre  $10^2$  e  $10^4$  CFU/g em as uvas sãs (Fleet et al., 2002), sendo que em uvas deterioradas este número pode ser dez vezes superior (Barata et al., 2012). A evolução destas populações pode estar relacionada com a área de superfície de cada bago e a disponibilidade de nutrientes (Renouf et al., 2005; Liu et al., 2017; Ciani & Comitini, 2019). À medida que os bagos vão amadurecendo, as populações residentes vão-se alterando (Renouf et al., 2005). Em bagos verdes, de baixo teor de nutrientes, estão presentes principalmente espécies oligotróficas, oxidativas, como *Aureobasidium pullulans* e alguns basidiomycetes como *Rhodotorula sp.* e *Rhodospiridium sp.*, que vão diminuindo de número à medida que os bagos amadurecem (Renouf et al., 2005; Barata et al., 2012; Ciani & Comitini, 2019). Como nesta fase os bagos se tornam maiores e mais suaves, a disponibilidade de nutrientes aumenta, levando a um aumento de espécies ascomicetes oxidativas ou pouco fermentativas como as *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia* e *Pichia spp.* (Renouf et al., 2005; Barata et al., 2012). Em uvas danificadas a disponibilidade de nutrientes é maior, o que leva a um número ainda

maior de espécies nos bagos, sendo as mais numerosas as espécies fermentativas tais como *Pichia spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Zygoascus spp.*, *Torulaspota spp.* (Barata et al., 2012). As *Saccharomyces spp.* e leveduras contaminantes do vinho estão presentes nos bagos, mas em número muito reduzido mesmo em uvas danificadas (Barata et al., 2012).



**Figura 5** - Abundância relativa de espécies de leveduras cultiváveis em bagos de uva de castas Vinhão e Loureiro (adaptado de Martins et al., (2022))

A composição destas comunidades microbianas é influenciada por vários fatores, tais como as variações climáticas (temperatura, humidade, radiação UV), a composição metabólica do bago de uva (Martins et al., 2023) e os tratamentos fitossanitários feitos na vinha (Renouf et al., 2005, Barata et al., 2012 Drumonde-Neves et al., 2016). Estudos recentes de metabolómica e *metabarcoding* mostraram que o conteúdo em aminoácidos, fenólicos e ceras do fruto modela a biodiversidade microbiana, existindo uma correlação negativa entre a concentração de estigmasterol e amirina e a abundância relativa de fungos patogénicos como *Erysiphe necator* e *Aspergillus carbonarius* (**Figura 6**) (Martins et al., 2023).



**Figura 6** - Correlações entre metabolitos do bago de uva e a microbiota residente, na região vitivinícola do Douro (adaptado de Martins et al. 2023).

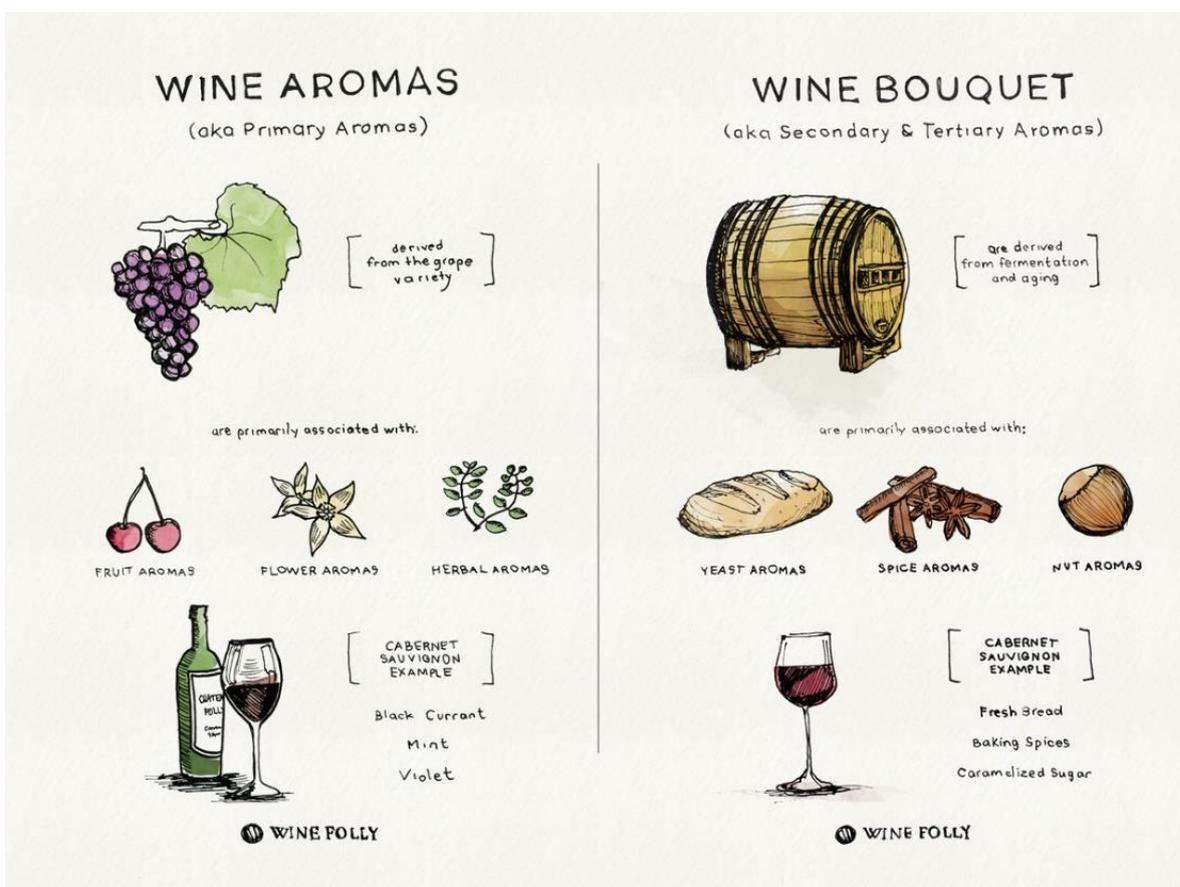
Diversos estudos referem que a abundância de leveduras é menor em anos chuvosos e/ou frios (Comitini & Ciani, 2006; Drumonde-Neves et al., 2016), porém alguns estudos reportam maiores contagens de leveduras em anos com muita chuva e tempo frio (Čadež et al., 2010). A diversidade de espécies encontradas em cada ano também pode variar significativamente (Barata et al., 2012; Drumonde-Neves et al., 2016; Martins et al. 2022). Também não há consenso na literatura relativo à influência dos pesticidas ou fungicidas, para combater maioritariamente doenças como o mildio, oídio e podridão cinzenta, no número e diversidade de espécies de leveduras existentes (Barata et al., 2012; Drumonde-Neves et al., 2016). Alguns estudos referem os fungicidas diminuem a biodiversidade, incluindo a calda bordalesa cujo princípio ativo é o sulfato de cobre, um forte inibidor do crescimento e capacidade fermentativa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Guerra et al., 1999; Calhela et al., 2006; Martins et al., 2015). No entanto, outros estudos mostraram que os tratamentos fitossanitários têm um impacto insignificante na composição das comunidades do bago (Oliva et al., 2007; Čadež et al., 2010; Barata et al., 2012; Drumonde-Neves et al., 2016).

Fatores bióticos também influenciam a abundância, número e diversidade das populações microbianas dos bagos de uva (Barata et al., 2012; Ciani & Comitini, 2019). Vetores de microorganismos como abelhas e vespas podem ativamente transferir leveduras entre os bagos e as vinhas (Francesca et al., 2011; Ciani & Comitini, 2019). As aves, durante as suas migrações, também podem disseminar leveduras com potencial biotecnológico entre plantas, porém são necessários mais estudos neste âmbito (Francesca et al., 2011, Ciani & Comitini, 2019). Outro aspeto que pode afetar a diversidade de espécies de levedura nos bagos consiste nas interações entre os próprios microorganismos (Barata et al., 2012), uma vez que diversas leveduras têm a capacidade de antagonizar o crescimento de outros microorganismos, incluindo fungos patogénicos (Ayogu et al., 2023). Outros estudos mostraram que certas comunidades microbianas ativam vias de defesa da planta, induzindo a acumulação de proteínas relacionadas com a patogénese (Pinto et al., 2015), que protegem os bagos de fungos

patogênicos ou outros tipos de stresse biológico (Ding et al., 2021).

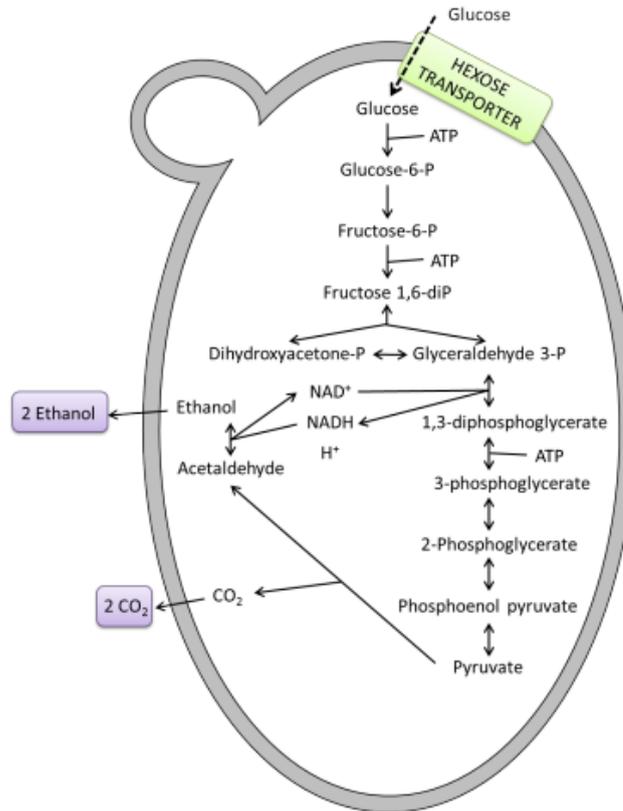
#### 1.4. Relevância da microbiota para produção de vinho

A composição química dos vinhos é responsável pela componente sensorial e é determinada por vários fatores, que incluem a variedade dos bagos, as condições geográficas, a ecologia microbiana e os processos fermentativos e de vinificação (Fleet, 2003). De uma forma geral, há três tipos de aromas no vinho: os aromas primários, derivados diretamente do fruto, característicos da casta, e todas as práticas de viticultura, os aromas secundários, gerados durante a vinificação e finalmente, os aromas terciários, provenientes dos processos de maturação e envelhecimento do vinho (**Figura 7**) (Styger et al., 2011; Mina & Tsalts, 2017).



**Figura 7** - Aromas presentes no vinho (adaptado de Folly Enterprises (2016)).

A fermentação é um processo natural usado pela humanidade há milhares de anos com a finalidade de produzir bebidas alcoólicas, pão, iogurte, entre outros (Maicas, 2020). Do ponto de vista bioquímico, a fermentação é o processo central metabólico, no qual um organismo converte um hidrato de carbono, em álcool ou ácido orgânico (**Figura 8**) (Maicas, 2020).



**Figura 8** - Metabolismo bioquímico da fermentação (adaptado de Maicas, 2020)

As leveduras são as principais responsáveis pela fermentação alcoólica do mosto e têm também um papel preponderante na formação dos aromas do vinho (Mina & Tsaltas, 2017, Fleet, 2003), mediando a formação de compostos secundários. Enzimas produzidas pelas diferentes espécies de leveduras utilizam compostos precursores neutros presentes no mosto para sintetizar metabolitos ativos, tais como ácidos, ésteres, polióis, aldeídos, cetonas e outros (**Tabela 1**) (Fleet, 2003, Borren & Tian, 2020). Além disso, as leveduras também produzem compostos resultantes do metabolismo primário, tal como etanol, glicerol, ácido acético e acetaldeído (Fleet, 2003, Mina & Tsaltas, 2017). Os produtos diferem tanto em quantidade como em diversidade com a espécie e estirpe da levedura e a sua abundância, podendo contribuir de forma positiva ou negativa para o aroma final do vinho (Fleet, 2003, Englezos et al., 2022). Elevadas concentrações de sulfureto de hidrogénio e outros compostos voláteis sulfúricos, ácido acético, alguns ésteres e fenóis voláteis conferem aromas desagradáveis e indesejáveis para o vinho. Portanto, uma compreensão aprofundada das características das leveduras inoculadas é fundamental para a produção de vinhos de alta qualidade. (Fleet, 2003).

**Tabela 1** - Classes de compostos voláteis comuns produzidos durante a fermentação, enzimas responsáveis pela sua formação, substratos iniciais e seus efeitos no aroma do vinho (adaptado de Borren & Tian, 2020).

<b>Classes de compostos voláteis</b>	<b>Enzima responsável pela formação</b>	<b>Substratos iniciais</b>	<b>Descrição do aroma</b>
Ésteres	Esterase, álcool acetiltransferase	Álcool + ácidos	Frutado, floral
Terpenos	Glucosidase	Terpenóides Glicósidos	Floral, varietal
Álcoois superiores	Álcool desidrogenase	Aminoácidos	Teor baixo: frutado Teor elevado: etéreo
Fenóis voláteis	Fenol redutase, descarboxilase	Ácidos carboxílicos	Teor baixo: fumado, bacon Teor elevado: suor, animal, couro
Compostos sulfurados	Liase sulfurosa, álcool desidrogenase	Aminoácidos, tióis, enxofre	Sulfitos: ovos estragados Tióis: frutas tropicais
Ácidos gordos voláteis	Descarboxilase, sintetase de ácidos gordos	Acetil-CoA, malonil-CoA	Vinagre, comida rançosa, odor muito intenso

As leveduras fermentativas podem ser divididas em 2 grandes grupos, as *Saccharomyces* (maioritariamente *S. cerevisiae*) e as não-*Saccharomyces*. As *S. cerevisiae* são as mais estudadas e usadas na fermentação de vinhos devido às suas capacidades fermentativas, crescimento rápido e fácil adaptação (Maicas, 2020). As leveduras não-*Saccharomyces* são todas as outras leveduras com potencial enológico que não pertencem ao género *Saccharomyces* (Maicas, 2020, Roudil et al., 2020).

Durante uma fermentação espontânea, realizada por leveduras essencialmente presentes na microbiota das uvas e da adega, são as espécies não-*Saccharomyces* que iniciam os primeiros estágios da fermentação alcoólica, devido à sua maior presença em relação às *Saccharomyces* (Benito et al., 2019, Maicas, 2020). No entanto, as *S. cerevisiae* rapidamente assumem o controlo devido à sua maior resistência ao etanol (Benito et al., 2019, Maicas, 2020). Estas são as únicas leveduras capazes de concluir a fermentação, ou seja, de consumir o açúcar do mosto na totalidade (Benito et al., 2019, Roudil et al., 2020). Esta imprevisibilidade do número de espécies e estirpes presentes neste tipo de fermentação pode resultar em produção de compostos prejudiciais para os vinhos (Comitini et al., 2021). Desta forma, desde os anos 70 iniciou-se a vinificação com fermentações controladas através do inóculo de uma cultura *starter* pura de *S. cerevisiae* (Comitini et al., 2021). No entanto, o uso desta espécie comercial reduziu a biodiversidade microbiana do processo, tendo como consequência a

redução da complexidade dos vinhos, promovida pelas não-*Saccharomyces*, comprovada pela comparação dos perfis sensoriais de vinhos inoculados com monoculturas de *S. cerevisiae* ou com vinhos de fermentações espontâneas (Varela et al., 2009; Comitini et al., 2021; Englezos et al., 2022).

Nos últimos anos tem sido estudado o uso controlado de culturas *starter* de leveduras não-*Saccharomyces* em adição às já usadas de *S. cerevisiae*, em fermentações mistas, de forma sequencial (geralmente, primeiro as não-*Saccharomyces* e de seguida uma *S. cerevisiae*) ou simultânea, de forma a melhorar as características específicas do vinho, quer pela valorização da complexidade das características estruturais ou aromáticas, a redução de etanol, ou o controlo de microrganismos espontâneos e indesejados (Benito et al., 2019, Comitini et al., 2021, Englezos et al., 2022).

Algumas das leveduras não-*Saccharomyces* mais estudadas e usadas em fermentações mistas são *Torulaspota delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans* e *Metschnikowia pulcherrima* (**Tabela 2**) (Benito et al., 2019, Roudil et al., 2020).

*T. delbrueckii* foi a primeira levedura não-*Saccharomyces* utilizada comercialmente devido às suas características semelhantes à *S. cerevisiae*, especialmente a elevada tolerância ao etanol (até 14% (v/v)) e SO<sub>2</sub>, bem como a sua capacidade fermentativa, podendo produzir até 10% (v/v) de etanol no vinho (Benito et al., 2019; Borren & Tian, 2020). Em co-fermentação com *S. cerevisiae*, esta aumenta a complexidade aromática do vinho com destaque para o aroma a frutos secos e a pastelaria (Zhang et al., 2018; Borren & Tian, 2020).

*L. thermotolerans* tem ganho destaque na indústria, devido às boas propriedades enológicas, na medida em que tem boa tolerância ao etanol, até 9 a 10%, e boa capacidade fermentativa, mesmo em co-cultura com *S. cerevisiae* (Morata et al., 2018; Borren & Tian, 2020). A principal característica desta levedura é a elevada produtividade de ácido láctico que acidifica os vinhos (diminui o pH) e aumenta os níveis de SO<sub>2</sub> molecular, protegendo os vinhos contra leveduras contaminantes e bactérias (Morata et al., 2018; Benito et al., 2019; Borren & Tian, 2020; Vicente et al., 2021). Para além disto, em combinação com *S. cerevisiae* pode aumentar os aromas florais e a frutas tropicais em vinhos brancos e aromas mais complexos e redondos em vinhos tintos (Balikci et al., 2016).

Ao contrário das leveduras mencionadas anteriormente, *Metschnikowia pulcherrima* apresenta uma capacidade fermentativa e tolerância ao etanol mais baixa, suportando até 4 a 5% (v/v) (Morata et al., 2019; Borren & Tian, 2020). Apesar disso, destaca-se pelas suas características enológicas interessantes, especialmente quando usada em co-cultura com *S. cerevisiae* (Vicente et al., 2020). Uma das vantagens da *M. pulcherrima* em co-cultura é a sua elevada capacidade proteolítica que resulta na libertação de aminoácidos no mosto, que podem ser aproveitados pela *S. cerevisiae* como fonte de nutrientes e substrato para a formação de etil ésteres, juntamente com etanol (Morata et al., 2019; Borren & Tian, 2020). Além das suas contribuições enológicas, *M.*

*pulcherrima* também pode ser utilizada como agente de controlo biológico (Morata et al., 2019, Vicente et al., 2020). Isso deve-se à sua capacidade para produzir pulcherrimina, um pigmento com atividade antifúngica (Morata et al., 2019; Borren & Tian, 2020; Vicente et al., 2020) que inibe o crescimento de leveduras *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida* e *Pichia*, que podem causar deterioração do mosto, bem como das uvas antes da colheita, e de fungos patogénicos como *Botrytis cinerea*, *Penicillium* e *Alternaria* (Morata et al., 2019; Borren & Tian, 2020; Vicente et al., 2020).

**Tabela 2** - Principais características e aromas descritivos das leveduras não-*Saccharomyces* retratadas neste trabalho (adaptado de M Victoria Moreno-Arribas et al., 2009, p. 369; Balikci et al., 2016; Morata et al., (2018); Zhang et al., 2018; Benito et al., (2019); Morata et al., (2019); Borren & Tian, (2020); Fernandes et al., 2021; Vicente et al., (2021); Englezos et al., (2022))

Espécie	Relevância no vinho	Influência no aroma final do vinho
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Elevada tolerância a etanol (14%) e SO <sub>2</sub> . Elevada capacidade fermentativa (até 10%). Capacidade para reduzir teor de etanol e de álcoois superiores em co-cultura com <i>S. cerevisiae</i> . Produção de baixos níveis de ácido acético. Libertação de terpenos, tióis, manoproteínas e polissacarídeos. Boa capacidade de produzir ácido succínico. Baixa produção de acetaldeído.	Complexidade aromática;  Aromas a frutos secos e pastéis.
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Boa tolerância ao etanol (9 a 10%). Capacidade para reduzir a quantidade de etanol no produto final quando em co-cultura com <i>S. cerevisiae</i> . Elevada produção de ácido láctico. Boa produção de glicerol. Baixa produção de ácido acético e álcoois superiores. Elevada concentração de β-liases e de liases de carbono-enxofre.	Aumenta os aromas a flores e frutas tropicais em vinho branco;  Aromas mais complexos e redondos em vinhos tintos.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Fraca atividade fermentativa e baixa capacidade para tolerar etanol (até 4 ou 5% (v/v)). Elevada produção de ésteres, terpenos e álcoois superiores. Aumento da concentração de glicerol. Elevada capacidade proteolítica.	Aumento dos aromas varietais especialmente florais;  Aumento de aromas a fruta.

## 1.5. Objetivos

A regionalidade e autenticidade dos vinhos é cada vez mais procurada no mercado vitivinícola. Dado o papel preponderante das leveduras no aroma do vinho, o presente trabalho teve como principal objetivo explorar o potencial de leveduras nativas *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* isoladas de bagos de uva da região DOC Douro para a produção de vinhos com características aromáticas diferenciadoras. Foi inicialmente caracterizado o fenótipo de diversos isolados com vista à identificação de estirpes com maior resistência a fatores de stresse abiótico encontrados durante a vinificação. Posteriormente, foi ainda avaliada a performance fermentativa dos isolados, com vista à otimização de cocktails de culturas *starter* para a produção de vinhos regionais. Finalmente, foram realizadas fermentações sequenciais em mosto natural, à escala laboratorial, utilizando isolados selecionados de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* com vista à análise do perfil volátil dos vinhos produzidos e da sua caracterização aromática.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto FCT GrapeMicrobiota (PTDC/BAA-AGR/2691/2020) que visa a exploração do *terroir* microbiano e a utilização de estirpes nativas para produção de vinhos regionais de excelência com elevada tipicidade. Os resultados obtidos foram essenciais para a realização de fermentações em adega utilizando as culturas *starter* otimizadas, na vindima de 2023.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Estirpes de levedura e condições de cultivo

As estirpes de levedura utilizadas no presente estudo foram isoladas previamente da microbiota nativa de bagos de uva das castas Sousão e Touriga Nacional, localizadas na Quinta de S. Luiz (Sogevinus, S.A.), na região vinícola demarcada do Douro. O método de isolamento das leveduras cultiváveis foi iniciado através do plaqueamento de mosto em meio sólido diferencial de Wallerstein e em meio de lisina, conforme descrito anteriormente (Martins et al., 2022). Após 5 d de incubação a 24 °C, as colónias foram isoladas para meio fresco e as espécies correspondentes foram identificadas através de sequenciação de Sanger da região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) e do domínio D1/D2 da subunidade maior do rDNA (LSU), utilizando métodos previamente descritos (Martins et al., 2022). A identificação das estirpes dentro de cada espécie baseou-se no grau de homologia com DNA de estirpes previamente anotadas na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), através da ferramenta BLASTn (*basic local alignment search tool*). As estirpes foram conservadas em stocks de glicerol no Departamento de Biologia da Universidade do Minho e crescidas em meio sólido YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de agar) 3 d antes da realização dos ensaios experimentais. No presente trabalho, foram selecionadas 4 espécies fermentativas de elevado interesse enológico, num total de 15 estirpes: *Saccharomyces cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspora*

## **2.2. Avaliação da resistência dos isolados a fatores de stresse abiótico**

O crescimento dos diferentes isolados foi avaliado na presença de fatores causadores de stresse abiótico frequentemente encontrados durante o processo de vinificação, nomeadamente presença de etanol, dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), sulfato de cobre (princípio ativo de fungicidas usados na vinha), sorbitol (indutor de stresse osmótico) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (indutor de stresse oxidativo). Para o efeito, alíquotas de 3 µl de cultura ajustada a uma densidade ótica (DO<sub>600nm</sub>) inicial de 0,1 foram inoculados em meio sólido YPD suplementado com concentrações crescentes de cada fator como descrito anteriormente (Barbosa et al. 2018): 1) etanol a 6, 9, 12 e 15% (v/v); 2) sorbitol a 10, 20, 30 e 40% (m/v); 3) 2, 4 e 6 mM de SO<sub>2</sub> adicionado sob a forma de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 4) CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O a 500, 1000, 2000, 3000 e 5000 mg/L; e 5) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,25, 0,5, 1 e 10 mM. As placas foram incubadas no escuro a 24 °C durante 3 d e a avaliação do crescimento foi realizada por comparação com o crescimento de cada estirpe na ausência do fator de stresse. Os ensaios foram realizados em triplicado.

## **2.3. Curvas de crescimento e avaliação do potencial fermentativo**

Foram preparados pré-inóculos em meio mineral sintético líquido composto por NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> (0.5% m/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.5% m/v), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.05% m/v), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.013% m/v), glucose (2% m/v), micronutrientes MS (Murashige & Skoog, 1962) e vitaminas, com pH ajustado a 4,5, consoante o método descrito por Silva et al., (2004). Após incubação a 24°C durante 14 h com agitação a 200 rpm, foram preparadas culturas em triplicado, a uma DO<sub>600nm</sub> de 0,1 em 100 mL de meio mineral fresco. O crescimento das culturas foi monitorizado através do registo da sua DO<sub>600nm</sub> a cada 2 h, ao longo de 55 h, permitindo a construção de curvas de crescimento e a determinação da taxa específica de crescimento (µ) e do tempo de duplicação (Td) de cada estirpe.

O potencial fermentativo das espécies foi avaliado através do registo do consumo de glucose e produção de etanol, ácido acético e glicerol, quantificados por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). Foram recolhidas alíquotas de 1 mL de meio de cultura, desproteinizadas com 34 µL de ácido perclórico a 60%, e posteriormente analisadas num cromatógrafo LaChrom Elite -DEMO (Hitachi) com coluna Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%) da marca Phenomex, mantida a 40 °C, com 2,5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel, a uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min. As concentrações de glucose, etanol, ácido acético e glicerol foram determinadas através da análise do tempo de retenção e área do respetivo pico dos cromatogramas, por comparação com curvas de calibração previamente efetuadas com soluções padrão de glucose (de 5 a 20 g/L), etanol (de 1 a 80 g/L), ácido acético (de 1 a 60 g/L) e glicerol (de 1 a 10 g/L).

## 2.4. Microvinificações

Quatro estirpes de levedura foram selecionadas para a realização de microvinificações, nomeadamente *Saccharomyces cerevisiae* (isolados 159, 141 e 264), *Lachancea thermotolerans* (isolado 186), *Torulasporea delbrueckii* (isolado 195) e *Metschnikowia pulcherrima* (isolado 204). As fermentações foram realizadas com mosto natural obtido a partir de bagos das castas Viosinho, Sousão e Touriga Nacional, da mesma quinta de onde foram obtidas as leveduras cultiváveis. Os bagos foram esmagados manualmente, e os mostos foram suplementados com 60 mg/L de SO<sub>2</sub>. Após maceração em repouso a 4 °C durante 24 horas para os mostos Viosinho e de 48 horas para os mostos de Sousão e Touriga Nacional, foram removidas as grainhas e as películas (Whitener et al., 2017). Posteriormente, alíquotas de 250 mL de mosto foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 250 mL.

Fermentações sequenciais foram iniciadas por inoculação dos mostos com 10<sup>6</sup> CFU/mL de leveduras não-*Saccharomyces*, de acordo com o método de Oliveira & Ferreira (2019). Após 5 d de fermentação a 16 °C para os mostos de Viosinho ou 3 d de fermentação a 24 °C para os mostos de Sousão e Touriga Nacional, foi adicionada a levedura *S. cerevisiae* (10<sup>6</sup> CFU/mL) a todos os mostos. Como controlo, foram realizadas fermentações com apenas *S. cerevisiae* inoculada na mesma concentração.

O progresso das fermentações foi avaliado diariamente através da medição do °Brix com um refratómetro analítico portátil e da percentagem de álcool com um vinómetro de vidro (Oliveira & Ferreira, 2019; Martins et al., 2020). Os vinhos foram recolhidos no final da fermentação, quando a variação dos valores de °Brix e álcool cessaram completamente (Martins et al., 2020).

## 2.5. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos em mosto, antes da fermentação, e em vinhos no final da fermentação.

### 2.5.1. Açúcares redutores

A concentração dos açúcares redutores foi determinada pelo método de Miller (1959), através do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para o efeito, foi necessário diluir 200x as amostras de mosto das 3 castas em H<sub>2</sub>O desionizada, e 4x as amostras dos vinhos de Sousão e Touriga Nacional. Posteriormente, a 100 µL de amostra diluída foram adicionados 100 µL do reagente DNS. Após homogeneização no vórtex, as misturas foram ferveridas durante 3 min em banho-maria. Foi ainda adicionado 1 mL de H<sub>2</sub>O fria a cada mistura de reação, e posteriormente lida a absorvância a 540 nm num espectrofotómetro *Genesys20*. A concentração dos açúcares redutores foi determinada através de uma curva de calibração obtida a partir dos valores de absorvância obtidos

pela reação do DNS com soluções de glicose de concentrações pré-definidas. Os resultados foram expressos em g de açúcares redutores por L de mosto ou vinho, e representados pela média  $\pm$  desvio padrão de 3 réplicas biológicas.

### **2.5.2. Acidez titulável e pH**

A acidez titulável (AT) foi determinada pela adição, gota a gota, de uma solução de 0.1 N NaOH, a 3 mL de amostra de mosto ou vinho das 3 castas, até se atingir o pH de 8.2, de acordo com o método de Amerine and Ough (1980). O pH foi determinado com um *Multiparameter Analyzer Consort C-860*. A acidez titulável foi expressa em equivalentes de ácido tartárico através da fórmula:  $AT \text{ (g/L)} = [\text{volume de NaOH adicionado (mL)} \times \text{molaridade da solução de NaOH (M)} \times 75] / \text{volume da amostra (mL)}$ . As quantificações foram realizadas em 3 réplicas biológicas por condição (Martins et al., 2015).

### **2.5.3. Fenólicos totais**

A composição em fenólicos totais foi avaliada segundo o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). Foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  das amostras de mosto/vinho de Sousão e Touriga Nacional a 1500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , e 50  $\mu\text{L}$  das amostras de mosto/vinho de Viosinho a 1460  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , seguidos de 10  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin. Após homogeneização no vórtex, foram ainda adicionados 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 M). Após incubação durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente, foi medida a absorvância das amostras a 765 nm num espectrofotómetro Genesys20.

A concentração de fenólicos totais foi determinada através de uma curva de calibração obtida por soluções de ácido gálico de concentrações pré-definidas. Os resultados foram expressos em g de fenólicos totais por L de amostra (mosto ou vinho), e representados pela média  $\pm$  desvio padrão de 3 réplicas biológicas.

### **2.5.4. Antocianinas totais**

O teor em antocianinas foi quantificado em mostos e vinhos das castas tintas pela adaptação do método do pH diferencial (Nicoué et al., 2007, Martins et al., 2020).

A extração das antocianinas foi realizada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de amostra a 80  $\mu\text{L}$  de Metanol. Posteriormente, foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de uma solução de KCl (25 mM) a pH 1,0 às misturas de reação e a absorvância foi medida a 520 nm.

A concentração de antocianinas totais foi determinada pelo coeficiente de extração molar da malvidina-3-O-glicosídeo, e os resultados foram expressos em g de antocianinas totais por L de mosto ou vinho, e representados pela média  $\pm$  desvio padrão de 3 réplicas biológicas.

### 2.5.5. Análise estatística

O teste One-Way ANOVA foi utilizado para a comparação dos valores obtidos, no software Prism 8.0.1, GraphPad Software, Inc.. As diferenças estatisticamente significativas foram assinaladas com letras diferentes (a,b,c), para valores de  $P \leq 0.05$ .

## 3. Resultados

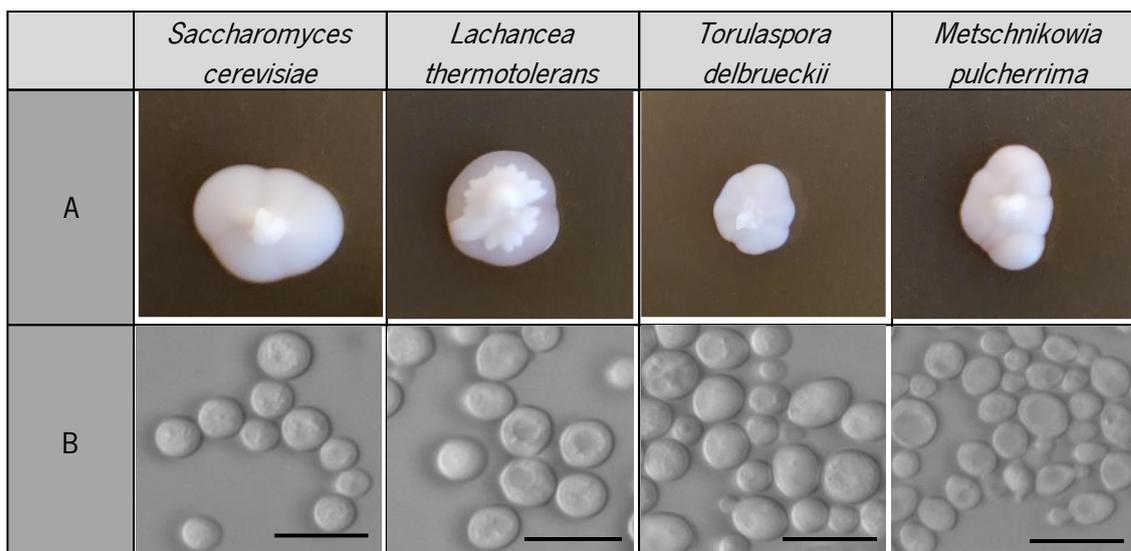
### 3.1. Estirpes de leveduras nativas do bago de uva utilizadas no presente trabalho

No presente trabalho, foram alvo de estudo 15 estirpes de levedura de uma coleção de isolados da microbiota nativa de bagos de uva, das castas Sousão e Touriga Nacional da região DOC Douro. Entre os isolados previamente identificados encontravam-se 10 *Saccharomyces cerevisiae*, 2 *Torulaspota delbrueckii*, 2 *Lachancea thermotolerans* e 1 *Metschnikowia pulcherrima* (**Tabela 3**).

**Tabela 3** - Espécies, estirpes e origem dos diferentes isolados microbianos alvo de estudo no presente trabalho.

Número de isolado	Espécie	Estirpe	Casta de origem
131	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S9	Sousão
132	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LTQB67	Sousão
141	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S22	Sousão
149	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HBUAS61087	Sousão
159	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YNCA9006	Sousão
164	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Exir 98	Sousão
242	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RO201	Touriga Nacional
255	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AAA3	Touriga Nacional
258	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YMSSF7-1	Touriga Nacional
264	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L26A	Touriga Nacional
171	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CBS3085	Sousão
195	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CBS6991	Sousão
186	<i>Lachancea thermotolerans</i>	CBS2917	Sousão
262	<i>Lachancea thermotolerans</i>	AUMC 10224	Touriga Nacional
204	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	APC 1.2	Touriga Nacional

As características macroscópicas e microscópicas das 4 espécies estão catalogadas na **figura 9**. Estas leveduras mostram semelhanças notáveis quando observadas macroscopicamente, exibindo uma aparência opaca e esbranquiçada. Microscopicamente, todas exibem uma forma esférica a ovoide, com tamanhos muito semelhantes, tornando-as praticamente indistinguíveis sob o microscópio. Reproduzem-se por gemulação, bem evidenciado na imagem microscópica das leveduras *T. delbrueckii* e *M. pulcherrima*.



**Figura 9** - Características macroscópicas (A) e microscópicas (DIC; escala = 10 µm) (B) das 4 espécies de levedura utilizadas no presente estudo.

### 3.2. Avaliação da tolerância dos isolados a fatores de stresse abiótico

O efeito de fatores de stresse abiótico foi avaliado no crescimento das leveduras (**Figura 10**), de forma qualitativa, após 3 d de incubação a 24 °C, em meio sólido YPD. De um modo geral, como o demonstra a **figura 11**, o crescimento das 15 leveduras foi inibido de forma dependente da dose, para praticamente todos os fatores testados, à exceção do stresse oxidativo provocado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O isolado *S. cerevisiae* 149 apresentou dificuldades de crescimento mesmo na ausência dos fatores de stresse.

O efeito do etanol no crescimento das leveduras começou a evidenciar-se a partir da concentração de 9%. Todas as 15 apresentaram uma diminuição no seu crescimento, sendo que os isolados *S. cerevisiae* 149 e *M. pulcherrima* 204 foram os que apresentaram maior sensibilidade a este fator de stresse. A dificuldade de crescimento evidenciou-se ainda mais na presença de 12% de etanol, verificando-se uma inibição total do crescimento de todos os isolados na presença de 15% de etanol.

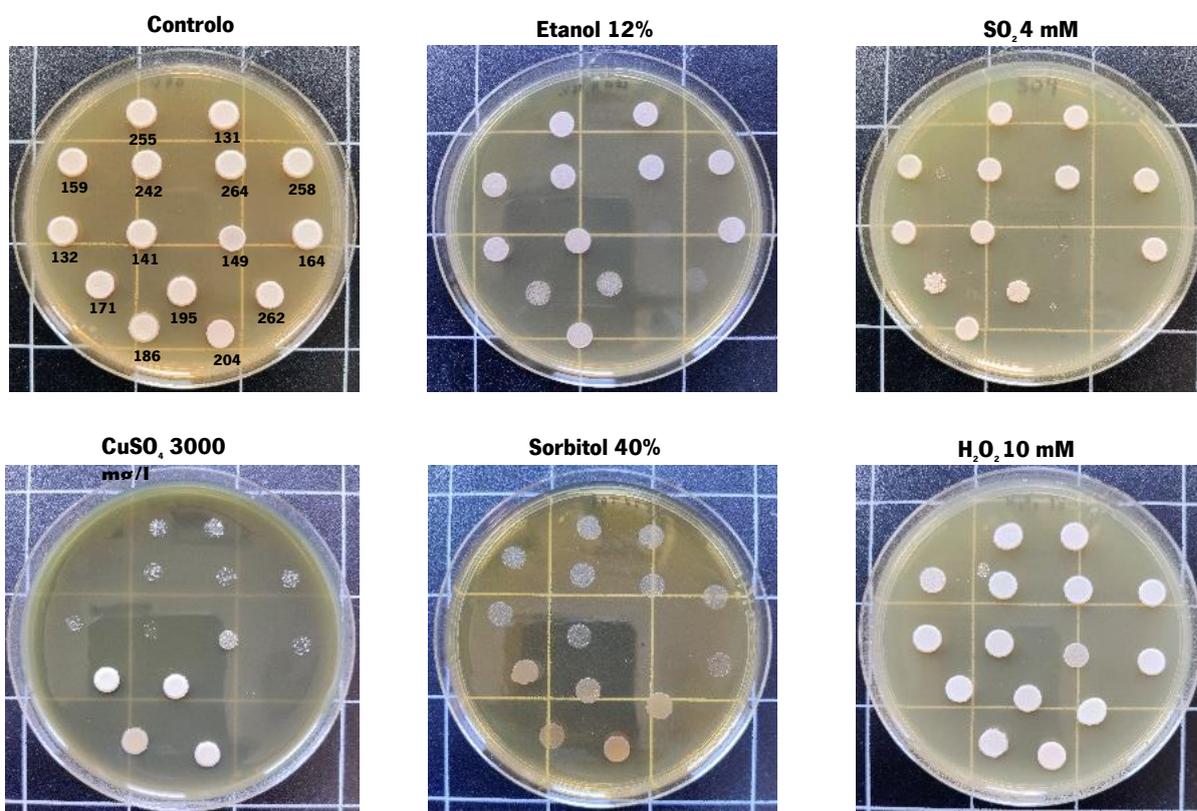
O efeito inibitório do SO<sub>2</sub> foi mais evidente nas leveduras não-*Saccharomyces*. O crescimento da *L. thermotolerans* 262 foi completamente inibido na presença de 2 mM de SO<sub>2</sub>, sendo este o isolado mais sensível a este fator de stresse. Na presença de 4 mM de SO<sub>2</sub>, a *M. pulcherrima* 204, também não se desenvolveu, e as *T. delbrueckii* 171 e 195 apresentaram visíveis dificuldades no crescimento, em comparação com as *Saccharomyces*. Na presença de 6 mM de SO<sub>2</sub>, o crescimento de todos os isolados foi totalmente inibido.

O sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), por outro lado, afetou mais os isolados de *S. cerevisiae* do que os de não-*Saccharomyces*. Todas as *Saccharomyces* apresentaram dificuldades de crescimento a partir de 3000 mg/L de CuSO<sub>4</sub> e aos 5000 mg/L não se conseguiram desenvolver. Por outro lado, o crescimento das não-*Saccharomyces*

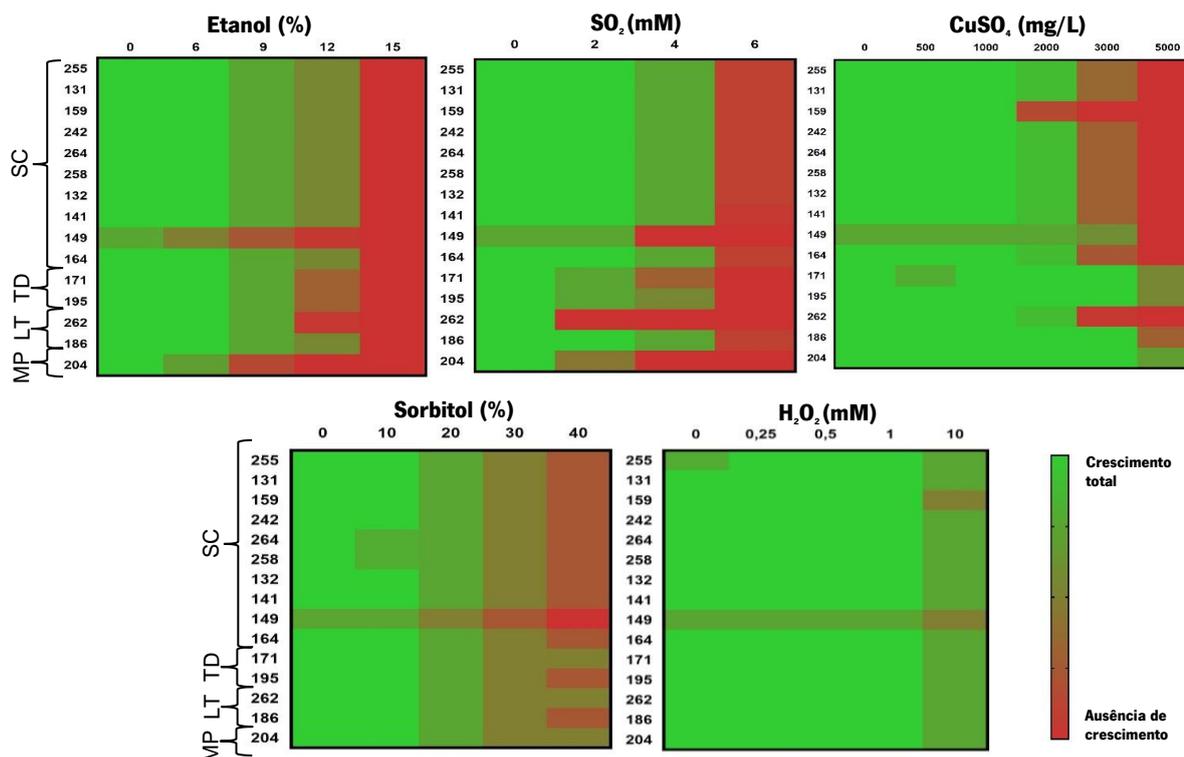
só foi afetado na concentração de 5000 mg/L, com exceção da *L. thermotolerans* 262 que apresentou um comportamento semelhante às *Saccharomyces*.

Nos testes de resistência ao stresse osmótico simulado com sorbitol, mais uma vez foram as estirpes de *Saccharomyces* a revelar maior sensibilidade. Na presença de 40% de sorbitol, estas evidenciaram um crescimento inferior ao das não-*Saccharomyces*, com exceção das estirpes de *T. delbrueckii* 195 e *L. thermotolerans* 186 que apresentaram um comportamento semelhante às *Saccharomyces*.

O teste de resistência ao stresse oxidativo provocado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, revelou que apenas a 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é que as leveduras começam a apresentar dificuldades no seu desenvolvimento, sendo as estirpes *S. cerevisiae* 149 e *S. cerevisiae* 159 as mais sensíveis.



**Figura 10** - Tolerância dos diferentes isolados a fatores de stresse abiótico. Cada colônia corresponde a um isolado, inoculado pela ordem descrita na tabela 3, da esquerda para a direita e de cima para baixo. As imagens são representativas do crescimento após 3 d de incubação a 24 °C em meio sólido YPD.



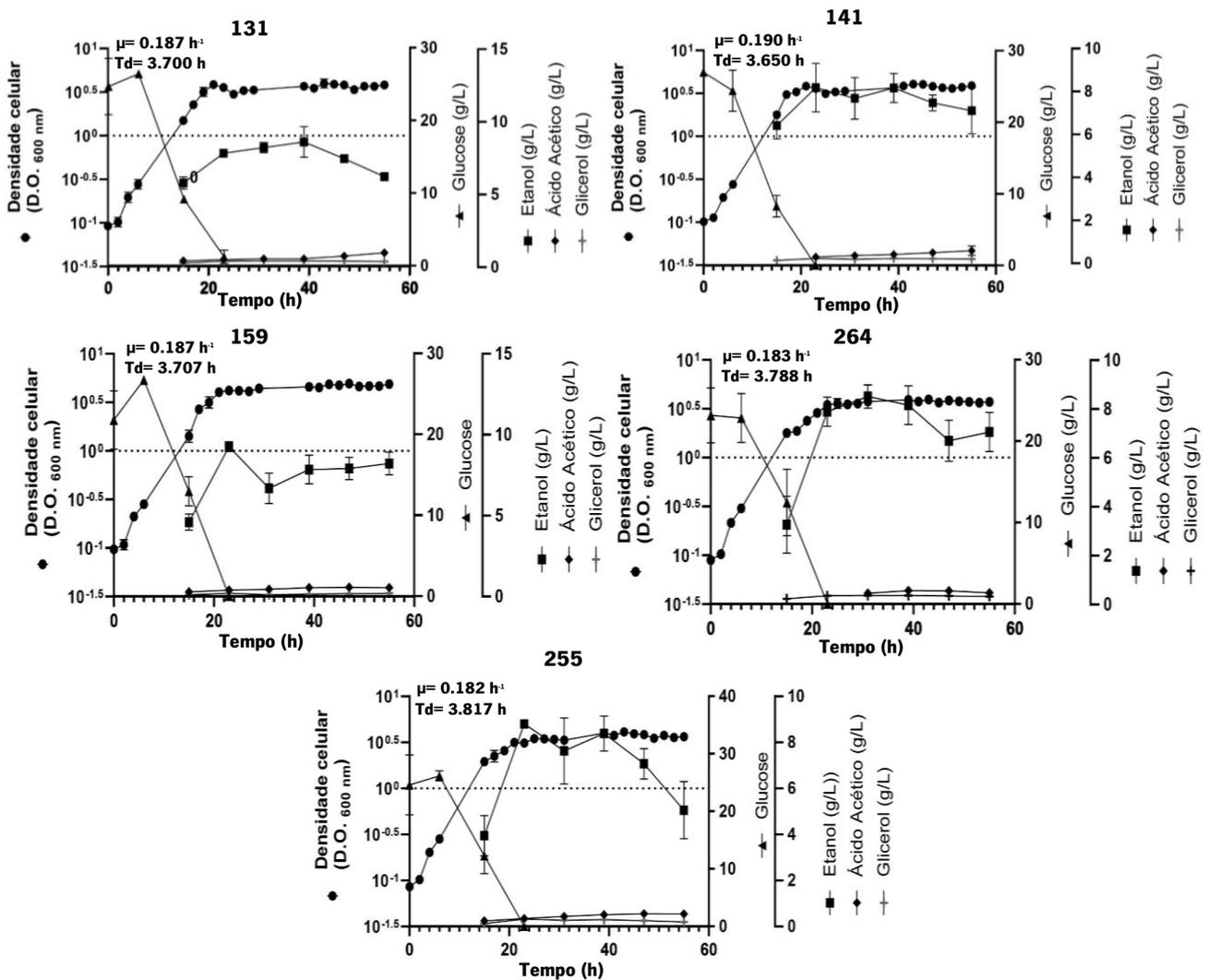
**Figura 11** - Heat map da resistência dos diferentes isolados microbianos a fatores de stresse abiótico. O crescimento foi avaliado após 3 d de incubação a 24 °C em meio sólido YPD. Na escala de cores, o crescimento total corresponde a crescimento idêntico ao obtido na ausência do fator de stresse.

### 3.3. Perfil de crescimento e potencial fermentativo de isolados selecionados em meio definido

Com base em resultados anteriores, foram selecionados 8 isolados com diferentes graus de resistência aos fatores de stresse testados para avaliação do seu perfil de crescimento e potencial fermentativo, em meio mineral definido, suplementado com glucose como fonte de carbono. Entre estes encontravam-se 5 *S. cerevisiae* (131, 141, 159, 255 e 264), e 1 de cada espécie não-*Saccharomyces* (*L. thermotolerans* 186, *T. delbrueckii* 195 e *M. pulcherrima* 204).

Os perfis de crescimento foram semelhantes para os 5 isolados de *S. cerevisiae*, como se pode verificar na **Figura 12**. As taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ) e tempo de duplicação foram, respetivamente, 0.187 h<sup>-1</sup> e 3.7 h para o isolado 131, 0.187 h<sup>-1</sup> e 3.707 h para 159, 0.190 h<sup>-1</sup> e 3.65 h para 141, 0.183 h<sup>-1</sup> e 3.788 h para 255, e 0.182 h<sup>-1</sup> e 3.817 h para 264 (**Tabela 4**).

O potencial fermentativo foi avaliado através do consumo de glucose e produção de etanol, ácido acético e glicerol (**Figura 12**). Não foi detetada a produção de ácido succínico e ácido láctico. A taxa de consumo de glucose foi semelhante para os 5 isolados, uma vez que para todos, às 23 h, a quantidade de glucose no meio era praticamente nula.



**Figura 12** - Avaliação do crescimento celular, consumo de glucose, produção de etanol, ácido acético e glicerol de diferentes isolados de *Saccharomyces cerevisiae* (131, 141, 159, 255 e 264) a 24 °C em meio mineral suplementado com 2% de glucose como fonte única de carbono, e pH 4,5. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de valores obtidos para 3 réplicas biológicas.

A quantidade de etanol produzida também foi semelhante para todas as *S. cerevisiae*, que apresentaram um máximo de 8 g/L, à exceção do isolado 159 que apresentou um máximo de 9 g/L. Para o isolado 131 este pico foi registado às 39 h, enquanto que para os isolados 159, 141 e 255, este valor foi registado inicialmente às 23 h. Já para o isolado 264, este pico foi atingido às 31 h. De salientar que após ser atingido o valor máximo de concentração de etanol, este ao longo do tempo diminuiu para valores entre os 5 g/L (isolado 255) e os 8 g/L (isolado 159).

A produção de glicerol foi detetada para as 5 estirpes de *S. cerevisiae*, a partir das 15 h, observando-se o pico de concentração entre as 23 e 31 h. O isolado 159, menos produtor, apresentou uma concentração máxima de 0.2 g/L, enquanto os restantes atingiram os 0.3 g/L de glicerol.

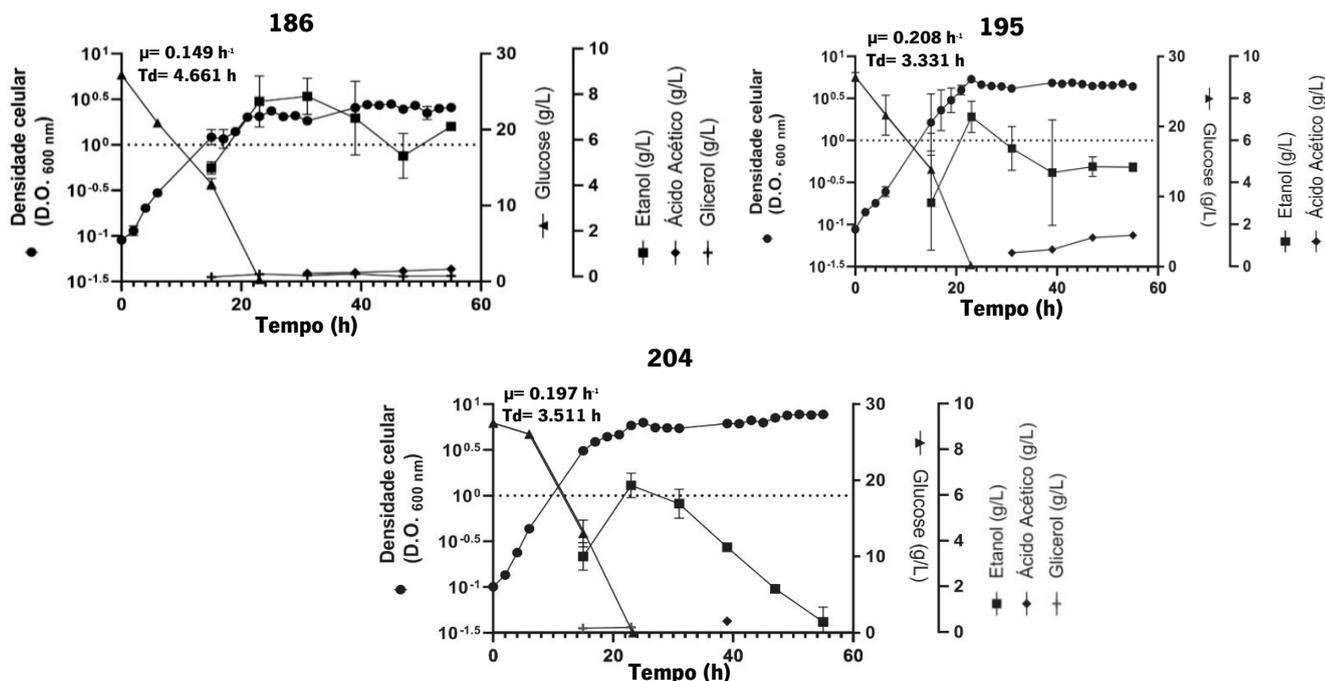
A produção de ácido acético também foi observada para as 5 estirpes de *S. cerevisiae*, tendo sido detetada

logo às 15 h para os isolados 131, 159 e 255, e mais tarde para os isolados 141 (23 h) e 264 (31 h). Os isolados 131 e 141 mostraram um aumento na produção de ácido acético nas horas finais do ensaio, tendo sido obtido um máximo de 0.9 g/L e de 0.7 g/L, respetivamente. Os restantes isolados apresentam o pico máximo na concentração de ácido acético às 47 h, de 0.57 g/L para o 159, e de 0.55 g/L para o 255. O isolado 264 apresentou o valor máximo de 0.55 g/L às 39 h.

Os padrões de crescimento e potenciais fermentativos das 3 espécies não-*Saccharomyces* estão representados na **Figura 13**. *L. thermotolerans* (186) apresentou o crescimento celular mais demorado, com uma taxa específica de crescimento de  $0.149 \text{ h}^{-1}$  e um tempo de duplicação de 4.661 h (**Tabela 4**). Apresentou um consumo de glucose semelhante aos restantes isolados, uma vez que às 23 h já não se detetou glucose no meio de cultura. Apresentou um pico máximo de etanol de 8 g/L às 31 h, e produção de glicerol a partir das 15 h, com uma concentração máxima de 0.31 g/L. A produção de ácido acético, à semelhança de algumas estirpes de *S. cerevisiae*, só foi detetada às 31 h, apresentando uma concentração máxima de 0.54 g/L.

*T. delbrueckii* (195) apresentou o crescimento celular mais rápido das 3 leveduras não-*Saccharomyces*, com uma taxa específica de crescimento de  $0.208 \text{ h}^{-1}$  e tempo de duplicação de 3.331 h. Esta também consumiu toda a glucose do meio em 23 h, e contrariamente a todas as outras leveduras neste ensaio analisadas, não se verificou produção de glicerol. Quanto ao ácido acético, foi detetado no meio a partir das 31 h, numa concentração máxima 1.5 g/L.

*M. pulcherrima* (204) apresentou uma taxa de crescimento celular de  $0.197 \text{ h}^{-1}$ , e um tempo de duplicação de 3.511 h. Além disso, está bem evidente, uma segunda fase de crescimento (crescimento diáuxico), marcada pelo consumo de etanol. A glucose também foi totalmente consumida nas primeiras 23 h do ensaio. O pico máximo da concentração de etanol foi observado também às 23 h, com 6.4 g/L. A produção de ácido acético e glicerol também foi detetada, no entanto, no caso do ácido acético, apenas numa concentração de 0.5 g/L às 40 h, e no caso do glicerol, uma concentração máxima de 0.23 g/L às 23 h.



**Figura 13** - Avaliação do crescimento celular, consumo de glicose, produção de etanol, ácido acético e glicerol de isolados de *L. thermotolerans* (186), *T. delbrueckii* (195) e *M. pulcherrima* (204), a 24 °C em meio mineral suplementado com 2% de glicose como fonte única de carbono, e pH 4,5. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de valores obtidos para 3 réplicas biológicas.

**Tabela 4** - Valores da taxa de crescimento celular, tempo de duplicação, consumo de glicose, valor de etanol máximo obtido, etanol final obtido, produção de ácido acético e produção de glicerol. Os resultados indicam a média  $\pm$  desvio padrão de valores obtidos para 3 réplicas biológicas. Diferenças estatisticamente significativas entre isolados estão indicadas por letras diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

Isolado	<i>S. cerevisiae</i>					Não- <i>Saccharomyces</i>		
	131	141	159	255	264	186	195	204
Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) ( $h^{-1}$ )	0,187	0,19	0,187	0,183	0,182	0,149	0,208	0,197
Tempo de duplicação (h)	3,700	3,650	3,707	3,788	3,817	4,661	3,331	3,511
EtOH máximo (g/L)	8,53 $\pm$ 0,86 <sup>ab</sup>	8,29 $\pm$ 0,93 <sup>abc</sup>	9,26 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	8,79 $\pm$ 0,16 <sup>ab</sup>	8,49 $\pm$ 0,39 <sup>ab</sup>	8,13 $\pm$ 0,65 <sup>abc</sup>	7,13 $\pm$ 0,61 <sup>bc</sup>	6,43 $\pm$ 0,44 <sup>c</sup>
EtOH final (g/L)	6,15 $\pm$ 0,19 <sup>abc</sup>	7,21 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	8,21 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	5,05 $\pm$ 1,02 <sup>b</sup>	7,04 $\pm$ 0,65 <sup>ab</sup>	6,81 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	4,74 $\pm$ 0,17 <sup>cd</sup>	0,46 $\pm$ 0,54 <sup>d</sup>
Ácido acético (g/L)	0,9 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,69 $\pm$ 0,18 <sup>bc</sup>	0,57 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>	0,55 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,55 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	0,55 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	1,5 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>
Glicerol (g/L)	0,35 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,33 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,31 $\pm$ 0,00 <sup>ac</sup>	0,35 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,33 $\pm$ 0,04 <sup>ad</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>e</sup>	0,23 $\pm$ 0,02 <sup>bcd</sup>

### 3.4. Fermentações sequenciais com isolados selecionados em mosto natural

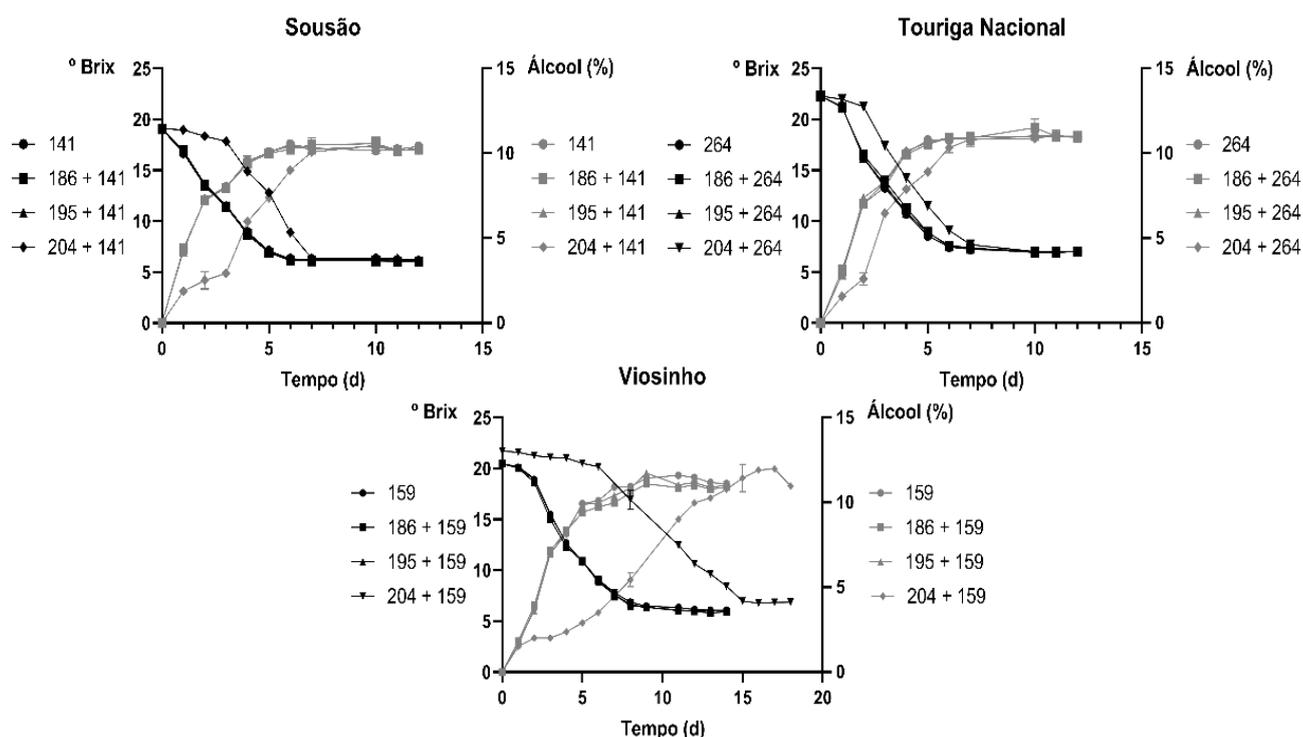
Com base nos resultados anteriores, foram selecionados 3 isolados de *S. cerevisiae* (141, 159 e 264) e os 3 isolados das leveduras *não-Saccharomyces* (186, 195 e 204) para a realização de microvinificações em mosto natural das castas Sousão, Touriga Nacional e Viosinho. Para cada casta, as fermentações foram iniciadas pela

inoculação do mosto com uma levedura não-*Saccharomyces*, seguida de uma *Saccharomyces* após 3-5 d de fermentação, como detalhado no Material e Métodos. Como controlo, foram também conduzidas fermentações com mostos inoculados apenas com o isolado correspondente de *S. cerevisiae*. O critério de seleção dos isolados de *S. cerevisiae* para inocular os mostos foi baseado na sua casta de origem (**tabela 1**), à exceção de Viosinho, para o qual foi utilizado o isolado 159 obtido de bagos cv. Sousão.

A evolução das fermentações foi avaliada pela diminuição do °Brix e produção de álcool (**Figura 14**). Em geral, as microvinificações com mostos da casta Sousão duraram 12 d a 24 °C. Para as fermentações sequenciais com *L. thermotolerans* (186) e *T. delbrueckii* (195), o valor mínimo de °Brix (6 °B) e máximo de álcool foram atingidos após 6 d, semelhantes à fermentação conduzida apenas por *S. cerevisiae* (141). As fermentações iniciadas com *M. pulcherrima* (204) foram mais lentas, tendo-se atingido estes valores após 7 d. No entanto, o teor final em álcool foi semelhante para todas as fermentações de mostos da casta Sousão, tendo variado entre 10,2% (com isolados 186 + 141 ou 204 + 141) e 10,4% (com isolado 141).

A evolução das microvinificações com mostos da casta Touriga Nacional foi muito semelhante à observada para mostos cv. Sousão, tendo uma duração total de 12 d. No entanto, o valor mínimo de °Brix e máximo de álcool obtido foi de 7°B e 10,9%, respetivamente, idêntico para todas as combinações de isolados testadas. Novamente, as fermentações iniciadas com *M. pulcherrima* (204) apresentaram uma progressão mais lenta.

As microvinificações com mostos da casta branca Viosinho apresentaram um comportamento diferente das castas tintas, uma vez que decorreram a 16 °C e demoraram entre 14 d (159; 186 + 159; 195 + 159) e 18 d (204 + 159). O valor mínimo de °Brix (6°B) e máximo de álcool (11%) foi atingido após 11 d, exceto para os mostos inoculados inicialmente com *M. pulcherrima* (204). Estes apresentaram uma evolução demarcadamente mais lenta do que os restantes, atingindo um valor mínimo de °Brix (6,9°B) após 15 d e máximo de álcool (12%) após 17 d.



**Figura 14** - Evolução do °Brix e teor de álcool em mostos obtidos a partir de uvas das castas Sousão, Touriga Nacional e Viosinho, ao longo da fermentação sequencial. O processo foi iniciado por inoculação dos mostos com as leveduras não-*Saccharomyces L. thermotolerans* (186), *T. delbrueckii* (195) e *M. pulcherrima* (204). Após 3 ou 5 d de fermentação para as castas brancas ou tintas, respetivamente, foi adicionado o inóculo de *S. cerevisiae* (isolados 141, 159 ou 264). Os resultados indicam a média ± desvio padrão de valores obtidos para 3 réplicas biológicas.

**Tabela 5**- Valores de mínimos de °Brix e máximo no teor em álcool em mostos obtidos ao longo da fermentação sequencial. Os resultados indicam a média ± desvio padrão de valores obtidos para 3 réplicas biológicas. Diferenças estatisticamente significativas entre parâmetros dentro de cada casta estão indicadas por letras diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

	Sousão				T. Nacional				Viosinho			
Isolados usados	141	186+141	195+141	204+141	264	186+264	195+264	204+264	159	186+159	195+159	204+159
°Brix final	6,1 ± 0,08 <sup>ab</sup>	6,0 ± 0,05 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,2 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,05 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,00 <sup>ab</sup>	6,9 ± 0,05 <sup>c</sup>
Álcool (%)	10,4 ± 0,08 <sup>a</sup>	10,2 ± 0,05 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,08 <sup>a</sup>	10,2 ± 0,14 <sup>a</sup>	10,97 ± 0,05 <sup>a</sup>	11,0 ± 0,00 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,05 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,08 <sup>a</sup>	11,1 ± 0,08 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,08 <sup>a</sup>	11,0 ± 0,19 <sup>a</sup>	11,0 ± 0,05 <sup>a</sup>

### 3.5. Parâmetros bioquímicos dos mostos e vinhos

Para uma melhor avaliação da *performance* fermentativa dos diferentes isolados em inoculações sequenciais, foram determinados os teores em açúcares redutores, fenólicos totais, antocianinas totais, pH e acidez titulável no início (mosto) e final da fermentação (vinho). Os resultados estão sumariados na **tabela 6**. Os mostos de Touriga Nacional apresentaram maior teor em açúcares redutores (AR), seguidos dos mostos Viosinho e Sousão. No final da fermentação, os vinhos cv. Viosinho apresentaram menor teor em AR (0.77 a 1.08 g/L). De um modo geral, as fermentações com *M. pulcherrima* (204) em mostos Sousão e Viosinho foram as menos eficientes em termos de consumo de açúcares, tendo sido detetados os valores mais elevados destes solutos em

vinhos fermentados com esta espécie para estas castas.

O pH dos mostos variou de casta para casta, sendo que Touriga Nacional apresentou os valores mais elevados (4,2) e Sousão os mais baixos (3,5). Após a fermentação, o pH baixou em todas as amostras, mantendo-se, no entanto, a diferença de pH típica entre castas. Entre as fermentações com as diferentes espécies de levedura, observaram-se menores valores de pH nos fermentados com os isolados 186 e 204, principalmente em cv. Viosinho.

Quanto à acidez titulável, os mostos de cv. Viosinho apresentaram os valores mais elevados (3.33 g/L) e os mostos de cv. Sousão os mais baixos (2.68 g/L). A acidez titulável aumentou após a fermentação, tendo-se verificado um valor de 4.62 a 5.49 g/L em vinhos cv. Viosinho. Nas castas tintas, o isolado 204 foi o que conferiu maior acidez titulável aos vinhos (6.84 g/L cv. Sousão e 8.18 g/L cv. Touriga Nacional).

Relativamente aos fenólicos totais, os mostos Viosinho apresentaram menor concentração destes solutos (0.18 g/L), enquanto que os de Touriga Nacional apresentaram os valores mais elevados (1.01 g/L). Em ambas as castas verificou-se uma diminuição dos fenólicos totais no final da fermentação. Pelo contrário, em vinhos Sousão verificou-se um aumento na concentração destes compostos relativamente aos mostos. Não se verificaram diferenças significativas entre os valores encontrados em vinhos fermentados com as diferentes espécies de levedura.

As antocianinas foram detetadas apenas em amostras provenientes das castas tintas. Os mostos de Touriga Nacional apresentaram tendencialmente a maior concentração destes solutos, apesar dos valores não serem estatisticamente diferentes dos detetados em mostos cv. Sousão. De um modo geral, verificou-se uma diminuição na concentração de antocianinas após a fermentação. Não se verificaram diferenças decorrentes da utilização dos diferentes isolados de levedura.

**Tabela 6** - Parâmetros bioquímicos dos mostos e vinhos das castas Sousão, Touriga Nacional e Viosinho. Os resultados indicam a média ± desvio padrão de 3 réplicas biológicas. Diferenças estatisticamente significativas entre os mostos ou vinhos dentro de cada casta estão indicadas por letras diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

		Açúcares redutores (g/L)		pH		Acidez titulável (g/L)		Fenólicos totais (g/L)		Antocianinas totais (g/L)		
		média	± SD	média	± SD	média	± SD	média	± SD	média	± SD	
Mostos	Sousão	136,41 <sup>b</sup>	22,02	3,52 <sup>b</sup>	0,01	2,68 <sup>a</sup>	0,39	0,85 <sup>a</sup>	0,11	0,16 <sup>a</sup>	0,017	
	Touriga Nacional	190,06 <sup>a</sup>	20,43	4,17 <sup>a</sup>	0,04	3,08 <sup>a</sup>	0,41	1,01 <sup>a</sup>	0,17	0,18 <sup>a</sup>	0,028	
	Viosinho	170,09 <sup>ab</sup>	9,25	3,66 <sup>c</sup>	0,05	3,33 <sup>a</sup>	0,02	0,18 <sup>b</sup>	0,01	0,00	0,00	
Vinhos	Sousão	141	1,80 <sup>ab</sup>	0,08	3,09 <sup>a</sup>	0,02	6,15 <sup>a</sup>	0,27	1,00 <sup>a</sup>	0,07	0,144 <sup>a</sup>	0,015
		186	1,76 <sup>ab</sup>	0,09	3,07 <sup>a</sup>	0,05	6,32 <sup>a</sup>	0,38	0,98 <sup>a</sup>	0,04	0,157 <sup>a</sup>	0,017
		195	1,64 <sup>b</sup>	0,21	3,09 <sup>a</sup>	0,04	6,45 <sup>a</sup>	0,32	0,99 <sup>a</sup>	0,06	0,145 <sup>a</sup>	0,01
		204	1,98 <sup>a</sup>	0,04	3,12 <sup>a</sup>	0,04	6,84 <sup>a</sup>	0,07	0,98 <sup>a</sup>	0,05	0,167 <sup>a</sup>	0,021
	Touriga Nacional	264	1,81 <sup>a</sup>	0,12	3,70 <sup>a</sup>	0,02	7,10 <sup>b</sup>	0,5	0,75 <sup>a</sup>	0,09	0,135 <sup>a</sup>	0,007
		186	1,85 <sup>a</sup>	0,07	3,71 <sup>a</sup>	0,02	7,74 <sup>ab</sup>	0,08	0,75 <sup>a</sup>	0,02	0,137 <sup>a</sup>	0,003
		195	1,78 <sup>a</sup>	0,06	3,71 <sup>a</sup>	0,04	7,25 <sup>b</sup>	0,02	0,75 <sup>a</sup>	0,04	0,135 <sup>a</sup>	0,002
		204	1,84 <sup>a</sup>	0,06	3,69 <sup>a</sup>	0,01	8,18 <sup>a</sup>	0,17	0,71 <sup>a</sup>	0,05	0,137 <sup>a</sup>	0,004
	Viosinho	159	0,77 <sup>b</sup>	0,05	3,45 <sup>a</sup>	0,00	4,62 <sup>b</sup>	0,06	0,13 <sup>a</sup>	0,01	0,00	0,00
		186	0,79 <sup>b</sup>	0,01	3,31 <sup>b</sup>	0,03	5,49 <sup>a</sup>	0,36	0,13 <sup>a</sup>	0,00	0,00	0,00
		195	0,85 <sup>b</sup>	0,03	3,42 <sup>a</sup>	0,01	5,10 <sup>ab</sup>	0,08	0,13 <sup>a</sup>	0,01	0,00	0,00
		204	1,08 <sup>a</sup>	0,12	3,32 <sup>b</sup>	0,03	4,67 <sup>b</sup>	0,08	0,15 <sup>a</sup>	0,02	0,00	0,00

## 4. Discussão de resultados

### 4.1. As leveduras nativas do bago de uva apresentam diferente suscetibilidade a fatores de stresse abiótico

Os resultados do presente estudo mostraram diferenças na resistência das leveduras nativas a fatores de stresse abiótico presentes na vinha ou no ambiente fermentativo. De acordo com estudos anteriores, o etanol, em concentrações elevadas, afeta a estrutura e a permeabilidade da membrana plasmática das e inibe o metabolismo e crescimento das leveduras (Carrasco et al., 2001; Šuranská et al., 2016). No caso de *Saccharomyces cerevisiae*, quase todas as estirpes alvo de estudo apresentaram um nível semelhante de resistência ao etanol, em linha com estudos anteriores; Carrasco e colaboradores (Carrasco et al., 2001), no seu trabalho com estirpes de *S. cerevisiae* comerciais, observaram que a uma concentração de etanol de 12% (v/v), o crescimento de *S. cerevisiae* sofre uma redução. Na concentração de etanol de 13,5% (v/v) ainda conseguem sobreviver, no entanto, na concentração de 15% (v/v) somente uma estirpe (UCLM S377 da Springer Oenologie, Bio Springer, Maisons-Alfort, France) conseguiu apresentar crescimento. Por outro lado, outras estirpes como MW 14 e T19 (Aponte e Blaiotta *et al.*, 2016), X1 e 1-09 (Šuranská et al., 2016) conseguem prosperar em concentrações de etanol de 15% e 16% (v/v), demonstrando maior tolerância a este composto. No que diz respeito às leveduras não-*Saccharomyces*, o isolado de *L. thermotolerans* 186 revelou-se o mais tolerante ao etanol, equiparando-se às *S. cerevisiae*. Este isolado conseguiu crescer em concentrações de etanol até 12%, semelhante à estirpe comercial Concerto™ (*L. thermotolerans*, Chr. Hansen, Denmark) (Binati et al., 2019) e

superando o valor de tolerância máximo de 10% observado para todas as estirpes (T43, T44, T6, T27, T33 e T15) avaliadas por Aponte e Blaiotta et al. (2016). Por outro lado, *M. pulcherrima* 204 apresentou uma maior suscetibilidade ao etanol do que as restantes leveduras não-*Saccharomyces* alvo de estudo, uma vez que praticamente não conseguiu desenvolver-se em concentrações na ordem dos 9%. No entanto, outras estirpes desta espécie exploradas em estudos anteriores apenas prosperaram em concentrações de etanol até 6% (Barbosa et al., 2018). As estirpes comerciais Level2 Initia™ e Level2 Flavia™ (*M. pulcherrima*, Lallemand Inc., Austrália) estão caracterizadas para um máximo de 3% de etanol, pelo que pode concluir-se que o nível de tolerância do isolado 204 é bastante elevado.

No processo de vinificação, a sulfitação com adição de SO<sub>2</sub> constitui um passo importante principalmente para o controlo de microorganismos indesejados no vinho. Os sulfitos apresentam um efeito tóxico ao reagirem com vários compostos, especialmente os grupos carbonilos dos constituintes celulares das leveduras (Jürgen Fröhlich et al., 2017). De um modo geral, as estirpes de *S. cerevisiae* alvo de estudo no presente trabalho demonstraram maior tolerância ao SO<sub>2</sub> do que as estirpes não-*Saccharomyces*, conseguindo prosperar na presença de concentrações até 4 mM deste composto, bastante acima do valor reportado por Comitini et al. (2011) (0.9 mM SO<sub>2</sub> livre) e de acordo com os resultados obtidos por Barbosa et al. (2014). Em paralelo, a maior tolerância de *T. delbrueckii* do que *M. pulcherrima* ao SO<sub>2</sub> está também de acordo com este estudo. Em particular, o isolado de *M. pulcherrima* 204 apresentou tolerância a concentrações de SO<sub>2</sub> até 2 mM, de acordo com o observado para outras estirpes estudadas por Barbosa et al. (2018), salientando a baixa resistência desta espécie a este fator de stresse. Já os isolados de *L. thermotolerans*, por outro lado, apresentaram comportamentos notavelmente diversos entre si. O isolado 186 revelou níveis de tolerância semelhantes às estirpes de *S. cerevisiae*, o que constitui um resultado promissor, uma vez que esta espécie é geralmente considerada pouco tolerante ao SO<sub>2</sub> (Benito et al., 2018), como evidenciado também por Comitini et al. (2011), que observaram tolerância até 0.3 mM de SO<sub>2</sub> nas estirpes em análise. As diferenças na performance dos diferentes isolados na presença de SO<sub>2</sub> podem estar relacionadas com a capacidade de desenvolverem estratégias de resistência, incluindo a produção de acetaldeído como *scavengers* de sulfitos, ou síntese de aminoácidos com grupos sulfurosos, como a metionina e cisteína. Outro mecanismo que pode ajudar na resistência a este fator de stresse é o reforço da parede celular e da síntese de lípidos membranares como resposta adaptativa primária (Jürgen Fröhlich et al., 2017).

No início da fermentação, a elevada quantidade de açúcares e o respetivo efeito stresse osmótico são os fatores que condicionam mais a diversidade das leveduras (García et al., 2016). Neste trabalho, o stresse osmótico foi simulado com sorbitol, um poliol análogo da glucose, que não se dissocia e não é assimilado pelas leveduras, permitindo manter a pressão osmótica no meio durante todo o ensaio (García et al., 2016). As estirpes

de *S. cerevisiae* revelaram ser mais suscetíveis a este fator de stresse, apresentando um menor crescimento em comparação com as leveduras não-*Saccharomyces* na presença de 40% (p/v) de sorbitol. Este resultado está de acordo com estudos anteriores em outras estirpes (Mukherjee et al., 2017). Neste estudo, verificou-se que a *S. cerevisiae* demonstrou menor tolerância (<50% (p/v) sorbitol) a este tipo de stresse quando comparada com *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* e *M. pulcherrima* (>55% (p/v) sorbitol). Por outro lado, García et al. (2016) observou que as estirpes de *S. cerevisiae* estudadas exibiram alguma suscetibilidade a concentrações de sorbitol de 30% (p/v), enquanto que *L. thermotolerans*, *M. pulcherrima* e *T. delbrueckii* apresentaram maior tolerância a essa concentração. *M. pulcherrima* está descrita como tolerante ao stresse osmótico, já que está naturalmente presente em néctares florais, cuja concentração de açúcar pode superar os 50% (p/v) glucose (Brysch-Herzberget al., 2004; Pozo et al., 2012; Mukherjee et al., 2017). Um dos mecanismos utilizado pelas leveduras para resistirem ao stresse osmótico consiste na indução da via de sinalização *High-Osmolarity-Glycerol* (HOG) e na produção de glicerol, que se acumula dentro das células, ativando assim a glicólise (Jürgen Fröhlich et al., 2017). Nos vinhos, este aumento de glicerol pode ser desejável, porém este mecanismo pode também originar maiores níveis de acetato (Zhao et al., 2015). Neste sentido, *T. delbrueckii* está descrita como uma boa levedura para iniciar fermentações de mostos com elevados níveis de açúcar, uma vez que gera menores teores de acetato em comparação com *S. cerevisiae* (Bely et al., 2008). A estirpe comercial LEVEL2 Biodiva™ (*T. delbrueckii*, Lallemand Inc., Austrália) é particularmente adaptada e recomendada para condições de elevados níveis de açúcar, como a produção de vinhos *late Harvest/botrytised*, devido à elevada tolerância a choque osmótico e baixa produção de acidez volátil.

O cobre é um metal pesado utilizado em formulações de pesticidas, aplicados na vinha para controlo de fungos, tais como o mildio e o oídio (Devez et al., 2005; Gava et al., 2016). Este é também um micronutriente essencial para os organismos, como elemento integrante de várias enzimas e como catalisador de reacções redox numa variedade de vias metabólicas (Gava et al., 2016). No entanto, em concentrações elevadas interfere com vários processos celulares, podendo inibir o crescimento e a divisão celular (Devez et al., 2005; Gava et al., 2016). No presente trabalho, as estirpes nativas de *S. cerevisiae* apresentaram menor tolerância ao cobre do que as leveduras não-*Saccharomyces*, complementando estudos de Warringer et al. (2011), que reportaram uma maior suscetibilidade de estirpes selvagens de *S. cerevisiae* ao cobre do que estirpes utilizadas comercialmente. Em linha com este estudo, Martins et al. (2015) reportou que o uso de calda bordalesa à base de sulfato de cobre, para proteção das vinhas contra fungos, conduz a um atraso na fermentação conduzida por *S. cerevisiae*, modificando o perfil volátil do vinho. No entanto, as estirpes estudadas neste trabalho demonstraram uma maior tolerância ao cobre do que as estirpes utilizadas por Fay et al. (2004) [1197 mg/L (p/v) em meio YPD sólido], Grangeteau et al. (2017) [2060 mg/L (p/v) em meio líquido] e Vadkertiová e Sláviková et al. (2006) [319 mg/L

(p/v) em meio sintético]. De maneira semelhante, a tolerância de *M. pulcherrima* foi significativamente superior (5000 mg/L) à observada noutros estudos, como os de Vadkertiová e Sláviková et al. (2006) [1596 mg/L (p/v)] e Barbosa et al. (2018) [638 mg/L (p/v) em meio YPD sólido]. A tolerância de determinadas estirpes ao cobre pode dever-se à sua melhor adaptação aos tratamentos anuais que têm sido realizados nas vinhas com sulfato de cobre (Warringer et al., 2011; Barbosa et al., 2018;). Um dos mecanismos envolvidos neste processo é o sequestro de  $\text{Cu}^{2+}$  no vacúolo das células, através de antiportadores de  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}^+$  e transportadores do tipo Ctr, que por sua vez são regulados pelos níveis exógenos de cobre (Martins et al., 2012; 2014a; 2014b).

O metabolismo das leveduras, especialmente a respiração, produz espécies reativas de oxigénio (ROS) e radicais livres que causam danos nas estruturas celulares e desencadeiam processos de morte celular programada (Jürgen Fröhlich et al., 2017). Durante a vinificação, os ROS são maioritariamente produzidos no início da fermentação, quando as leveduras se estão a multiplicar, e no final da fermentação, devido à exposição prolongada ao etanol e à presença de oxigénio (Jürgen Fröhlich et al., 2017). Neste estudo, nenhuma estirpe mostrou uma elevada suscetibilidade à presença de ROS, tal como descrito por Barbosa et al. (2018) para as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  avaliadas, e por Grazia et al. (2019), onde apenas na concentração de 250 mM foi observada variabilidade na resistência das estirpes em análise. A elevada resistência ao stresse oxidativo pode estar relacionado com a atividade de diversas enzimas antioxidantes como a catalase, que destoxifica o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela sua conversão a  $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  (Gamero-Sandemetrio et al., 2014; Furlani et al., 2017).

#### **4.2. Estirpes nativas *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* apresentam diferentes níveis de produção de etanol, ácido acético e glicerol**

Todas as leveduras alvo de estudo no presente trabalho apresentaram um crescimento diáuxico em meio mineral suplementado com glucose, caracterizado, na primeira fase, por um crescimento exponencial celular resultante da fermentação da glucose em etanol (Busti et al., 2010). Após o esgotamento da glucose no meio, observou-se uma paragem no crescimento e uma alteração metabólica nas leveduras, que passam de um modo fermentativo para o modo respiratório. Nesta segunda fase, o etanol passa a ser a fonte de carbono utilizada, verificando-se um aumento ligeiro (bem evidente para a *M. pulcherrima* 204) ou uma manutenção da densidade celular (Kappeli et al., 1987; Busti et al., 2010; Assawajaruwan et al., 2017). Os resultados obtidos no presente estudo relativamente à produção de etanol estão de acordo com o trabalho realizado por Schnierda et al. (2014), que reportou produção de 9 g/L por *S. cerevisiae*, e de 6,5 g/L por *M. pulcherrima*. Em contrário, o isolado 186 de *L. thermotolerans* utilizado no presente estudo apresentou uma produção de etanol mais elevada (8 g/L) do que a estirpe utilizada no estudo de Schnierda et al. (2014; 6 g/L).

O ácido acético é um dos compostos responsáveis pela acidez volátil do vinho e frequentemente produzido

pelas leveduras fermentativas durante a fermentação alcoólica (Vilela-Moura et al., 2010). Em elevadas concentrações (> 1.2 g/L) pode conferir um sabor avinagrado ao vinho, tornando-se indesejável. Neste estudo, as estirpes de *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* e *L. thermotolerans* escolhidas produziram ácido acético após o consumo completo da glucose e durante a segunda fase do crescimento diáuxico mencionado anteriormente. Esta fase também pode ser caracterizada pela conversão do etanol em ácido acético, como descrito por Samson et al. (1987) e Tsai et al. (1987). A gama de concentrações produzida pelas leveduras no presente trabalho está de acordo com estudos anteriores (0.2 g/L a 0.6 g/L; Vilela-Moura et al., 2010), sem prejuízo para a qualidade do vinho. *T. delbrueckii* apresentou uma maior produção de ácido acético do que as restantes espécies, de acordo com estudos anteriores (Loira et al., 2014). Não obstante, a gama de concentrações obtida é substancialmente inferior à reportada por leveduras contaminantes do vinho como *Brettanomyces/Dekkera*, capazes de produzir até 2.4 g/L (Silva et al., 2004) no mesmo meio mineral utilizado no presente estudo. De contrário, *M. pulcherrima* apresentou um maior consumo de etanol ao longo do tempo, no entanto, sem produção de ácido acético. Estas espécies são conhecidas pela baixa produção de ácido acético, conforme documentado por Englezos et al. (2022). De acordo com Comitini et al. (2011), e em consonância com outros estudos (Ciani e Maccarelli et al., 1997; Kapsopoulou et al., 2005), todas as fermentações com culturas puras das estirpes de *T. delbrueckii*, *L. thermotolerans* e *M. pulcherrima* demonstraram uma produção significativamente inferior de ácido acético em comparação com as fermentações com culturas puras de *S. cerevisiae*.

O glicerol é o metabolito resultante do metabolismo das leveduras mais abundante a seguir ao etanol e o CO<sub>2</sub> (Ivit et al., 2020), contribuindo para o corpo, viscosidade ou doçura dos vinhos (Yalçin & Özbas et al., 2004; Ivit et al., 2020). No presente trabalho, os isolados de *S. cerevisiae* e *L. thermotolerans* apresentaram produção substancial deste composto (0.31 g/L a 0.35 g/L), em níveis ainda assim inferiores aos observados para outra estirpe de *S. cerevisiae* (0.82 g/L) em condições de crescimento semelhantes (Yalçin and Özbas et al., 2004). Em paralelo, *T. delbrueckii* e *M. pulcherrima* apenas produziram níveis residuais de glicerol, o que contrasta com estudos anteriores que indicam um aumento na concentração desse composto em fermentações sequenciais com *S. cerevisiae* (Englezos et al., 2022). No caso de *T. delbrueckii*, esses aumentos podem variar de 0,1 g/L a 1 g/L de glicerol, em comparação com fermentações envolvendo apenas *S. cerevisiae* (Benito et al., 2018), enquanto que para *M. pulcherrima*, a variação pode ser de 4% a 20% (Vicente et al., 2020). Por outro lado, outros estudos não relatam qualquer diferença na concentração final de glicerol em fermentações com *T. delbrueckii* (Minaar et al., 2015; Belda et al., 2017). A produção de glicerol pode estar ligada ao aumento da concentração de agentes oxidantes no meio, já que a síntese desse composto pelas leveduras está principalmente associada à regulação do potencial redox nas células (Yalçin & Özbas et al., 2004; Ivit et al., 2020).

### **4.3. As estirpes utilizadas nas fermentações sequenciais e a casta são fatores determinantes na acidez e no conteúdo em fenólicos do vinho**

As fermentações sequenciais realizadas com mosto natural no presente trabalho foram inicialmente monitorizadas pela medição do °Brix com um refratómetro e do teor em álcool com um vinómetro. Estes métodos têm sido amplamente utilizados para obter uma estimativa grosseira do progresso da fermentação (Martins et al., 2020). No entanto, a medição feita com o refratómetro é afetada pelo índice de refração do álcool produzido durante a fermentação, influenciando a leitura real dos açúcares presentes no vinho (Jacobson et al., 2006). Este fator pode ter condicionado os valores de °Brix obtidos no final da fermentação, facto que foi colmatado pela determinação dos níveis de açúcares redutores pelo método do DNS. De facto, de acordo com a concentração de açúcares redutores obtidos (< 5 g/L), podemos considerar que todas as fermentações foram completas (International Organization of Vine and Wine, 2022).

Os resultados do presente trabalho mostraram que as fermentações sequenciais iniciadas por estirpes nativas de *L. thermotolerans* e *T. delbrueckii* evoluíram de forma idêntica à fermentação conduzida apenas por *S. cerevisiae*. Pelo contrário, estudos anteriores reportaram, quer um atraso na fermentação, quer uma diminuição no teor alcoólico dos vinhos em até 1% (v/v) (Cus & Jenko et al., 2013; Gobbi et al., 2013; Balikci et al., 2016; Ruiz et al., 2018; Zhang et al., 2023) mesmo, em fermentações sequenciais com estirpes comerciais Prelude™ (*T. delbrueckii*, Chr. Hansen, Denmark) e Concerto™ (*L. thermotolerans*, Chr. Hansen, Denmark) (Zhang et al., 2021). A fermentação iniciada por *M. pulcherrima*, pelo contrário, mostrou-se mais lenta que as restantes, principalmente no início da fermentação, decorrente provavelmente da maior sensibilidade deste isolado ao SO<sub>2</sub> adicionado no mosto, comparativamente aos restantes isolados selecionados para este ensaio. Este resultado está de acordo com estudos anteriores, mostrando o aumento substancial da velocidade de produção de álcool e diminuição do °Brix após a adição de *S. cerevisiae*, tanto em fermentações de vinhos brancos como de vinhos tintos (Ruiz et al. 2018; Barbosa et al. 2018; Benito et al. 2019; Escribano-Viana et al. 2019).

Neste tipo de fermentações com inóculos mistos, *S. cerevisiae* facilmente domina o processo fermentativo, razão pela qual é benéfico realizar fermentações sequenciais iniciadas apenas pela levedura não-*Saccharomyces*, em alternativa à co-inoculação com ambas as leveduras logo no início da fermentação. Não obstante, mesmo em fermentações sequenciais, apenas a *S. cerevisiae* se apresenta ativa nos momentos finais da fermentação (Chen et al., 2018).

Os resultados deste estudo indicaram que os vinhos produzidos exclusivamente com *S. cerevisiae* têm níveis mais baixos de acidez em comparação com os vinhos resultantes de fermentações sequenciais. *T. delbrueckii* e *M. pulcherrima* não têm um impacto tão significativo na acidez total quanto *L. thermotolerans*, mas há evidências de que *T. delbrueckii* pode aumentar a acidez dos vinhos, devido à sua capacidade de produzir

ácido succínico, como documentado por Ciani e Maccarelli et al. (1998), Fernandes et al. (2021) e Sgouros et al. (2023). *M. pulcherrima*, por outro lado, está mais associada à diminuição da acidez total, conforme observado em estudos de Comitini et al. (2011) e Dutraive et al. (2019). No entanto, também existem relatos de aumentos na acidez final, como mencionado por Aplin et al. (2021). *L. thermotolerans*, por sua vez, é conhecida por acidificar os vinhos, devido à sua capacidade de produzir elevadas concentrações de ácido láctico, como destacado por Morata et al. (2018). Esta é uma das principais características da estirpe comercial Concerto™ (*L. thermotolerans*, Chr. Hansen, Denmark). Neste trabalho essa capacidade não foi evidente, o que está de acordo com os resultados das análises de HPLC em que este composto não foi detectado. A influência das leveduras na acidez do vinho provém da sua capacidade de produção de ácido pirúvico e acético, além de ácido láctico e succínico, resultantes do seu metabolismo (Volmer et al., 2017; Chidi et al., 2018). Este fator é particularmente relevante na escolha de estirpes com maior produção destes metabolitos, contribuindo para o aumento da acidez titulável e diminuição do pH, fatores essenciais para a qualidade do vinho (Vicente et al., 2022). Um vinho com baixa acidez tem um perfil aromático menos intenso e definido e maior propensão para a contaminação por microorganismos. Por outro lado, um vinho com elevada acidez é geralmente definido como excessivamente azedo e picante (Sainz et al., 2022). Os ácidos orgânicos provenientes do bago (málico, cítrico e tartárico) têm também um papel essencial nos níveis de acidez do vinho, corroborando os resultados do presente trabalho, que mostram uma clara influência da casta na acidez titulável e pH do vinho. No seu conjunto, os resultados suportam que a escolha de estirpes adequadas a cada casta é essencial para a obtenção de um bom vinho (Mendes Ferreira e Mendes-Faia, 2020).

No presente trabalho, a casta foi o principal fator determinante na concentração de compostos fenólicos e antocianinas totais no vinho, sendo que as estirpes utilizadas na fermentação não influenciaram estes parâmetros. Estudos anteriores mostraram que a extração destes compostos do bago e a sua estabilidade no vinho está dependente das técnicas de vinificação usadas, incluindo, por exemplo, o processo de maceração (Monagas et al., 2005; Minnaar et al., 2018). No presente trabalho, a duração deste processo foi superior para os mostos tintos, justificando parcialmente o maior teor em fenólicos nos vinhos tintos do que no vinho branco. Os níveis de fenólicos totais detectados nos vinhos tintos são 4X inferiores ao reportados por Martins et al. (2020), uma vez que nesse estudo as películas e grainhas foram mantidas no mosto durante todo o processo fermentativo, ao contrário do presente estudo em que a maceração apenas durou 48 h.

Em particular, as antocianinas que conferem a cor ao vinho também são características de cada casta; Sousão é caracterizada pela sua cor intensa avermelhada, resultante da elevada acumulação de antocianinas tri-OH incluindo a malvidina-3-O-glucosídeo, enquanto que várias outras antocianinas incluindo di-OH são tipicamente mais abundantes em Touriga Nacional, conferindo uma coloração menos intensa aos vinhos (Martins et al.,

2023b). As leveduras podem influenciar a cor dos vinhos de diversas maneiras, incluindo a de-glicosilação das antocianinas e a adsorção dos pigmentos pela parede celular das leveduras (Echeverrigaray et al., 2020). Um estudo sobre o uso de *L. thermotolerans* em fermentações sequenciais com *S. cerevisiae* demonstrou um aumento significativo de cerca de 10% na intensidade da cor. Isso foi atribuído ao pH mais baixo, que permite uma maior coloração das moléculas de antocianinas, devido ao aumento da acidez causado pelo ácido láctico (Benito et al., 2018; Vicente et al., 2021). Benito et al. (2017) também observou uma menor adsorção de antocianinas por *L. thermotolerans* em comparação com fermentações com culturas puras de *S. cerevisiae*. *T. delbrueckii*, por sua vez, pode aumentar o teor de antocianinas, como relatado por Escribano-Viana et al. (2019; 33%) e por Chen et al. (2018; 46 mg/L). No caso de *M. pulcherrima*, Morata et al. (2019) afirmou que esta espécie tem uma capacidade de adsorção de antocianinas menor em comparação com *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* ou *L. thermotolerans*. No entanto, Vicente et al. (2020) indicou que, em fermentações sequenciais com *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* reduz significativamente o teor de antocianinas nos vinhos devido à sua elevada adsorção de antocianinas nas paredes celulares. É importante notar que a capacidade de adsorção de antocianinas pelas leveduras varia consideravelmente de uma estirpe para outra. Portanto, é essencial avaliar esse parâmetro para obter a melhor qualidade do vinho final (Benito et al., 2017; Echeverrigaray et al., 2020; Vicente et al., 2020).

## 5. Conclusão e perspectivas futuras

Os resultados do presente estudo exploraram a aplicabilidade de leveduras nativas do bago de uva para a produção de vinhos regionais, através da caracterização da resistência das diferentes estirpes a fatores de stresse abiótico tipicamente encontrados durante a fermentação, e da avaliação do seu potencial fermentativo. Os dados obtidos têm um impacto relevante na possível modelação de parâmetros de qualidade do vinho traduzida pelos níveis de etanol, ácido acético, glicerol, e acidez, entre outros. A produção de vinhos com menor teor alcoólico e maior acidez é um dos grandes atuais desafios da viticultura em Portugal. Em particular na região do Douro, as alterações climáticas têm vindo a causar uma quebra na acidez do vinho, pelo que há uma procura crescente por estirpes que colmatem este problema.

Num próximo passo deste trabalho, serão analisados os compostos voláteis dos vinhos produzidos, por técnicas otimizadas de GC-FID e SPE Ion-trap MS (Martins et al. 2020), permitindo assim caracterizar o bouquet aromático conferido por cada conjunto de estirpes selecionado. De acordo com estudos anteriores, os vinhos produzidos com *T. delbrueckii* poderão apresentar elevadas concentrações de terpenos, tióis, polissacarídeos e manoproteínas, que contribuem para a sua complexidade e estabilização aromática (Benito et al., 2019; Fernandes et al., 2021; Englezos et al., 2022; Romano et al., 2022). Em paralelo, *L. thermotolerans* é conhecida

por produzir baixos níveis de álcoois superiores, promovendo os aromas florais e tropicais do vinho em fermentações mistas, bem como elevada concentração de glicerol e 2-feniletanol. *M. pulcherrima* tem uma elevada atividade de  $\beta$ -glucosidase, permitindo a clivagem de terpenos e tióis, sendo expectável o aumento da complexidade aromática e do aroma varietal do vinho, contribuindo com características florais (Morata et al., 2019; Borren & Tian, 2020; Vicente et al., 2020). Esta levedura é também conhecida pela produção de elevadas quantidades de ésteres, como octanoato de etilo, característico de aroma frutados como a pera, bem como acetato de etilo e álcoois superiores, que podem influenciar positiva ou negativamente o aroma do vinho de acordo com a sua concentração (M Victoria Moreno-Arribas et al., 2009; Varela et al., 2016; Borren & Tian et al., 2020).

A seleção de estirpes nativas decorrente do presente trabalho foi fundamental para a otimização de culturas *starter*, utilizadas em fermentações à escala piloto. Estas estão a decorrer nas instalações da adega da Quinta de S. Luiz, de onde as leveduras nativas são provenientes. Desta forma, o presente trabalho foi o ponto de partida para a avaliação da capacidade de utilização das estirpes nativas a nível industrial. Os vinhos produzidos em adega serão também avaliados quanto ao seu perfil aromático, por um painel de provadores especializado. No seu conjunto, o presente trabalho contribuiu de forma muito significativa para os objetivos do projeto em curso GrapeMicrobiota (PTDC/BAA-AGR/2691/2020), com vista à produção de vinhos regionais que reflitam o seu *terroir*.

## 6. Referências

- Ali, K., Maltese, F., Fortes, A. M., Pais, M. S., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2011). Monitoring biochemical changes during grape berry development in Portuguese cultivars by NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 124(4), 1760–1769. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.015>
- Amerine, M.A. and Ough, C.S. (1980) *Methods for analysis of musts and wines* (John Wiley and Sons: New York, NY, USA).
- Aplin, J. J., Paup, V. D., Ross, C. F., & Edwards, C. G. (2021). Chemical and Sensory Profiles of Merlot Wines Produced by Sequential Inoculation of *Metschnikowia pulcherrima* or *Meyerozyma guilliermondii*. *Fermentation*, 7(3), 126–126. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030126>
- Aponte, M., & Blaiotta, G. (2016). Potential role of yeast strains isolated from grapes in the production of taurasi D.O.C.G. *Frontiers in Microbiology*, 7(809). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00809>
- Assawajaruwan, S., Eckard, P., & Hitzmann, B. (2017). On-line monitoring of relevant fluorophores of yeast cultivations due to glucose addition during the diauxic growth. *Process Biochemistry*, 58, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.007>
- Ayogu, P., Teixeira, A., Hernâni Gerós, & Martins, V. (2023). Identification of grape berry indigenous epiphytic yeasts with in vitro and in vivo antagonistic activity towards pathogenic fungi. *OENO One*, 57(1), 253–264. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2023.57.1.7273>
- Balikci, E. K., Tanguler, H., Jolly, N. P., & Erten, H. (2016). Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast*, 33(7), 313–321. <https://doi.org/10.1002/yea.3166>

- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Barbosa, C., Lage, P., Esteves, M., Chambel, L., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2018). Molecular and phenotypic characterization of *Metschnikowia pulcherrima* strains from douro wine region. *Fermentation*, 4(1), 8. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010008>
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S., & Santos, A. (2017). Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* – *Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2019). The influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters. *Fermentation*, 5(3), 54. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030054>
- Benito, S. (2018). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6775–6790. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9117-z>
- Benito, S., Hofmann, T., Laier, M., Lochbühler, B., Schüttler, A., Ebert, K., Fritsch, S., Röcker, J., & Rauhut, D. (2015). Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *European Food Research and Technology*, 241(5), 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
- Binati, R. L., Innocente, G., Gatto, V., Celebrin, A., Polo, M., Felis, G. E., & Torriani, S. (2019). Exploring the diversity of a collection of native non-*Saccharomyces* yeasts to develop co-starter cultures for winemaking. *Food Research International*, 122, 432-442.
- Borren, E., & Tian, B. (2020). The important contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to the aroma complexity of wine: A review. *Foods*, 10(1), 13. <https://doi.org/10.3390/foods10010013>
- Brysch-Herzberg, M. (2004). Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in central Europe. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(2), 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.06.003>
- Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L., & Vanoni, M. (2010). Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors*, 10(6), 6195–6240. <https://doi.org/10.3390/s100606195>
- Čadež, N., Zupan, J., & Raspor, P. (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research*, 10(5), no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00635.x>
- Calhelha, R. C., João Verdial Andrade, Isabel C.F.R. Ferreira, & Estevinho, L. M. (2006). Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiology*, 23(4), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.04.008>
- Cantu, D., & M. Andrew Walker. (2019). *The Grape Genome*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-18601-2>
- Carrasco, P., Querol, A., & del Olmo, M. (2001). Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, 175(6), 450–457. <https://doi.org/10.1007/s002030100289>
- Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J. M., Morata, A., Tesfaye, W., Calderon, F., Suárez-Lepe, J. A., Han, S., & Benito, S. (2018a). Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology*, 69, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.018>
- Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J. M., Morata, A., Tesfaye, W., Calderon, F., Suárez-Lepe, J. A., Han, S., & Benito, S. (2018b). Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology*, 69, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.018>
- Chidi, B. S., Bauer, F. F., & Rossouw, D. (2018). Organic acid metabolism and the impact of fermentation practices on wine acidity: A

review. South African Journal of Enology and Viticulture, 39(2). <https://doi.org/10.21548/39-2-3172>

Ciani, M., & Comitini, F. (2019). Yeast ecology of wine production. In *Yeasts in the Production of Wine* (pp. 1–42). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4_1)

Comitini, F., Agarbati, A., Canonico, L., & Ciani, M. (2021). Yeast interactions and molecular mechanisms in wine fermentation: a comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7754. <https://doi.org/10.3390/ijms22147754>

Comitini, F., & Ciani, M. (2006). Survival of inoculated *Saccharomyces cerevisiae* strain on wine grapes during two vintages. *Letters in Applied Microbiology*, 42(3), 248–253. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2005.01837.x>

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>

Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., ... & Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1, 1-22.

Coombe, B. G. (1992). Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1), 101–110. <https://doi.org/10.5344/ajev.1992.43.1.101>

Cus, F., & Jenko, M. (2013). The influence of yeast strains on the composition and sensory quality of Gewurztraminer wine. *Food Technology and Biotechnology*, 51(4), 547–554.

Ding, Y., Wei, R., Wang, L., Wang, W., Wang, H., & Li, H. (2023). Exploring the ecological characteristics of natural microbial communities along the continuum from grape berries to winemaking. *Food Research International*, 167, 112718.

D. Possner, & Kliewer, W. M. (2015). The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis*, 24(4), 229–229. <https://doi.org/10.5073/vitis.1985.24.229-240>

Devez, A., Gomez, E., Gilbin, R., Elbaz-Poulichet, F., Persin, F., Andrieux, P., & Casellas, C. (2005). Assessment of copper bioavailability and toxicity in vineyard runoff waters by DPASV and algal bioassay. *Science of the Total Environment*, 348(1-3), 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.004>

Ding, Y., Wei, R., Wang, L., Yang, C.-L., Li, H., & Wang, H. (2021). Diversity and dynamics of microbial ecosystem on berry surface during the ripening of Ecolly (*Vitis vinifera* L.) grape in Wuhai, China. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 37(12). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03170-8>

Drumonde-Neves, J., Franco-Duarte, R., Lima, T., Schuller, D., & Pais, C. (2016). Yeast biodiversity in vineyard environments is increased by human intervention. *PLOS ONE*, 11(8), e0160579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160579>

Dutraive, O., Benito, S., Fritsch, S., Beisert, B., Patz, C.-D., & Rauhut, D. (2019). Effect of Sequential Inoculation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation*, 5(3), 79. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030079>

Echeverrigaray, S., Scariot, F. J., Menegotto, M., & Delamare, A. P. L. (2020). Anthocyanin adsorption by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation is associated to the loss of yeast cell wall/membrane integrity. *International Journal of Food Microbiology*, 314, 108383. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108383>

Englezos, V., Jolly, N. P., Di Gianvito, P., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2022). Microbial interactions in winemaking: Ecological aspects and effect on wine quality. *Trends in Food Science & Technology*, 127, 99–113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.015>

Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., Gutiérrez, A. R., & González-Arenzana, L. (2019). Effect of the sequential inoculation of non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* on the anthocyanins and stilbenes composition of tempranillo wines. *Frontiers in Microbiology*, 9(10). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00773>

Fay, J., Mccullough, H., Sniegowski, P., & Eisen, M. (2004). Population genetic variation in gene expression is associated with phenotypic variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology*, 5(4), 1–14.

- Fernandes, T., Silva-Sousa, F., Pereira, F., Rito, T., Soares, P., Franco-Duarte, R., & Sousa, M. J. (2021). Biotechnological importance of *Torulaspora delbrueckii*. From the obscurity to the spotlight. *Journal of Fungi*, 7(9), 712. <https://doi.org/10.3390/jof7090712>
- Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11–22. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00245-9)
- Fleet, G. H., Cheunjit Prakitchaiwattana, Beh, A. L., Heard, G. M., & Ciani, M. (2002). The yeast ecology of wine grapes. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*, 1–17.
- Folly Enterprises. (2016, March 2). Tips on tasting: Wine bouquet vs aroma. *Wine Folly*. <https://winefolly.com/tips/tips-on-tasting-wine-bouquet-vs-aroma/>
- Fraga, H., Costa, R., & Santos, J. A. (2017). Multivariate clustering of viticultural terroirs in the Douro winemaking region. *Ciência E Técnica Vitivinícola*, 32(2), 142–153. <https://doi.org/10.1051/ctv/20173202142>
- Francesca, N., Canale, D. E., Settanni, L., & Moschetti, G. (2011). Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00310.x>
- Gamero-Sandemetro, E., Gómez-Pastor, R., & Matallana, E. (2014). Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. *Biotechnology Journal*, 9(8), 1055–1064. <https://doi.org/10.1002/biot.201300448>
- García, M., Greetham, D., Wimalasena, T. T., Phister, T. G., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2016). The phenotypic characterization of yeast strains to stresses inherent to wine fermentation in warm climates. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 215–233. <https://doi.org/10.1111/jam.13139>
- Gava, A., Evandro Ficagna, Simone Bertazzo Rossato, Cisilotto, B., Paula, S., & Gabbi, H. T. (2016). Change in kinetic parameters of commercial yeast in the presence of copper fungicides. *BIO Web of Conferences*, 7(02029). <https://doi.org/10.1051/bioconf/20160702029>
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology*, 33(2), 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2014). Wine aroma compounds in grapes: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(2), 202–218. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.650336>
- Grangeteau, C., David, V., Hervé, A., Guilloux-Benatier, M., & Rousseaux, S. (2017). The sensitivity of yeasts and yeasts-like fungi to copper and sulfur could explain lower yeast biodiversity in organic vineyards. *FEMS Yeast Research*, 17(8). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox092>
- Grazia, A., Pietrafesa, A., Capece, A., Pietrafesa, R., Siesto, G., & Romano, P. (2019). Exploitation of technological variability among wild non-*Saccharomyces* yeasts to select mixed starters for the production of low alcohol wines. *BIO Web of Conferences*, 15, 02031–02031. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191502031>
- Guerra, E., Sordi, G., Mannazzu, I., Clementi, F., & Fatichenti, F. (1999). Occurrence of wine yeasts on grapes subjected to different pesticide treatments. *Italian Journal of Food Science*, 11.
- Hernáñi Gerós, M Manuela Chaves, & Serge Delrot. (2012). *The Biochemistry of the Grape Berry*. Bentham Science Publishers.
- Instituto Da Vinha E Do Vinho, I.P. (2023a). Evolução da área total de vinha - portugal . Instituto Da Vinha E Do Vinho, I.P. <https://www.ivv.gov.pt/np4/7179.html>
- Instituto Da Vinha E Do Vinho, I.P. (2023b). Evolução da produção nacional de vinho por região vitivinícola. Instituto Da Vinha E Do Vinho, I.P. <https://www.ivv.gov.pt/np4/7179.html>
- Instituto da Vinha e do Vinho, I.P. (2018, April 9). Regiões. IVV. <https://www.ivv.gov.pt/np4/regioes/>

- International Organization of Vine and Wine. (2022). Reducing substances (Type-IV). In OIV. <https://www.oiv.int/standards/annex-a-methods-of-analysis-of-wines-and-musts/section-3-chemical-analysis/section-3-1-organic-compounds/section-3-1-1-sugars/reducing-substances-%28type-iv%29>
- International Organization of Vine and Wine. (2023). State of the world vine and wine sector in 2022. In OIV. [https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/2023\\_SWVWS\\_report\\_EN.pdf](https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/2023_SWVWS_report_EN.pdf)
- Ivit, N. N., Longo, R., & Kemp, B. (2020). The effect of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces non-cerevisiae* yeasts on ethanol and glycerol levels in wine. *Fermentation*, 6(3), 77. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030077>
- Jacobson, J. L. (2006). Introduction to wine laboratory practices and procedures (pp. 130–131). Springer Science & Business Media.
- Jaywant, S. A., Singh, H., & Arif, K. M. (2022). Sensors and instruments for brix measurement: A review. *Sensors*, 22(6), 2290. <https://doi.org/10.3390/s22062290>
- Jürgen Fröhlich, Helmut König, & Gottfried Uden. (2017). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine (pp. 377–395). Springer International Publishing.
- Kappeli, O. (1987). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Advances in Microbial Physiology*, 28, 181–209.
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., & Spyropoulos, H. (2005). Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8-9), 1599–1602. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-8220-3>
- Kennedy, J. (2002). Understanding grape berry development. *Practical Winery & Vineyard*, 4, 1–5.
- Licker, J. L., Acree, T. E., & Henick-Kling, T. (1998). What is “brett” (*brettanomyces*) flavor?: A preliminary investigation. In *Chemistry of Wine Flavor* (No. 0; Vol. 714, p. 96115). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk19980714.ch008>
- Lachance, M.-A. (2003). The Phaff school of yeast ecology. *International Microbiology*, 6(3), 163–167. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0129-9>
- Liu, D., Zhang, P., Chen, D., & Howell, K. (2019). From the vineyard to the winery: How microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. *Frontiers in Microbiology*, 10(2679). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02679>
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2017). Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 856–873. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591>
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., & Suárez-Lepe, J. A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 915–922. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>
- Lourenço-Gomes, L., Pinto, L. M. C., & Rebelo, J. (2015). Wine and cultural heritage. The experience of the Alto Douro wine region. *Wine Economics and Policy*, 4(2), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2015.09.001>
- M Victoria Moreno-Arribas, Polo, C., & Springerlink (Online Service. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry* (p. 369). Springer New York.
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Martins, V., Bassil, E., Hanana, M., Blumwald, E., & Gerós, H. (2014a). Copper homeostasis in grapevine: functional characterization of the *Vitis vinifera* copper transporter 1. *Planta*, 240(1), 91–101. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2067-5>
- Martins, V., Billet, K., Cristina, A., Lanoue, A., & Hernâni Gerós. (2020). Exogenous calcium deflects grape berry metabolism towards the production of more stilbenoids and less anthocyanins. 313, 126123–126123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126123>

- Martins, V., Costa, L., Rafaela Duailibe Soares, Ayogu, P., Teixeira, A., & Hernâni Gerós. (2022). A catalogue of cultivable yeasts from the microbiota of grape berries cv. Vinhão and Loureiro. 56(3), 247–260. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.3.5462>
- Martins, V., Ferreira, V., García, A. I., Teixeira, A., & Hernâni Gerós. (2020). Vineyard calcium sprays shift the volatile profile of young red wine produced by induced and spontaneous fermentation. *Food Research International*, 131, 108983–108983. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108983>
- Martins, V., Garcia, A., Costa, C., Sottomayor, M., & Gerós, H. (2018). Calcium- and hormone-driven regulation of secondary metabolism and cell wall enzymes in grape berry cells. *Journal of Plant Physiology*, 231, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.011>
- Martins, V., Hanana, M., Blumwald, E., & Gerós, H. (2012). Copper Transport and Compartmentation in Grape Cells. *Plant and Cell Physiology*, 53(11), 1866–1880. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs125>
- Martins, V., Szakiel, A., Teixeira, A., Abdallah, C., Moreira, C., Cezary Paçzkowski, Lanoue, A., & Hernâni Gerós. (2023). Combined omics approaches expose metabolite-microbiota correlations in grape berries of three cultivars of Douro wine region. *Food Chemistry*, 429, 136859–136859. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136859>
- Martins, V., Teixeira, A., Bassil, E., Blumwald, E., & Gerós, H. (2014). Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.016>
- Martins, V., Teixeira, A., Bassil, E., Hanana, M., Blumwald, E., & Gerós, H. (2014b). Copper-based fungicide Bordeaux mixture regulates the expression of *Vitis vinifera* copper transporters. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(3), 451–458. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12096>
- Martins, V., Teixeira, A., & Gerós, H. (2015). Changes in the volatile composition of wine from grapes treated with Bordeaux mixture: a laboratory-scale study. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(3), 425–429. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12150>
- Mendes Ferreira, A., & Mendes-Faia, A. (2020). The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking. *Foods*, 9(9), 1231. <https://doi.org/10.3390/foods9091231>
- Mestre Furlani, M. V., Maturano, Y. P., Combina, M., Mercado, L. A., Toro, M. E., & Vazquez, F. (2017). Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Research*, 17(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox010>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mina, M., & Tsaltas, D. (2017). Contribution of yeast in wine aroma and flavour. *Yeast - Industrial Applications*, 117–134. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70656>
- Minnaar, P. P., Ntushelo, N., Ngqumba, Z., van Breda, V., & Jolly, N. P. (2016). Effect of *Torulaspota delbrueckii* Yeast on the Anthocyanin and Flavanol Concentrations of Cabernet franc and Pinotage Wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(1). <https://doi.org/10.21548/36-1-936>
- Minnaar, P., Nyobo, L., Jolly, N., Ntushelo, N., & Meiring, S. (2018). Anthocyanins and polyphenols in Cabernet Franc wines produced with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* yeast strains: Spectrophotometric analysis and effect on selected sensory attributes. *Food Chemistry*, 268, 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.074>
- Monagas, M., Bartolomé, B., & Gomés-Cordomez, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(2), 85–118. <https://doi.org/10.1080/10408690490911710>
- Morata, A., Loira, I., Escott, C., del Fresno, J. M., Bañuelos, M. A., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology. *Fermentation*, 5(3), 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030063>
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M., González, C., & Suárez Lepe, J. (2018). *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology. *Fermentation*, 4(3), 53. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>

- Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K. J., Lievens, B., & Thevelein, J. M. (2017). Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0899-5>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nicoué, E. É., Savard, S., & Belkacemi, K. (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5626–5635. <https://doi.org/10.1021/jf0703304>
- Oliva, J., Maria Luz Cayuela, Payá, P., Martínez-Cachá, A., Cámara, M. A., & Barba, A. (2007). Influence of fungicides on grape yeast content and its evolution in the fermentation. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 72(2), 181–189.
- Oliveira, I., & Ferreira, V. (2019). Modulating fermentative, varietal and aging aromas of wine using non-*Saccharomyces* yeasts in a sequential inoculation approach. *Microorganisms*, 7(6), 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060164>
- Ollat, N., Carde, J.-P., Gaudillère, J.-P., Barrieu, F., Diakou-Verdin, P., & Moing, A. (2002). Grape berry development: A review. *OENO One*, 36(3), 109–131. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2002.36.3.970>
- Panzone, L. A., & Simões, O. M. (2009). The importance of regional and local origin in the choice of wine: Hedonic models of portuguese wines in portugal. *Journal of Wine Research*, 20(1), 27–44. <https://doi.org/10.1080/09571260902978527>
- Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905>
- Pozo, M. I., Lachance, M.-A., & Herrera, C. M. (2012). Nectar yeasts of two southern spanish plants: the roles of immigration and physiological traits in community assembly. *FEMS Microbiology Ecology*, 80(2), 281–293. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01286.x>
- RENOUF, V., CLAISSE, O., & LONVAUD-FUNEL, A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316–327. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00031.x>
- Romano, P., Braschi, G., Siesto, G., Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2022). Role of yeasts on the sensory component of wines. *Foods*, 11(13), 1921. <https://doi.org/10.3390/foods11131921>
- Romano, P., Ciani, M., & Fleet, G. H. (Eds.). (2019). *Yeasts in the Production of Wine* (p. 515). New York, NY, USA: Springer.
- Romeyer, F. M., Macheix, J. J., Goiffon, J. J., Reminiac, C. C., & Sapis, J. C. (1983). Browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(2), 346–349. <https://doi.org/10.1021/jf00116a040>
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., & Capozzi, V. (2020). Non-*Saccharomyces* commercial starter cultures: Scientific trends, recent patents and innovation in the wine sector. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11(1), 27–39. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>
- Ruiz, J., Belda, I., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Santos, A., & Benito, S. (2018). Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(19), 8501–8509. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>
- Sainz, F., Pardo, J. E., José, A., Expósito, D., Armero, R., Querol, A., & José Manuel Guillamón. (2022). Use of non-conventional yeasts to increase total acidity in the Cava base wines. *LWT*, 158, 113183–113183. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113183>
- Samson, R., Beaumier, D., & Beaulieu, C. (1987). Simultaneous evaluation of on-line microcalorimetry and fluorometry during batch culture of *Pseudomonas putida*-ATCC 11172 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 18824. *Journal of Biotechnology*, 6(3), 175–190. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(87\)90001-0](https://doi.org/10.1016/0168-1656(87)90001-0)

- Schnierda, T., Bauer, F. F., Divol, B., van Rensburg, E., & Görgens, J. F. (2014). Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 58(5), 478–485. <https://doi.org/10.1111/lam.12217>
- Sgouros, G., Mallouchos, A., Dourou, D., Banilas, G., Chalvanti, I., Kourkoutas, Y., & Nisiotou, A. (2023). *Torulaspota delbrueckii* May Help Manage Total and Volatile Acidity of Santorini-Assyrtiko Wine in View of Global Warming. *Foods*, 12(1), 191. <https://doi.org/10.3390/foods12010191>
- Silva, P. J., Cardoso, H., & Hernâni Gerós. (2004). Studies on the wine spoilage capacity of *brettanomyces/dekkera* spp. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(1), 65–72.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1145–1159. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- Šuranská, H., Vránová, D., & Omelková, J. (2016). Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.010>
- Sven Erik Jorgensen, & Fath, B. D. (2008). *Encyclopedia of ecology*. Elsevier.
- Tsai, C.-S., Aveledo, A. J., McDonald, I., & Johnson, B. F. (1987). Diauxic growth of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* in mixtures of glucose and ethanol or acetate. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(7), 593–597. <https://doi.org/10.1139/m87-103>
- UNESCO World Heritage. (2001). Alto Douro Wine Region. UNESCO World Heritage Centre. <https://whc.unesco.org/en/list/1046>
- Vadkertiová, R., & Sláviková, E. (2006). Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *Journal of Basic Microbiology*, 46(2), 145–152. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510609>
- Varela, C., Sengler, F., Solomon, M., & Curtin, C. (2016). Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chemistry*, 209, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.024>
- VARELA, C., SIEBERT, T., COZZOLINO, D., ROSE, L., MCLEAN, H., & HENSCHKE, P. A. (2009). Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with “wild” Indigenous and inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(3), 238–248. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00054.x>
- Vicente, J., Baran, Y., Navascués, E., Santos, A., Calderón, F., Marquina, D., Rauhut, D., & Benito, S. (2022). Biological management of acidity in wine industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 375, 109726. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109726>
- Vicente, J., Navascués, E., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). An integrative view of the role of *Lachancea thermotolerans* in wine technology. *Foods*, 10(11), 2878. <https://doi.org/10.3390/foods10112878>
- Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., & Benito, S. (2020). The genus *Metschnikowia* in enology. *Microorganisms*, 8(7), 1038. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071038>
- Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R. D., Chaves, S. R., Sousa, M. J., & Côte-Real, M. (2010). The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(2), 271–280. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2898-3>
- Volmer, D. A., Curbani, L., Parker, T. A., Garcia, J., Schultz, L. D., & Borges, E. M. (2017). Determination of titratable acidity in wine using potentiometric, conductometric, and photometric methods. *Journal of Chemical Education*, 94(9), 1296–1302. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00891>
- Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F. A., Zia, A., Gjuvslund, A., Simpson, J. T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S. W., Louis, E. J., Liti, G., Moses, A., & Blomberg, A. (2011). Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS Genetics*, 7(6), e1002111. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002111>

- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6(1), 11–1.
- Whitener, M. E. B., Stanstrup, J., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., & Vrhovsek, U. (2017). Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(2), 179–192. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12269>
- Yalçın, S. Karasu., & Özbas, Z. Y. (2004). Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. *Process Biochemistry*, 39(10), 1285–1291. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(03\)00252-8](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(03)00252-8)
- Zhang, B., Hu, J., Cheng, C., Xu, Y., Duan, C., & Yan, G. (2023). Effects of native *Lachancea thermotolerans* combined with *Saccharomyces cerevisiae* on wine volatile and phenolic profiles in pilot and industrial scale. *Food Chemistry Advances*, 2, 100258. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100258>
- Zhang, B., Ivanova-Petropulos, V., Duan, C., & Yan, G. (2021). Distinctive chemical and aromatic composition of red wines produced by *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with indigenous and commercial non-*Saccharomyces* strains. *Food Bioscience*, 41, 100925.
- Zhang, B.-Q., Luan, Y., Duan, C.-Q., & Yan, G.-L. (2018). Use of *Torulaspora delbrueckii* Co-fermentation With Two *Saccharomyces cerevisiae* Strains With Different Aromatic Characteristic to Improve the Diversity of Red Wine Aroma Profile. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00606>
- Zhao, X., Procopio, S., & Becker, T. (2015). Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7588–7598. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1977-y>