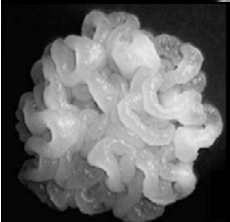
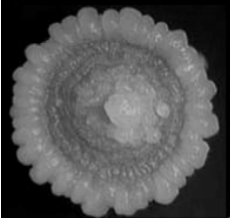
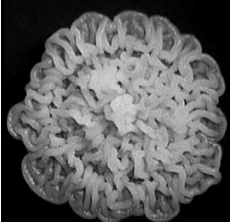


# eno safe workshop

Entrada Livre

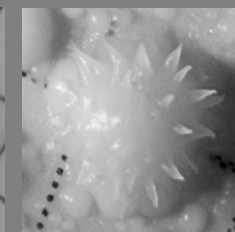
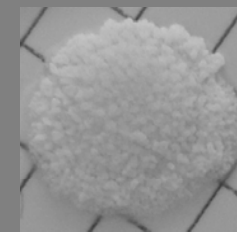
**Segurança e controlo de qualidade de vinhos:  
implementação de técnicas rápidas de  
monitorização e rastreabilidade microbiológica**

(Projecto 762 – Programa AGRO Medida 8.1)



**tipagem molecular de leveduras:  
caracterização da colecção enológica**

**dorit-elisabeth schuller**

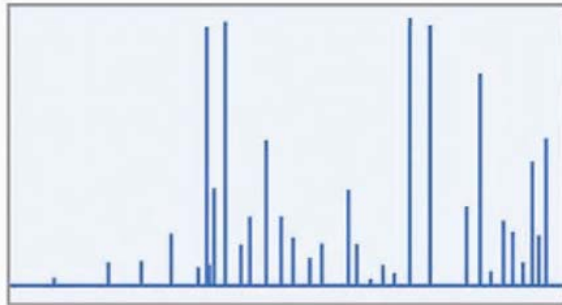


**comissão de viticultura da região  
dos vinhos verdes**

**porto**

**12 abril 2007**

# A evolução do aroma / sabor ao longo da fermentação alcoólica



Compostos voláteis do mosto



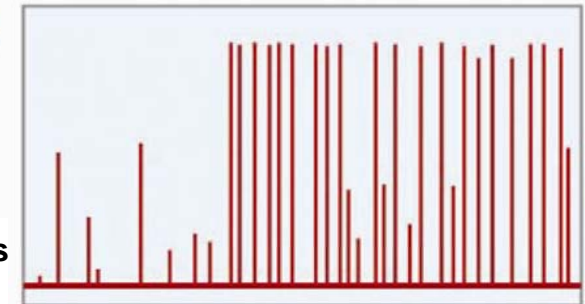
*Saccharomyces cerevisiae*



*Oenococcus oeni*

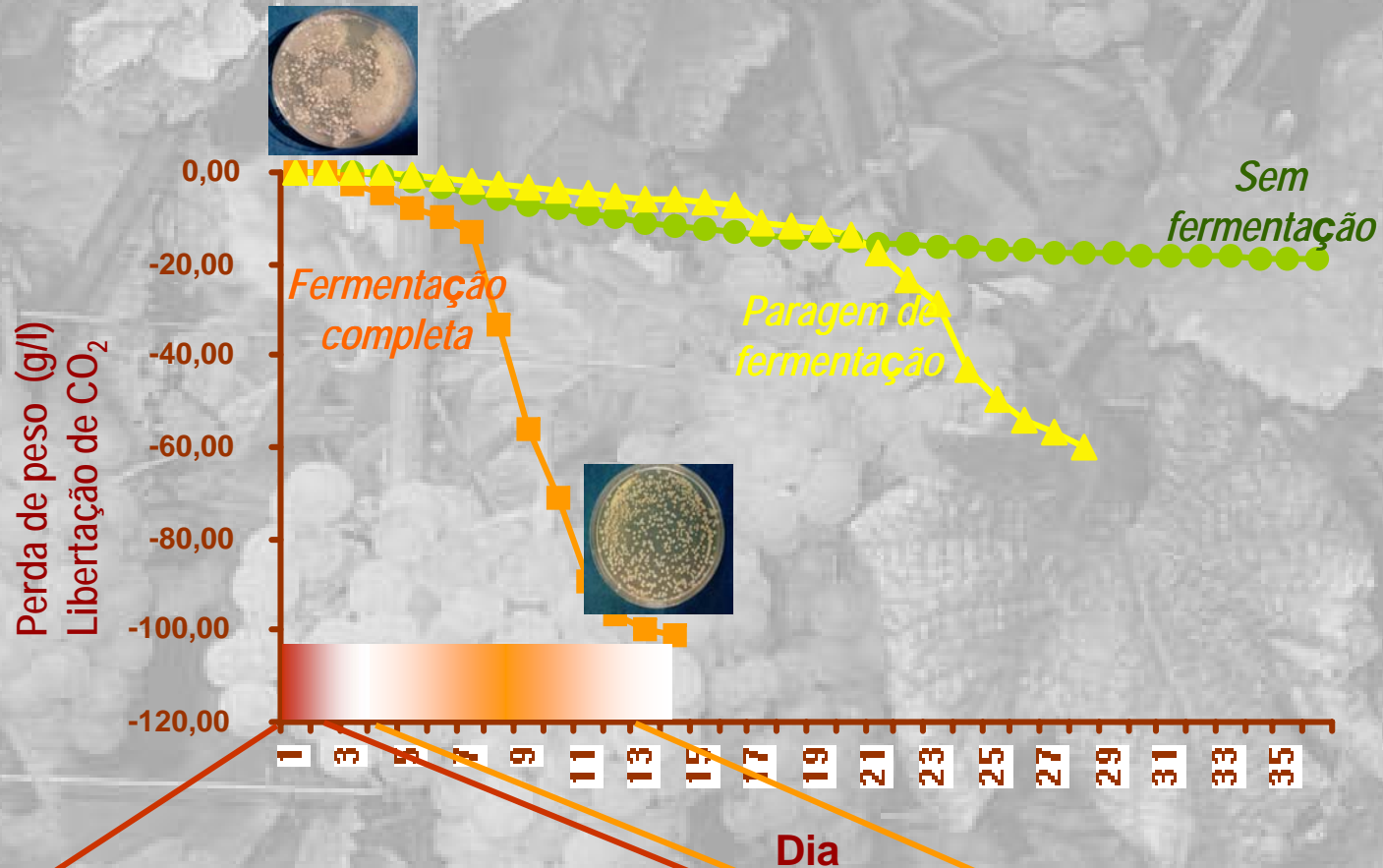


Quais os compostos aromáticos mais relevantes?



Compostos voláteis do vinho

Adaptado de Swiegers et al, Australian Journal of Grape and Wine Research, 2005



**Quantas estirpes participam na fermentação?**

**Qual (quais) a(s) estirpe(s) dominante(s)?**

<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Candida stellata</i>	<i>Metschnikovia pulcherrima</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>

**Qual (quais) a(s) estirpe(s) importantes do ponto de vista tecnológico / aromático?**

<i>Saccaromyces cerevisiae</i>

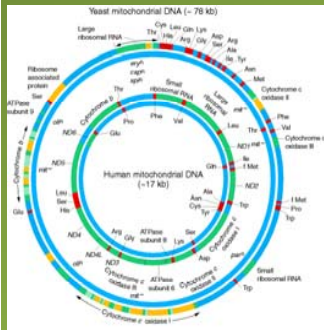
*Elevada capacidade de adaptação a um ambiente cuja composição química e nutricional muda dramaticamente ao longo da fermentação*

# Tipagem molecular de estirpes de *Sacharomyces cerevisiae*



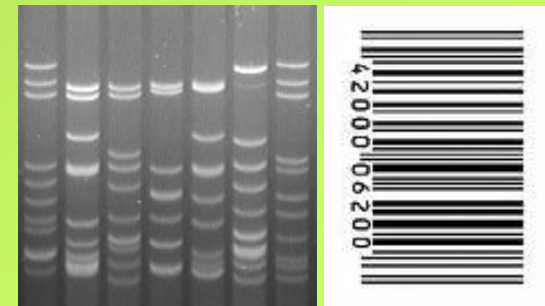
## Análise do perfil de restrição de DNA mitocondrial (Mitochondrial DNA restriction analysis, mtDNA RFLP)

(Querol et al., 1992; Lopez et al., 2001)



- ❑ DNA mitocondrial de *S. cerevisiae*: ~ 70 kb
- ❑ Estirpes enológicas de *S. cerevisiae* possuem elevada diversidade de DNA mitocondrial
- ❑ Digestão com enzimas de restrição (HinfI ou RsaI)
- ❑ Análise do perfil de bandas (fragmentos de DNA)

“Código de barras”  
único e característico para  
cada estirpe de *S. cerevisiae*



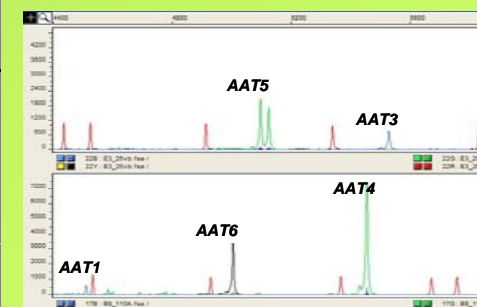


# Tipagem molecular de estirpes de *Sacharomyces cerevisiae*

## Análise de microssatélites (Pérez et al., 2001)

- Curtas (1-10) seqüências trinucleotídicas em repetidas - SSR (Simple Sequence Repeats)
- Dispersão pelo genoma
- Elevada variabilidade

Microssatélite	Cromossoma	Posição/ORF	Repetição	Nº de alelos	Ref.
ScAAT1	XIII	86 901 – 87 129	ATT	29	Pérez and Gallego, 2001
ScAAT2	II	YBL084c	ATT	18	
ScAAT3	IV	YDR160w	ATT	19	
ScAAT4	VII	431 334 – 431 637	ATT	17	
ScAAT5	XVI	897 028 - 897 259	TAA	6	
ScAAT6	IX	105 661 – 105 926	TAA	10	
YPL009	XV	YOR156c	TAA	13	Legras et al., 2005
SCYOR267C	XV	YOR267c	TGT	12	
C4	XV	110 701-110 935	TAA+TAG	9	
C5	VI	210250-210414	GT	19	
C11	X	518870-519072	GT	18	



# A colecção de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*



Minho

2001 – 2006

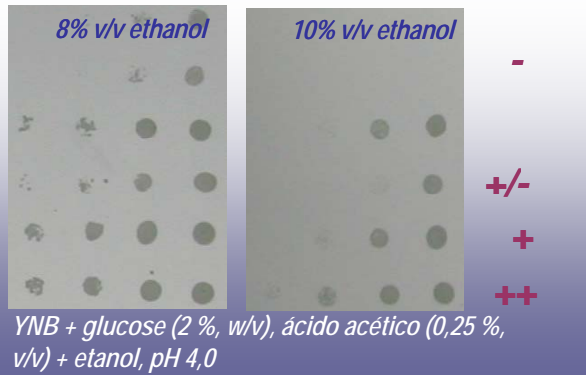
Número de amostras de uva	192
Amostras com fermentação espontânea	84
Número de isolados de leveduras	2520
Número de isolados de <i>S. cerevisiae</i>	2520
Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> (perfil genético único)	341



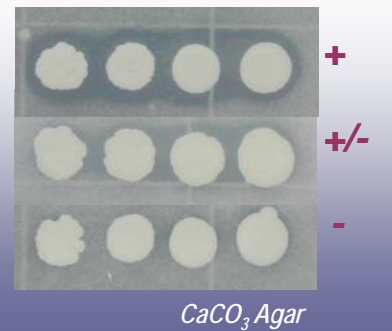
# Caracterização fisiológica

## Meios de cultura selectivos

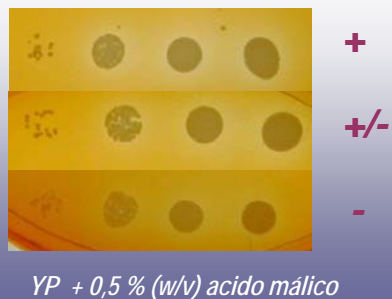
### Resistência ao etanol



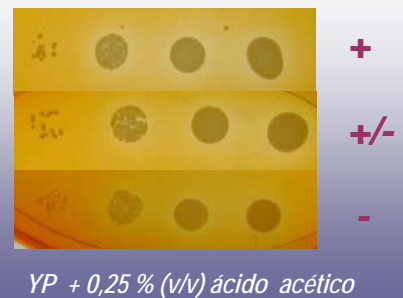
### Produção de ácido acético



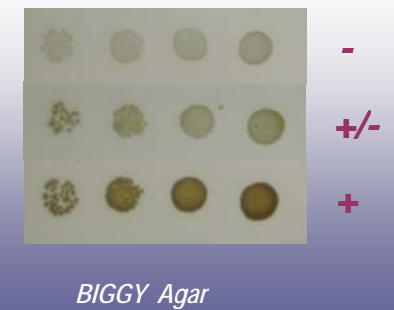
### Utilização de ácido málico



### Utilização de ácido acético



### Produção de H<sub>2</sub>S



# Caracterização fisiológica

Resistência ao etanol	Utilização de ácido málico	Utilização de ácido acético	Produção de H <sub>2</sub> S	Número de estirpes
-	-	-	+	4
-	-	-	++	2
-	-	+	-	2
-	-	+	+	20
-	-	+	++	10
-	-	++	+	12
-	-	++	++	6
-	+	+	+	6
-	+	+	++	4
-	+	++	+	5
-	++	+	+	1
-	++	++	+	1
+	-	-	+	6
+	-	+	-	5
+	-	+	+	48
+	-	+	++	6
+	-	++	-	2
+	-	++	+	20
+	-	++	++	3
+	+	-	+	1
+	+	+	-	1
+	+	+	+	10
+	+	+	++	5
+	+	++	+	6
++	-	-	+	1
++	-	+	+	7
++	-	+	++	3
++	-	++	-	1
++	-	++	+	6

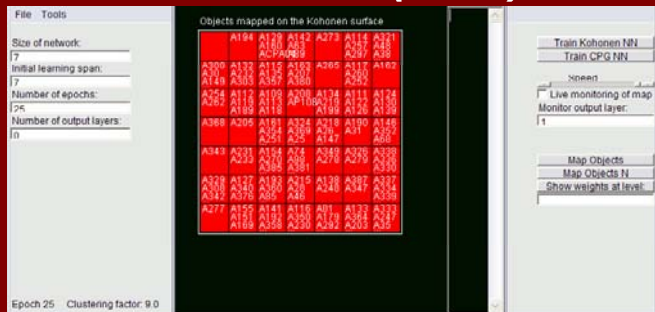


*Fermentações em escala piloto*

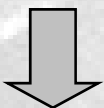




## Redes neuronais (SOM)



**Seleção de um conjunto de 47 estirpes geneticamente diverso**



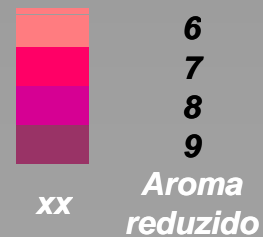
**Micro - fermentações em escala laboratorial (500 ml)**

## Microfermentações:

### Classificação sensorial para 48 estirpes de *S. cerevisiae*

31	222
40	234
68	236
69	237
76	252
77	254
80	265
85	295
89	300
96	301
106	308
115	333
122	342
142	344
147	348
158	357
161	361
189	363
192	364
194	366
198	368
202	376
205	385
218	QA23

### Legenda



**EVAG**

**Fermentações (50 l)**



- QA23
- 48
- 122
- 144
- 158
- 254
- 308
- 333
- 344
- 348

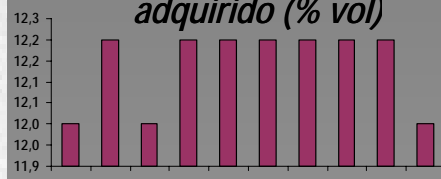


**Mosto  
Casta Trajadura**

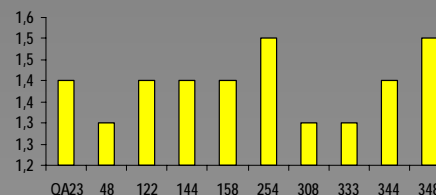
**CVRVV**

**Análise físico-química**

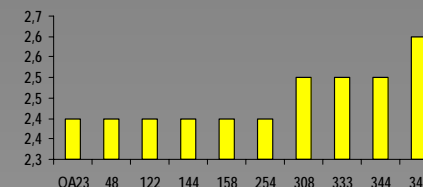
**Título alcoométrico volúmico adquirido (% vol)**



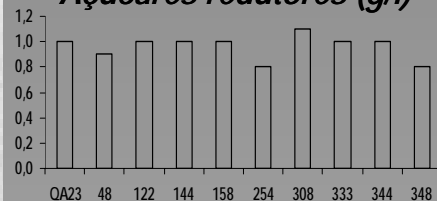
**Ácido L-málico (g/l)**



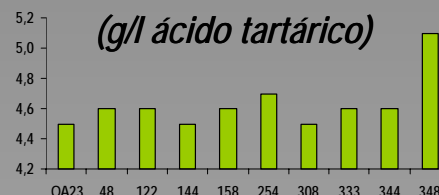
**Ácido tartárico (g/l)**



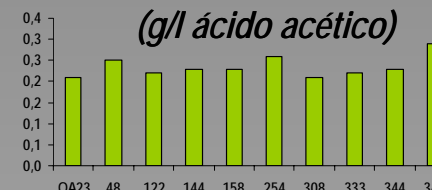
**Açúcares redutores (g/l)**



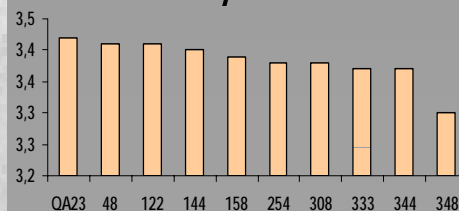
**Acidez total (g/l ácido tartárico)**



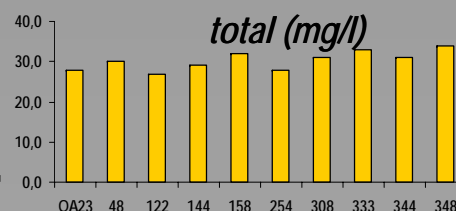
**Acidez volátil (g/l ácido acético)**



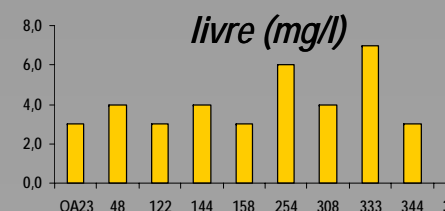
**pH**



**Dióxido de enxofre total (mg/l)**



**Dióxido de enxofre livre (mg/l)**

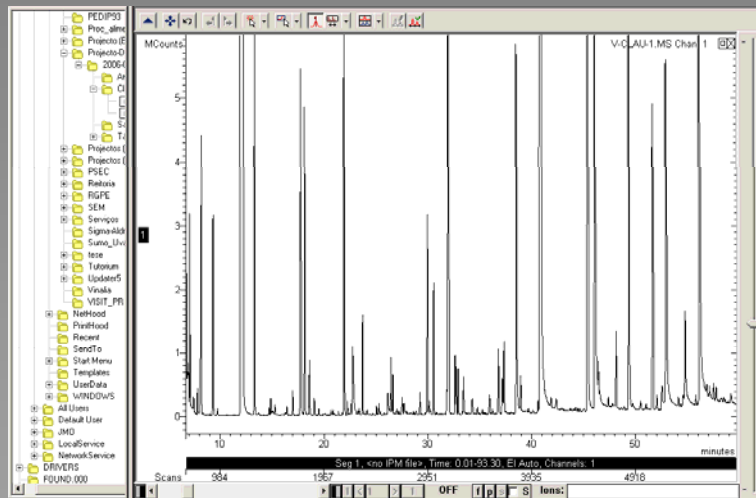


# Trabalhos em curso

## DEB-UMinho



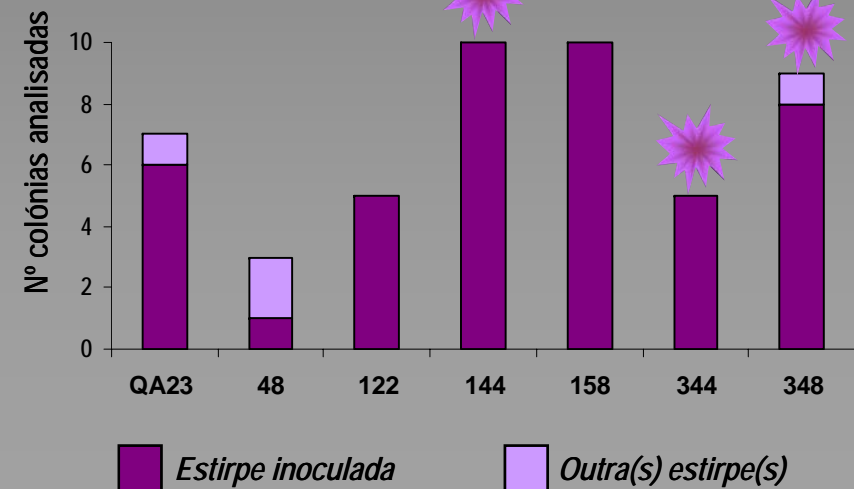
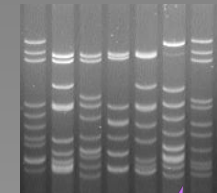
### Perfis aromáticos



## DB-UMinho

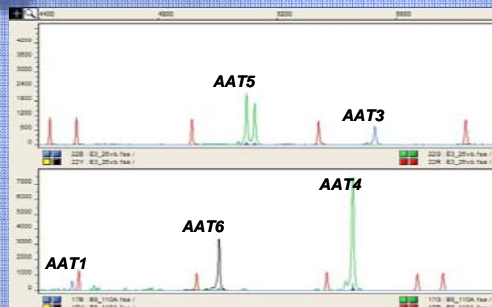


### Implantação - Tipagem molecular



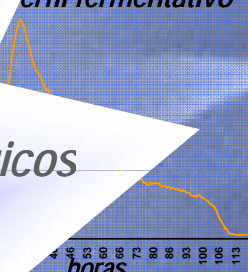
# Abordagens a desenvolver ....

Genética



Comportamento fermentativo

Perfil fermentativo



*Integração de dados genéticos e fisiológicos*

*Bioinformática  
Métodos computacionais*

*Previsão de características desejáveis  
a partir de dados genéticos*

