

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Ciências da Vida

Acção antimicrobiana de sobrenadantes mistos *S. cerevisiae* / *H. guilliermondii* em leveduras não-*Saccharomyces*

Estudo do efeito inibitório da fracção proteica

Diana Lisa Ramos Francisco

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Maria Helena Whytton da Terra Soares de Albergaria

Lisboa

2008

Agradecimentos

Ao Doutor Francisco Gírio, director da Unidade de Fisiologia Microbiana e Bioprocessos (UFMB) do INETI, pela possibilidade concedida de realização do projecto de mestrado, neste espaço.

À Dr.^a Helena Albergaria, minha orientadora, pelos conhecimentos transmitidos, conselhos, sugestões, disponibilidade, companheirismo, apoio, revisão do relatório e pela motivadora discussão de ideias.

À Professora Susana Barreiros, coordenadora do mestrado de biotecnologia, que sempre esclareceu e acalmou as minhas questões prontamente.

Às Dr.^a Isabel Spencer e Dr.^a Paula Gonçalves, elos de ligação entre a faculdade e a instituição, pelo acompanhamento que as condições permitiram fazer. À Dr.^a Isabel Spencer agradeço a sugestão de trabalho apresentada no sentido de enriquecimento do projecto e à Dr. Paula Gonçalves agradeço a calma que me trouxe ao tomar conhecimento do meu projecto.

À Margarida, Amélia, Céu e Carlos pela disponibilidade, auxílio e simpatia.

À Ana, pela amizade que se construiu. Agradeço-te a terapia de vício e conversa e o apoio que com simplicidade me prestastes.

À Talita, Mafalda, Patrícia, Júlio, Joana e Sérgio, companheiros de laboratório, agradeço-vos o apoio, amizade e diversão que convosco partilhei.

Agradeço a minha família por ter financiado mais este projecto e pelo apoio que me dão.

Aos meus amigos agradeço acreditarem em mim e o apoio que de vós posso ter independentemente do caminho que optar.

Resumo

A primeira fase deste trabalho consistiu na caracterização do perfil de células viáveis e comportamento fermentativo dum cultivo misto de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e *Hanseniaspora guilliermondii* (Hg) em condições enológicas de crescimento. A fermentação mista foi realizada em mosto sintético, que simula a composição química dos mostos de uva (200 g l⁻¹ de glucose e frutose, pH=3,5), sem agitação nem arejamento, e o meio foi inoculado com uma densidade celular de cerca de 10⁶ UFC ml⁻¹ de cada uma das leveduras. O estudo mostrou que as duas leveduras cresceram durante o primeiro dia de cultivo, apresentando a levedura Hg uma diminuição da densidade celular a partir deste ponto e atingido a densidade celular de 5,0×10² UFC ml⁻¹ aos 4 dias de fermentação; pelo contrário a levedura Sc manteve a viabilidade celular ao longo dos restantes dias de fermentação. Este comportamento foi comparado com o observado em fermentações simples de Hg e Sc, efectuadas nas mesmas condições de crescimento. Na fermentação simples a Hg apresentou uma densidade celular aos 4 dias de cultivo de 3,0×10⁶ UFC ml⁻¹ e na fermentação simples Sc, a levedura apresentou, por sua vez, um perfil de células viáveis idêntico ao do cultivo misto. O perfil de consumo de açúcares das leveduras em cultivos simples mostrou a natureza frutofílica de Hg e glicofílica de Sc.

Para investigar o efeito inibitório da fracção proteica dos sobrenadantes mistos (Sc/Hg) sobre o crescimento da levedura Hg, fraccionaram-se e concentraram-se sobrenadantes, obtidos a partir de cultivos mistos (Sc/Hg) com 4 dias de fermentação, utilizando um sistema de ultrafiltração por membranas. As fracções concentradas (>2 kDa, >10 Kda e (2-10) kDa) foram adicionadas a mosto sintético modificado (MSmod) que foi formulado de modo a conter uma concentração inicial de açúcares (100 g l⁻¹) e etanol (45 g l⁻¹) semelhante à existente nos sobrenadantes mistos com 4 dias de fermentação (SM-4d). No cultivo efectuado no SM-4d a levedura Hg perdeu totalmente a sua viabilidade celular ao fim de 4-5 dias. Nos cultivos efectuados em MSmod verificou-se que a adição das fracções proteicas induziu uma inibição inicial do crescimento durante os primeiros 2 dias. Estes resultados confirmaram a existência de compostos proteicos nos sobrenadantes mistos (Sc/Hg) com acção antimicrobiana contra a levedura Hg. No entanto, comparando os perfis de células viáveis no SM-4d com os observados no MSmod contendo as fracções proteicas pode-se afirmar que para além destes compostos proteicos os sobrenadantes mistos contêm outras substâncias tóxicas que em conjunto com os inibidores proteicos serão responsáveis pelo efeito de morte observado nos SM-4d.

Testou-se o efeito inibitório dos sobrenadantes mistos (Sc/Hg) sobre o crescimento de 6 estirpes de leveduras não-*Saccharomyces* associadas à microflora enológica: *H. guilliermondii* (Hg); *H. uvarum* (Hu), *Kluyveromyces marxianus* (Km), *K. thermotolerans* (Kt), *Torulaspora delbrueckii* (Td) e *Zygosaccharomyces bailii* (Zb). Para tal efectuaram-se cultivos de cada uma destas estirpes em SM-4d nas mesmas condições que as utilizadas anteriormente. Os resultados obtidos mostraram que o SM-4d induziu a morte de todas as leveduras à excepção da Zb que manteve a viabilidade celular durante 8 dias de cultivo. As taxas de morte das leveduras Hg, Hu, Km, Kt e Td, variaram entre a perda total de viabilidade celular ao fim de 3 dias para a levedura Hu e ao fim de 5-7 dias para as leveduras Hg, Kt e Td.

Finalmente, para investigar se a morte das leveduras não-*Saccharomyces* observada nos cultivos efectuados nos SM-4d poderia também estar relacionada com a fracção proteica dos mesmos, efectuaram-se cultivos das leveduras Km, Kt e Td em mosto sintético modificado (100 g l⁻¹ de açúcares, 60 g l⁻¹ de etanol e 0,6 g l⁻¹ de ácido acético). Verificou-se que todas as leveduras estudadas (Km, Kt e Td), embora sofrendo uma inibição inicial, foram capazes de crescer no referido meio o que significa que nem o etanol, nem o ácido acético podem explicar a morte observada no SM-4d. A adição das fracções proteicas ao mosto sintético modificado provocou, embora com intensidades diferenciadas, um efeito de inibição em todas as leveduras, tendo sido mais acentuada na levedura Km do que nas leveduras Kt e Td.

De todos os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o desaparecimento prematuro de muitas leveduras não-*Saccharomyces* durante fermentações vinárias não resulta primeiramente do etanol existente no meio mas sim de outros compostos tóxicos produzidos pela Sc, nomeadamente de substâncias proteicas com acção antimicrobiana contra muitas destas espécies.

Abstract

In the first stage of this work we characterised the viable cells profiles and fermentation performance of a mixed *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) and *Hanseniaspora guilliermondii* (Hg) fermentation, carried out under enological growth conditions. The mixed fermentation was performed in synthetic grape juice, which simulates the average chemical composition of grape musts (200 g l⁻¹ of glucose plus fructose, pH=3.5), without agitation or aeration, and the medium was inoculated in order to attain an initial cell density of 10⁶ CFU ml⁻¹ of each strain. Results showed that both yeasts grew during the first day of mixed cultivation, however after the first day Hg began to die off and its cell density fell to 5.0×10² CFU ml⁻¹ after 4 days of cultivation, Sc in turn kept the cell viability at high values (ca 10⁷ CFU ml⁻¹) during the remaining days of fermentation. This behaviour was compared with the Hg and Sc single fermentations performed with the same growth conditions. In the Hg single fermentation, the yeast achieved a cell density value of 3.0×10⁶ CFU ml⁻¹ at the 4th day of cultivation. Under single fermentation, Sc showed a viable cells profile similar to the one exhibited in the mixed fermentation. The sugars consumption profiles in the single cultures showed the fructophilic behaviour of Hg and the glucophilic nature of Sc.

To investigate the inhibitory effect of the proteic fraction of mixed supernatants (Sc/Hg) on the growth of Hg, supernatants obtained from mixed cultures (Sc / Hg) after 4 days of fermentation were fractionated and concentrated using membrane ultrafiltration systems. The concentrated fractions (> 2 kDa, > 10 kDa and (2-10) kDa) were added to modified synthetic grape juice (MSmod), prepared to have initial concentrations of sugar (100 g l⁻¹) and ethanol (45 g l⁻¹) similar to those present in the 4 day-old mixed supernatants (SM-4d). In the Hg culture performed in the SM-4d, the yeast showed total loss of cell viability after 4-5 days. The cultures performed in the MSmod showed that the addition of proteic fractions induced an initial growth inhibition during the first 2-3 days. These results confirmed the existence in the mixed supernatants (Sc/Hg) of protein compounds exhibiting antimicrobial activity against Hg. However, comparing the yeast viable cell profiles in the SM-4d culture with those observed in the MSmod with the protein fractions cultures it can be stated that the SM-4d contain other toxic compounds which together with the proteic fraction will induce the death of Hg in the SM-4d.

The inhibitory effect of the mixed supernatants (Sc/Hg) on the growth of 6 non-*Saccharomyces* yeasts strains associated with oenological microflora was tested: *H.*

guilliermondii (Hg), *H. uvarum* (Hu), *Kluyveromyces marxianus* (Km), *K. thermotolerans* (KT), *Torulaspora delbrueckii* (Td) and *Zygosaccharomyces bailii* (Zb). With that purpose, single cultures of each strain were performed in the SM-4d under the same growth conditions previously described. The results showed that the SM-4d induced cell death of all strains with the exception of Zb that maintained the cell viability during 8 days of cultivation. Death rates of Hg, Hu, Km, Kt and Td, ranged from total loss of cell viability after 3 days for Hu and 5-7 days for Hg, KT and Td.

Finally, to investigate the effect of the protein fraction of SM-4d on the growth of non-*Saccharomyces* strains, cultures of Km, Kt and Td were performed in modified synthetic grape juice (100 g l⁻¹ of sugars, 60 g l⁻¹ of ethanol and 0.6 g l⁻¹ of acetic acid). In this medium all strains (Km, KT and Td) were able to grow, although with an initial lag phase, which means that neither ethanol nor the acetic acid can explain the cell death observed in the SM-4d. Addition of the protein fractions to this medium inhibited the growth of all strains, albeit at different levels: more pronounced in Km than in KT and Td strains.

The results obtained under the present work indicate that the early death of most non-*Saccharomyces* yeasts during spontaneous wine fermentations is not primarily due to ethanol but conversely might be due to other toxic compounds produced by Sc, namely protein compounds exhibiting antimicrobial activity against most of those yeasts.

Abreviaturas

MS – Mosto sintético

MSmod1 (2) – Mosto sintético modificado 1 (2)

YM – Meio liquido Yeast Malt

YMA – Yeast Malt Agar

cYMA – Yeast Malt Agar com cicloheximida

g l⁻¹ – gramas por litro

Hg – *Hanseniaspora guilliermondii* (NCYC 2380)

Hg2 – *Hanseniaspora guilliermondii* (isolado de mosto)

Hu – *Hanseniaspora uvarum* (PYCC 4193)

Km - *Kluyveromyces marxianus* (PYCC 2671)

Kt - *Kluyveromyces thermotolerans* (PYCC 2908)

Sc – *Saccharomyces cerevisiae* (CCMI 885)

Td – *Torulaspota delbrueckii* (PYCC 4487)

Zb – *Zygosaccharomyces bailii* (isolado de mosto)

NS – não-*Saccharomyces*

UFC ml⁻¹ – Unidades formadoras de colónias por mililitro

Sc/Hg – *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora guilliermondii*

SS – Sobrenadante simples

SS-4d – Sobrenadante simples, pré-fermentado 4 dias

SM – Sobrenadante misto

SM-4d – Sobrenadante misto *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora guilliermondii*,
pré-fermentado 4 dias

Da – Dalton

kDa – 1000Da

f - fracção

>2 kDa – maior que 2 kDa

>10 kDa – maior que 10 kDa

(2-10) kDa – 2 a 10 kDa

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	v
Abreviaturas	vii
Índice Geral	viii
Índice de Figuras	xi
I. Introdução	1
I.1 O Processo de Vinificação	2
I.1.1 Breve contexto histórico do processo vínico	2
I.1.2 Microflora enológica	5
I.1.3 Fermentação alcoólica – A via metabólica de eleição das leveduras.....	6
I.2 A fermentação alcoólica: Tradição vs Inovação	8
I.2.1 Dinâmica populacional das fermentações espontâneas	8
I.2.2 Leveduras de arranque: segurança microbiológica	10
I.2.3 Fermentações incompletas e amuadas	11
I.3 Factores que afectam a sobrevivência das leveduras durante as fermentações vinárias	12
II Materiais e Métodos	16

II.1 Estirpes, Meios de Cultivo e Inóculos.....	17
II.1.1 Microrganismos	17
II.1.2 Meios de Cultura e Inóculos	17
II.2 Microvinificação mista de <i>S. cerevisiae</i> e <i>H. guilliermondii</i> e simples de <i>S. cerevisiae</i> e de <i>H. guilliermondii</i>	18
II.3 Ultrafiltração e Concentração de sobrenadantes	18
II.4 Efeito inibitório das fracções concentradas de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) no crescimento de <i>H. guilliermondii</i>	19
II.5 Efeito de morte de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) em diferentes leveduras não- <i>Saccharomyces</i> (NS): Hg2, Hu, Kt, Km Td e Zb	20
II.6 Efeito inibitório da fracção proteica de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) sobre as leveduras não- <i>Saccharomyces</i> : Km, Kt e Td	20
II.7 Métodos analíticos	21
II.7.1 Análise do crescimento	21
II.7.2 Doseamento de substratos e produtos microbianos por HPLC.....	21
II.7.3 Análise do perfil proteico dos sobrenadantes e fracções concentradas por electroforese SDS-PAGE	22
III Resultados e discussão	23
III.1 Fermentação mista de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> e fermentações simples <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	24

III.2 Estudo do efeito inibitório de diferentes fracções proteicas de sobrenadantes mistos no crescimento de <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	30
III.3 Avaliação do efeito de morte de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) em diferentes espécies não- <i>Saccharomyces</i>	36
III.4 Efeito inibitório da fracção proteica de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) no crescimento das leveduras não- <i>Saccharomyces</i> : <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>K. thermotolerans</i> e <i>Torulaspota delbrueckii</i>	39
IV Conclusões	43
V. Bibliografia	46
Anexos	51
A1. Composição do meio Yeast Malt Agar	51
A2. Composição do Mosto Sintético (SGJ)	51
A3 Composição do Mosto Sintético Modificado 1 (MSmod1).....	52
A4 Composição do Mosto Sintético Modificado 2 (MSmod2).....	53
A5 Composição do Gel de Tricina SDS-PAGE	53

Índice de Figuras

Figura I.1: Expansão e distribuição mundial da produção de vinho e sua tecnologia (retirado de Pretorius, 2000).....	2
Figura I.2: Representação esquemática do processo de produção de Vinho (adaptado de Bisson, 2004 e Pretorius, 2000).....	3
Figura I.3: Diagrama do metabolismo da glucose pela <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (retirado e adaptado de Barnett e Entian, 2005).....	7
Figura I.4: Crescimento diáuxico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em cultura descontínua aeróbia com D-glucose (retirado de Barnett e Entian, 2005).....	8
Figura I.5: Proporção relativa de estirpes pertencentes a diferentes espécies não- <i>Saccharomyces</i> ao longo das diferentes fases duma vinificação espontânea. Ka, <i>Kloeckera apiculata</i> ; Cv, <i>Candida valida</i> ; Cs, <i>Cândida stellata</i> , Zf, <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> . (retirado de Romano <i>et al.</i> , 1997).....	9
Figura III.1: Evolução das células viáveis (A) de <i>S. cerevisiae</i> (●) e <i>H. guilliermondii</i> (○), consumo de glucose (■) e frutose (▲) e produção de etanol (◆) (B) durante a microvinificação mista efectuada em mosto sintético.....	24
Figura III.2: Evolução das células viáveis (●,○) (A), do consumo de glucose (■,□) e frutose (▲,△) (B) e da produção de etanol (◆,◇) (C) durante as microvinificações simples de <i>S. cerevisiae</i> (símbolos a cheio) e <i>H. guilliermondii</i> (símbolos vazios) efectuadas em mosto sintético.....	26
Figura III.3: Células viáveis de <i>H. guilliermondii</i> durante cultivos realizados em MSmod1 (●), em Msmod1 contendo a fracção proteica >10 kDa (●), em MSmod1 contendo a fracção proteica >2kDa (●) e num SM-4d (○) (A); Células viáveis de <i>H. guilliermondii</i> durante cultivos realizados em MSmod1 (●), em Msmod1 contendo a fracção proteica >10 kDa (●) e em Msmod1 contendo a fracção proteica (2-10) kDa (●) (B).....	31
Figura III.4: Proporção de células viáveis de <i>H. guilliermondii</i> em cultivos efectuados em MSmod1 com adição das fracções >10 kDa (■) e >2 kDa (■) (A) e com adição de fracções	

>10 kDa (■) e (2–10) kDa (■) (B) em relação a cultivos efectuados em MSmod1 sem fracções.....32

Figura III.5: Evolução do consumo de açúcares (□) e produção de etanol (◇) durante cultivos de *H. guilliermondii* realizados em MSmod1 (■,◇), em MSmod1 contendo as fracções >10 kDa (■,◇) e > 2 kDa (■,◇) (A); em MSmod1 (■,◇), em MSmod1 contendo as fracções >10 kDa (■,◇) e (2-10) kDa (■,◇) (B).....33

Figura III.6: Gel de Tricina SDS-PAGE (16,5%) revelado em “Silver Staining”; M– Marcador molecular (sigma); 1– Fracção conc. >2 kDa obtida dum SS-4d (Sc); 2– Fracção conc. >2 kDa obtida dum SM-4d (Sc/Hg); 3– Fracção conc. (2-10) kDa obtida dum SM-4d (Sc/Hg); 4– Fracção conc >10 kDa obtida dum SM-4d (Sc/Hg).....35

Figura III.7: Evolução da densidade celular das leveduras *H. guilliermondii* (●), *H. uvarum* (●), *Kluyveromyces marxianus* (●), *K. thermotolerans* (●), *Torulaspota delbrueckii* (●) e *Zygosaccharomyces bailii* (●), durante cultivos efectuados num sobrenadante misto (Sc/Hg) pré-fermentado durante 4 dias (SM-4d).....36

Figura III.8: Concentração de açúcares (A) e etanol (B) durante os cultivos das leveduras *H. guilliermondii* (■,◇), *H. uvarum* (■,◇), *Kluyveromyces marxianus* (■,◇), *K. thermotolerans* (■,◇), *Torulaspota delbrueckii* (■,◇) e *Zygosaccharomyces bailii* (■,◇), efectuados em sobrenadantes mistos (Sc/Hg), pré-fermentados durante 4 dias.....37

Figura III.9: Proporção de células viáveis de *K. marxianus* (■), *K. thermotolerans* (■) e *T. delbrueckii* (■) nos cultivos efectuados em MSmod2 contendo a fracção (SM-4d) >2 kDa e relativamente aos cultivos efectuados no MSmod2 sem fracção.....39

Figura III.10: Células viáveis (●,○), consumo de açúcar (■,□) e produção de etanol (◆,◇) de *K. marxianus* (A e D), *K. thermotolerans* (B e E) e *T. delbrueckii* (C e F) em MSmod2 (símbolos a cheios) e em MSmod2 com adição da fracção >2 kDa (símbolos vazios).....41

I. Introdução

I.1 O Processo de Vinificação

I.1.1 Breve contexto histórico do processo vínico

Expressões como: “Dádiva dos Deuses”, “Sangue de Cristo”, “Essência da vida”, “Néctar dos Deuses” são desde tempos remotos usados para designar o vinho, demonstrando a sua importância quer cultural quer religiosa.

As primeiras referências históricas relativas ao vinho, remontam a 6000 AC e situam a sua produção nas regiões da Mesopotâmia e Cáucaso (Pretorius, 2000). A expansão da produção vínica a outras zonas geográficas decorreu ao longo dos tempos (**Figura I.1**) (Pretorius, 2000). A colonização Romana levou esta tecnologia a todo o mediterrâneo (500 AC) e mais tarde, durante os descobrimentos – século 16, os exploradores europeus introduziram o vinho no Novo Mundo.

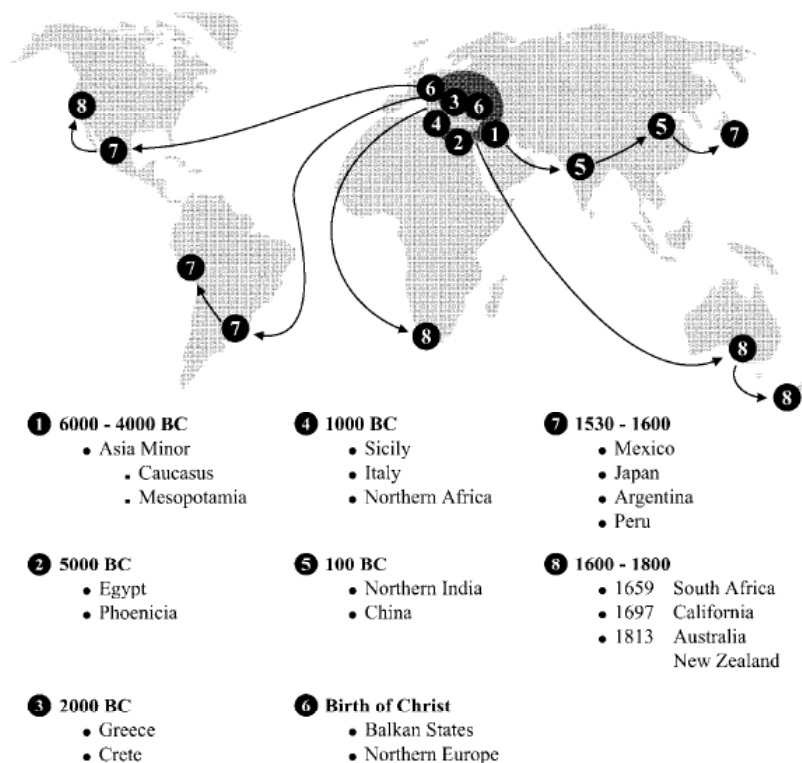


Figura I.1: Expansão e distribuição mundial da produção de vinho e sua tecnologia (retirado de Pretorius, 2000).

Por volta de 1870, uma grave epidemia designada por filoxera, resultante do ataque do insecto *Phylloxera vastatrix* às raízes da planta da videira, ameaçou quase toda a vinha na Europa e no Novo Mundo (Barnett, 1998). Para combater esta praga recorreu-se às espécies de videira nativas das Américas resistentes à filoxera e efectuaram-se enxertos nas raízes das videiras de *Vitis vinífera*.

Apesar da propagação da tecnologia de produção de vinho pelo mundo, o desconhecimento dos processos químicos e biológicos envolvidos na transformação do mosto de uva em vinho impediu que ocorressem alterações significativas no seu processamento, durante um longo período de tempo. Hoje, mesmo com a evolução tecnológica e as especificidades próprias existentes na produção de determinados tipos de vinho, o mais antigo processo biotecnológico da história -a produção de vinho, pouco se alterou no que respeita os seus métodos básicos (**Figura I.2**) (Bisson, 2004, Petrorius, 2000).

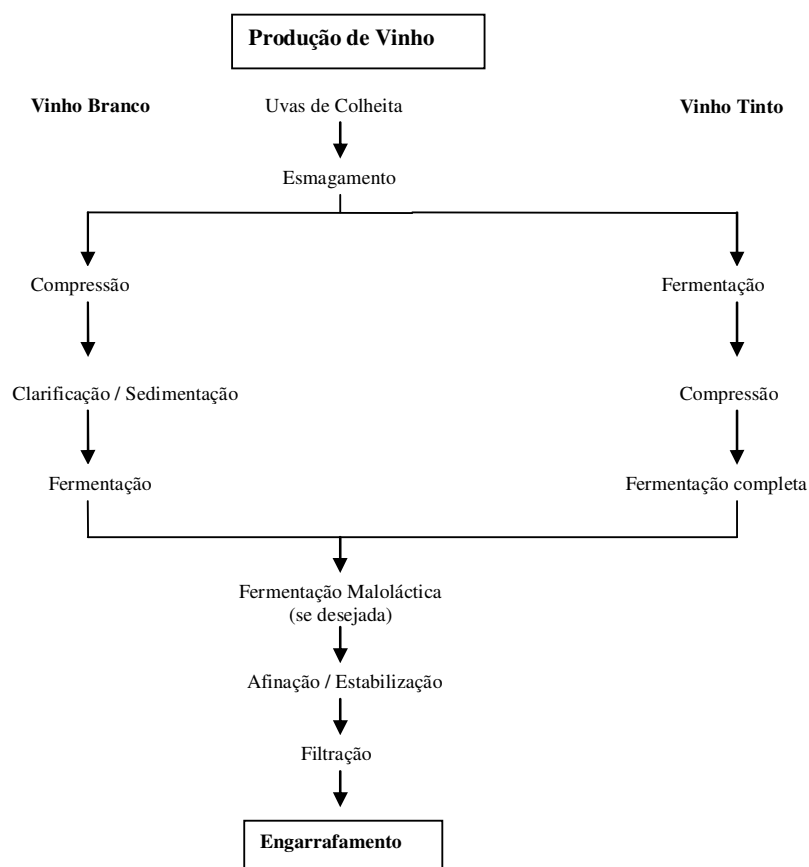
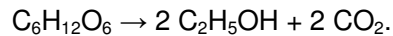


Figura I.2: Representação esquemática do processo de produção de Vinho (adaptado de Bisson, 2004 e Pretorius, 2000).

Apesar da metodologia base do processo se manter, o conhecimento científico adquirido nos últimos 150 anos forneceu conhecimentos que permitiram uma melhoria significativa no processamento do mosto em vinho, reflectindo-se num aumento da qualidade do produto (Pretorius, 2000).

O conhecimento científico do processo de transformação da uva em vinho começou com uma abordagem química feita por Lavoisier. Em 1789, Lavoisier publicou um trabalho onde foram quantificadas as principais alterações químicas que ocorrem na fermentação vinária. No seu trabalho, Lavoisier determinou que 100 partes em peso de açúcares são convertidas em 60,17 partes de álcool, 36,81 partes de dióxido de carbono e 2,61 partes de ácido acético, tendo escrito o seguinte (Barnett, 1998): *“when the fermentation is completed, the juice of grapes is changed from being sweet, and full of sugar, into a vinous liquor which no longer contains any sugar, and from which we produce by distillation, an inflammable liquor ... [for which] we have adopted ... the Arabic word alkohol...”*

Em 1815, Gay-Lussac estabeleceu a equação global da fermentação alcoólica:



Contudo, foi apenas em 1863 que Louis Pasteur demonstrou que a origem das alterações químicas ocorridas na produção de vinho resulta da actividade metabólica de microorganismos, nomeadamente das leveduras (Pretorius, 2000). O estudo microbiano desenvolvido permitiu reconhecer, que as leveduras são responsáveis pela biotransformação dos açúcares da uva em álcool e dióxido de carbono.

Por volta de 1890, Muller-Thurgau introduziu o conceito da inoculação de mostos de uva com culturas puras de leveduras, e a selecção de leveduras com características enológicas melhoradas, tornou-se uma prática corrente desde então. O estudo de Muller-Thurgau é a origem da utilização de leveduras *starter*, e resultou num melhoramento do processo vínico, aumentando a quantidade e qualidade do vinho produzido (Pretorius, 2000).

Hoje, os estudos científicos no campo da genética e engenharia metabólica revolucionam a indústria vínica, na tentativa de melhorar a variedade e qualidade do vinho. As novas abordagens tecnológicas geram uma tensão entre a tradição e a inovação, em resposta à procura do mercado. Como resposta, melhoramentos na produção de vinho por refinação de práticas vitivinícolas e enológicas continuam no sentido de satisfazer as exigências do consumidor de qualidade e variedade dos vinhos (Albergaria; 2007).

I.1.2 Microflora enológica

A microflora enológica é composta por fungos, leveduras e bactérias que estão presentes na película das uvas ou na superfície dos equipamentos das adegas (Fleet e Heard, 1993). No processo de vinificação, as leveduras são o principal microrganismo da microflora enológica, sendo responsáveis pela principal biotransformação do processo, a fermentação alcoólica (Fleet, 2003; Pretorius, 2000).

As leveduras pertencentes à microflora natural dos mostos de uvas comportam um número elevadíssimo de estirpes pertencentes a inúmeros géneros e espécies. Pelo menos 16 géneros diferentes de leveduras têm sido associados ao processo de vinificação: *Brettanomyces* e o seu equivalente sexual *Dekkera*, *Cândida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* e o equivalente sexual *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotura*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (Barnett *et al.*, 2000).

Na uva, a população de leveduras presentes é composta maioritariamente por estirpes pertencentes a espécies não-*Saccharomyces*, representando as espécies de leveduras apiculadas do género *Kloeckera* e *Hanseniaspora* 50-75% da população total de leveduras (Fleet e Heard, 1993), como as leveduras *Hanseniaspora guilliermondii* e *Hanseniaspora uvarum*. Menos prevalentes mas numericamente relevantes encontram-se espécies de leveduras pertencentes aos géneros *Candida*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, e *Hansenula*, como sejam as espécies *C. stellata*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. thermotolerans* e *Torulaspora delbrueckii* (Fleet e Heard, 1993).

Além das leveduras apiculadas existentes em maior quantidade no mosto de uva, existem também espécies de leveduras que acabam por dominar o processo fermentativo e que pertencem ao género *Saccharomyces*. A principal espécie de levedura responsável pela fermentação dos mostos de uva é a levedura *S. cerevisiae*. As leveduras desta espécie são raramente encontradas na superfície das uvas, mas fazem parte da microflora residente da adega e devido à sua elevada capacidade fermentativa, acabam por dominar o processo fermentativo (Ciani *et al.*, 2004; Fleet e Heard, 1993; Fleet, 2003; Martini, 2003).

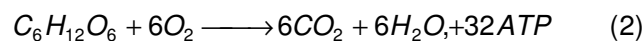
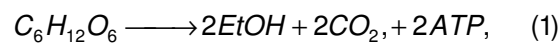
Além das leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica, algumas bactérias como as bactérias lácticas podem intervir no processo de vinificação através da realização da fermentação maloláctica. Esta fermentação ocorre após a fermentação alcoólica e realiza a transformação do ácido málico em ácido láctico diminuindo deste modo a acidez do vinho. Este processo fermentativo ocorre em vinhos com elevado valor de pH, podendo usar os açúcares residuais como substratos (Comitini *et al.*, 2005; Fleet, 2003).

Os fungos são geralmente eliminados pela aplicação rotineira de fungicidas na uva. Esta prática permite eliminar a sua presença na microflora enológica evitando deste modo a interferência negativa que podem ter no processo vínico. Os fungos podem alterar negativamente o sabor do vinho e ainda interferir directa ou indirectamente no desenvolvimento das leveduras (Fleet, 2003).

I.1.3 Fermentação alcoólica – A via metabólica de eleição das leveduras

As leveduras obtêm a energia necessária aos seus processos metabólicos por duas vias fundamentais: a via respiratória e a via fermentativa.

No processo vínico, as leveduras metabolizam os hidratos de carbono do mosto para obtenção de energia essencialmente por via fermentativa, produzindo etanol e dióxido de carbono – **equação 1** (Barnett, 1998, Barnett e Entian, 2005). A energia obtida pela metabolização de uma molécula de glucose pela via fermentativa (2ATPs) é contudo muito menor que a obtida pela – via respiratória (32 ATPs) – **equação 2** (Berg *et al.*, 2002).



As vinificações ocorrem em condições de elevadas concentrações de açúcar, 150-240 g l⁻¹, nos mostos e pouca disponibilidade em oxigénio (Alexandre e Charpentier, 1998). Em condições de elevada concentração de glucose a levedura *S. cerevisiae* sofre um fenómeno de repressão da respiração, mesmo na presença de oxigénio, que se designa por – **Efeito de Crabtree**. Este fenómeno é caracterizado pela repressão da síntese das enzimas envolvidas na via respiratória através dos catabolitos acumulados pelo catabolismo da glucose (Barnett e Entian, 2005). Como consequência desta repressão o piruvato produzido através da glicólise é maioritariamente convertido em etanol em vez de seguir o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, e a actividade respiratória das leveduras diminui (**Figura I.3**).

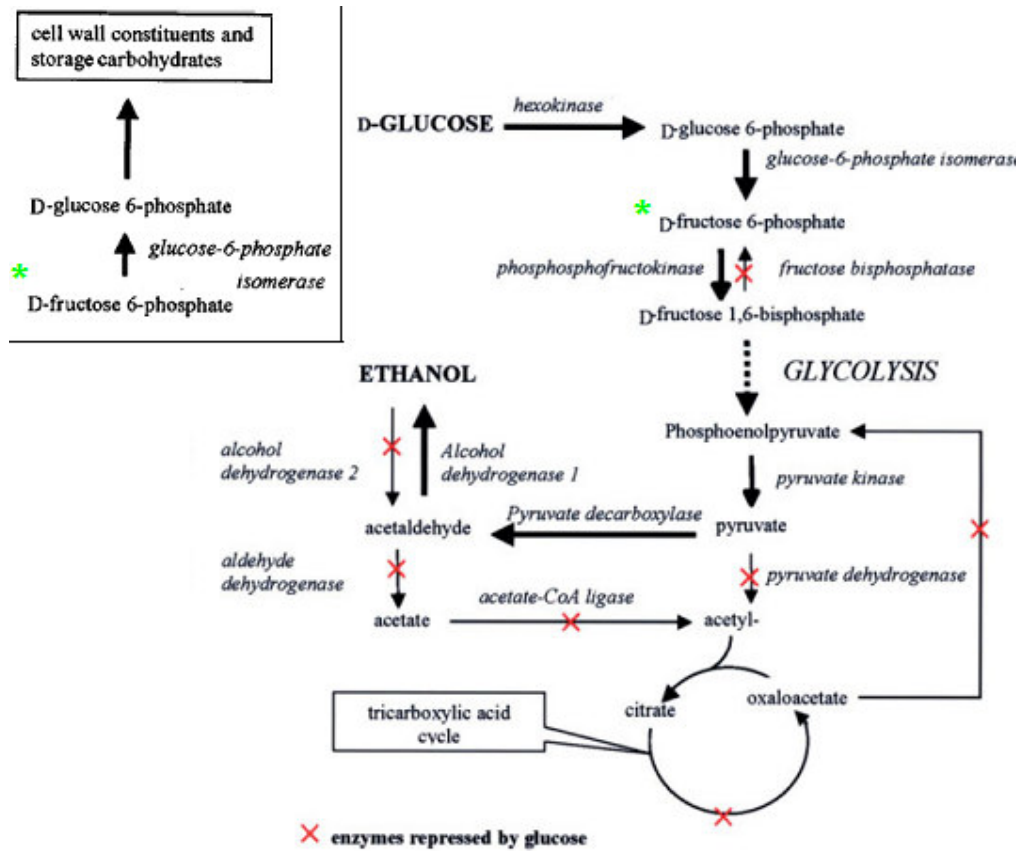


Figura I.3: Diagrama do metabolismo da glucose pela *Saccharomyces cerevisiae* (retirado e adaptado de Barnett e Entian, 2005).

A **Figura I.3** mostra as enzimas que são reprimidas pela presença de elevadas concentrações de glucose. Contudo, quando a glucose é escassa, deixa de existir repressão das enzimas envolvidas na via oxidativa.

Na presença de oxigénio e glucose a levedura *S. cerevisiae*, principal levedura do processo vínico, apresenta um crescimento diáxico, consumindo a glucose e produzindo etanol numa primeira fase. Numa segunda fase, correspondendo a uma quantidade de glucose escassa, a levedura metaboliza o etanol produzido na primeira fase (**Figura I.4**). Na fase inicial, caracterizada pela presença de glucose, a levedura consome o açúcar por via fermentativa produzindo etanol -Fase Fermentativa. Quando existe pouca glucose no meio a levedura deixa de sentir o efeito de repressão da glucose e adota a via respiratória oxidando o etanol inicialmente formado como fonte de carbono – Fase Respiratória (Barnett e Entian, 2005; Lopes e Fonseca, 1996).

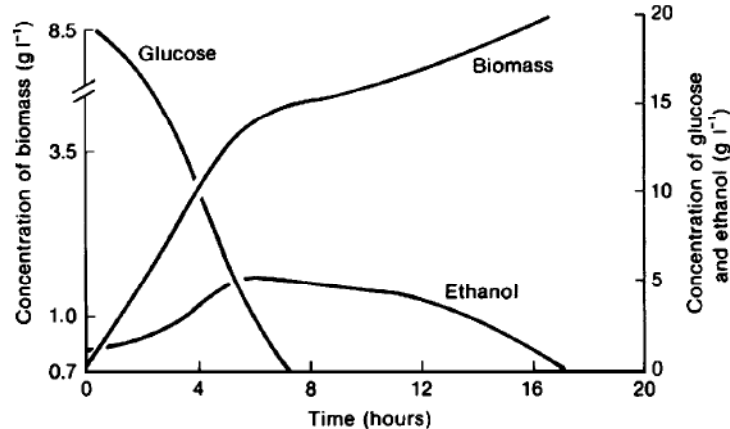


Figura I.4: Crescimento diáuxico de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura descontínua aeróbia com D-glucose (retirado de Barnett e Entian, 2005).

Em condições vínicas nem todas as leveduras apresentam este efeito (Crabtree positivas) ou não o apresentam tão pronunciado como a *S. cerevisiae* reflectindo-se em diferentes capacidades fermentativas e na produção de diferentes metabolitos de fermentação. A levedura *Hanseniaspora guilliermondii* provou ser Crabtree positiva, e o seu metabolismo encontra-se entre o exibido por *S. cerevisiae* e *H. uvarum* (leveduras Crabtree positiva e Crabtree negativa, respectivamente), resultando na menor produção de etanol que *S. cerevisiae* e na maior produção de ácido acético e ácido málico entre outros (Albergaria *et al.*, 2003).

I.2 A fermentação alcoólica: Tradição vs Inovação

I.2.1 Dinâmica populacional das fermentações espontâneas

As fermentações espontâneas do mosto de uva são iniciadas com o crescimento de varias espécies de *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, e em menor proporção por espécies de *Hansenula* e *Pichia* (Fleet e Heard, 1993). No início do processo fermentativo estas leveduras encontram-se em maior quantidade, promovendo o arranque da fermentação,

contudo após dois ou três dias de fermentação começam a morrer sendo substituídas por espécies com maior capacidade fermentativa e maior tolerância ao etanol como as leveduras do género *Saccharomyces* (Martini, 2003; Ciani e Maccarelli, 1998; Fleet e Heard, 1993). As leveduras apiculadas (ex: *H. guilliermondii*), inicialmente presentes nos mostos de uva em elevadas proporções (50-75 % da população total) crescem durante a fase inicial da fermentação (3-4 °alcoólicos), sendo substituídas pelas leveduras elípticas como a *S. cerevisiae* que produzem elevadas concentrações de etanol (11-15 °alcoólicos) (Ansanay-Galeote *et al.*, 2001; Ciani e Maccarelli, 1998).

A **Figura I.5** exemplifica a dinâmica populacional de estirpes não-*Saccharomyces* durante a fase inicial duma fermentação espontânea em mosto de uva (Romano *et al.*, 1997).

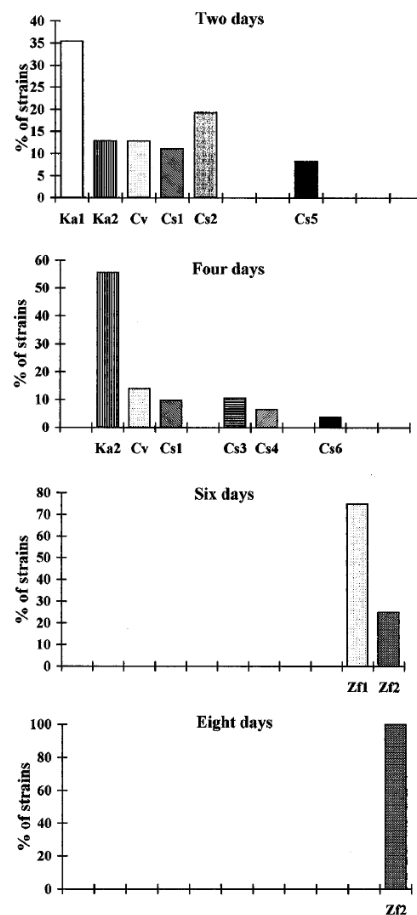


Figura I.5: Proporção relativa de estirpes pertencentes a diferentes espécies não-*Saccharomyces* ao longo das diferentes fases duma vinificação espontânea. Ka, *Kloeckera apiculata*; Cv, *Candida valida*; Cs, *Cândida stellata*, Zf, *Zygosaccharomyces fermentatii*. (retirado de Romano *et al.*, 1997).

O desaparecimento precoce das leveduras não-*Saccharomyces* durante vinificações espontâneas está geralmente associada à sua menor capacidade fermentativa, menor tolerância ao etanol (Pina *et al.*, 2004; Ciani *et al.*, 2006), bem como à sua incapacidade para resistir às condições progressivamente adversas resultantes da evolução do processo fermentativo: limitações nutricionais, escassez de oxigénio, baixos valores de pH, elevadas concentrações de etanol e outros metabolitos fermentativos como sejam ácidos orgânicos, ácido acético (Fleet, 2003). A pressão selectiva exercida por estes factores ambientais bem como por certas interacções que podem ocorrer entre leveduras (e.g. factor *Killer*) explicam a existência de apenas algumas estirpes de *S. cerevisiae* no final do processo fermentativo (Martini, 2003; Ciani *et al.*, 2004).

1.2.2 Leveduras de arranque: segurança microbiológica

O processo fermentativo da uva não é um processo estéril, existindo um elevado risco do desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (Ciani e Pepe, 2002; Bisson, 2004). No intuito de diminuir os riscos associados ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, é usualmente adicionado sulfuroso (SO_2) aos mostos de uva, em concentrações que inibam a propagação da flora contaminante mas permitam o desenvolvimento das leveduras desejadas ($50\text{-}100\text{ mg l}^{-1}$) (Lustrato *et al.*, 2006). A adição de SO_2 aos mostos permite controlar as reacções de oxidação e limitar o crescimento de leveduras indesejadas (Constantí *et al.*, 1998). A sua toxicidade, leva contudo instituições como a Organização Mundial de Saúde e a Comunidade Económica Europeia, a limitar o seu uso em alimentos frescos e processados (Lustrato *et al.*, 2006).

Os limites de SO_2 impostos e a ineficiência na inibição do crescimento de certos contaminantes, tem levado à procura de alternativas mais saudáveis no controlo da microflora enológica como seja o uso de corrente eléctrica de baixa voltagem (Ciani e Fatichenti, 2001; Lustrago *et al.*, 2006). A aplicação de corrente eléctrica de baixa voltagem provou ser uma alternativa viável para o controlo da microflora enológica. A corrente interfere com a flora indígena por alteração da sua estrutura membranar. O estudo de Lustrato *et al.* (2006) indica que a composição química e qualidade total do vinho obtido com o uso de corrente eléctrica é semelhante à obtida com uso de SO_2 .

A utilização de culturas de arranque –*starters*, em enologia é uma prática corrente desde os anos 1980 (Pretorius, 2000). A inoculação dos mostos de uva com leveduras seleccionadas garante a rápida produção de álcool e a conseguinte diminuição dos riscos

associados ao crescimento de contaminantes, à ocorrência de paragens de fermentações (fermentações amuadas) e à produção de compostos indesejáveis, permitindo a produção de vinhos com sabores mais consistentes e adequados (Ciani e Pepe, 2002; Henick-Kling *et al.*, 1998, Pérez *et al.*, 2001).

O uso de *starter* apresenta vantagens que tornam a sua utilização generalizada em termos de produção de vinho a nível mundial. No entanto, muitos produtores de vinho são ainda reticentes quanto ao seu uso; defendendo que certas características sensoriais resultantes da presença e desenvolvimento da microflora indígena dos mostos, nomeadamente das leveduras não-*Saccharomyces*, desaparecem quando se inoculam os mostos com *starters* (Ganga e Martínez, 2004; Pretorius, 2000).

A selecção de estirpes de leveduras com características adequadas para serem utilizadas como *starters* de vinificação, como sejam capacidade de conduzir e dominar a fermentação e sobreviver em diversas condições ambientais, tem sido um objectivo perseguido pelos produtores de culturas de arranque. As leveduras colonizadoras dos lagares representam uma boa opção de leveduras *starter*, uma vez que foram sujeitas a pressões selectivas e adaptativas durante longas temporadas de processamento dos mostos locais e portanto comportam características organolépticas únicas de determinados vinhos (Martini *et al.*, 2003).

A manipulação genética de leveduras para apresentarem características desejáveis em vinificação (elevada produção de determinados aromas, rapidez de fermentação, etc.) tem também sido objecto de estudos científicos, no entanto, a sua aplicação prática encontra-se limitada pela legislação existente que proíbe a utilização de organismos geneticamente modificados (OGM) em alimentos (Pretorius, 2000).

1.2.3 Fermentações incompletas e amuadas

Os mostos de uva caracterizam-se pela sua elevada concentração de açúcares (150-240 g l⁻¹) que por fermentação são transformados na sua quase totalidade em etanol e dióxido de carbono, originando no final concentrações residuais de açúcar no vinho inferiores a 2-4 g l⁻¹ (Alexandre e Charpentier, 1998; Ansanay *et al.*, 2001). As condições existentes durante o processo de produção de vinho, quer no que diz respeito às características nutricionais dos mostos e composição da microflora, quer no que respeita às condições ambientais como temperatura e oxigenação, podem impedir uma incorrecta catálise dos hidratos de carbono originando fermentações incompletas ou amuadas. As fermentações designam-se

por incompletas quando o processo fermentativo termina sem que os açúcares dos mostos tenham sido completamente metabolizados, o que origina vinhos inaceitavelmente doces (os vinhos de mesa devem ter concentrações de açúcar inferiores a 2-4 g l⁻¹ e com elevado risco de contaminações por outros microrganismos). As fermentações amuadas, por sua vez, caracterizam-se por processos fermentativos muito lentos que originam certos metabolitos secundários indesejáveis em termos organolépticos e igualmente elevados riscos de contaminação. Os factores mais frequentemente apresentados como responsáveis por fermentações incompletas ou amuadas são: teores de açúcar demasiado elevados nos mostos, deficiências nutricionais dos mostos, nomeadamente baixos teores de azoto e vitaminas, condições anaeróbias, elevado teor em etanol; clarificação excessiva dos mostos, presença de ácidos gordos tóxicos, elevadas concentrações de acidez volátil, temperaturas excessivas (altas ou baixas) e presença de microrganismos esporulados (Alexandre e Charpentier, 1998; Santos *et al.*, 2008). A reinoculação do meio de fermentação com leveduras seleccionadas é uma das estratégias utilizadas quando ocorrem paragens de fermentação, contudo as leveduras têm que possuir elevada resistência ao etanol e às outras condições adversas que existem em meios parcialmente fermentados (Santos *et al.*, 2008). Este tipo de fermentações podem ocorrer no processamento da uva a vinho, representando perdas financeiras significativas, pelo que a procura de estratégias adequadas para evitar e ultrapassar estes problemas é muito importante em enologia.

I.3 Factores que afectam a sobrevivência das leveduras durante as fermentações vinárias

O desaparecimento precoce durante fermentações vinárias espontâneas das leveduras não-*Saccharomyces*, como as pertencentes aos géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e *Candida*, tem sido desde sempre atribuído à sua fraca capacidade fermentativa, assim como à sua menor resistência às condições de crescimento adversas que se estabelecem no meio à medida que a fermentação se desenvolve, como sejam: escassez de oxigénio e outros nutrientes, elevadas concentrações de etanol e outros compostos tóxicos (e.g. ácidos orgânicos), baixos valores de pH; proteínas *killer*; etc (Albergaria *et al.*, 2008; Fleet, 2003; Nissen *et al.*, 2003).

A predominância destes factores clássicos no desaparecimento das leveduras não-*Saccharomyces* durante as fermentações vinárias tem sido recentemente questionado e

outros fenómenos, nomeadamente interações entre leveduras, têm sido sugeridos por diversos autores (Ciani e Pepe, 2002; Nissen e Arneborg, 2003; Nissen *et al.*, 2003; Arneborg *et al.*, 2005, Pérez-Nevado *et al.*, 2006). Num estudo recente, Pérez-Nevado *et al.* (2006) demonstraram que a morte prematura de duas estirpes de leveduras não-*Saccharomyces* (*H. uvarum* e *H. guilliermondii*) não se devia a elevadas concentrações de etanol, nem a limitações nutricionais ou falta de oxigénio mas sim à existência de outros compostos tóxicos produzidos durante fermentações mistas com *S. cerevisiae*.

Uma das primeiras tentativas de explicar a dinâmica populacional de morte de leveduras não-*Saccharomyces* foi apresentada por Hansen *et al.* (2001), que no seu trabalho estudaram o efeito que a presença de oxigénio tem na morte das leveduras não-*Saccharomyces*, *Kluyveromyces thermotolerans* e *Toluraspota delbrueckii*, em cultivos mistos com a levedura *S. cerevisiae*. Hansen *et al.* (2001), mostraram que a morte das leveduras não-*Saccharomyces* é mais demorada na presença de maior concentração de oxigénio, sugerindo pelos seus resultados ser a baixa tolerância às condições de oxigénio disponíveis, em vez da intolerância a metabolitos tóxicos como o etanol, o factor que afecta a sucessão de leveduras durante as fermentações vínicas. As leveduras não-*Saccharomyces* estudadas apresentaram menos tolerância à ausência de oxigénio que a levedura *S. cerevisiae* (Hansen *et al.*, 2001).

Em condições enológicas o pouco oxigénio presente é rapidamente consumido. O aumento da taxa de sobrevivência das leveduras na presença de oxigénio está relacionado com o enriquecimento da membrana plasmática, com os ácidos gordos e ergosterol produzidos por via respiratória (Alexandre e Charpentier, 1998; Chi e Arneborg, 1999). Chi e Arneborg (1999) mostraram existir uma relação entre a tolerância ao etanol, a composição da camada lipídica e mutantes com deficiências respiratórias induzidas pelo etanol. No seu estudo comprovaram que as espécies mais tolerantes ao etanol apresentam menor frequência de mutantes com deficiência respiratória induzida pelo etanol e maior quantidade de constituintes incorporados na camada lipídica como os ácidos gordos de cadeia longa e ergosterol (Chi e Arneborg, 1999).

Além da relação, entre a disponibilidade em oxigénio e a produção de constituintes que conferem resistência as condições de toxicidade do meio fermentativo sobre condições “aeróbias”, não se pode menosprezar o efeito do próprio etanol e de outros metabolitos fermentativos e da sua acção na viabilidade das leveduras.

Durante muitos anos, a morte das leveduras não-*Saccharomyces* durante o processo de vinificação foi associado à sua incapacidade de tolerar elevadas concentrações de etanol, sendo o máximo de tolerância descrito de 6 % v.v⁻¹. A acumulação de etanol no ambiente

microbiológico representa uma forma de stress químico para os microrganismos presentes no meio, existindo na levedura *S. cerevisiae* uma correlação directa entre a diminuição da velocidade de fermentação e o aumento da quantidade de etanol (Ansanay *et al.*, 2001). O etanol tem capacidade de interferir com a membrana plasmática, alterando a organização e permeabilidade da mesma e perturbando sistemas de transporte da célula, como inibição do transporte de hexoses, da permease de aminoácidos e de fluxos de protões da levedura *S. cerevisiae* (Alexandre e Charpentier, 1998; Ansanay-Galeote *et al.*, 2001).

Alguns ácidos produzidos durante a fermentação alcoólica interferem também com o processo fermentativo e a viabilidade celular das leveduras, podendo a sua acção estar correlacionada com o etanol presente no meio (Casal *et al.*, 1998; Sousa, *et al.*, 1996). Na levedura *S. cerevisiae*, o ácido acético entra na célula por difusão simples, onde se dissocia se o pH no interior da célula for superior ao pH no exterior da célula, estando sujeito ao efeito de repressão da glucose (efeito de Crabtree), o ácido acumula no interior da célula e eventualmente acidifica o citosol. Em células de *S. cerevisiae* a crescerem em glucose, a permeabilidade da membrana ao ácido acético e a inabilidade do metabolizar pode justificar a intolerância de *S. cerevisiae* em meios contendo etanol e ácido acético, como as condições existentes em fermentações paradas e amuadas (Alexandre e Charpentier, 1998; Casal *et al.*, 1998)

Além da toxicidade dos metabolitos de fermentação, existem outros factores que justificam a perda de viabilidade de algumas leveduras, como seja o factor *Killer*. Algumas leveduras têm a capacidade de produzir compostos proteicos capazes de induzir a morte de outras leveduras, como as proteínas *Killer*. As proteínas *killer* são produzidas por estirpes *killer* e induzem a morte às estirpes sensíveis, podendo o espectro de acção destas proteínas ser mais ou menos restrito. As proteínas *killer* de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* revelam um espectro de acção restrito ao género *Saccharomyces* e as leveduras do género *Pichia*, *Hansenula*, *Williopsis* e *Kluyveromyces* demonstram um espectro, mais amplo, entre - géneros (Ciani e Fatichenti, 2001;). O estudo de Ciani e Fatichenti (2001), por exemplo, identificou uma toxina *Killer* produzida por uma estirpe de *Kluyveromyces phaffii*, com potencial para agente de biopreservação na produção de vinho no combate a levedura apiculadas.

Além do factor *Killer*, foram ainda identificados factores proteicos capazes de induzir a morte de bactérias malolácticas (Comitini *et al.*, 2005), factores proteicos capazes de induzir a morte de não-*Saccharomyces* (Albergaria *et al.*, 2008) e de pequenos péptidos sintéticos capazes de combater leveduras contaminantes (Enrique *et al.*, 2007).

Na tentativa de explicar as causas a dinâmica de morte de leveduras não-*Saccharomyces* foi também introduzido um novo conceito de interacção entre leveduras, o mecanismo *cell-cell contact*, justificando a morte celular como derivada da interacção directa das leveduras *S. cerevisiae* com as leveduras não-*Saccharomyces*, *K. thermotolerans* e *T. delbrueckii*, (Nissen e Arneborg; 2003).

II Materiais e Métodos

II.1 Estirpes, Meios de Cultivo e Inóculos

II.1.1 Microrganismos

Neste trabalho usaram-se seis estirpes de leveduras não-*Saccharomyces* (NS) e uma estirpe de levedura *S. cerevisiae* (Sc) CCMI 885. As estirpes de leveduras NS utilizadas foram: *Hanseniaspora guilliermondii* (Hg) NCYC 2380, *H. guilliermondii* (Hg2) (isolado de mosto vínico), *H. uvarum* (Hu) PYCC 5937, *Zygosaccharomyces bailii* (Zb) (isolado de mosto vínico), *Kluyveromyces thermotolerans* (Kth) PYCC 2908, *K. marxianus* (Km) PYCC 2671 e *Toluraspota delbrueckii* (Td) PYCC 4487.

A estirpe Hg NCYC 2380 (National Collection of Yeast Cultures, Norwick, UK) foi fornecida pela Escola Superior de Biotecnologia (Universidade Católica Portuguesa) e isolada de mostos de uvas da região do Douro. As restantes estirpes NS pertencem à Portuguese Yeast Culture Collection (PYCC) e foram fornecidas pela Universidade Nova de Lisboa. A estirpe de levedura Sc CCMI 885 pertence à Colecção de Culturas de Microrganismos Industriais (CCMI) do INETI e foi isolada da flora indígena de mostos da região do Alentejo pelo Instituto de Vinha e do Vinho.

As estirpes de leveduras utilizadas foram mantidas em rampas de meio sólido YMA (composição em Anexo A1), a 4°C, sendo repicadas periodicamente (de 3 em 3 meses).

II.1.2 Meios de Cultura e Inóculos

As microvinificações mistas de *S. cerevisiae* e *H. guilliermondii* (Sc/Hg) e simples de *S. cerevisiae* e de *H. guilliermondii* foram efectuadas em meio quimicamente definido, designado por mosto sintético (MS), que simula a composição química de mostos das uvas. Este meio contém aproximadamente 110 g l⁻¹ de glucose e 110 g l⁻¹ de frutose e um pH de 3,5 (composição em anexo A2).

Os inóculos utilizados em todos os cultivos efectuados neste trabalho foram preparados por transferência da biomassa presente numa rampa de YMA (pré-incubada a 30 °C durante 2 dias) para balões de 250 ml contendo 100 ml de meio YM (40 g l⁻¹ de peptona, 20 g l⁻¹ de

glucose e 20 g l⁻¹ de extracto de levedura). Os balões inoculados foram então incubados a 30 °C, durante 16 h, com 150 rpm de agitação (Incubator Shaker G25; New Jersey; U.S.A.).

II.2 Microvinificação mista de *S. cerevisiae* e *H. guilliermondii* e simples de *S. cerevisiae* e de *H. guilliermondii*

Foram efectuadas microvinificações mistas (Sc/Hg) e simples de Sc e de Hg em balões de 2 l contendo 1,5 l de MS, que foram incubadas a 20 °C sem agitação. Nas microvinificações, mista (Sc/Hg) e simples Sc e Hg, inoculou-se os meios de forma a obter uma concentração inicial de 10⁶ UFC ml⁻¹ para cada uma das estirpes (Hg e Sc) na microvinificação mista e 10⁶ UFC ml⁻¹ de Sc e 10⁶ UFC ml⁻¹ de Hg nas respectivas microvinificações simples.

Todos os cultivos foram efectuados em duplicado para cada experiência, tendo-se retirado amostras diárias para a determinação do número de células viáveis (UFC ml⁻¹) e quantificação dos açúcares consumidos e etanol produzido.

II.3 Ultrafiltração e Concentração de sobrenadantes

Obtiveram-se sobrenadantes simples de Sc (SS-4d) e mistos de Sc/Hg (SM-4d) a partir de microvinificações simples de Sc e mista de Sc/Hg após filtração esterilizante por membranas 0.2 µm (Millipore, USA) dos respectivos meios fermentados durante 4 dias.

Obtiveram-se fracções (>2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa) dos referidos sobrenadantes (SM-4d e SS-4d) ultrafiltrando e concentrando esses sobrenadantes através de sistemas de ultrafiltração tangencial (Vivaspin 15R, Sartorius, Alemanha) contendo membranas com limites de exclusão molecular de 2 e 10 kDa, respectivamente. Os sistemas de ultrafiltração contendo aproximadamente 12,5 ml de sobrenadante foram centrifugados a 6000 g e 4 °C durante 6 horas numa centrífuga Sigma (Sigma 2-16K, Sartorius, Alemanha). Para obter as fracções contendo compostos com peso molecular entre (2-10) kDa ultrafiltrou-se o

sobrenadante num primeiro passo por membranas de 10 kDa e em seguida utilizaram-se membranas de 2 kDa para concentrar este permeado

Obtiveram-se fracções concentradas (5 vezes) dum SM-4d contendo compostos >2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa que foram utilizadas em cultivos simples efectuados para estudar o seu efeito inibitório no crescimento da levedura Hg (subsecção II.4) e ainda das leveduras Km, Kt e Td (subsecção II.6).

Prepararam-se ainda fracções concentradas (10 vezes) do SM 4-d (>2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa) e do SS 4-d de Sc (>2 kDa) para analisar os respectivos perfis proteicos em géis de tricina por electroforese SDS-PAGE (subsecção II.7.3).

II.4 Efeito inibitório das fracções concentradas de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) no crescimento de *H. guilliermondii*

Estudou-se o efeito inibitório das fracções concentradas >2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa obtidas por ultrafiltração e concentração do SM-4d (Sc/Hg) no crescimento da Hg. Para isso efectuaram-se cultivos simples de Hg em MS modificado (MSmod1) com e sem adição das respectivas fracções.

O MSmod1 (composição em anexo A3) foi preparado de modo a conter uma concentração inicial de açúcares (100 g l⁻¹) e de etanol (45 g l⁻¹) semelhante à existente num sobrenadante misto (Sc/Hg) de 4 dias (SM-4d). As fracções proteicas do SM-4d foram concentradas (5 vezes) e adicionadas ao MSmod1 para que a sua concentração final fosse a mesma que a existente inicialmente no SM-4d, ou seja, diluindo 5 vezes as fracções concentradas (5 vezes) no MSmod1.

Os cultivos simples de Hg foram efectuados em balões de 100 ml contendo 75 ml de cada um dos meios (MSmod1 e MSmod1 com fracção) em duplicado. Cada balão foi inoculado com um volume de inóculo de Hg de tal forma que a densidade celular inicial fosse aproximadamente 10⁶ UFC ml⁻¹. Os balões inoculados foram incubados a 20 °C sem agitação e acompanhados com amostragens diárias para determinação do número de células viáveis (UFC ml⁻¹) e quantificação dos açúcares consumidos e etanol produzido.

II.5 Efeito de morte de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) em diferentes leveduras não-*Saccharomyces* (NS): Hg2, Hu, Kt, Km Td e Zb

Estudou-se o efeito de morte do SM-4d (Sc/Hg) nas diferentes leveduras não-*Saccharomyces*: Hg2, Hu, Km, Kth, Td e Zb efectuando cultivos simples das leveduras em SM-4d. Os cultivos simples de cada levedura foram efectuados em duplicado em balões de 100 ml contendo 75 ml de SM-4d que foram inoculados com as referidas leveduras de forma a se obter densidade celular inicial de 10^6 UFC ml⁻¹. Os balões inoculados foram incubados a 20 °C sem agitação e acompanhados com amostragem diária efectuada para a determinação do número de células viáveis (UFC ml⁻¹) e quantificação dos açúcares consumidos e etanol produzido.

II.6 Efeito inibitório da fracção proteica de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) sobre as leveduras não-*Saccharomyces*: Km, Kt e Td

Estudou-se o efeito inibitório da fracção concentrada >2 kDa do SM-4d no crescimento das leveduras Km, Kt e Td, efectuando cultivos simples destas leveduras em MS modificado (MSmod2) com e sem adição da respectiva fracção.

O MSmod2 (composição em anexo A4) foi preparado de modo a conter uma concentração inicial de açúcares (100 g l⁻¹), etanol (60 g l⁻¹) e ácido acético (0,6 g l⁻¹) semelhante à existente no SM-4d. A fracções proteica >2 kDa do SM-4d foi concentrada (5 vezes) e adicionadas ao MSmod1 de forma a que a sua concentração final fosse a mesma que a existente inicialmente no SM-4d, ou seja, diluindo 5 vezes a fracção concentrada (5 vezes) no MSmod2.

Os cultivos simples de cada levedura foram efectuados, em duplicado, em balões de 100 ml contendo 75 ml de cada um dos meios (MSmod2 e MSmod2 com fracção > 2 kDa) e inoculados para uma densidade celular inicial de 10^6 UFC ml⁻¹ de cada levedura. Os cultivos foram incubados a 20 °C sem agitação e acompanhados com a amostragem diária efectuada para a determinação do número de células viáveis (UFC ml⁻¹) e quantificação dos açúcares consumidos e etanol produzido.

II.7 Métodos analíticos

II.7.1 Análise do crescimento

A análise de crescimento dos cultivos efectuados foi feita pela leitura da densidade óptica dos meios de cultivo e por contagem do número de células viáveis (UFC ml⁻¹) em placas de YMA.

A leitura da densidade óptica foi efectuada no espectrofotómetro (Genesys, Thermo Electron Corporation) a 600 nm com diluição do meio sempre que o seu valor foi superior a 0,8.

A contagem de células viáveis foi efectuada por plaqueamento em placas de YMA das amostras do meio de cultivo após diluição apropriada (Método da diluição em série). As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C e as contagens das unidades formadoras de colónias (UFC) foram efectuadas após 3 dias de incubação. Nos crescimentos mistos a diferenciação entre o número de células viáveis de Hg e Sc foi efectuada por plaqueamento simultâneo das amostras em meio de YMA e num meio selectivo cYMA (YMA contendo 0,01 % de cicloheximida) onde só crescem células de Hg. A diferença entre o número total de colónias presentes nas placas de YMA e nas placas de cYMA (UFC de Hg) permitiu calcular o número de células viáveis de Sc (Pérez *et al.*, 2000).

II.7.2 Doseamento de substratos e produtos microbianos por HPLC

A concentração de açúcares (glucose e frutose) e etanol de amostras filtradas por membranas Millipore 0,45 µm foi determinada utilizando um sistema de HPLC (Merck Hitachi, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma bomba (L-7100), um forno (L-73-50), um detector de índice de refração (La Chrom L-7490) e um injector automático (Merck, L-72000). As amostras foram injectadas numa coluna cromatográfica Sugar-PakTM (Waters, Milford, USA), aquecida a 90 °C, e eluídas com uma fase móvel contendo 50 mg ml⁻¹ de CaEDTA, a um fluxo isocrático de 0,5 ml min⁻¹. Todas as amostras foram injectadas em duplicado e as respectivas concentrações calculadas a partir de rectas de calibração obtidas com padrões constituídos por misturas de glucose, frutose e etanol para concentrações de 15 g l⁻¹, 7,5 g l⁻¹ e 3,75 g l⁻¹.

II.7.3 Análise do perfil proteico dos sobrenadantes e fracções concentradas por electroforese SDS-PAGE

Analisou-se o perfil proteico das fracções concentradas (10 vezes) >2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa do SM-4d e da fracção >2 kDa do SS-4d em géis de tricina SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamida Gel Electrophoresis). Utilizaram-se géis de acrilamida/bisacrilamida (16,5 %) com tampão Tris-HCl 8,45 (composição em anexo A6), formulados de acordo com o método descrito por Schagger e von Jagow (1987).

A proteína das amostras foi precipitada com igual volume de ácido tricloroacético a 20% ($v v^{-1}$) e os respectivos precipitados ressuspensos em tampão de amostra (BioRad, Cat. no. 161-0735) para géis de tricina. Após desnaturação da proteína das amostras (5 min a 90 °C) carregaram-se os géis com 20 μ l de amostra. Utilizaram-se marcadores de baixo peso molecular da SIGMA (Ultra Low Range Molecular Weight M.W. 1,060-26,600; Cat.no. M3546) que foram diluídos 1:20 em tampão de amostra e sujeitos ao mesmo tratamento de desnaturação utilizado para as amostras.

As electroforeses foram efectuadas no sistema Mini-Protean3 (Mini Trans-Blot System, Bio-Rad), aplicando uma voltagem de 120 volts durante 2h e um tampão de corrida Tris/Tricina/SDS pH 8,3 (Bio Rad, Cat.no. 161-0744). Os géis foram revelados pelo método de "Silver Staining" e fotografados.

III Resultados e discussão

III.1 Fermentação mista de *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora guilliermondii* e fermentações simples *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora guilliermondii*

A primeira fase deste trabalho consistiu na realização duma fermentação mista de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e *Hanseniaspora guilliermondii* (Hg) em condições enológicas. O meio de crescimento foi inoculado com cerca de 1×10^6 UFC ml^{-1} de cada estirpe. Analisou-se o perfil de células viáveis de ambas as leveduras durante os primeiros 4 dias de fermentação, bem como o consumo de açúcares e produção de etanol (**Figura III.1-A, B**). A microvinificação mista Sc/Hg efectuou-se em mosto sintético (MS) que simula a composição química de mosto de uva.

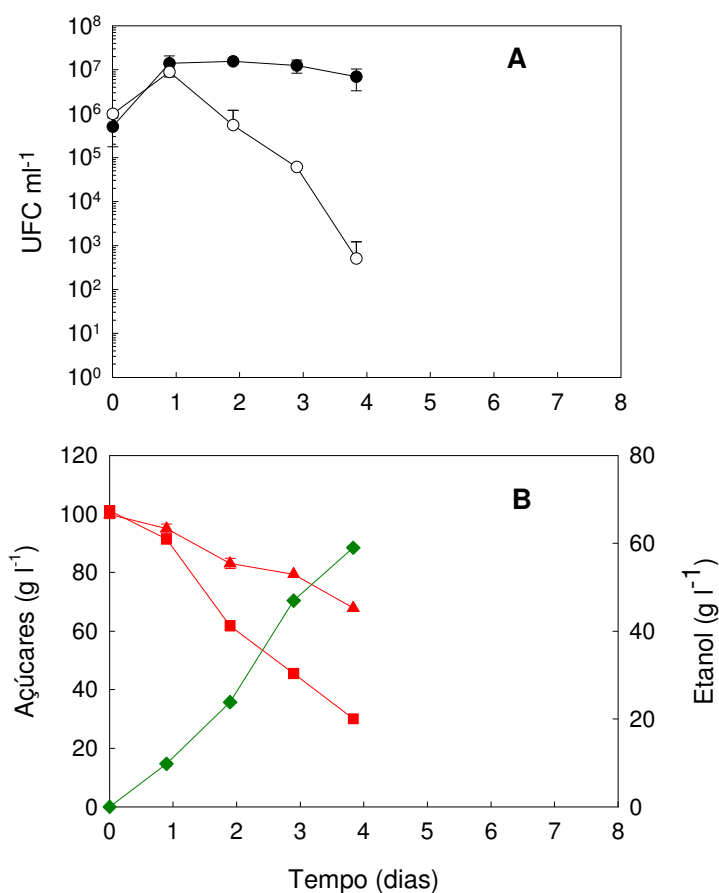


Figura III.1: Evolução das células viáveis (A) de *S. cerevisiae* (●) e *H. guilliermondii* (○), consumo de glucose (■) e frutose (▲) e produção de etanol (◆) (B) durante a microvinificação mista efectuada em mosto sintético.

Os resultados apresentados na **Figura III.1-A** mostram que durante o 1º dia ambas as leveduras aumentam a sua densidade celular, sendo contudo o aumento mais demarcado na levedura Hg. Após este período (1º dia), a levedura Hg começou a morrer e a sua densidade celular diminuiu de $8,9 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ no 1º dia para $5,0 \times 10^2$ UFC ml⁻¹ no 4º dia. A levedura Sc atingiu $1,4 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ ao fim do 1º dia de crescimento, entrando em fase estacionária de crescimento e mantendo a densidade celular durante os restantes dias da microvinificação.

O comportamento fermentativo das leveduras durante esta microvinificação mista Sc/Hg está representado na **Figura III.1-B**. Durante os 4 dias da microvinificação mista foram consumidos 103 g l⁻¹ dos 201 g l⁻¹ de açúcares inicialmente presentes no MS e produzidos 59 g l⁻¹ de etanol. A quantidade de glucose consumida, 71 g l⁻¹, foi superior à de frutose, 32 g l⁻¹, o que significa que a levedura Sc foi a principal responsável pelo consumo dos açúcares do meio, visto este ser um perfil de consumo glucófilico característico desta espécie.

Foram também efectuadas microvinificações simples das estirpes Sc e Hg nas mesmas condições de crescimento utilizadas para a microvinificação mista Sc/Hg, estando os respectivos perfis de células viáveis, consumo de açúcares e produção de etanol representados na **Figura III.2**. Tal como no cultivo misto Sc/Hg, as leveduras Sc e Hg em cultivo simples também demonstraram aumento da densidade populacional durante o primeiro dia de fermentação (**Figura III.2-A**).

A levedura Hg em cultivo simples (**Figura III.2-A**) atingiu uma densidade celular mais elevada ($8,3 \times 10^7$ UFC ml⁻¹) que em cultivo misto ($1,4 \times 10^7$ UFC ml⁻¹) (**Figura III.1-A**) tendo mantido esse valor até ao 2º dia. Aos 4 dias de fermentação, a levedura Hg apresenta uma densidade celular de 3×10^6 UFC ml⁻¹ em cultivo simples e de apenas $5,0 \times 10^2$ UFC ml⁻¹ em cultivo misto. A levedura Sc apresentou um perfil de células viáveis durante o cultivo simples (**Figura III.2-A**) muito semelhante ao exibido durante o crescimento misto (**Figura III.1-A**), tendo aumentado a densidade celular de $1,1 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ para $1,4 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ durante o primeiro dia de fermentação e mantido a densidade celular até ao 4 dia de fermentação.

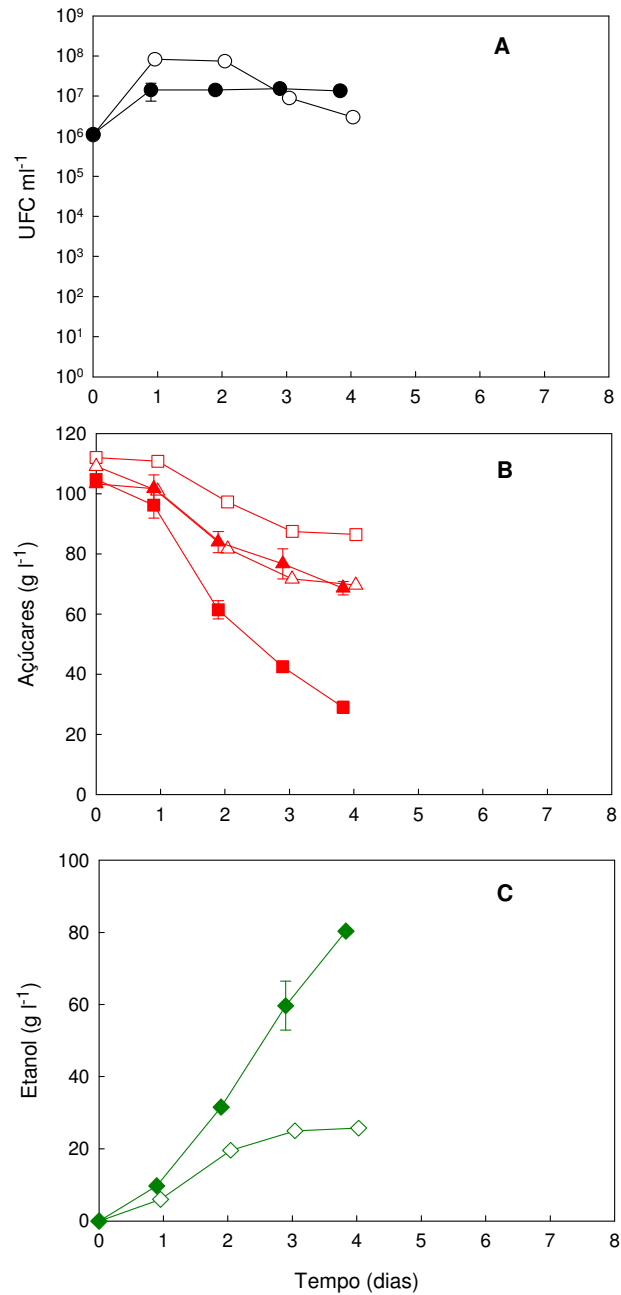


Figura III.2: Evolução das células viáveis (●,○) (A), do consumo de glucose (■,□) e frutose (▲,△) (B) e da produção de etanol (◆,◇) (C) durante as microvinificações simples de *S. cerevisiae* (símbolos a cheio) e *H. guilliermondii* (símbolos vazios) efectuadas em mosto sintético.

Quanto ao perfil de consumo de açúcares, glucose e frutose, as leveduras Sc e Hg exibiram durante as respectivas microvinificações simples (**Figura III.2-B**) o comportamento característico de cada espécie. As leveduras Sc são tipicamente glucofílicas, o que significa que assimilam preferencialmente glucose, tendo esta estirpe consumido 76 g l^{-1} de glucose e apenas 35 g l^{-1} de frutose. Por sua vez, a levedura Hg, tipicamente frutofílica (consumo preferencial de frutose) consumiu 40 g l^{-1} de frutose e apenas 26 g l^{-1} de glucose. A Sc consumiu uma quantidade muito superior de açúcares totais (110 g l^{-1}) à consumida pela Hg (65 g l^{-1}), o que se traduziu numa produção de etanol muito superior também (80 g l^{-1} para Sc e 26 g l^{-1} para Hg), (**Figura III.2-C**).

As espécies de leveduras não-*Saccharomyces* (NS) apresentam em regra menor capacidade fermentativa do que as espécies *Saccharomyces* e a produção de maior quantidade de metabolitos secundários que podem ser benéficos ou prejudiciais ao sabor e aroma do vinho (Romano *et al.*, 1997; Ciani e Maccarelli, 1998; Henick-Kling *et al.*, 1998). Representando a morte precoce de algumas leveduras NS uma restrição à produção de compostos que melhoram as propriedades organolépticas do vinho (Ciani *et al.*, 2006).

A morte de leveduras NS em cultivos mistos com *S. cerevisiae* é geralmente associada à sua intolerância ao etanol. Contudo, e como podemos ver comparando os resultados apresentados nas **Figuras III.2-A e III.2-C**, a quantidade de etanol produzida pela Hg ao fim de 4 dias de cultivo simples, 26 g l^{-1} , foi muito superior aos 10 g l^{-1} de etanol (**Figura III.1-A**) presentes na microvinificação mista Sc/Hg no início da morte (1 dia) da levedura Hg. Este resultado está de acordo com resultados anteriormente obtidos para esta e outras leveduras do género *Hanseniaspora* (Pérez-Nevado *et al.*, 2006; Pina *et al.*, 2004), em que se comprovou que as leveduras apresentam uma tolerância ao etanol superior à que anteriormente era dada como responsável pela sua morte em cultivo misto com *S. cerevisiae*.

H. guilliermondii é uma espécie de levedura, designada por apiculada devido à morfologia das suas células em forma de limão, que apresenta um comportamento frutofílico (assimilação preferencial de frutose em relação à glucose) e que pertence à microflora inicial dos mostos de uva (Fleet e Heard, 1993; Ciani e Faticenti, 1999). As leveduras pertencentes ao género *Hanseniaspora* representam cerca de 50-75% da população de leveduras presentes na uva, assegurando o arranque de fermentação e as primeiras fases do processo fermentativo (4-5 °alcoólicos) durante as fermentações espontâneas (Fleet e Heard, 1993).

A presença de espécies NS com menor capacidade fermentativa diminui a produção de etanol mas pode melhorar as características organolépticas do vinho (Ciani *et al.*, 1998; Ciani e Fatichenti, 1999; Romano *et al.*; 1997), existindo referências a estirpes do género *Hanseniaspora* como contribuindo de forma positiva para o aroma e sabor do vinho (Romano *et al.*, 1997, Fleet *et al.*, 2003). Contudo, e como se pode ver na microvinificação mista Sc/Hg realizada, cujos resultados são semelhantes aos obtidos anteriormente para as mesmas condições e estirpes (Pérez-Nevado *et al.*, 2006; Albergaria, 2007), a levedura Hg começa a morrer ao fim de 1-2 dias de fermentação mista com Sc. Este perfil apesar de diferente do existente em fermentações espontâneas em mosto de uva, mostra em condições de laboratório o comportamento que a levedura tem em cultivo misto com Sc. Os diversos estudos efectuados sobre a dinâmica populacional das leveduras durante vinificações espontâneas tem mostrado que estirpes não-*Saccharomyces* pertencentes à microflora inicial dos mostos de uvas, nomeadamente as pertencentes ao género *Hanseniaspora*, crescem durante os primeiros dias de fermentação (3 a 4 dias) mas em seguida são substituídas por estirpes de Sc que passam a dominar o processo fermentativo (Fleet e Heard, 1993; Romano *et al.*, 1997; Pretorius, 2000).

O conhecimento mais aprofundado da dinâmica de morte das leveduras NS permite um melhor controlo da população de leveduras NS em fermentações vínicas, quer a sua influência seja benéfica ou prejudicial, tornando-se um potencial instrumento para a melhoria das práticas vínicas. A origem da dinâmica de morte de leveduras NS em cultivo misto com *S. cerevisiae* tem interesse e tem sido objecto de estudos recentes (Hansen *et al.*, 2001; Nissen e Arneborg, 2003; Nissen *et al.*, 2003, Pérez-Nevado *et al.*, 2006, Albergaria *et al.*, 2008).

Estudos recentes (Pérez-Nevado *et al.*, 2006) mostraram que a morte prematura da levedura Hg durante fermentações mistas com Sc não resulta dos factores usualmente referidos na literatura, como sejam limitações nutricionais, falta de oxigénio, baixos valores de pH, fraca tolerância ao etanol ou factor “*Killer*”, mas sim de substâncias tóxicas ainda não identificadas que são produzidas pela Sc quando esta atinge elevadas densidades celulares ($>10^6$ UFC ml⁻¹). Trabalho posterior (Albergaria, 2007; Albergaria *et al.*, 2008) mostrou que esses compostos tóxicos são de natureza proteica sendo o seu efeito letal inactivado após tratamento com proteases. Além disso, a análise dos perfis proteicos de sobrenadantes mistos (SM) (Sc/Hg) e simples (SS) (Hg) mostrou a existência dum pequeno péptido de 3,5 kDa nos sobrenadantes que induzem a morte da Hg (SM-4d), que estava ausente dos sobrenadantes onde a Hg era capaz de crescer. Este resultado deu uma indicação de que o péptido de 3,5 kDa poderia ser um dos compostos tóxicos produzidos pela Sc e que poderia ter um

efeito antimicrobiano contra a Hg. Com o objectivo de testar quais as substâncias proteicas que poderiam ter uma acção antimicrobiana no crescimento da Hg, realizaram-se cultivos simples de Hg em SM ultrafiltrados através de membranas de 2 e 10 kDa, respectivamente.

Os resultados mostraram que no ultrafiltrado onde se removeram os compostos de peso molecular superior a 10 kDa (ultrafiltrado <10 kDa) não houve alteração do perfil de morte celular mas que no ultrafiltrado <2 kDa o efeito de morte foi menos pronunciado que o observado no SM. Estes resultados preliminares indicaram que a fracção do SM contendo substâncias com peso molecular entre 2-10 kDa deveriam conter substâncias com acção inibidora do crescimento da Hg (Abergaria *et al.*, 2008).

Tendo por base os conhecimentos anteriormente descritos, no presente trabalho realizaram-se experiências com o objectivo de confirmar o efeito inibitório das diferentes fracções proteicas (>2 kDa, >10 kDa e (2–10) kDa) obtidas a partir de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) no crescimento de diferentes de leveduras NS.

III.2 Estudo do efeito inibitório de diferentes fracções proteicas de sobrenadantes mistos no crescimento de *Hanseniaspora guilliermondii*

Com o objectivo de estudar o efeito inibitório das diferentes fracções proteicas de sobrenadantes mistos (SM-4d) no crescimento da levedura Hg, efectuaram-se cultivos simples de Hg em mosto sintético modificado (MSmod1), com e sem adição das respectivas fracções concentradas (>2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa). O MSmod1 foi preparado de modo a conter uma concentração de açúcares (100 g l⁻¹) e etanol (45 g l⁻¹) semelhante à existente no SM-4d e as fracções foram adicionadas para simularem a quantidade de fracção proteica presente no SM-4d.

Na **Figura III.3** apresentam-se os perfis de células viáveis de Hg obtidos para os cultivos efectuados. Em ambas as experiências efectuadas (**A e B**) verificou-se que a adição de qualquer das fracções concentradas (>2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa) ao MSmod1 inibiu o crescimento da Hg por comparação com o crescimento exibido no mesmo meio sem adição das fracções (MSmod1). Estes resultados confirmaram a existência de compostos inibitórios na fracção proteica do SM-4d, mas não permitiram distinguir o poder inibitório das diferentes fracções. Na verdade, estes resultados não suportam os dados anteriormente obtidos por Albergaria *et al.* (2007) que tinham mostrado que removendo do SM-4d a fracção proteica >10 kDa não ocorria alteração do perfil de morte da Hg, enquanto que ultrafiltrados <2 kDa permitiam que a levedura Hg mantivesse uma viabilidade celular superior à observada no SM-4d não ultrafiltrado.

As experiências realizadas mostraram ainda que a levedura Hg é capaz de crescer num meio contendo 45 g l⁻¹ de etanol, embora o seu crescimento tenha sido inibido por comparação com o crescimento que apresentou no MS sem etanol (**Figura III.2-A**).

Na **Figura III.3-A** apresenta-se também o perfil de células viáveis de Hg num cultivo efectuado em SM-4d. A comparação deste perfil com os perfis exibidos nos cultivos efectuados em MSmod1 com adição das diferentes fracções proteicas (**Figuras III.3-A e B**) mostra claramente que embora as fracções proteicas inibam o crescimento de Hg não induzem a sua morte total, como se verifica no caso do SM-4d (morte total ao fim de 4-5 dias). Estes resultados mostram que o SM-4d possui para além dos compostos proteicos outros compostos tóxicos, que em conjunto ou não com a fracção proteica, induzem a morte da levedura.

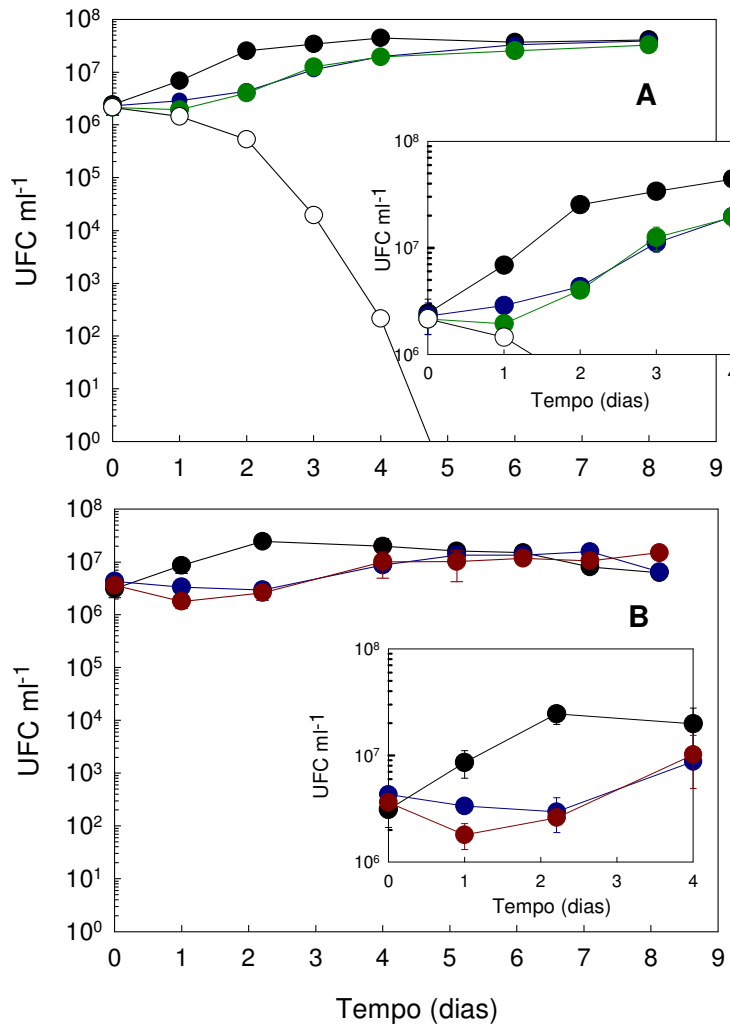


Figura III.3: Células viáveis de *H. guilliermondii* durante cultivos realizados em MSmod1 (●), em Msmo1 contendo a fracção proteica >10 kDa (●), em MSmod1 contendo a fracção proteica >2 kDa (●) e num SM-4d (○) (A); Células viáveis de *H. guilliermondii* durante cultivos realizados em MSmod1 (●), em Msmo1 contendo a fracção proteica >10 kDa (●) e em Msmo1 contendo a fracção proteica (2-10) kDa (●) (B).

A proporção entre o número de células viáveis de Hg presentes no cultivo efectuado em MSmod1 com adição da fracção proteica e sem adição de fracção

encontra-se representada na **Figura III.4**. Os resultados mostram que o efeito inibitório de todas as fracções (>2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa) é maior durante os primeiros 2 dias de cultivo (**Figura III.4-A e B**). No caso das fracções >2 kDa e >10 kDa o número de células viáveis presentes nos respectivos cultivos ao fim de 2 dias correspondia apenas a 20% do número de células viáveis no cultivo em MSmod1 e no caso da fracção (2-10) kDa apenas 10%. Após o 2º dia de cultivo a proporção de células viáveis entre o MSmod1 com fracção e sem fracção aumentou o que significa que as células sofreram um processo de adaptação (2 dias) após o qual parecem ter sido capazes de tolerar os compostos tóxicos presentes no meio.

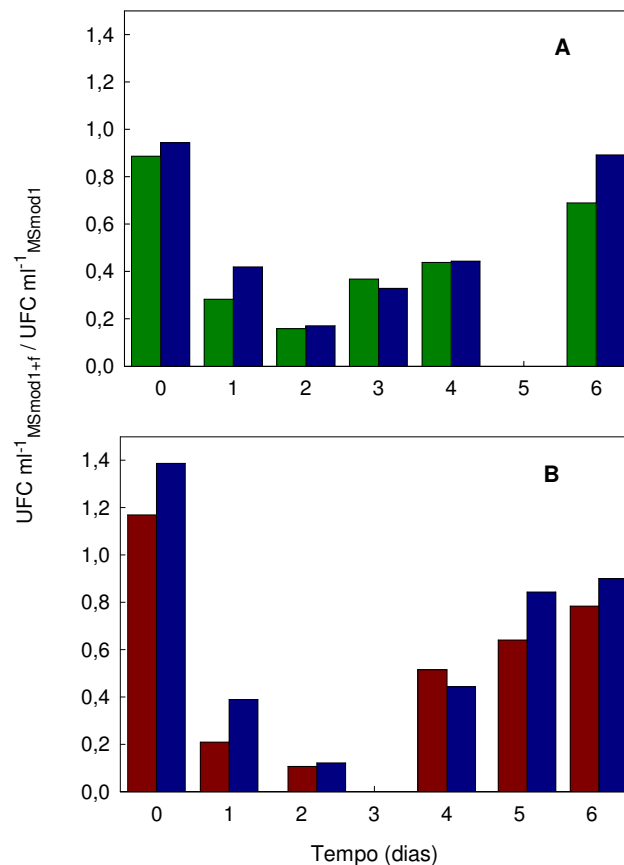


Figura III.4: Proporção de células viáveis de *H. guilliermondii* em cultivos efectuados em MSmod1 com adição das fracções >10 kDa (■) e >2 kDa (■) (**A1**) e com adição de fracções >10 kDa (■) e (2-10) kDa (■) (**B1**) em relação a cultivos efectuados em MSmod1 sem fracções.

A evolução do consumo de açúcares e produção de etanol durante os cultivos efectuados no MSmod1 com e sem adição das fracções mostra que existe uma relação entre a evolução das células viáveis de Hg (**Figura III.3-A, B**) e os respectivos perfis de consumo de açúcares e produção de etanol (**Figura III.5-A,B**). Efectivamente verifica-se que o consumo de açúcares e a produção de etanol está inibida durante os primeiros dias de cultivo (2-3 dias), e só depois se verifica algum consumo de açúcares, sendo este consumo sempre maior no meio sem fracção (MSmod1) do que nos cultivos contendo qualquer uma das fracções.

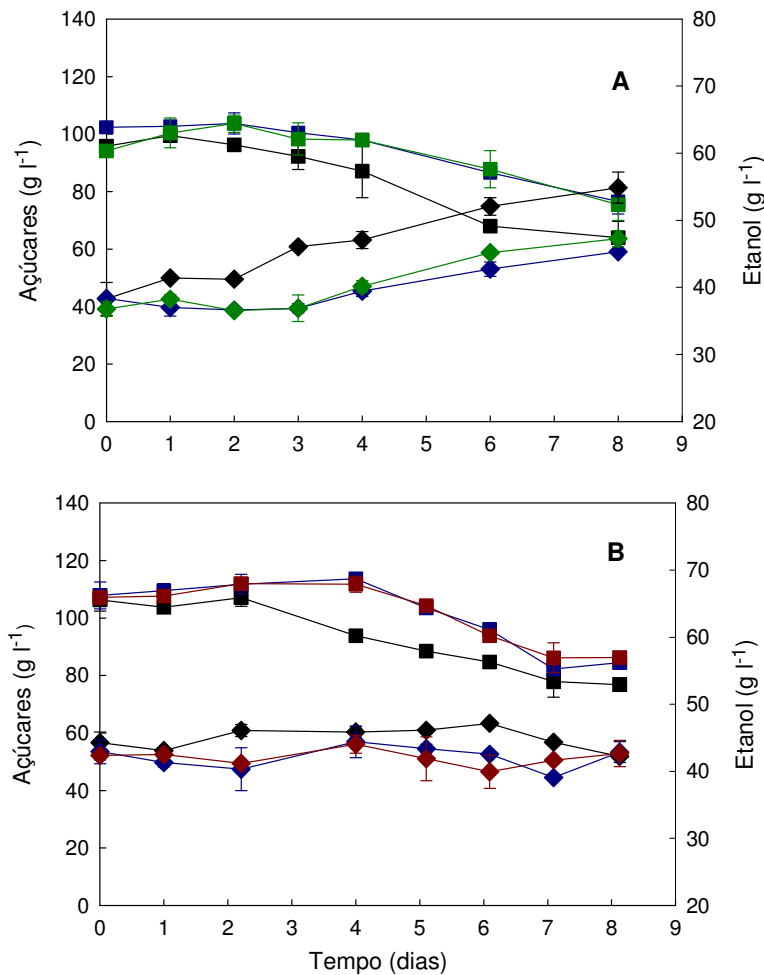


Figura III.5: Evolução do consumo de açúcares (□) e produção de etanol (◇) durante cultivos de *H. guilliermondii* realizados em MSmod1 (■, ◆), em MSmod1 contendo as fracções >10 kDa (■, ◆) e > 2 kDa (■, ◆) (**A**); em MSmod1 (■, ◆), em MSmod1 contendo as fracções >10 kDa (■, ◆) e (2-10) kDa (■, ◆) (**B**).

Na experiência representada na **Figura III.5-A**, a levedura Hg mostrou maior produção de etanol e consumo de açúcares em MSmod1 que em MSmod1 com adição das diferentes fracções. O perfil de consumo de açúcar e produção de etanol da levedura Hg é muito idêntico nos meios com as várias fracções proteicas, correspondendo o início do consumo de açúcares e produção de etanol, à recuperação no número de células viáveis observada a partir do 2º dia (**Figura III.4-A**).

Na experiência representada na **Figura III.5-B**, o MSmod1 continha uma quantidade de etanol superior (43 g l^{-1}) à presente na experiência anterior (38 g l^{-1}). Esta diferença pode justificar que neste caso a levedura Hg não tenha sido capaz de produzir etanol no MSmod1 sem fracção (**Figura III.5-B**), apesar do seu perfil de consumo de açúcares ser muito semelhante em ambos os meios com fracção considerados.

Considerando que os presentes resultados contrariam os anteriormente obtidos (Albergaria *et al.*, 2008) quanto à ausência de compostos inibitórios na fracção proteica $>10 \text{ kDa}$ e a hipótese da existência de um pequeno péptido de $3,5 \text{ kDa}$ nos SM-4d, foi-se testar a eficiência das membranas quanto à sua capacidade para reterem selectivamente todas as substâncias de peso molecular superior ao indicado. Efectuaram-se electroforeses em géis de Tricina (SDS-PAGE) para as diferentes fracções concentradas, $>10 \text{ kDa}$; $>2 \text{ kDa}$ e $(2-10) \text{ kDa}$ do SM-4d. A análise dos perfis proteicos exibidos no gel (**Figura III.6**) para as diferentes fracções permitiu concluir que os sistemas de membranas utilizados para ultrafiltrar e concentrar as fracções (Vivaspin 15-R, Sartorius, Alemanha) não é suficientemente selectivo pois em todas as fracções aparece uma banda de peso molecular inferior a $6,5 \text{ kDa}$. Esta constatação compromete as conclusões que se poderiam retirar dos cultivos realizados com as diferentes fracções proteicas (**Figura III.3-A,B**).

Na **Figura III.6** apresenta-se o gel de Tricina efectuado com as fracção $> 2 \text{ kDa}$ de sobrenadante simples Sc (poço1) e com as fracções de sobrenadantes mistos de Sc/Hg com 4 dias (SM-4d), usadas anteriormente, $>2\text{kDa}$ (poço 2), $(2-10) \text{ kDa}$ (poço 3) e $> 10 \text{ kDa}$ (poço 4). Os perfis apresentados demonstram a existência de uma banda inferior a $6,5 \text{ kDa}$ para todas as fracções usadas nas experiências anteriores. A presença da banda de baixo peso molecular, abaixo do marcador de $6,5 \text{ kDa}$, parece corresponder à banda anteriormente detectada nos SM-4d de Sc/Hg (Albergaria *et al.*, 2008). A presença desta banda na fracção $>10 \text{ kDa}$ (poço 4) mostra que a selectividade das membranas utilizadas não é suficiente para eliminar completamente

substâncias de peso molecular inferior ao “*cut-off*” da membrana, pelo que das experiências efectuadas neste ponto do trabalho apenas se pode dizer que as fracções proteica dos SM-4d (Sc/Hg) contêm substâncias inibidoras do crescimento da levedura Hg.

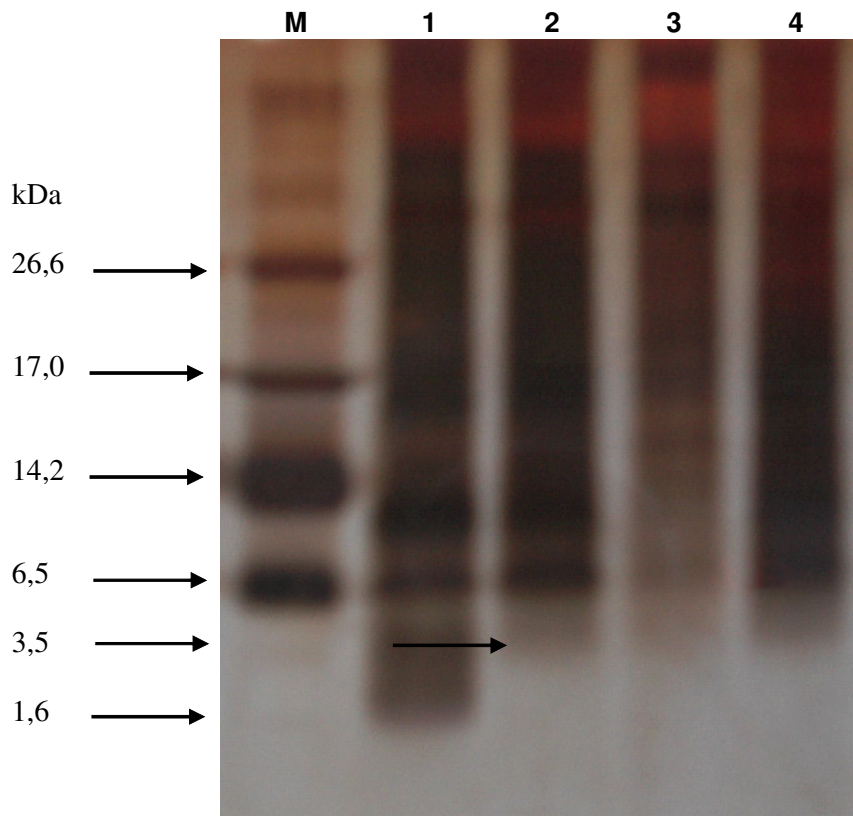


Figura III.6: Gel de Tricina SDS-PAGE (16,5%) revelado em “Silver Staining”; M– Marcador molecular (sigma); 1– Fracção conc. >2 kDa obtida dum SS-4d (Sc); 2– Fracção conc. >2 kDa obtida dum SM-4d (Sc/Hg); 3– Fracção conc. (2-10) kDa obtida dum SM-4d (Sc/Hg); 4– Fracção conc >10 kDa obtida dum SM-4d (Sc/Hg).

III.3 Avaliação do efeito de morte de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) em diferentes espécies não-*Saccharomyces*

Tendo o conhecimento prévio que o sobrenadante misto (Sc/Hg) pré-fermentado durante 4 dias (SM-4d) é indutor da morte da levedura Hg (**Figura 3-A**), neste ponto experimental pretendeu-se estudar o seu efeito noutras espécies de leveduras NS.

Na **Figura III.7** estão representados os perfis de células viáveis de cultivos simples de 6 estirpes de leveduras NS associadas a fermentações vinárias, *H. guilliermondii* (Hg2), *H. uvarum* (Hu), *Kluyveromyces marxianus* (Km), *K. thermotolerans* (Kt), *Torulaspora delbrueckii* (Td) e *Zygosaccharomyces bailii* (Zb), efectuados no SM-4d. O perfil de células viáveis mostra a morte de todas as leveduras NS exceptuado a levedura Zb que manteve aproximadamente a mesma densidade celular desde o momento de inoculação até ao final do cultivo (9º dia).

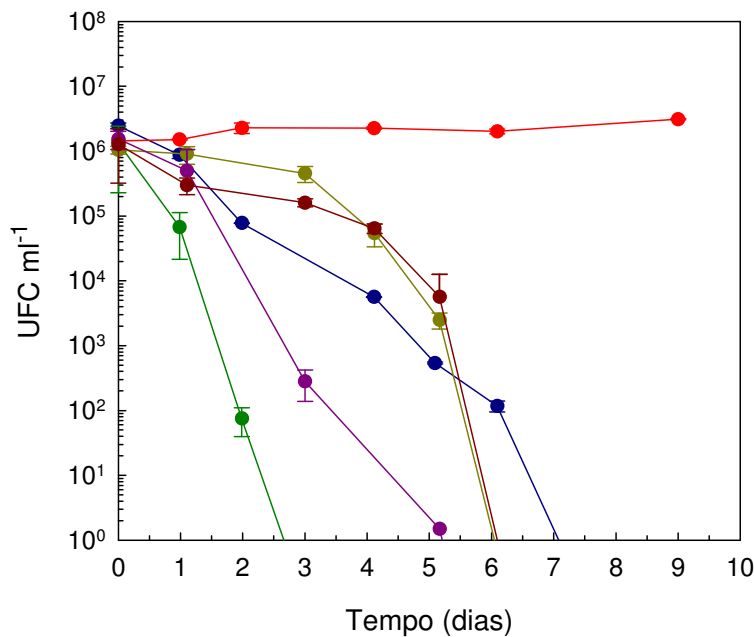


Figura III.7: Evolução da densidade celular das leveduras *H. guilliermondii* (●), *H. uvarum* (●), *Kluyveromyces marxianus* (●), *K. thermotolerans* (●), *Torulaspora delbrueckii* (●) e *Zygosaccharomyces bailii* (●), durante cultivos efectuados num sobrenadante misto (Sc/Hg) pré-fermentado durante 4 dias.

Os resultados apresentados na **Figura III.7** mostram ainda que as leveduras apresentam diferentes taxas de morte. A levedura Hu foi aquela que apresentou uma taxa de morte mais acentuada, tendo ocorrido morte total ao fim de 3 dias. Seguidamente foi a levedura Km aquela que apresentou uma morte mais rápida (morte total ao fim de 5 dias) e depois as leveduras Kt e Td que morreram ao 6º dia. A estirpe Hg2 perdeu totalmente a sua viabilidade celular ao fim de 7 dias, o que foi uma taxa de morte mais lenta que a observada anteriormente para a estirpe Hg NCYC 2380 (**Figura III.3-A**). Este resultado evidencia que a taxa de morte observada depende da estirpe em causa podendo variar dentro da mesma espécie.

Os resultados mostraram que o SM-4d induziu a morte celular, embora a diferentes taxas, de todas as estirpes de leveduras NS estudadas, exceptuado a levedura Zb. Na verdade, os estudos realizados sobre a dinâmica populacional de vinificações espontâneas mostram que entre as espécies de leveduras NS testadas aquela que é mais frequentemente encontrada em mostos no final da fermentação é a Zb, levedura que é considerada um contaminante do vinho (Sousa *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2008).

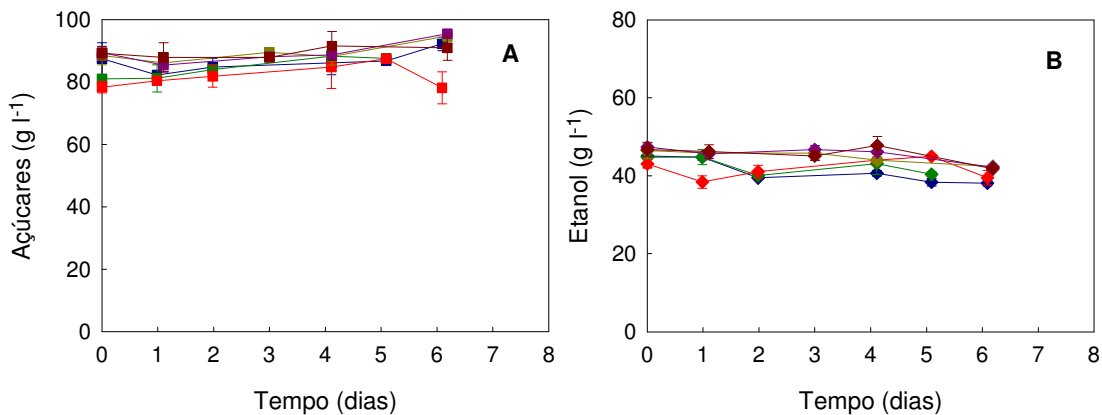


Figura III.8: Concentração de açúcares (A) e etanol (B) durante os cultivos das leveduras *H. guilliermondii* (■, ◆), *H. uvarum* (■, ◆), *Kluyveromyces marxianus* (■, ◆), *K. thermotolerans* (■, ◆), *Torulaspora delbrueckii* (■, ◆) e *Zygosaccharomyces bailii* (■, ◆), efectuados em sobrenadantes mistos (Sc/Hg), pré-fermentados durante 4 dias.

No que respeita ao consumo de açúcares e produção de etanol (**Figura III.8**), pode observar-se que nenhuma levedura estudada apresentou consumo de açúcares e produção de etanol. A levedura Zb, apesar de manter a sua densidade celular constante (**Figura III.7**) não apresentou consumo de açúcares e produção de etanol (**Figura III.8**), sugerindo que o metabolismo fermentativo se encontra inibido.

A levedura *Z. bailii* é conhecida como uma levedura contaminante de alimentos, com capacidade de sobreviver a ambientes de stress, como sejam elevadas concentrações de ácidos e etanol como as existentes num vinho (Sousa *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2008).

A morte das leveduras depende de vários factores existindo indícios de que as leveduras a crescerem em meios com aumento progressivo de etanol e metabolitos tóxicos apresentam uma adaptação às condições do meio que pode influenciar a sua resistência a condições adversas do meio e o seu perfil de morte. No estudo de Santos *et al.* (2008), por exemplo, demonstrou-se que a capacidade de consumo de frutose por Td variava de acordo com as condições do pré-inóculo. No caso dos cultivos efectuados neste trabalho nenhuma das leveduras estudadas foi sujeita a uma pré-adaptação ao meio e deste modo a sua morte pode ter resultado da súbita exposição a condições adversas como a concentração de etanol, de ácidos orgânicos e outros compostos tóxicos como os compostos proteicos anteriormente identificados.

Apesar do estudo efectuado provar que o sobrenadante misto tem a capacidade de induzir a morte a outras leveduras NS (Hg2, Hu, Km, Kt e Td), não permite afirmar que o factor proteico identificado anteriormente (Albergaria *et al.*, 2008) é o responsável pela morte das leveduras estudadas. No próximo ponto experimental, estuda-se portanto o efeito que a fracção proteica > 2 kDa tem no crescimento de outras leveduras NS.

III.4 Efeito inibitório da fracção proteica de sobrenadantes mistos (Sc/Hg) no crescimento das leveduras não-*Saccharomyces*: *Kluyveromyces marxianus*, *K. thermotolerans* e *Torulaspota delbrueckii*

No ponto anterior deste trabalho (secção III.3) verificou-se que o efeito de morte induzido pelo sobrenadante misto (Sc/Hg) pré-fermentado durante 4 dias (SM-4d) não é exclusivo para a levedura *H. guilliermondii*, mas também ocorreu para outras leveduras NS (Hu, Km, Kt e Td). Por essa razão, foi-se estudar o efeito da adição da fracções proteica (SM-4d) >2 kDa a um mosto sintético modificado (MSmod2) no crescimento das leveduras não-*Saccharomyces*, *Kluyveromyces marxianus* (Km), *K. thermotolerans* (Kt) e *Torulaspota delbrueckii* (Td). O MSmod2 foi preparado para simular as quantidades de açúcar (100 g l^{-1}), etanol (60 g l^{-1}) e ácido acético ($0,6 \text{ g l}^{-1}$) presentes no SM-4d (Sc/Hg) e, tal como para no ponto experimental III.2, a fracção foi adicionada para simular a quantidade de proteína presente no SM-4d (Sc/Hg).

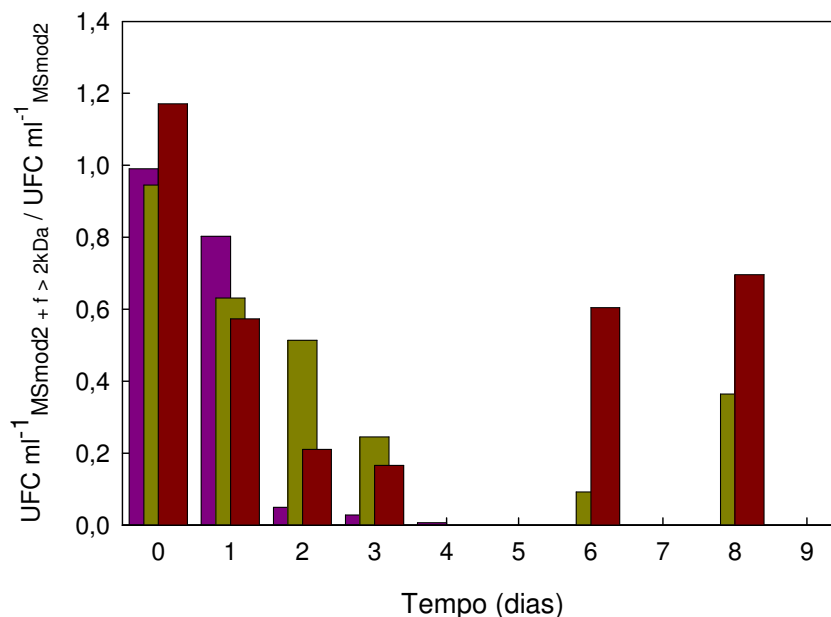


Figura III.9: Proporção de células viáveis de *K. marxianus* (■), *K. thermotolerans* (■) e *T. delbrueckii* (■) nos cultivos efectuados em MSmod2 contendo a fracção (SM-4d) >2 kDa e relativamente aos cultivos efectuados no MSmod2 sem fracção.

Na **Figura III.9**, está representada a proporção de células viáveis de cada levedura em MSmod2 com fracção (> 2 kDa) e em MSmod2 sem fracção. A levedura Km mostrou uma diminuição sucessiva da proporção de células viáveis em MSmod2 com fracção relativamente ao MSmod2, visível também no seu perfil de células viáveis (**Figura III.10-A**) e na quantidade de células viáveis presentes em cada meio no final da experiência ($3,1 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ em MSmod2 e $1,2 \times 10^3$ UFC ml⁻¹ em MSmod2 com fracção). A levedura Kt mostrou uma diminuição da proporção de células viáveis entre os dois meios até ao 6º dia altura em inverteu esta tendência. A levedura Td, por sua vez, apresentou uma diminuição mais acentuada na proporção de células viáveis no meio contendo a fracção do que a levedura Kt até ao 3º dia, contudo a partir deste ponto esta tendência inverteu-se.

O perfil de células viáveis, de consumos de açúcares e produção de etanol para cada uma das leveduras estudadas está representado na **Figura III.10 (painéis A a F)**. Na **Figura III.10-A**, pode ver-se que apesar da levedura Km ter sido capaz de crescer em MSmod2, a sua densidade celular diminuiu durante o 1º dia, de $2,5 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ para $7,1 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ tendo-se verificado a existência duma fase de latência durante os primeiros 3 dias de cultivo. A partir desse período a levedura foi capaz de crescer e aumentou a sua densidade celular para valores próximos de 10^8 UFC ml⁻¹. A adição da fracção proteica do SM-4d induziu, por sua vez, a diminuição da densidade celular da levedura visível na perda de viabilidade celular de $2,5 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ iniciais para apenas $1,2 \times 10^3$ UFC ml⁻¹ aos 8 dias de cultivo. O perfil de consumos de açúcares e produção de etanol da levedura Km expresso na **Figura III.10-D**, mostra uma diminuição da quantidade de etanol até ao 8º dia no MSmod2 com fracção e uma diminuição até ao 5º dia no meio MSmod2, sendo que só após o 5º dia se verificou consumo de açúcares no meio sem fracção.

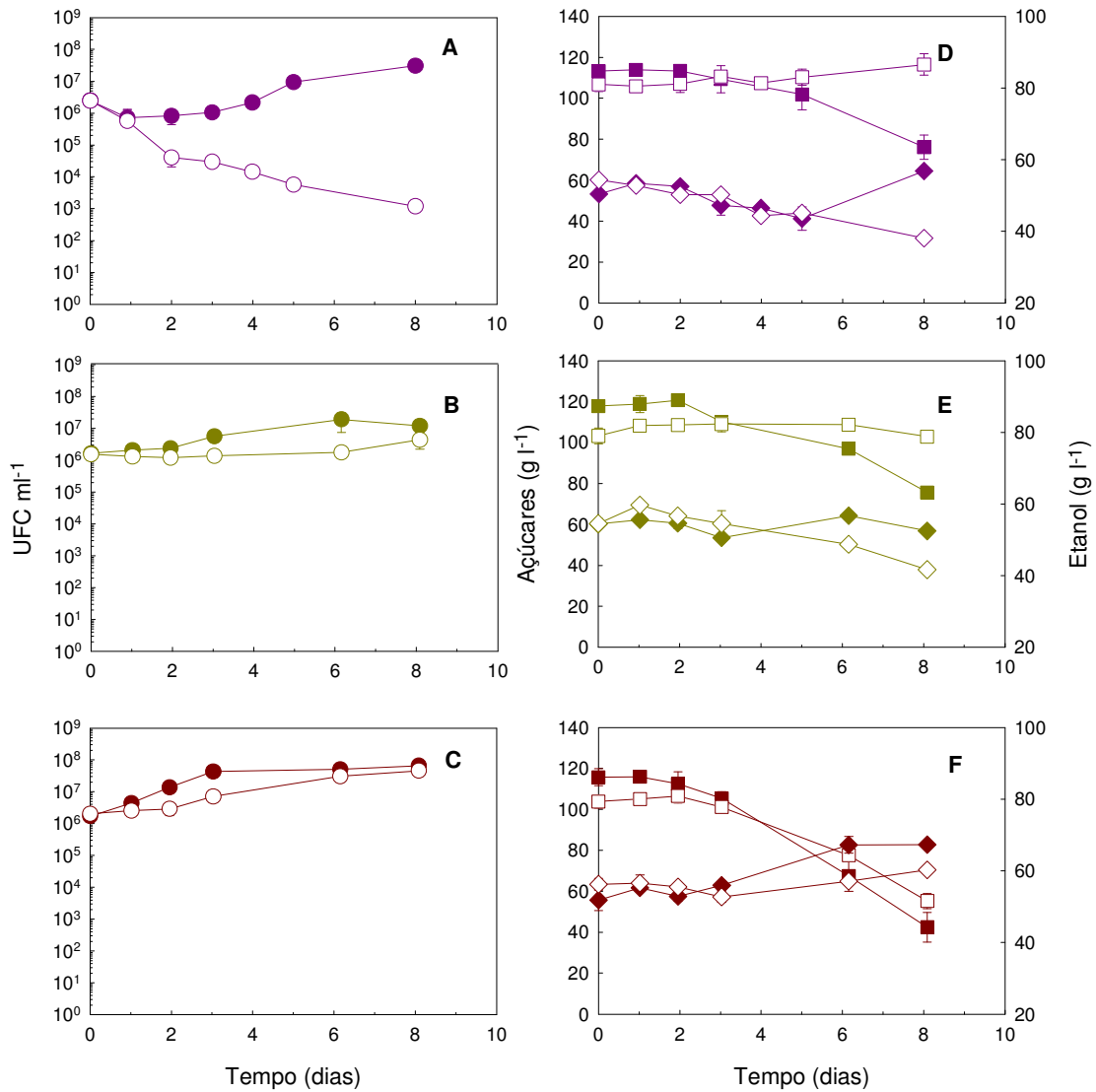


Figura III.10: Células viáveis (●,○), consumo de açúcar (■,□) e produção de etanol (◆,◇) de *K. marxianus* (A e D), *K. thermotolerans* (B e E) e *T. delbrueckii* (C e F) em MSmod2 (símbolos a cheios) e em MSmod2 com adição da fracção >2 kDa (símbolos vazios).

No que respeita ao comportamento da levedura Kt no MSmod2 com e sem fracção (Figuras III.10-B e E), podemos ver que o meio MSmod2 só por si não induziu a perda de viabilidade celular da levedura (Figura III.10-B), mas alterou o seu crescimento,

apresentado a levedura Kt ao fim de 2 dias $2,4 \times 10^6$ UFC ml⁻¹, um valor muito próximo das $1,6 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ presentes no início do cultivo. O crescimento da levedura Kt em MSmod2 com fracção foi muito pouco pronunciado, mantendo-se a densidade celular inicial de $1,6 \times 10^6$ UFC ml⁻¹, praticamente inalterada até ao 6.º dia com $1,8 \times 10^6$ UFC ml⁻¹, e aumentando ligeiramente até ao fim do cultivo (8.º dia) com $4,4 \times 10^6$ UFC ml⁻¹. Comparando as densidades celulares da levedura em ambos os meios é claro que em MSmod2 com fracção existe uma inibição ao crescimento muito mais denotada que em MSmod2, enquanto a levedura em MSmod2 apresenta a densidade celular no último dia de cultivo de $1,2 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ no meio com fracção a sua densidade comprovou ser muito inferior $4,4 \times 10^6$ UFC ml⁻¹. No que respeita o consumo de açúcares presente na **Figura 10-E**, a levedura Kt em MSmod2 apresentou um consumo significativo dos açúcares a partir do 2.º dia, coincidindo com o aumento de células viáveis (**Figura 10-B**), no meio MSmod2 com fracção, por sua vez, não se observa consumo dos açúcares. No que respeitou à produção de etanol (**Figura 10-E**), na levedura Kt em MSmod2 onde existiu consumo significativo de açúcares, a quantidade de etanol é idêntica à presente inicialmente no meio enquanto a levedura Kt em MSmod2 com fracção, onde não houve consumo de açúcares, a quantidade de etanol diminuiu. Este resultado é concordante com o resultado de consumo de açúcares e produção de etanol obtido para Km em MSmod2 com fracção, contudo neste caso não se observou perda da viabilidade celular da levedura.

A levedura Td foi das três leveduras não-*Saccharomyces* estudadas a que apresentou uma melhor adaptação às condições do meio, quer ao MSmod2, quer ao MSmod2 com fracção. A levedura Td em MSmod2 cresceu até ao 3.º dia de cultivo, apresentando inicialmente $1,7 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ de Td e $4,3 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ de Td ao 3.º dia, altura em que a sua densidade celular estabiliza (Figura 10-C). A levedura a crescer em MSmod2 com fracção, apresentou por sua vez inibição do crescimento até ao 2.º dia, visível no ligeiro crescimento de células viáveis, $2,0 \times 10^6$ UFC no início do cultivo e $2,9 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ ao 2.º dia. Na **Figura 10-F** que apresenta o consumo de açúcares e produção de etanol da levedura Td, observa-se que a levedura começa a consumir os açúcares e a produzir etanol a partir do 3.º dia em ambos os meios (MSmod2 e MSmod2 com fracção), sendo contudo mais demarcado o consumo e produção da levedura Hg no MSmod2.

A diminuição da concentração de etanol observada nos cultivos efectuados com as leveduras Km e Kt em MSmod2 contendo a fracção (**Figura III.10-D e F**) provavelmente resulta da evaporação do etanol, visto tratar-se de um composto volátil.

IV Conclusões

O estudo das fermentações mistas *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e *Hanseniaspora guilliermondii* (Hg) e simples Hg e Sc, mostrou um perfil de morte prematura de Hg em cultivo misto a partir do 1º dia, concluindo-se que a presença de Sc induziu a morte de Hg.

Do estudo do efeito inibitório das diferentes fracções proteicas (>2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa) do sobrenadante misto (Sc/Hg) pré-fermentado durante 4 dias (SM-4d) pode-se concluir que as fracções inibiram o crescimento da levedura Hg comparativamente com o crescimento evidenciado pela levedura em mosto sintético modificado (MSmod) contendo 45 g l⁻¹ de etanol inicial. A capacidade de crescimento da Hg no MSmod provou que esta levedura é capaz de crescer num meio contendo 45 g l⁻¹ de etanol mesmo em condições enológicas de crescimento (sem arejamento, pH=3,5 e elevadas concentrações de açúcares). A comparação entre a inibição provocada pelas fracções proteicas no crescimento da Hg e o perfil de morte observado no SM-4d (morte total ao fim de 4-5 dias) permite concluir que no SM-4d existem além dos compostos de natureza proteica, outros compostos que induzem a morte da levedura.

Pode-se igualmente concluir que o sistema de ultrafiltração por membranas não foi suficientemente selectivo uma vez que o perfil proteico da fracção (2-10) kDa apresentou bandas de peso molecular superior a 10 kDa e que a fracção >10 kDa apresentou uma banda inferior a 6,5 kDa. Por esta razão, do estudo do efeito inibitório das diferentes fracções (>2 kDa, >10 kDa e (2-10) kDa) não se puderam tirar conclusões definitivas relativamente a quais das fracções contêm substâncias proteicas com acção antimicrobiana. Como alternativa, sugiro que se utilize um sistema de filtração em gel (Sephadex) para isolar as diferentes fracções proteicas do SM-4d, nomeadamente o péptido de 3,5 kDa anteriormente identificado como potencial agente bioactivo contra a levedura Hg. A adição das diferentes fracções proteicas, do SM-4d, assim obtidas poderia em seguida ser adicionadas ao SM-4d tratado com proteases para se avaliar quais teriam um efeito inibidor no crescimento de Hg.

Da avaliação do efeito de SM-4d (Sc/Hg) em diferentes espécies não-*Saccharomyces* (NS), concluiu-se que o SM-4d induz a morte das leveduras NS: *Hanseniaspora guilliermondii* (Hg), *H. uvarum* (Hu), *Kluyveromyces marxianus* (Km), *K.*

thermotolerans (Kt) e *Torulaspota delbrueckii* (Td) e inibe o metabolismo fermentativo de *Zygosaccharomyces baillii* (Zb). Estes resultados parecem indicar que os compostos tóxicos presentes no SM-4d são activos contra a maioria das espécies NS normalmente presentes na microflora dos mostos de uvas. No entanto, para comprovar este efeito será necessário testar um maior número de estirpes de cada espécie uma vez que a capacidade de resistência poderá variar entre estirpes, tal como se verificou entre as duas estirpes de Hg testadas (NCYC 2380 e um isolado vínico)

Do estudo do efeito antimicrobiano da fracção proteica de sobrenadantes mistos Sc/Hg sobre as leveduras NS: Km, Kt e Td concluiu-se a adição de fracção proteica ($f > 2$ kDa) a mosto sintético modificado (100 g l^{-1} de açúcares, 60 g l^{-1} de etanol e $0,6 \text{ g l}^{-1}$ de ácido acético) induziu perda de viabilidade da levedura Km e inibiu o crescimento das leveduras Kt e Td bem como o seu metabolismo fermentativo. No sentido de aprofundar o efeito que a fracção proteica tem no crescimento destas leveduras sugiro que também neste caso se repita a experiência sujeitando as leveduras a um pré-inoculo que as adapte às condições de toxicidade de etanol e acidez do meio e que em vez da adição destas fracções se adicione o péptido de 3,5 kDa após filtração por gel.

V. Bibliografia

Alexandre, H., Chapentier, C., (1998) Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **20**, 20-27.

Albergaria, Helena, (2007) Physiological Studies of non-*Saccharomyces* Wine-Related Strains in Single and Mixed Cultures with *S. cerevisiae*, Tese de Doutoramento, Univerisidade Católica Portuguesa.

Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., Girio, F., (2008) Growth inhibition of *Hanseniaspora guilliermondii* by proteinaceous compound(s) produced during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. (submetido)

Albergaria, H., Torrão, A. R., Hogg, T., Francisco, M. G., (2003) Physiological behaviour of *Hanseniaspora guilliermondii* in aerobic glucose-limited continuous cultures, *FEMS Yeast Research*, 211-216.

Ansanay-Galeote, V., Blondin, B., Dequin, S., Sablayrolles, J.M., (2001) Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Letters*, **23**, 677-681.

Barnett, J. A., (1998) A History of Research on Yeasts: Work by Chemists and Biologists 1789-1850, *Yeast*, **14**, 1438-1451.

Barnett, J. A., Entian K. D., (2005) A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism, *Yeast*, **22**, 835-894.

Barnett, J. A., Payne, R.W., Yarrow, D., (2000) *Yeasts: Characteristics and identification* 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L., Stryer, L., (2002) In Freeman (ed.), *Biochemistry*. (5th ed.), United States of America, pp. 426-38.

Bisson, L. F., (2004) The Biotechnology of Wine Yeast, *Food Biotechnology*, **18**, 63-96.

Casal, M., Cardoso, H., Leão, C., (1998) Effects of Ethanol and Other Alkanols on Transport of Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Environment Microbiology*, **Feb**, 665-668.

Ciani, M., Fatichenti, F. (1999) Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, **28**, 203-206.

Ciani, M., Maccarelli, F. (1998) Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, **14**, 199-203

Ciani, M., Beco L., Comitini, F., (2006) Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*,

Ciani, M., Fatichenti, F., (2001) Killer Toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a Biopreservative Agent To Control Apiculate Wine Yeasts. *Applied Environment Microbiology*, **67**, 3058-3063

Ciani, M. Pepe, V., (2002) The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 573-578.

Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., Martini, A., (2004) Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **85**, 159-164.

Comitini, F., Ferretti, R., Clementi, F., Mannazzu, I., Ciani, M., (2005) Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, 105-111.

Enrique, M., Marcos, J. F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., Manzanares, P., (2007) Antimicrobial action of peptides towards wine spoilage yeasts, *International Journal of Food Microbiology*, **118**, 318-325.

Fleet, G.H.,(2003) Yeast interactions on wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 11-22.

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

Hansen, E. H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. C., Arneborg, N., (2001) The effect of the oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 541-547.

Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P., (1998) Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast population and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 865-876.

Lopes, A. M., Fonseca, A., (1996) *Biologia Molecular*, Universidade aberta (ed), Portugal, 140-143.

Lustrago, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, M., Ranalli, G., (2006) Scaling-up in industrial winemaking using low-electric current as na alternative to sulfur dioxide addition. *Journal of Applied Microbiology*, **101**, 682-690.

Martini, Alessandro, (2003) Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *International Microbiology*, **6**, 207-209.

Mendes-Ferreira, A., Olmo, M., Garcia-Martínez, J., Jiménez-Martí, E., Mendes-Faia, A., Pérez-Ortín, J. E., Leão, C., (2007) Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Different Nitrogen Concentrations during Alcoholic Fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, **May**, 3049-3060.

Nissen, P., Arneborg, N., (2003) Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.*, **180**, 257-263.

Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., (2003) Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, **20**, 331-341.

Péres-Nevaldo, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F., (2006) Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, **108**, 336-345.

Pérez, F., Regodón, J.A. Valdês, M.E., De Miguel, C., Ramirez, M., (2000) Cycloheximide resistance as a marker for monitoring yeasts in wine fermentations. *Food Microbiology*, **17**, 119-128

Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., Hogg, T., (2004) Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeast in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-influence of different culture conditions. *Food Microbiology*, **21**, 439-447.

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

Romano, P., Suzzi, G., Dominizio, P., Fatichenti, F., (1997) Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains Strain diversity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Antoine Van Leewenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **71**, 239-242. *

Santos, J., Sousa, M. J., Cardoso, H., Inácio, J., Silva, S., Spencer-Martins, I., Leão, C., (2008) Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology*, **154**, 422-430.

Shagger, H., and von Jagow, G., (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166**, 368-379.

Sousa, M.J., Miranda, L., Côrte-Real, M., Leão, C., (1996) Transport of Acetic Acid in *Zygosaccharomyces bailii*: Effects of Ethanol and Their Implications on the Resistance of the Yeast to Acidic Enviroments, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **Sept.**, 3152-3157.

Anexos

A1. Composição do meio Yeast Malt Agar

Composto	Concentração (g l ⁻¹)
Estrato de levedura	3
Estrato de malte	3
Bacto Peptona	5
Glucose	10
Agar	20

A2. Composição do Mosto Sintético (SGJ)

Para preparar 1l de mosto sintético junta-se 0,5 l de solução A, 0,25 l de solução B, e 0,25 l de solução C. As soluções B e C são sujeitas a um acerto de pH a 3,5, e todas as soluções são autoclavadas.

Solução A

Composto	Concentração (g l ⁻¹)
Glucose	220
Frutose	220

Solução B

Composto	Concentração (g l ⁻¹)
Ácido Tartárico	24
Ácido Málico	12
Ácido Cítrico	2

Solução C

Composto	Concentração (g l⁻¹)
Yeast Nitrogen Base	28,2
Cloreto de Cálcio	0,8
Arginina-HCl	3,2
Prolina	4
Riptofano	0,4

A3 Composição do Mosto Sintético Modificado 1 (MSmod1)

Solução/Composto	Quantidade (ml l⁻¹)
Solução A	250
Solução B	250
Solução C	250
Extracto de Levedura	25
Etanol	63
H ₂ O MiliQ	162

A4 Composição do Mosto Sintético Modificado 2 (MSmod2)

Solução/Composto	Quantidade (ml l ⁻¹)
Solução A	250
Solução B	250
Solução C	250
Extracto de Levedura	25
Etanol	76,33
Ácido Acético	0,571
H ₂ O MiliQ	148

A5 Composição do Gel de Tricina SDS-PAGE

Gel de Concentração – 4%

Compostos	Quantidade (µl)
Tampão Tris-HCl 3M, pH 8,45	744
Solução Acrilamida Bis-acrilamida (48:1,5%)	250
Água MiliQ	1980
Temed	6
PSA (10%)	20

3ml de gel de concentração

Gel de concentração – 16,5%

Composto	Quantidade (ml)
Tampão Tris-HCl 3M, pH 8,45	3,33
Solução Acrilamida Bis-acrilamida (48:1,5%)	3,44
Água MiliQ	3,18
Temed	10 μ l
PSA (10%)	33 μ

10ml de gel de resolução