

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**Variabilidade do perfil aromático de vinhos Gewürztraminer em função da
levedura utilizada na fermentação alcoólica**

Esther Theisen Gabbardo

Pelotas, 2020

Esther Theisen Gabbardo

**Variabilidade do perfil aromático de vinhos Gewürztraminer em função da
levedura utilizada na fermentação alcoólica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Comitê de Orientação: Prof. Dr. César Valmor Rombaldi, Prof. Dr. Marcos Gabbardo e Dra. Tanize Acunha

Pelotas, 2020

Esther Theisen Gabbardo

Variabilidade do perfil aromático de vinhos Gewurztraminer em função da levedura
utilizada na fermentação alcoólica

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28/02/2020

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Escola Nationale Superieure Agronomique
de Toulouse (França)

.....
Prof. Dr. Marcos Gabbardo

Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas
(Brasil)

.....
Prof. Dr. Rafael Schumacher

Doutor em Enologia pela Universidad de Castilla La Mancha (Espanha)

.....
Dr^a. Tanize dos Santos Acunha

Doutora em Biologia e Ciências da Alimentação pela Universidad Autónoma de Madri
(Espanha)

.....
Prof^a Dr^a. Ângela Marcon Rossi

Doutora em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul (Brasil)

Dedico este trabalho à minha filha, Melissa.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, a quem prefiro chamar de tempo, compositor de destinos, por ser tão inventivo e ter me colocado aqui e agora.

Agradeço ao meu esposo e coorientador Marcos Gabbardo, pelo sustento intelectual, emocional, moral e material durante todo este percurso.

Agradeço à minha filha, razão pela qual não me permiti desistir, força motora de vida que me leva a alcançar meus objetivos.

Agradeço aos meus pais, irmãs, avós, sogros, familiares mais chegados e amigos mais íntimos, que contribuíram de diversas formas para que alcançasse esse objetivo.

Agradeço ao meu orientador César Valmor Rombaldi, que me permitiu crescer e desenvolver meu próprio entendimento da ciência e da pesquisa, sem nunca deixar de fornecer todo o suporte necessário para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço à Doutora Tanize Acunha, por ter me transmitido uma nova forma de ver os dados e a pesquisa, ajudando a ampliar meus horizontes na ciência.

Agradeço ao amigo e professor Daniel Hanke pela colaboração e aula de estatística que tanto colaboraram com esse trabalho.

Agradeço aos colegas do PPGCTA/Ufpel, em especial à Paula Filoda, do LaCEM, pela parceria e imensa ajuda nas análises de voláteis e processamento de dados.

Agradeço ao povo brasileiro por financiar minha pesquisa e meu crescimento pessoal e profissional através da disponibilidade de uma Universidade Pública de qualidade e de bolsa de pesquisa CNPq.

Resumo

GABBARDO, Esther Theisen. **Variabilidade do perfil aromático de vinhos Gewürztraminer em função da levedura utilizada na fermentação alcoólica.** 2020. Orientador: Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. 2020. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

O vinho é uma matriz complexa, resultado de inúmeras reações bioquímicas, algumas delas resultando na formação de compostos voláteis com impacto sensorial. Uma das vias metabólicas envolvidas na formação de compostos voláteis em vinhos é o metabolismo secundário das leveduras responsáveis pelo processo de fermentação alcoólica. Tradicionalmente leveduras do gênero *Saccharomyces* são utilizadas na fermentação de vinhos e outras bebidas, porém diversos estudos apontam que o emprego de leveduras de gêneros diversos, comumente citadas como não-*Saccharomyces*, possuem atividades enzimáticas distintas, capazes de contribuir com a complexidade aromática de vinhos. Uma das uvas ricas em compostos precursores presentes em forma glicosilada é a cv. Gewürztraminer, caracterizada pela alta concentração de terpenos de baixo peso molecular. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da variabilidade do perfil aromático de vinho Gewürztraminer, através da análise de compostos voláteis e análise sensorial de vinhos fermentados com leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. As uvas provenientes da Campanha Gaúcha – RS (Brasil) foram vinificadas em recipientes de vidro de 14 litros com três leveduras *Saccharomyces* e duas leveduras não – *Saccharomyces*. Após finalizada a fermentação alcoólica foram realizadas análises físico-químicas clássicas para ver se o processo fermentativo fora conduzido adequadamente. Nove meses após a conclusão da fermentação alcoólica, foram realizadas as análises de compostos voláteis por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) e análise sensorial por teste de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ). Das análises enológicas clássicas verificou-se que a levedura *Torulaspora delbrueckii* apresentou menor poder fermentativo, com menor teor de álcool final e maior açúcar residual e maior produção de ácido acético, embora ainda abaixo do limiar de percepção. Da análise de voláteis 36 compostos foram caracterizados, incluindo álcoois, ésteres, terpenóides, cetonas, aldeídos, ácidos, benzenóides e fenóis voláteis. A levedura *Saccharomyces cerevisiae bayanus* apresentou maior intensidade para a maioria dos picos de álcoois superiores e ésteres. Na avaliação sensorial as notas nos atributos de aroma de frutas cítricas, floral e frutas tropicais foram maiores para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* (T1) e *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (T3) e menores para as leveduras não – *Saccharomyces* (T4 e T5) com as exceções dos atributos vegetal/herbáceo, para a levedura *Torulaspora delbrueckii* (T4), e frutas de polpa branca para a levedura *Metschnikowia pulcherrima* (T5), que apresentaram nota semelhante à *Saccharomyces cerevisiae bayanus*. Na análise de ordenação por componentes principais incluindo análise sensorial e análise de compostos voláteis foi possível observar que: 1) a levedura *Torulaspora delbrueckii* (T4) é oposta à levedura *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* (T1) 2) a levedura *Metschnikowia pulcherrima*

(T5) é oposta à levedura *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (T3) e 3) a levedura *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* (T2) é mais próxima de todas as outras. Como conclusão é possível afirmar que a levedura *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (T3) mostrou melhor performance na produção de vinhos Gewürztraminer, com maior concentração de importantes compostos voláteis tais como álcoois, ésteres e terpenóides. Assim como maiores notas na análise sensorial.

Palavras-chave: Fermentação. Leveduras. Compostos Voláteis. Análise Sensorial. Vinho.

Abstract

GABBARDO, Esther Theisen. **Variability of the aromatic profile of Gewürztraminer wines due to the yeast used in alcoholic fermentation.** Advisor: Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. 2020. 72f. Dissertation (Master in Food Science and Technology) - Postgraduate Program in Food Science and Technology. Faculty of Agronomy Eliseu Maciel. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020.

Wine is a complex matrix, the result of numerous biochemical reactions, some of which result in the formation of volatile compounds with sensory impact. One of the metabolic pathways involved in the formation of volatile compounds in wines is the secondary metabolism of yeasts responsible for the alcoholic fermentation process. Traditionally yeasts of the *Saccharomyces* genus are used in the fermentation of wines and other beverages, however, several studies indicate that the use of yeasts of different genres, commonly cited as non-*Saccharomyces*, have different enzymatic activities, capable of contributing to the aromatic complexity of wines. One of the grapes rich in precursor compounds present in glycosylated form is cv. Gewürztraminer, characterized by the high concentration of low molecular weight terpenes. This work aimed to evaluate the potential of the variability of the aromatic profile of Gewürztraminer wine, through the analysis of volatile compounds and sensory analysis of Gewürztraminer wines fermented with yeasts of the genera *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces*. The grapes from the Campanha Gaúcha - RS (Brazil) were done in 14 liters glass containers with three *Saccharomyces* and two non-*Saccharomyces* yeasts. After the alcoholic fermentation was completed, classic physical-chemical analyzes were carried out so that the fermentation process was conducted properly. Nine months after the completion of alcoholic fermentation, volatile compounds were analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and sensory analysis by Quantitative Descriptive Analysis (QDA) test. From the classic oenological analyzes it was found that the yeast *Torulaspora delbrueckii* had less fermentative power, with less final alcohol content and higher residual sugar and higher acetic acid production, although still below the perception threshold. From the analysis of volatiles, 36 compounds were characterized, including alcohols, esters, terpenoids, ketones, aldehydes, acids, benzenes and volatile phenols. The yeast *Saccharomyces cerevisiae bayanus* showed greater intensity for most peaks of higher alcohols and esters. In the sensory evaluation, the notes on the aroma attributes of citrus fruits, flora, tropical fruits, and white fruits were higher for *Saccharomyces* yeasts (T1 and T3) and lower for non - *Saccharomyces* yeasts (T4 and T5) with the exception of the vegetable attribute, in which the yeast *Torulaspora delbrueckii* (T4) presented a similar note to *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (T3). In the principal component analysis (PCA) including sensory analysis and volatile compounds analysis it was possible to observe that: 1) the yeast *Torulaspora delbrueckii* (T4) is opposite to the yeast *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* (T1) 2) the yeast *Metschnikowia pulcherrima* (T5) is opposite to the yeast *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (T3) and 3) the yeast *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* (T2) is closer to all the others. In conclusion is possible affirm that the yeast *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (T3) showed best performance in the production of Gewürztraminer wines, whit more concentration of important volatile

compounds as alcohols, terpens and esters, and more height notes in the sensory analysis.

Keywords: Fermentation. Yeasts. Volatile Compounds. Sensory Analysis. Wine

Lista de Figuras

Figura 1 - Principais terpenos presentes em vinhos.....	21
Figura 2 - Principais norisoprenóides presentes em vinhos.	22
Figura 3 - Etanol e principais álcoois superiores presente nos vinhos.	23
Figura 4 - Principais ésteres encontrados no vinho.....	25
Figura 5 - Principais tióis voláteis em vinhos.....	26
Figura 6 - Esquema da formação dos principais grupos de compostos voláteis durante o metabolismo secundário das leveduras.	29
Figura 7 - <i>Heatmap</i> do perfil de compostos voláteis de vinhos Gewürztraminer produzidos por leveduras <i>Saccharomyces</i> e não- <i>Saccharomyces</i>	43
Figura 8 - Análise descritiva de vinhos Gewürztraminer produzidos por leveduras de <i>Saccharomyces</i> e não- <i>Saccharomyces</i>	47
Figura 9 - <i>Score plot</i> para o modelo PCA construído com o conjunto de dados obtido da análise de compostos voláteis e análise sensorial de vinhos Gewürztraminer produzidos por leveduras <i>Saccharomyces</i> e não- <i>Saccharomyces</i> (A), and <i>loading plot</i> do primeiro e segundo.....	49
Figura 10 – Poster exposto no 41º World Congresso of Vine and Wine – Punta del Este – Uruguay, 2018.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características físico-químicas dos vinhos Gewürztraminer produzidos por leveduras <i>Saccharomyces</i> e <i>não-Saccharomyces</i>	39
Tabela 2 - Composição volátil de vinhos Gewürztraminer produzidos por leveduras <i>Saccharomyces</i> e <i>não-Saccharomyces</i>	42

Lista de abreviaturas e siglas

%	Por cento
.css	Arquivos comma-separated values
μl	Microlitro
μm	Micrometro
3MH	3 – sulfanyhexan 1 – ol ou 3 – mercaptohexan – 1 – ol
3MHA	Acetato de 3-sulfanylhexan 1 – ol ou acetato de 3 – mercaptohexan – 1 – ol
4MMP	4-mercapto -4 methylpentan – 2one
Acetil CoA	Acetil coenzima a
ADQ	Análise descritiva quantitativa
ANAVA	Análise de Variância
AAT	Álcool acetil transferases
ATP	Adenosina trifosfato
cv.	Cultivar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano
EI	Impacto de elétrons
FT – IR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GC	Cromatografia gasosa
H ₂ S	Ácido sulfídrico
Kg	Quilogramas
LB14	Clone da variedade Gewurztraminer
m/v	Massa por volume
MEP	Metileritritol – fosfato
MEV	Mevalonato
Min.	Minutos
ml	Mililitro
MS	Espectrometria de Massas
NaCl	Cloreto de sódio

°C	Grau Celsius
PCA	Análise de Componentes Principais
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Rxi-1MS	Coluna cromatográfica
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SO ₂	Dióxido de enxofre
SO ₄	Clone de porta-enxerto
SPME	Microextração em fase sólida
TCH	(2,2,6 – trimethylcyclohexanona)
TDN	(1,1,6 – trimethyl- 1,2 – dihydronaphtalene)
TPB	(4 – (2, 3, 6 – trimethylphenyl)buta 1, 3 – diene)
TR	Tempo de Retenção

Sumário

1 Introdução	16
1.1 Problema.....	17
1.2 Hipótese.....	18
1.3 Objetivo Geral.....	18
2 Revisão Bibliográfica.....	19
2.1 Compostos voláteis em vinhos	19
2.1.1 Terpenos	20
2.1.2 Norisoprenóides	22
2.1.3 Álcoois Superiores	22
2.1.4 Ésteres	24
2.1.5 Tióis.....	25
2.2 Gewürztraminer	26
2.3 Leveduras	27
2.3.1 <i>Saccharomyces</i>	28
2.3.2 Não- <i>Saccharomyces</i>	29
Artigo 1: Mudanças na composição volátil e na qualidade sensorial de vinhos Gewürztraminer fermentados por leveduras <i>Saccharomyces</i> e não – <i>Saccharomyces</i>	32
1 Introdução	33
2 Material e Métodos.....	34
2.1 Uvas e localização do vinhedo	34
2.2 Tratamentos pré-fermentativos.....	35
2.3 Fermentação.....	35
2.4 Análises dos Vinhos.....	36
2.4.1 Análises enológicas convencionais	36

2.4.2 Análise de Compostos Voláteis.....	37
2.4.3 Análise Sensorial.....	37
2.5 Processamento de dados	38
3 Resultados e Discussão	38
3.1 Características físico-químicas gerais dos vinhos Gewürztraminer produzidos com leveduras <i>Saccharomyces</i> e não- <i>Saccharomyces</i>	38
3.2 As leveduras alteram significativamente o perfil de compostos voláteis em vinhos Gewürztraminer	40
3.3 Os descritores aromáticos de vinhos Gewürztraminer são afetados pela levedura utilizada na fermentação alcoólica	46
3.4 Comparação entre as leveduras através de análise de componentes principais	48
4 Conclusão e Perspectivas	50
Referências	51
Artigo 2: Alternative Yeast at Elaboration of South Brazilian's Gewurztraminer Wine	57
1 Poster	59
2 Considerações Finais	60
Referências	61

1 Introdução

O termo complexidade é bastante utilizado na degustação de bebidas e é considerada uma característica positiva e desejável em vinhos. Mas afinal, o que é a complexidade? Wang; Spence (2018) respondem essa pergunta afirmando que a complexidade é uma percepção associativa de múltiplos elementos, sobretudo da sinergia de vários compostos individuais. Entretanto, os mesmos autores complementam que se pode considerar como indicativo de complexidade o número de compostos voláteis, aromáticos, que podem ser detectados em um vinho. Intuitivamente, afirmam que quanto maior o número de compostos aromáticos, maior é a percepção de complexidade.

A composição do perfil de compostos voláteis dos vinhos é resultado de vários fatores, como a cultivar, sua origem geográfica e tecnologia de vinificação (FURDÍKOVÁ *et al.*, 2017). Quando se fala especificamente da variedade Gewürztraminer, autores indicam que a tecnologia de produção empregada também apresenta impacto no perfil do vinho produzido (ČUŠ; JENKO, 2013; KATARÍNA *et al.*, 2014; LUKIĆ *et al.*, 2016; FURDÍKOVÁ *et al.*, 2017; ROMÁN *et al.*, 2018).

A uva Gewürztraminer é uma das mais antigas variedades produzidas no mundo (FURDÍKOVÁ *et al.*, 2017). É uma variedade típica de produção na região norte da Europa. Historicamente era muito difundida no norte da França, na Alemanha, Itália e no leste Europeu sendo posteriormente expandida para América e Austrália, onde é produzida até os dias de hoje (KATARÍNA *et al.*, 2014). Os vinhos de Gewürztraminer são complexos e conhecidos por seus aromas florais, frutados e cítricos, descritores aromáticos relacionados com terpenóides presentes em sua composição (ČUŠ; JENKO, 2013). Ademais desses aromas primários, recentes estudos têm demonstrado que diversos outros compostos voláteis provenientes do processo de vinificação, tais como norisoprenóides, ácidos voláteis, álcoois, ésteres, compostos sulfurosos, entre outros, também apresentam influência significativa no perfil sensorial nos vinhos dessa variedade (LUKIĆ *et al.*, 2016 e FURDÍKOVÁ *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, as leveduras *Saccharomyces* são as comumente empregadas no processo de vinificação; entretanto, nos últimos anos, outros gêneros de leveduras estão sendo propostos como uma alternativa que poderia impactar positivamente na qualidade final do vinho (MASNEUF-POMAREDE *et al.*, 2016).

Belda *et al.* (2017) afirmam que o uso de leveduras não – *Saccharomyces* no processo fermentativo tem demonstrado incremento de complexidade aromática. Ademais, Renault *et al.* (2015) afirmam que o emprego de *Torulaspora delbrueckii*, incrementa a produção de ésteres, como propanoato de etila, isobutanoato de etila e diidrocinnamato de etila. Além disso, Katarína *et al.* (2014) descrevem que as diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* também provocam a alteração do perfil de compostos voláteis produzidos, influenciando significativamente no sabor resultante do vinho branco.

Desta forma, é possível vislumbrar que, além das condições de produção da uva, as práticas enológicas podem influenciar diretamente na complexidade dos vinhos produzidos a partir da variedade Gewürztraminer. Além disso, trabalhos publicados com esta variedade em importantes periódicos da área de ciência e tecnologia de alimentos, viticultura e enologia, nos últimos anos, mostra que há apelo internacional nessa temática de pesquisa (DZIADAS; JELENÍ, 2010; ČUŠ; JENKO, 2013; KATARÍNA *et al.*, 2014; LUKIĆ *et al.*, 2016; ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2016; FURDÍKOVÁ *et al.*, 2017; ROMÁN *et al.*, 2018).

Sob essa perspectiva, o foco desse trabalho é empregar 5 leveduras, 2 não *Saccharomyces* e 3 *Saccharomyces* na fermentação de mosto Gewürztraminer e avaliar o perfil aromático dos vinhos obtidos através da análise sensorial e análise de voláteis por microextração em fase sólida associada à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (SPME–GC–MS).

1.1 Problema

Não se conhece a amplitude aromática que a cultivar Gewürztraminer produzida na Campanha Gaúcha, região sul do Brasil, pode apresentar como resultado da influência da levedura escolhida para o processo fermentativo.

1.2 Hipótese

A intensidade e complexidade aromática do vinho Gewürztraminer é significativamente afetada pela levedura utilizada na fermentação.

1.3 Objetivo Geral

Avaliar o perfil aromático de vinhos Gewürztraminer em função da levedura utilizada na fermentação.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Compostos voláteis em vinhos

Os compostos voláteis são responsáveis por um dos atributos qualitativos mais apreciados em vinhos, sua característica aromática (HU *et al.*, 2016). De fato, o aroma do vinho existe por que o olfato humano é capaz de detectar compostos voláteis aromáticos, e mesmo pequenas mudanças nas concentrações desses compostos podem significar um impacto importante na percepção sensorial do vinho (PEÑA-GALLEGA, 2012). Embora estudos envolvendo a caracterização de compostos voláteis de um produto não sejam suficientes para elucidar completamente a interação entre produto e consumidor (PIGGOTT, 1990), a uva e o vinho despertam interesse em estudos de composição volátil não só por sua importância cultural e econômica no mundo, mas também por sua complexidade (ROBINSON *et al.*, 2014).

Complexidade é um termo amplamente utilizado em enologia e no campo das percepções sensoriais de vinhos, mas o conceito exato do termo não é consenso. Wang; Spence (2018) em sua investigação sobre o termo complexidade trazem uma citação de um crítico de vinhos, Matt Kramer, que pode ilustrar melhor o tema:

O melhor termo usado para avaliar a qualidade de um vinho é complexidade. Quanto mais vezes você voltar a um copo de vinho e encontrar algo diferente nele - no buquê, no sabor - mais complexo o vinho. Os melhores vinhos não são tão avassaladores quanto são aparentemente ilimitados (MATT KRAMER, 2012).

Os mesmos autores mencionam que o termo complexidade está intimamente relacionado à diversidade e ao número de moléculas odorantes que compõe o vinho.

Sobre a fração volátil presente nos vinhos, as primeiras investigações sobre o tema identificaram mais de 800 compostos na bebida (MAARSE; VISCHER, 1989), entretanto, com o surgimento de novas e mais adaptadas técnicas analíticas, foi possível perceber que este número lido de forma isolada não auxilia na compreensão do aroma do vinho, por dois motivos: o primeiro é que há a necessidade de identificar quais compostos presentes na composição química do vinho estão na concentração e volatilidade necessária para a percepção humana na degustação, e o segundo motivo está relacionado à sinergia entre os compostos voláteis, já que são raros os

casos em que uma única molécula pode ser reconhecida e associada à um aroma específico (FERREIRA, 2007).

A origem dos compostos voláteis responsáveis pelo perfil aromático dos vinhos, conforme afirmam Robinson *et al.* (2014) passa por diversos caminhos: (a) contribuição direta dos compostos provenientes da variedade de uva, (b) de origem das atividades metabólicas secundárias de micro-organismos, (c) compostos derivados de madeiras, quando este é utilizado na fermentação ou estocagem do vinho, (d) modificações químicas relacionadas à ações enzimáticas e (e) modificações químicas relacionadas a processos oxidativos e redutivos.

As principais classes de compostos voláteis encontrados em vinhos são: terpenos, norisoprenóides, álcoois, ésteres, derivados de ácidos graxos, lactonas, aldeídos, cetonas, pirazinas, tióis voláteis e compostos enxofrados e fenólicos (ORTEGA-HERAS *et al.*, 2002; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

2.1.1 Terpenos

Uma das principais classes que contribuem para o aroma do vinho são os terpenos, e podem impactar o perfil aromático de vinhos com notas relacionadas à floral, frutado e cítrico (EBELEER, 2001). A biossíntese dos terpenos ou terpenóides nas plantas pode ter duas rotas metabólicas: a do mevalotano (MEV) ou a do metileritritol-fosfato (MEP).

Apesar de apresentarem diferenças estruturais entre si, os terpenos/terpenóides são basicamente compostos por blocos de 5 carbonos (unidades de isopreno C_5H_8), normalmente em ligação 1-4, mas que podem apresentar ligação 4-4, ligações cruzadas, ou ainda terpenos cíclicos, conforme Figura 1 (FELIPE; BICAS, 2017). Os monoterpenos e sesquiterpenos, por possuírem estruturas terpênicas de menor massa molecular, apresentam maior volatilidade, contribuindo significativamente no aroma de diversos alimentos e bebidas (FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2014). Embora a maior parte dos estudos aborde a presença de monoterpenos em vinhos, já há alguns autores que reportam múltiplos sesquiterpenos em uvas Riesling, Gewürztraminer, Muller-Thurgau, Shiraz entre outras variedades (COELHO *et al.*, 2006; PARKER *et al.*, 2007).

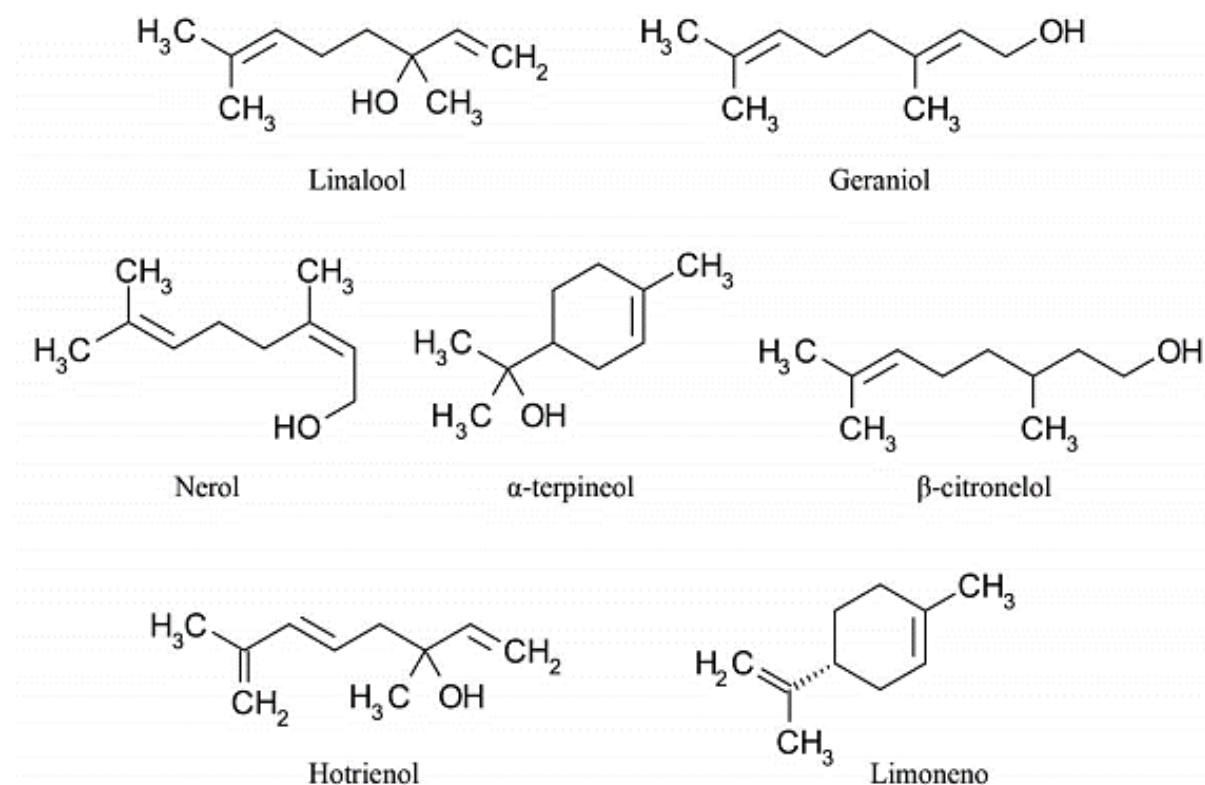


Figura 1 - Principais terpenos presentes em vinhos.
Fonte: Veríssimo (2015).

Os terpenos/terpenóides podem se apresentar em forma livre ou glicosilada, sendo a forma glicosilada a mais comum nas uvas (SWIEGERS; PRETORIUS, 2005). Algumas leveduras possuem enzimas glicosidases capazes de remover as ligações e volatilizar os compostos durante a fermentação alcoólica (HIRST; RICHTER, 2016).

Esses compostos podem apresentar uma ligação com monossacarídeos ou dissacarídeos, podendo ser mais ou menos complexa a sua liberação. No caso dos dissacarídeos, será necessária uma primeira etapa com a ação de uma enzima hidrolase (α -L-arabinofuranosidase, α -L-rhamnosidase, β -apiosidase) e em um segundo momento a ação de uma enzima β -glicosidase (MCMAHON *et al.*, 1999; GIL *et al.*, 2005; HIRST; RICHTER, 2016). É nesse contexto que leveduras como não – *Saccharomyces* ou *Saccharomyces* de diferentes clones podem contribuir por terem atividade glicosidásica, permitindo a liberação de mais compostos voláteis.

2.1.2 Norisoprenóides

Os norisoprenóides têm despertado interesse de pesquisadores do vinho, pois são compostos que têm um grande impacto no aroma do vinho mesmo que em baixas concentrações (MENDES-PINTO, 2009). Os principais norisoprenóides identificados em vinhos são: TCH (2,2,6-trimethylcyclohexanona), β -damascenona, β -ionona, vitispirane, actinidiol, TDN (1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphtalene) e TPB (4-(2,3,6-trimethylphenyl)buta-1,3-diene) (MENDES-PINTO, 2009; VERÍSSIMO, 2015).

A origem dos norisoprenóides pode estar relacionada com a degradação de alguns carotenóides presentes na uva, dando origem a compostos com 9, 10, 11 e 13 carbonos. Esses últimos são os que mais contribuem para o aroma do vinho, chamados de C13-norisoprenóides (Figura 2), e são responsáveis por aromas característicos a chá, violeta, flores, morango, cereja, entre outros (VERÍSSIMO, 2015).

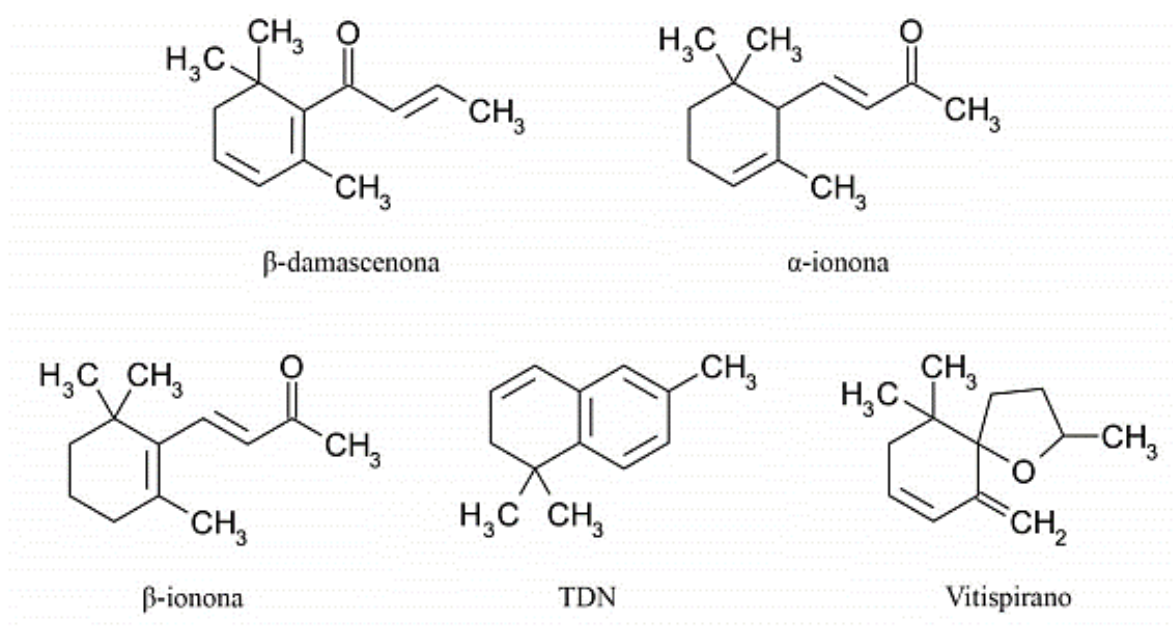


Figura 2 - Principais norisoprenóides presentes em vinhos.
Fonte: Veríssimo (2015).

2.1.3 Álcoois Superiores

Em uvas sãs a concentração de álcoois é muito baixa, com exceção dos hexanóis (VERÍSSIMO, 2015). Então, a maior parte dos compostos dessa classe que contribuem com o aroma do vinho são resultados do metabolismo secundário das leveduras envolvidas no processo fermentativo (HIRST; RICHTER, 2016).

Os álcoois superiores são os compostos voláteis produzidos em mais abundância pelas leveduras durante o processo de fermentação e contribuem significativamente com o aroma de diversos alimentos e bebidas (HAZELWOOD *et al.*, 2008).

São compostos (exemplos na Figura 3) de 3 a 6 átomos e apenas uma hidroxila (VERÍSSIMO, 2015), sua contribuição para o aroma do vinho está relacionada com a concentração em que se encontram, sendo superiores a 300mg.L^{-1} para alguns autores (ÉTIEVANT, 1991) ou 400mg.L^{-1} para outros autores (HIRST; RICHTER, 2016), e conferem aroma pungente, ou de solvente, sendo considerado negativo no aroma do vinho. A rota metabólica conhecida como Ehrlich, transforma aminoácidos em álcoois superiores em diversas etapas.

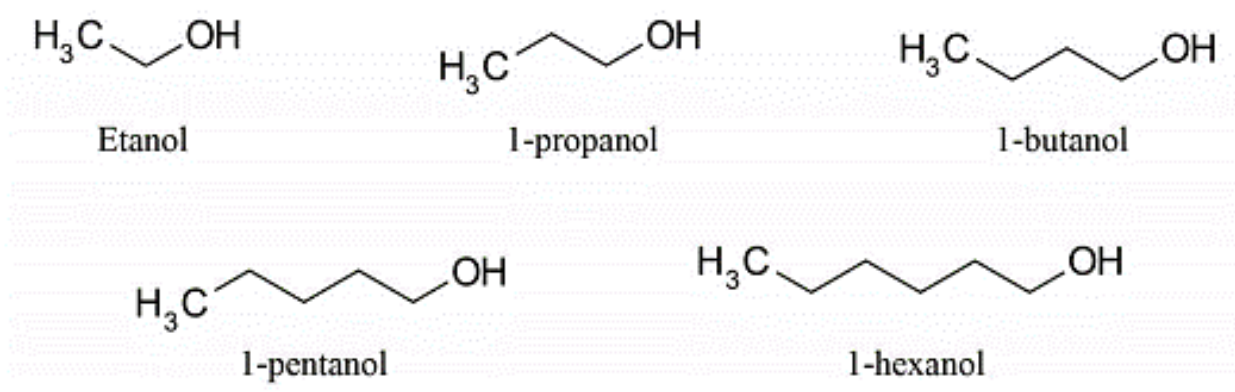


Figura 3 - Etanol e principais álcoois superiores presente nos vinhos.
Fonte: Veríssimo (2009).

2.1.4 Ésteres

Os ésteres são uma importante classe dos aromas, principalmente em vinhos brancos, já que são responsáveis pelas notas florais e frutadas (HIRST; RICHTER, 2016; ROBINSON *et al.*, 2014). A reação para a formação de ésteres requer: uma molécula de álcool, podendo ser etanol ou outro álcool presente no meio, Acetil-CoA, algum ácido graxo de cadeia média presente no meio, ou um aminoácido desaminado, uma enzima sintetizadora de éster (álcool acetil-transferases - ATF) e adenosina trifosfato (ATP), em meio ácido (SAERENS *et al.*, 2010). São compostos já presentes na uva e também decorrentes do metabolismo das leveduras, e já se sabe que o fator determinante para a concentração de ésteres acetatos presentes no meio está relacionada com o nível de expressão das enzimas álcool acetil-transferases (ATF1 e ATF2), já para ésteres etílicos, a concentração do ácido graxo precursor é o principal fator limitador da produção (ROBINSON *et al.*, 2014; VERSTREPEN *et al.*, 2003; SAERENS, 2008).

Durante a fermentação alcoólica são produzidos ésteres etílicos e acetatos (VERÍSSIMO, 2015; HIRST; RICHTER 2016; ROBINSON *et al.*, 2014). Os mais importantes citados na literatura são acetato de etila, butirato de etila, hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, acetato de hexila, acetato de isoamila, acetato de isobutila, acetato de feniletila (ROBINSON *et al.*, 2014; HIRST; RICHTER 2016) (Figura 4).

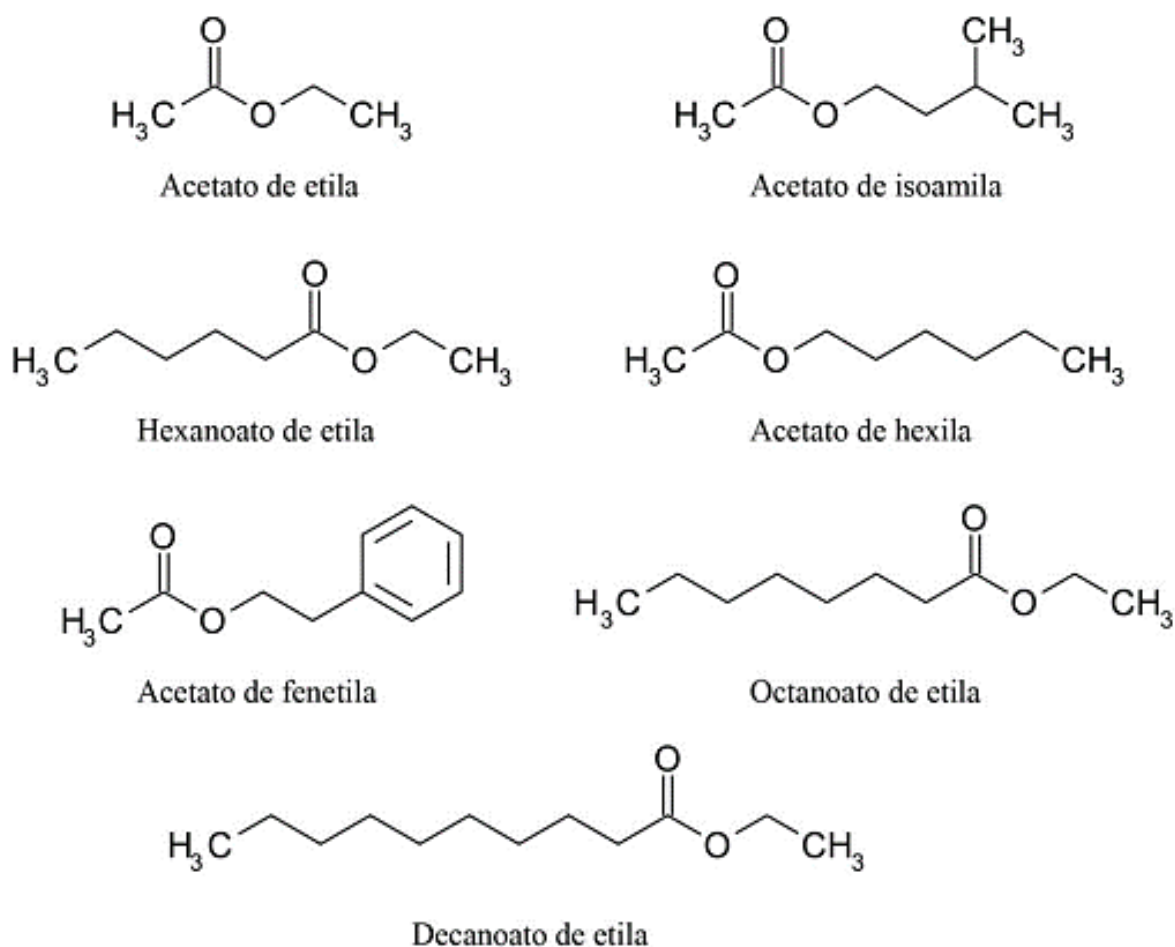


Figura 4 - Principais ésteres encontrados no vinho.
 Fonte: Veríssimo (2015).

2.1.5 Tióis

Os tióis são uma classe de compostos capazes de contribuir de forma determinante no perfil do aroma dos vinhos, haja vista que têm como característica um umbral de percepção extremamente baixo para percepção sensorial (ROMÁN *et al.*, 2018; PEÑA-GALLEGO *et al.*, 2012). Eles são responsáveis pelos aromas relacionados com frutas tropicais ou de ervas/vegetal (ROMÁN *et al.*, 2018).

Assim como outros compostos que se apresentam em forma glicosilada nas uvas, não estando voláteis e disponíveis para contribuir com o aroma do vinho, estudos têm relevado que alguns precursores de tióis estão presentes nas uvas ligados à cisteína e glutatona (PEÑA-GALLEGO *et al.*, 2012; ROMAN *et al.*, 2018;

HIRST; RICHTER, 2016). Ainda assim a concentração de tióis voláteis de um vinho está sempre relacionada à concentração de seus precursores, ainda que apenas uma pequena parte desses seja revelado durante a fermentação alcoólica (P. DESGACHONS *et al.*, 2000).

Embora a forma e as rotas para a liberação desses compostos ainda não esteja bem esclarecida (ROMAN *et al.*, 2018), se sabe que há ligação com a capacidade das leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica, de produzir enzimas β -liase capazes de reagir com esses compostos precursores de tióis, os S-conjugados de cisteína, S-conjugados de glutatona e E-hexen-2-al (CHAVES, 2014).

Os três tióis mais importantes em termos de impacto no aroma do vinho que hoje se encontram na literatura são 4-mercapto-4methylpentan-2-one (4MMP), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) e 3-mercaptohexyl acetato (3MHA) (Hirst e Richter, 2016), apresentando notas de buxo, toranja e maracujá (TOMINAGA *et al.*, 1995), conforme apresentado na Figura 5.

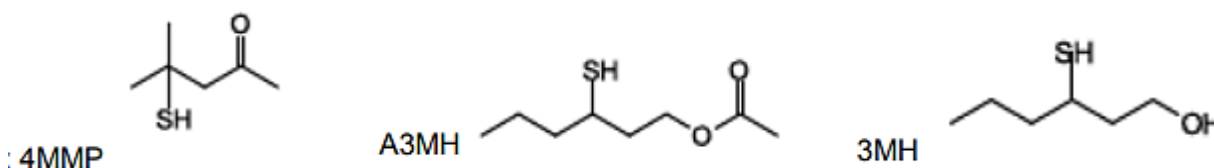


Figura 5 - Principais tióis voláteis em vinhos.
Fonte: Chaves (2014).

2.2 Gewürztraminer

Gewürztraminer é uma das mais antigas e tradicionais cultivares de uva produzidas no mundo (FURDIKOVA *et al.*, 2017). Pelos dados disponibilizados pela última edição do Cadastro Vitícola Brasileiro, do ano de 2015, haviam 46,1 hectares produtivos dessa cultivar em todo o território brasileiro.

É uma uva de casca rosada e reconhecida pela grande complexidade aromática proveniente de uma alta concentração de terpenóides, e pelos vinhos intensos e equilibrados (KATARINA *et al.*, 2014; SERRATOSA *et al.*, 2014).

Os terpenóides, pelos quais a cultivar Gewürztraminer é conhecida, são alguns dos mais prevalentes compostos voláteis em vinhos, e colaboram com as características de notas florais e cítricas (MARTIN *et al.*, 2012).

Uma uva rica em terpenos permite que através da tecnologia de produção empregada possam ser produzidos vinhos com uma composição volátil variada, já que a concentração de terpenos voláteis livres no vinho está condicionada a diversos fatores: local de produção, maceração pré-fermentativa, temperatura de fermentação e ainda atividades enzimáticas β -glicosidases (CUZ; JENKO, 2013).

Ademais desses aromas primários, recentes estudos têm demonstrado que diversos outros compostos voláteis provenientes do processo de vinificação, tais como norisoprenóides, ácidos voláteis, álcoois, ésteres, compostos sulfurosos, entre outros, também apresentam influência significativa no perfil sensorial nos vinhos dessa variedade (LUKIĆ *et al.*, 2016; FURDÍKOVÁ *et al.*, 2017).

2.3 Leveduras

O vinho, propriamente dito, é resultado de uma série de reações bioquímicas intimamente relacionadas com o metabolismo primário e secundário das leveduras. E se pode afirmar que um dos fatores que está diretamente correlacionado com a complexidade do aroma dos vinhos, e a variedade de compostos voláteis presentes no meio, é a grande variedade de leveduras capazes de realizar a fermentação alcoólica (ROMANO *et al.*, 2003).

A fermentação alcoólica em vinhos pode ser um processo dominado por um inóculo de uma levedura comercial específica, ou por um grande número de leveduras diferentes próprias da uva e do ambiente onde ocorre a fermentação (PINU, 2018). No último caso, podem ocorrer dificuldades na fermentação graças às características pouco favoráveis do meio a muitas cepas de leveduras, como um mosto muito rico em açúcares e pobre em nitrogênio, ou ainda, no decorrer da fermentação devido à toxicidade do etanol ou estresse oxidativo (PINU, 2018; CASU *et al.*, 2016).

Para compreender melhor a ação das leveduras na fermentação alcoólica e sua contribuição com a fração aromática dos vinhos, de modo geral a pesquisa tecnológica classifica as leveduras em dois grupos: leveduras *Saccharomyces*,

especialmente *S. cerevisiae*, e leveduras não *Saccharomyces*, onde se incluem diversos gêneros como *Rhodothorula*, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Debaryomyces* (LÓPEZ *et al.*, 2015; HIRST; RICHTER, 2016).

A contribuição das leveduras para o aroma do vinho se dá principalmente na fermentação alcoólica, onde açúcares, ácidos orgânicos e nutrientes são consumidos como substratos e nutrientes no metabolismo primário das leveduras, resultando como produtos etanol e uma série de outros compostos que contribuem sensorialmente com o vinho (RODRIGUEZ *et al.*, 2015). Além disso, no metabolismo secundários das leveduras durante a fermentação, as atividades enzimáticas mudam o perfil aromático do vinho através: da esterificação de ácidos graxos com álcoois, da transformação de aminoácidos em álcoois superiores e suas esterificações com ácidos gerando ésteres e, em alguns casos álcoois são oxidados em aldeídos, e também na liberação de compostos voláteis que originalmente estiverem em forma glicosilada (caso dos terpenos) ou conjugada com cisteína e glutathione (caso dos tióis voláteis) (RODRIGUEZ *et al.*, 2015; HIRST; RICHTER, 2016; MARTINEZ, 2006; ZIETSMAN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2017).

2.3.1 *Saccharomyces*

As leveduras do gênero *Saccharomyces*, principalmente as *Saccharomyces cerevisiae* são as mais utilizadas na fermentação de vinhos e outras bebidas fermentadas, pois são mais tolerantes às características do meio, principalmente à presença de etanol (ROMANO *et al.*, 2003). Seu metabolismo de fermentação basicamente se divide em dois estágios: o primário, responsável pelo crescimento, multiplicação de células e sobrevivência, que resulta em subprodutos como etanol, glicerol, acetaldeído e ácido acético, e o secundário, que não é essencial para a sobrevivência, mas que contribui principalmente na produção de compostos capazes de modificar a característica aromática do produto (STYGER *et al.*, 2011; HIRST; RICHTER, 2016) (Figura 6).

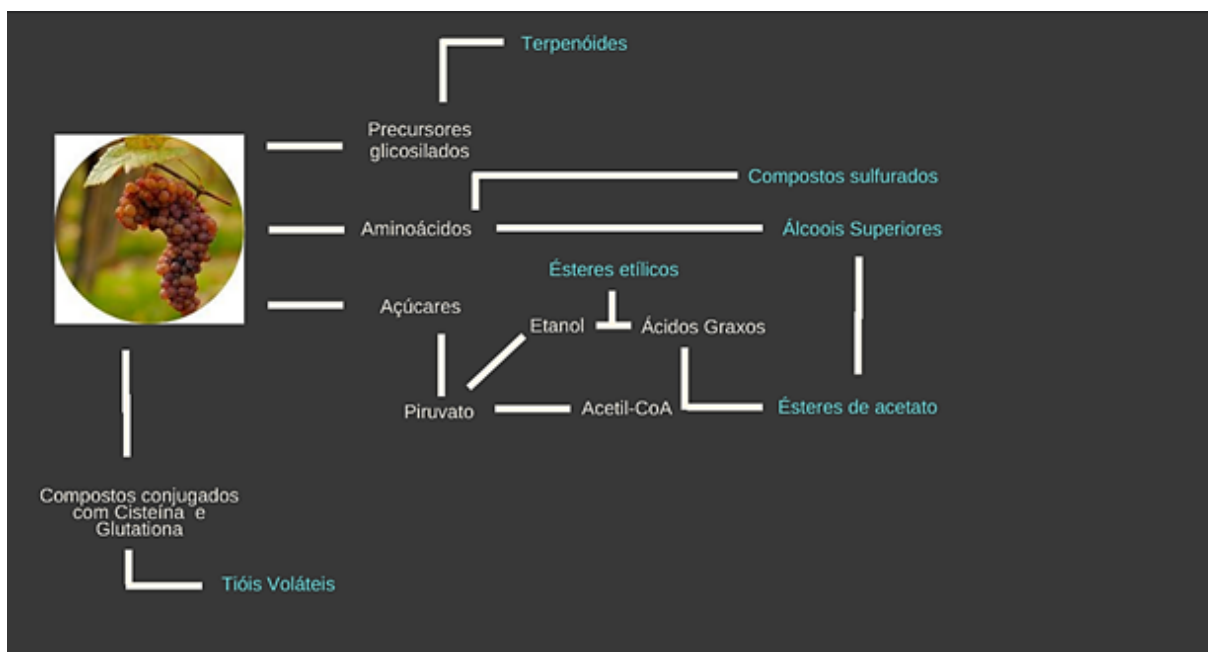


Figura 6 - Esquema da formação dos principais grupos de compostos voláteis durante o metabolismo secundário das leveduras.
Fonte: Hirst; Richter (2016).

Em relação às atividades enzimáticas, capazes de reagir com compostos precursores em formas glicosiladas, relacionadas à leveduras *Saccharomyces*, estudos apontam que as enzimas β -glicosidases produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* em geral tem baixa atividade enzimática na condição do pH do vinho, naturalmente baixo. Em contrapartida, outros estudos apontam que enzimas β -glicosidases de leveduras não-*Saccharomyces* demonstravam atividade ótima a pH 3,2, frequentemente encontrados em mosto de uvas (MCMAHON *et al.*, 1999; DELCROIX *et al.*, 1994; ROSI *et al.*, 1997).

2.3.2 Não-*Saccharomyces*

A população de microorganismos, particularmente leveduras, presentes nas uvas e no ambiente é bastante diversificada, e há uma série de outros gêneros e espécies além da *Saccharomyces cerevisiae* que pode contribuir com a fermentação alcoólica e impactar o aroma do vinho (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000).

Estudos apontam que algumas leveduras não-*Saccharomyces* possuem a capacidade de produção de diversas enzimas (esterases, proteases, glicosidases, β -

glicosidases, lipases, celulasas, etc), distintas das produzidas pelas *Saccharomyces*, que podem interagir com compostos precursores aromáticos provenientes das uvas, podendo contribuir com diferentes compostos voláteis no vinho (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2006; ZIETSMAN *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2015; OVALLE, *et al.*, 2018).

O resultado dessas atividades enzimáticas pode ser a melhoria da característica aromática dos vinhos e aumento de sua complexidade (ROMANO *et al.*, 2003), levando inclusive a alguns pesquisadores a sugerir o uso de tecnologias de DNA recombinante para expressar os genes de produção de algumas dessas enzimas em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (ZIETSMAN *et al.*, 2011; OVALLE *et al.*, 2018).

Uma das leveduras não-*Saccharomyces* que tem sido empregada na fermentação de vinhos é a *Torulaspora delbrueckii*. Estudos mostram que ela pode impactar positivamente no perfil sensorial dos vinhos (RENAULT *et al.*, 2009), principalmente por sua característica de baixa produção de compostos indesejados, como acetaldeído, acetonas, ácido acético e acetato de etila (RENAULT *et al.*, 2009). Alguns autores apontam que essa levedura produz menores concentrações de álcoois superiores, ésteres etílicos e acetatos, que outras leveduras não-*Saccharomyces* (RENAULT *et al.*, 2009; VIANA *et al.*, 2008), por outro lado, estudos mostram que algumas dessas leveduras possuem diferentes enzimas glicosidásicas capazes de liberar compostos voláteis presentes originalmente na uva em forma glicosilada (HERNANDEZ-ORTE *et al.*, 2008).

Outra levedura do grupo das não-*Saccharomyces* que tem sido empregada na fermentação de vinhos nos últimos anos é a *Metschnikowia pulcherrima*, que também apresenta atividade enzimática β -glucosidase e atividade proteolítica (MORATA *et al.*, 2019). Embora a literatura indique que a tolerância ao álcool dessa levedura seja baixa (COMBINA *et al.*, 2005), também há indícios que a produção ácido acético seja moderada, e que algumas cepas sejam capazes de reduzir a formação de H₂S (ácido sulfídrico) durante a fermentação, fatores positivos (MORATA *et al.*, 2019). Outras características dessa levedura são uma intermediária produção de acetonas durante a fermentação alcoólica, inclusive quando comparadas com *Saccharomyces cerevisiae*, e uma baixa sensibilidade à ação do SO₂ (dióxido de enxofre) (MORATA *et al.*, 2019). A contribuição com o aroma do vinho relacionada à essa levedura é uma

elevada produção de ésteres, derivada de expressiva atividade enzimática extracelular (PRIOR *et al.*, 2019), também há estudos apontando uma alta formação de álcoois superiores, como isobutanol e feniletanol (ESCOTT *et al.*, 2018).

É nesse contexto que esse projeto de dissertação se insere, numa perspectiva de verificar como as leveduras podem interferir na modificação do perfil sensorial, em especial aromático de vinho fino branco seco da cultivar Gewurztraminer.

Artigo 1: Mudanças na composição volátil e na qualidade sensorial de vinhos Gewürztraminer fermentados por leveduras *Saccharomyces* e não - *Saccharomyces*

(Artigo submetido à revista Australian Journal of Grape and Wine Research)

Abstract

Background and Aims: The aromatic complexity of wines is one of the main attributes of the sensory quality of white wines. This property is due, in addition to the varietal characteristics and cultivation conditions, to the oenological management, especially the type of yeast used. It is in this context that this work assesses the use of non - *Saccharomyces*, *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* yeasts in terms of their contribution to the profile of volatile compounds and sensory quality of Gewürztraminer wines.

Methods and Results: Gewürztraminer wines were made with 5 different yeasts in alcoholic fermentation, three yeasts of the genus *Saccharomyces* and two yeasts of non - *Saccharomyces* genus. The evaluations of volatile compounds were performed through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and sensory evaluation by quantitative descriptive analysis (ADQ). Of these treatments, 36 compounds can be identified and quantified (6 alcohols, 2 acids, 1 benzene, 1 volatile phenol, 5 aldehydes, 3 ketones, 6 terpenes and 11 esters). The profile of volatile compounds and sensory quality was affected by the yeast used in alcoholic fermentation. More specifically, the wines produced with *Saccharomyces cerevisiae bayanus C* stood out for presenting greater intensity in the volatile compounds corresponding to alcohols, esters and terpenes, obtaining the highest notes of floral aromas and tropical fruits.

Conclusions: The aromatic composition of Gewürztraminer wine is strongly affected by the yeast used in alcoholic fermentation and this is noticeable in the sensory evaluation.

Significance of the study: The work brings two relevant contributions. A technological one, of immediate application, demonstrating that the use of *S. cerevisiae bayanus C* generates Gewürztraminer wines (grapes from a new wine region) with greater aromatic intensity, and another, scientific, indicating for the work in progress, that the prospection of native yeasts, should look for strains that have a biochemical-molecular profile similar to the yeast highlighted in this work, *Saccharomyces cerevisiae bayanus C*.

Keywords: Fermentation. Yeast. Volatile compounds. Sensory analysis. Wine

1 Introdução

Um dos principais atributos de qualidade em vinhos brancos é a complexidade aromática, consequência da associação e da sinergia entre os compostos formadores do aroma, em especial os compostos voláteis (WANG; SPENCE, 2018).

É amplamente conhecido (RIBEREAU-GAYON; BOIDRON; TERRIER, 1975; KALUA; BOSS, 2010; DAL SANTO, *et al.*, 2013; ROBINSON *et al.*, 2014; FURDÍKOVA *et al.*, 2017) que a característica aromática de vinhos é influenciada pelas variáveis clássicas que compõem um *terroir*, como é o caso do solo, clima, cultivar, clone, manejo da videira, e as práticas enológicas empregadas. É a influência e a interação desses fatores que regulam a síntese e o acúmulo de compostos voláteis na uva e no vinho e que conferem a complexidade e a tipicidade aromática de um vinho (KATARÍNA *et al.*, 2014).

Do ponto de vista sensorial, são os compostos voláteis os principais geradores desse atributo, a qualidade aromática (FERREIRA, 2007). Esses compostos podem ser originados do metabolismo secundário da uva, do metabolismo de micro-organismos, do manejo enológico na fermentação e pós-fermentação, ou ainda decorrentes de mudanças químicas ocorridas durante a maturação dos vinhos (ROBINSON *et al.* 2014; ZIOLKOWSKA *et al.*, 2016). Os principais grupos de compostos voláteis presentes nos vinhos brancos são terpenos, C13 norisoprenóides, metoxipirazinas, álcoois, ésteres, lactonas, acetonas, aldeídos, compostos fenólicos e sulfurados (ORTEGA-HERAS *et al.*, 2002; HIRST; RICHTER, 2016).

Nos vinhos da cv. Gewürztraminer, que constitui o material desse estudo, os principais compostos voláteis já identificados e quantificados são das classes dos terpenóides, com destaque para os compostos geraniol, nerol, cis e trans – óxido de rosas (KATARÍNA *et al.*, 2014). Esses compostos, como a maioria dos compostos aromáticos e seus precursores, podem estar glicosilados com monossacarídeos ou dissacarídeos, e somente após a desglicosilação é que ocorre a volatilização contribuindo para a percepção sensorial (SWIEGERS; PRETORIUS, 2005; HIRST; RICHTER, 2016).

É nesse contexto que o uso de leveduras produtoras de enzimas capazes de catalisar essa reação pode contribuir para a diferenciação aromática dos vinhos (ZIETSMAN *et al.*, 2010; RICHTER *et al.*, 2013; OVALLE *et al.*, 2018). Em alguns

casos, inclusive, é proposto o uso de enzimas para alterar o perfil aromático de vinhos (VÁZQUEZ; PÉREZ-COELHO; CABEZUDO, 2002; HU *et al.*, 2016; FIA *et al.*, 2016).

Há consenso tecnológico de que a escolha da levedura para a fermentação alcoólica interfere no perfil aromático de vinhos brancos, permitindo a obtenção de vinhos com complexidades aromáticas distintas, inclusive dentro de um mesmo território (GIL *et al.*, 2005; MASNEUF-POMERADE *et al.*, 2016; BENITO, 2018; OVALLE *et al.*, 2018). Mesmo assim, é importante se estudar as interações entre a uva produzida num determinado local e as leveduras utilizadas no processo enológico (VARELA *et al.*, 2009; CAPOZZI *et al.*, 2015).

De modo geral, as leveduras mais utilizadas na elaboração de vinhos são da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, por sua adaptabilidade ao meio (mostos ricos em açúcares, pH baixo, tolerância ao etanol e dióxido de enxofre) (ROMANO *et al.*, 2003). Entretanto, estudos mostram que as leveduras de gêneros não – *Saccharomyces*, como por exemplo *Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*, podem incrementar a complexidade dos vinhos (JACOBS *et al.* 2016; MASNEUF-POMERADE *et al.*, 2016; BENITO, 2018; OVALLE *et al.*, 2018).

É nesse contexto que esse trabalho se insere, ou seja, produzir vinhos Gewürztraminer com leveduras do gênero *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae bayanus*), e de gêneros não – *Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*), comparando-os quanto ao perfil de compostos voláteis e quanto à qualidade sensorial. Parte-se da hipótese de que leveduras conhecidas por terem maiores atividades glicosidases proporcionarão vinhos Gewürztraminer com maior intensidade aromática.

2 Material e Métodos

2.1 Uvas e localização do vinhedo

O experimento foi realizado com uvas da cultivar *Vitis vinifera* Gewürztraminer, clone LB14, enxertadas em portaenxerto SO4, na região da Campanha Gaúcha, Rio Grande do Sul, Brasil. O vinhedo (altitude 200m latitude 31°), de 15 anos de produção, é cultivado em área com uma topografia com declividade de aproximadamente 15% e

solo com profundidade efetiva de 1,5 a 2m, composto majoritariamente por arenito com fragmentos de basalto interestratificado. O sistema de condução do vinhedo é espaldeira, com espaçamento entre fileiras de 3,3 metros e entre plantas de 1,2 metros, com poda conduzida em cordão esporonado bilateral. A produção média de uva por planta foi de 1,5 kg. Por ocasião da colheita da uva, na safra 2018, o mosto tinha um pH 3,2, uma acidez total de 5,3 g.L⁻¹ em ácido tartárico, um teor de açúcares totais de 22% (m\v).

2.2 Tratamentos pré-fermentativos

Imediatamente após a colheita, a uva, para todos os tratamentos, foi mantida em câmara fria por 24 horas a 8°C, de modo que atingisse temperatura inferior a 15°C. O processamento seguiu um protocolo padrão que incluiu pesagem, desengace e esmagamento com adição de agente antioxidante metabissulfito de potássio em dose de 8g.hL⁻¹, e enzima pectolítica (Rohavin MXT) em dose de 5 g.hL⁻¹. Após o esmagamento, as uvas foram prensadas em prensa vertical (Ricefer) resultando em rendimento de aproximadamente 60% em mosto. O mosto extraído foi submetido à adição de clarificante polivinilpolipirrolidona (PVPP) em 30g.hL⁻¹ e tratamento a frio (8°C por 12horas) para decantação das borras grossas. O mosto clarificado foi usado para os testes de fermentação.

2.3 Fermentação

O mosto foi dividido em alíquotas iguais de aproximadamente 10 litros, dispostas em frascos de vidro de quatorze litros e neles foram inoculadas as leveduras (reidratadas e aclimatadas) referentes aos tratamentos, em dosagem de 20 g.hL⁻¹. Cada unidade experimental foi constituída de um frasco de 10 litros. Para cada levedura, foram realizadas 3 unidades experimentais.

O processo fermentativo foi conduzido a 15°C em câmara fria até a transformação dos açúcares em álcool, monitorada pela queda de densidade até um valor inferior a 1.0. Esse monitoramento foi realizado diariamente coletando dados sobre a cinética de fermentação para cada tratamento (gráfico em anexo como material suplementar).

Após o fim da fermentação alcoólica, o vinho de cada unidade experimental foi clarificado com 0,8 g.L⁻¹ de bentonite (La Elcha) e mantido em câmara fria por 5 dias a 8°C. Passado esse tempo, fez-se a trasfega para recipientes de vidro de 4,5 litros, adicionando-se 4g.hL⁻¹ de metabissulfito de potássio e manteve-se os recipientes vedados e conservados a 12°C até o momento do envase em garrafas de 750ml. Após o envase os vinhos foram acondicionados em sala com temperatura de 15°C até o momento das avaliações.

Foram testadas 5 leveduras: *Metschnikowia pulcherrima* (MpE - Levulia Pulcherrima®) com característica de liberação de terpenos e produção de álcoois superiores, *Saccharomyces cerevisiae bayanus* (ScbC - ICV QA23®) com característica de alta produção de ésteres, *Saccharomyces cerevisiae* (SccB - Maxithiol®) com característica de liberação e formação de tióis voláteis e alta produção de ésteres, *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* (SccA - IVC D47®) com característica de valorização do aroma varietal, e *Torulaspora delbrueckii* (TdD - Zymaflore Alpha®) com característica de formação de tióis voláteis. As informações foram coletadas nas fichas técnicas disponibilizadas pelos fabricantes das leveduras.

2.4 Análises dos Vinhos

Foram realizadas as primeiras avaliações (análises físico-químicas clássicas de caracterização de vinhos) um mês após o fim da fermentação alcoólica, como forma de verificação do processo fermentativo. A partir dessas análises, verificou-se que todos os vinhos se encontravam dentro de padrões enológicos esperados (álcool, açúcar residual, ácido tartárico, ácido lático, ácido málico, ácido acético, glicerol e pH). Então, todos os vinhos foram armazenados por 8 meses, até a repetição dessas análises e avaliação de compostos voláteis e sensorial. Esse tempo de armazenamento simula as situações tecnológicas frequentemente utilizadas pelo produtores de vinhos jovens da cultivar Gewürztraminer.

2.4.1 Análises enológicas convencionais

As análises físico-químicas clássicas realizadas foram teor alcoólico (v/v %), açúcar residual (g.L⁻¹), ácido tartárico (g.L⁻¹), ácido lático (g.L⁻¹), ácido málico (g.L⁻¹),

ácido acético (g.L^{-1}), glicerol (g.L^{-1}) e pH. Para isso, se utilizou o equipamento de determinação rápida, modelo WineScan $\text{SO}_2^{\text{®}}$ (Foss Analytics, Hillerød, Denmark), pelo método de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).

2.4.2 Análise de Compostos Voláteis

O perfil de compostos voláteis dos vinhos foi analisado através da técnica de microextração em fase sólida (SPME) associada a um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS) Shimadzu® GC-MS QP2010 equipado com fonte de ionização por impacto de elétrons (EI), técnica amplamente utilizada na análise de compostos voláteis em vinhos. Os procedimentos operacionais seguiram o protocolo otimizado por componente desse trabalho (GABBARDO, 2016). Resumidamente, foram transferidos a um vial de SPME de 20mL: $20 \mu\text{L}^{-1}$ de vinho, $3960 \mu\text{L}^{-1}$ de água ultrapura e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno (benzofenona). Em seguida, 1 g de NaCl (cloreto de sódio) foi adicionado e as amostras foram mantidas sob agitação durante 15 minutos a 40°C . Uma fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), $50/30 \mu\text{m}$, (Supelco, USA) foi então exposta no headspace por 15 minutos e, a seguir, imediatamente inserida no injetor do GC-MS à temperatura de 220°C .

Para separação dos compostos foi utilizada uma coluna cromatográfica Rxi-1MS ($30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$) com a seguinte programação: de temperatura: 40°C por 5 minutos, aumentando a uma taxa de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 240°C , permanecendo nessas condições por 10 minutos. O gás Hélio foi usado como gás carreador com fluxo constante de 2 mL.min^{-1} através da coluna. O espectrômetro de massas foi operado com ionização de impacto eletrônico de 70 eV, temperatura de fonte de íons e interface de 230°C , faixa de massa de 30 a 350 m/z.

2.4.3 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada por 9 enólogos, 4 mulheres e 5 homens, com experiência em degustação de vinhos de no mínimo de 5 anos, pelo teste de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) utilizando uma ficha de avaliação com escala de

intensidade de 9 pontos para cada descritor aromático. A temperatura da sala de análise sensorial foi mantida em 20°C durante as avaliações e as amostras foram servidas, em volume de 30ml, a 10°C de forma sequencial, amostra por amostra, para os 5 tratamentos, em triplicata.

2.5 Processamento de dados

Os espectros de massas foram processados empregando software GCMS Postrun Analysis (Shimadzu, Japan), com integração automática do Cromatograma de Íons Totais (TIC). Após a integração dos picos, uma matriz de dados contendo tempo de retenção, razão massa/carga (m/z) e íons de referência, bem como a área dos picos, foi gerada. O alinhamento dos tempos de retenção e massas foi gerado automaticamente pelo software. A tentativa de identificação dos compostos voláteis foi realizada comparando os espectros de massas dos compostos eluídos com os da biblioteca NIST 2011 e de bancos de dados on-line, como PubChem. Para a elaboração do Heatmap foi utilizado o software MetaboAnalyst 4.0 e os dados foram normalizados em relação a área total no próprio software. Para a análise de componentes principais foi utilizado o software Past. Os dados da análise sensorial foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey 5% pelo software Sisvar 5.6.

3 Resultados e Discussão

3.1 Características físico-químicas gerais dos vinhos Gewürztraminer produzidos com leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*

Considerando-se que objetivo desse trabalho é verificar como o perfil aromático de vinhos Gewürztraminer pode ser diferenciado pela interferência da levedura utilizada na fermentação alcoólica, inicialmente fez-se a caracterização geral dos vinhos (Tabela 1). Dessas avaliações, se observou que o processo fermentativo foi bem conduzido, tendo em vista que os teores máximos de ácido acético foram de 0,4 g.L⁻¹ [abaixo do limiar de percepção de 0,7 g.L⁻¹ (DU PLESSIS *et al.*, 2017)], e que o teor de álcool gerado e de açúcar residual ainda presente são coerentes com o teor

de açúcar que existia no mosto (212 g.L⁻¹ de açúcares totais). Ao compararem-se as leveduras no processo fermentativo, verificou-se que a levedura *Torulaspora delbrueckii* (TdD) gerou vinhos com menor teor de álcool do que as leveduras do gênero *Saccharomyces*. Como esperado, esse vinho teve maior teor de açúcar residual. As leveduras não – *Saccharomyces* normalmente são citadas por terem dificuldade de completarem a fermentação alcoólica (JACOBS, 2015), embora contribuam para melhorar o perfil sensorial dos vinhos (COLOMBARD, 2009; MOLINA *et al.*, 2009). A menor produção de álcool pela levedura TdD observada nesse trabalho era esperada pois se conhece sua característica de produzir menos etanol que outras leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces* (RENAULT, *et al.*, 2009; CONTRERAS *et al.*, 2014). Mesmo assim, o vinho atingiu 11,65% (v/v). É por essa razão que, em alguns casos, essas leveduras são utilizadas em co-inóculo ou inóculo sequencial, para se obterem resultados aditivos ou sinérgicos no impacto sensorial, ou até se obterem vinhos com menor teor de álcool (RENAULT *et al.*, 2015; ENGLEZOS *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Características físico-químicas dos vinhos Gewurztraminer produzidos por leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*.

Parâmetros	Cepa da Levedura					
	SccA	SccB	ScbC	TdD	MpE	CV%
Álcool (%)	12,58bc*	12,57bc	12,72c	11,65a	12,24ab	1,15
Açúcar residual (g.L ⁻¹)	1,7ab	1,82ab	0,9a	12,3c	4,56b	24,21
Ácido tartárico (g.L ⁻¹)	7,66a	7,60a	7,63a	7,7a	7,4a	3,02
Ácido Lático (g.L ⁻¹)	0,5a	0,8a	0,23a	1,3ab	2,33b	65,36
Ácido Málico (g.L ⁻¹)	1,7b	1,76b	1,7b	1,6b	1,26a	4,55
Ácido Acético (g.L ⁻¹)	0,2b	0,1a	0,2b	0,43c	0,16ab	16,60
Glicerol (g.L ⁻¹)	6,93a	6,9a	6,76a	6,8a	6,9a	1,68
pH	3,07a	3,05a	3,06a	3,07a	3,13a	1,02

*Letras diferentes na linha significam diferenças significativas entre as leveduras (P< 0,05);

**Identificação das leveduras: SccA: *Saccharomyces cerevisiae* D47; SccB: *Saccharomyces cerevisiae* Maxithiol; ScbC: *Saccharomyces cerevisiae* bayanus QA23; TdD: *Torulaspora delbrueckii* Zimaflora Alpha e MpE: *Metschnikowia pulcherrima* Levulia Pulcherrima.

Outra variável que foi afetada pelas leveduras foi o teor de ácido lático, tendo-se detectado maiores concentrações nos vinhos produzidos com a levedura *Metschnikowia pulcherrima* (MpE) e também para a levedura TdD, embora essa última não demonstre diferença significativa em relação às leveduras *Saccharomyces*. Os teores de ácido málico foram menores nos vinhos fermentados com a levedura MpE. Du Plessis *et al.* (2017) já haviam observado que fermentações maloláticas realizadas

na sequência de fermentações alcoólicas conduzidas por leveduras não – *Saccharomyces* aconteciam de forma mais rápida e intensa do que aquelas conduzidas apenas por leveduras *Saccharomyces*.

A concentração de glicerol foi similar em todos os vinhos, e nesse quesito a literatura não mostra consenso. Por exemplo, Mendoza e Farias (2010) e Du Plessis et al (2017) verificaram que vinhos produzidos com leveduras não – *Saccharomyces* tinham menores teores de glicerol em relação aos vinhos fermentados com leveduras *Saccharomyces*. Por outro lado, os resultados de Comitini et al (2011) e Benito et al (2015) indicam que leveduras não – *Saccharomyces* produzem maiores concentrações de glicerol durante a fermentação alcoólica do que as *Saccharomyces*. Desse conjunto de resultados de caracterização geral dos vinhos, percebe-se que há consenso com os trabalhos anteriores (RENAULT et al., 2009; CONTRERAS et al., 2014; DU PLESSIS et al., 2017) no que tange à menor produção de álcool e maior transformação de ácido málico em láctico por leveduras *Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*, mas não há consenso em relação à produção de glicerol. Além disso, os resultados demonstram que todos os vinhos estão dentro de padrões de qualidade técnica e padrão legal definidos pelo Decreto 8.198/2014 e, por isso, puderam ser utilizados para a continuidade das avaliações, ou seja, avaliação dos compostos voláteis e da qualidade sensorial.

3.2 As leveduras alteram significativamente o perfil de compostos voláteis em vinhos Gewürztraminer

Após a análise por microextração em fase sólida associada à cromatografia gasosa hifenizada à espectrometria de massas (SPME-GC-MS), trinta e seis compostos foram putativamente identificados e quantificados nos vinhos Gewürztraminer fermentados com leveduras *Saccharomyces* e não – *Saccharomyces*. Dessa avaliação, se observaram alterações nas concentrações de álcoois, ésteres, terpenos, aldeídos e cetonas (Tabela 2; Figura 7).

Para facilitar a interpretação do conjunto de dados obtidos por SPME-GC-MS, permitindo uma rápida visualização das similaridades e diferenças entre os tratamentos, um heatmap com os compostos voláteis observados nos vinhos

Gewürztraminer produzidos com leveduras *Saccharomyces* e não – *Saccharomyces* foi gerado (Figura 7).

Se observam diferenças na abundância relativa de compostos entre as cepas, sugerindo que essas cepas geram diferentes perfis de compostos voláteis. Ademais, se observa que a levedura *Saccharomyces cerevisiae bayanus* C (ScbC) gerou, de modo geral, vinhos com maior abundância de compostos voláteis (Figura 7). Há exceções, como é o caso do 1-hexanol, onde o vinho produzido com a levedura *Torulaspora delbrueckii* (TdD) apresentou a maior abundância. Esse resultado corrobora os de Tofalo *et al.* (2016) que apontam que fermentação com leveduras não – *Saccharomyces* geraram maiores produção desse álcool. Benito (2018) afirma que as leveduras não – *Saccharomyces* em geral produzem menos álcoois aromáticos em relação às *Saccharomyces*. Esse fato, segundo Belda *et al.* (2017) é de maior interesse em vinhos brancos, pois melhora a percepção do aroma varietal dos vinhos. Por outro lado, outros autores apontam que a levedura *Torulaspora delbrueckii* proporcionou incremento em alguns álcoois superiores (AZZOLINI *et al.*, 2015; LOIRA *et al.*, 2014). Essa variação deve estar relacionada com a cepa específica da levedura (BENITO, 2018). Alguns autores apontam que leveduras *Metschnikowia pulcherrima* são produtoras de álcoois superiores (ESCRIBANO *et al.*, 2018; BELDA *et al.*, 2017), mas esse resultado não foi encontrado nas condições desse trabalho.

Tabela 2 - Composição volátil de vinhos Gewürztraminer produzidos por leveduras *Saccharomyces* e *não-Saccharomyces**.

Metabólitos †	Descrição Aromática**
Álcoois	
1-Hexanol	Etéreo, frutado, vegetal, herbáceo
2-Hexanol, 2,5-dimetil-, (S)-	ne***
Álcool Fenílico	Doce, floral, rosa, mel, lavanda
1-Nonanol	Fresco, gorduroso, floral, rosa, laranja
1-Octanol, 2-butil-	ne
1-Heptanol, 2,4-dietila-	ne
Ésteres	
Acetato de Isoamila	Pêra, banana
Acetato 2-Metilbutil	ne
Hexanoato de etila	Doce, gorduroso, abacaxi, banana
Succinato de dietila	Suave, frutado, maçã cozida
Octanoato de etila	Fruta tropical, abacaxi, maçã, floral
Acetato de feniletila	Doce, mel, floral, rosas
Decanoato de etila	Doce, ceroso, frutado, maçã
Decanoato de decila	ne
Benzoato 2-Etilhexil	ne
2-metilbutirato de etila	ne
Isovalerato de etila	Doce, abacaxi, maçã, laranja
Ácidos	
Ácido hexanóico, 2-etil-	ne
Ácido Tetradecanóico	ne
Benzenóides e fenóis	
Benzaldeído, 2,4-dimetil-	ne
4,6-di-tert-Butil-m-cresol	ne
Aldeídos	
Nonanal	Sabonete
2-Decenal, (E)-	ne
Dodecanal	Sabonete, ceroso, cítrico
Heptanal	Gorduroso
Octanal	Desagradável
Cetonas	
2-Octanona	Sabonete
5-Hepten-2-ona, 6-metil-	ne
2-Tetradecanona	ne
Terpenóides	
α-Pineno	Pinus, madeira, resina
p-Cimeno	Madeira, cítrico, limão, picante
Eucaliptol	Fresco, medicinal, eucaliptos
Óxido de nerol	Verde, vegetal, floral
α-Terpineol	Pinus, lavanda, cítricos, madeira
Mentol	ne***

*Cepas das leveduras usadas na fermentação: gênero *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* SccA – D47®; *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* SccB - Maxithiol® e *Saccharomyces cerevisiae bayanus* ScbC - QA23®) e gênero *Não-Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* TdD – *Zymaflore Alpha*® e *Metschnikowia pulcherrima* MpE – *Levulia pulcherrima*®) † Compostos analisados por GC/MS.

** Referências: Furdikova *et al.* (2017); Serratosa, *et al.*, (2014); Comuzzo *et al.* (2006); Furdikova *et al.* (2014); Capone *et al.*, (2011); Parr *et al.*, (2004);

***ne: não encontrado.

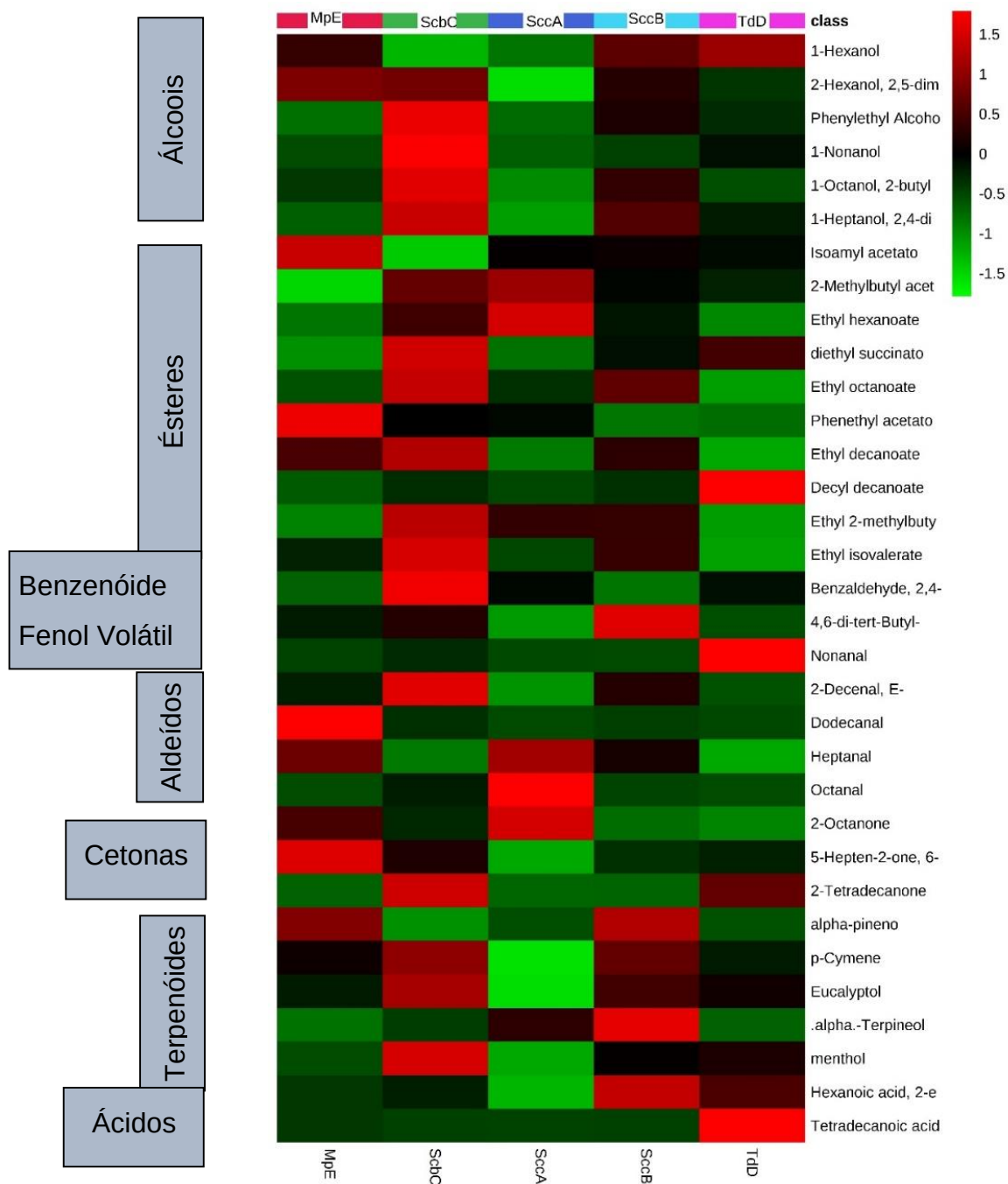


Figura 7 - Heatmap do perfil de compostos voláteis de vinhos Gewurztraminer produzidos por leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Cada linha corresponde a um composto volátil e cada coluna corresponde a cada cepa de levedura. A cor vermelha representa uma área maior de pico no cromatograma e a cor verde representa uma área menor. Cepas de leveduras utilizadas na fermentação: gênero *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* SccA – D47®; *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* SccB - Maxithiol® e *Saccharomyces cerevisiae bayanus* ScbC - QA23®) e gênero Não – *Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* TdD - Zymaflore Alpha® e *Metschnikowia pulcherrima* MpE – Levulia pulcherrima®).

Os ésteres representaram o grupo com maior número de compostos identificados. Dentre eles, estão o acetato de isoamila, hexanoato de etila e succinato de dietila decanoato de etila e isovalerato de etila, citados como responsáveis por aromas de frutas brancas e frutas tropicais em vinhos tanto da variedade Gewürztraminer (KATARÍNA *et al.*, 2014; LUKIC, *et al.*, 2016; FURDIKOVA *et al.*, 2017) como de outras variedades (COMUZZO *et al.*, 2006; NOGUEROL-PATO *et al.*, 2009; RENAULT *et al.*, 2015; ESCRIBANO *et al.*, 2018).

Dentro dessa classe de compostos, se pode observar que as leveduras *Saccharomyces*, especialmente ScbC, produziu maior abundância de ésteres etílicos (Figura 7). Esse era um resultado esperado, tendo em vista que essas leveduras foram selecionadas para essa finalidade, por terem maiores atividades de Álcool Acetil Transferase e glucosidase (HIRST E RICHTER, 2014).

Em exceção a essa tendência, a levedura MpE (não – *Saccharomyces*) apresentou maior produção de dois importantes ésteres para vinhos: acetato de isoamila e o acetato de feniletila. Segundo Ferreira (2007) o acetato de isoamila é um éster capaz de transmitir, sem necessidade de efeito sinérgico entre compostos, suas notas aromáticas frutadas ao vinho, e o éster acetato de feniletila, que apresenta aroma de rosas e contribui para a complexidade do vinho (FURDIKOVA *et al.*, 2017). O desempenho de leveduras *Metschnikowia pulcherrima* na produção de acetato de feniletila também é reportado por Escribano *et al.* (2018). Masneuf-Pomerade *et al.* (2016) também indicam que o interesse enológico do emprego de leveduras *Metschnikowia pulcherrima* é a produção de ésteres.

A levedura TdD gerou menor intensidade de ésteres, com exceção do decanoato de decila. A menor produção desses compostos nos vinhos produzidos com essa levedura em relação às outras está em conformidade com os resultados encontrados por Renault *et al.* (2009) e Azzolini (2015). Em contraste, diferem do apontado por Loira *et al.* (2014), Belda *et al.* (2017) e Renault *et al.* (2015), segundo os quais essa levedura tem capacidade de incrementar a composição de ésteres nos vinhos, principalmente propanoato de etila, isobutanoato de etila e diidrocinnamato de etila, compostos que não foram identificados nesse trabalho.

Dos terpenos identificados nesse estudo, alguns como α -terpineol, α -pineno, p-cimeno, mentol e óxido de nerol, foram anteriormente reportados em vinhos Gewürztraminer (DZÍADAS; JELEN, 2010; FURDIKOVA, *et al.*, 2014; LUKIC *et al.*,

2016). O composto eucaliptol é menos citado como componente em vinhos. Entretanto, estudos realizados em vinhos australianos investigaram a ocorrência e evolução desse composto, destacando maior concentração de eucaliptol em vinhos provenientes de vinhedos próximos à plantações de eucaliptos (CAPONE *et al.*, 2011), na região da Campanha Gaúcha, local de origem das uvas utilizadas nesse estudo, também é característica a plantação de eucaliptos em proximidade a vinhedos. Em contraponto, alguns autores indicam que os terpenos limoneno e α -terpineol são precursores de eucaliptol em vinhos Tannat, no Sul do Uruguai (FARIÑA *et al.*, 2005).

Ainda em relação aos terpenóides, existem trabalhos que apontam resultados diferentes para a contribuição das leveduras na composição e concentração desses compostos em vinhos. Segundo Du Plessis *et al.* (2017), em geral leveduras não – *Saccharomyces* produzem baixas concentrações de terpenos quando comparadas com *Saccharomyces cerevisiae*. Já Cus; Jenko (2013) e Whitener *et al.* (2017) reportaram incremento na concentração de terpenóides em vinhos para fermentações conduzidas parcialmente por não – *Saccharomyces*. Dessa forma, não há unanimidade frente a esse tema.

Nessa classe (terpenóides) a maior parte dos compostos apresentou picos com maior área nos vinhos fermentados com leveduras *Saccharomyces* (Figura 7) com exceção do α -pineno, composto que contribui com notas de pinus, resina ou amadeirado (PARR *et al.*, 2004) em que a levedura MpE apresentou valor mais intenso. Alguns autores reportam que a levedura *Torulaspora delbrueckii* tem potencial de relevar maiores concentrações de terpenos como α -terpineol (BENITO, 2018), o que não foi observado nos resultados desse trabalho.

Os compostos como cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos e fenóis voláteis, apresentaram variação entre os vinhos (Figura 7): a) o ácido tetradecanóico, 2-tetradecanona e nonanal, com maior concentração nos vinhos produzidos com a levedura TdD; b) a 2-octanona e heptanal com maior concentração nos vinhos produzidos com a levedura MpE; e, c) o fenol volátil 4,6-di-tert butyl-m cresol apresentou maior intensidade na levedura *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* B. Comuzzo *et al.* 2006 afirmam que alguns compostos como 2-octanona e octanal aportam para sensações gustativas desagradáveis ao aroma do vinho.

Por outro lado, um estudo de Culluré; Ferreira; Cacho (2011) sobre aldeídos alifáticos em vinhos reportam que esses compostos podem ter importante relação com as notas de frutas cítricas em vinhos.

3.3 Os descritores aromáticos de vinhos Gewürztraminer são afetados pela levedura utilizada na fermentação alcoólica

A percepção de diferentes descritores aromáticos na avaliação olfativa mostra que os vinhos diferiram significativamente entre si (Figura 8), o que confirma a informação de que leveduras não –*Saccharomyces* são capazes de impactar no perfil aromático de vinhos (BENITO, 2018; HIRST; RICHTER, 2014; JACOBS, 2015; BELDA *et al.*, 2017).

Os atributos de fruta tropical e frutas de polpa branca apresentaram maiores valores nos vinhos fermentados pelas leveduras ScbC e SccA. Esse resultado está em desacordo com o proposto por outros autores que apontam que o emprego de leveduras não – *Saccharomyces* é responsável pelo incremento da complexidade dos vinhos e da percepção de notas varietais e frutadas (LOIRA, *et al.*, 2014; BELDA, *et al.* 2017; RENAULT *et al.*, 2015).

Por outro lado, Cus; Jenko (2013) apontam que o maior valor do parâmetro de avaliação sensorial “frutas tropicais” foi do tratamento de fermentação exclusiva de leveduras *Saccharomyces*, e o menor valor do mesmo parâmetro na fermentação em co-inóculo com não – *Saccharomyces*.

Para o descritor floral, a levedura ScbC apresentou destaque com as maiores notas. Isso vai ao encontro dos resultados encontrados por Hernandez-Orte *et al.* (2008) que aponta que os descritores florais estiveram mais associados à leveduras *Saccharomyces*, quando comparadas com leveduras não – *Saccharomyces*. O resultado era esperado pela característica de atividade β -glucosidase dessa levedura.

A avaliação sensorial mostrou que não houve diferenças significativas nos atributos de intensidade de aroma, qualidade geral do aroma, equilíbrio gustativo e qualidade geral do vinho (Tabela 2 material suplementar). Os resultados não seguem a mesma tendência que encontraram Cus; Jenko (2013), onde no quesito qualidade geral do vinho, fermentações de vinhos Gewürztraminer realizadas exclusivamente

com *Saccharomyces cerevisiae* e fermentações em co-inóculo com não – *Saccharomyces* mostraram diferenças significativas entre si.

De uma forma geral as leveduras não – *Saccharomyces* receberam notas menores para todos os descritores aromáticos, com exceção da levedura TdD que apresentou a segunda maior nota no descritor ervas, o que pode ter relação com a presença e a maior concentração de 1-hexanol nesse tratamento (Figura 7), composto que tem como característica notas de vegetal/herbáceo (COMUZZO *et al.*, 2006).

Na avaliação sensorial, os vinhos produzidos pelas leveduras SccA e ScbC mostraram-se equivalentes, e distintos dos demais. Por outro lado as duas leveduras não – *Saccharomyces* também mantiveram padrão parecido, com notas menores do que os demais vinhos. Isso pode estar relacionado com o fato de que leveduras não – *Saccharomyces* geraram, de modo geral, menor produção de ésteres, álcoois e terpenos (Figura 7), corroborando trabalho anterior (DU PLESSIS *et al.*, 2017).

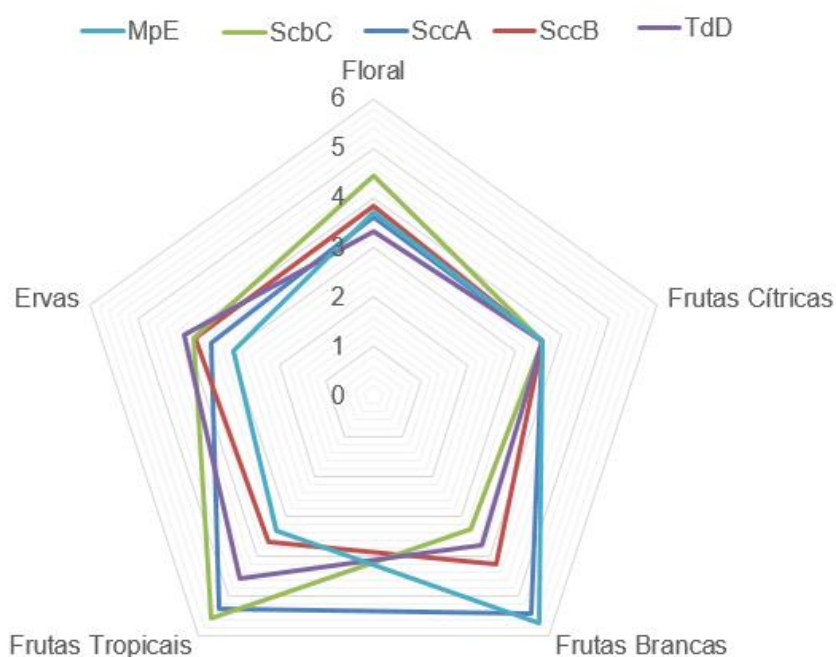


Figura 8 - Análise descritiva de vinhos Gewurztraminer produzidos por cepas de *Saccharomyces* e não *Saccharomyces*.

*Cepas de leveduras utilizadas na fermentação: gênero *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* SccA – D47®; *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* SccB - Maxithiol® e *Saccharomyces cerevisiae bayanus* ScbC - QA23®) e gênero Não – *Saccharomyces* (*Torulasporea delbrueckii* TdD - Zymaflore Alpha® e *Metschnikowia pulcherrima* MpE – Levulia pulcherrima®)

** As médias dos vinhos em diferentes linhas indicam diferença estatística (Tukey's Test, ANOVA, $p < 0.05$).

3.4 Comparação entre as leveduras através de análise de componentes principais

Com o objetivo de simplificar a alta dimensionalidade do conjunto de dados e compreender a variabilidade entre os tratamentos, os dados obtidos por SPME-GC-MS e análise sensorial foram combinados e submetidos a análise multivariada de componentes principais (PCA) para gerar uma representação visual da discriminação entre as leveduras pelo seu perfil de compostos voláteis e percepção sensorial.

Ao aplicar a PCA foi possível estabelecer algumas correlações que são apresentadas na figura 3, onde as leveduras se agrupam por similaridade. Os dois primeiros componentes principais explicam 64,14% da variância total do conjunto de dados e mostram (Figura 3a) que: 1) a levedura TdD é oposta à levedura SccA em distância euclidiana; 2) a levedura MpE é oposta à levedura ScbC; e, 3) a levedura SccB é mais próxima de todas as outras leveduras.

Verificou-se que em relação aos álcoois (Figura 9B) a levedura MpE aparece isolada das demais, o que difere do apontado por Chen *et al.* (2016), segundo os quais as leveduras *Metschnikowia pulcherrima* e *Torulaspora delbrueckii* têm produção de álcoois superiores similar, o que também tinha sido observado por Sadoudi *et al.* (2012) que apontaram similaridade para essa característica entre as leveduras *Metschnikowia pulcherrima* e leveduras do gênero *Saccharomyces*.

No loading plot dos dois primeiros PCs, se pode observar que relação ao perfil de álcoois e terpenóides (Figura 9b) a levedura TdD apresentou maior similaridade a levedura SccB e a levedura ScbC foi mais próxima à SccA. Em relação aos ésteres (Figura 9b), há uma separação mais clara entre leveduras *Saccharomyces* e não – *Saccharomyces*, corroborando os achados de Hernandez-Orte *et al.* (2008). Esse resultado também está de acordo com Viana *et al.* (2008) que reportaram diferenças na composição e concentração de ésteres em fermentação com leveduras não – *Saccharomyces*.

Por último, os demais compostos carbonílicos (Figura 9b) mostram a mesma tendência de álcoois e terpenóides, onde a levedura SccB apresenta maior similaridade com as leveduras não-*Saccharomyces*.

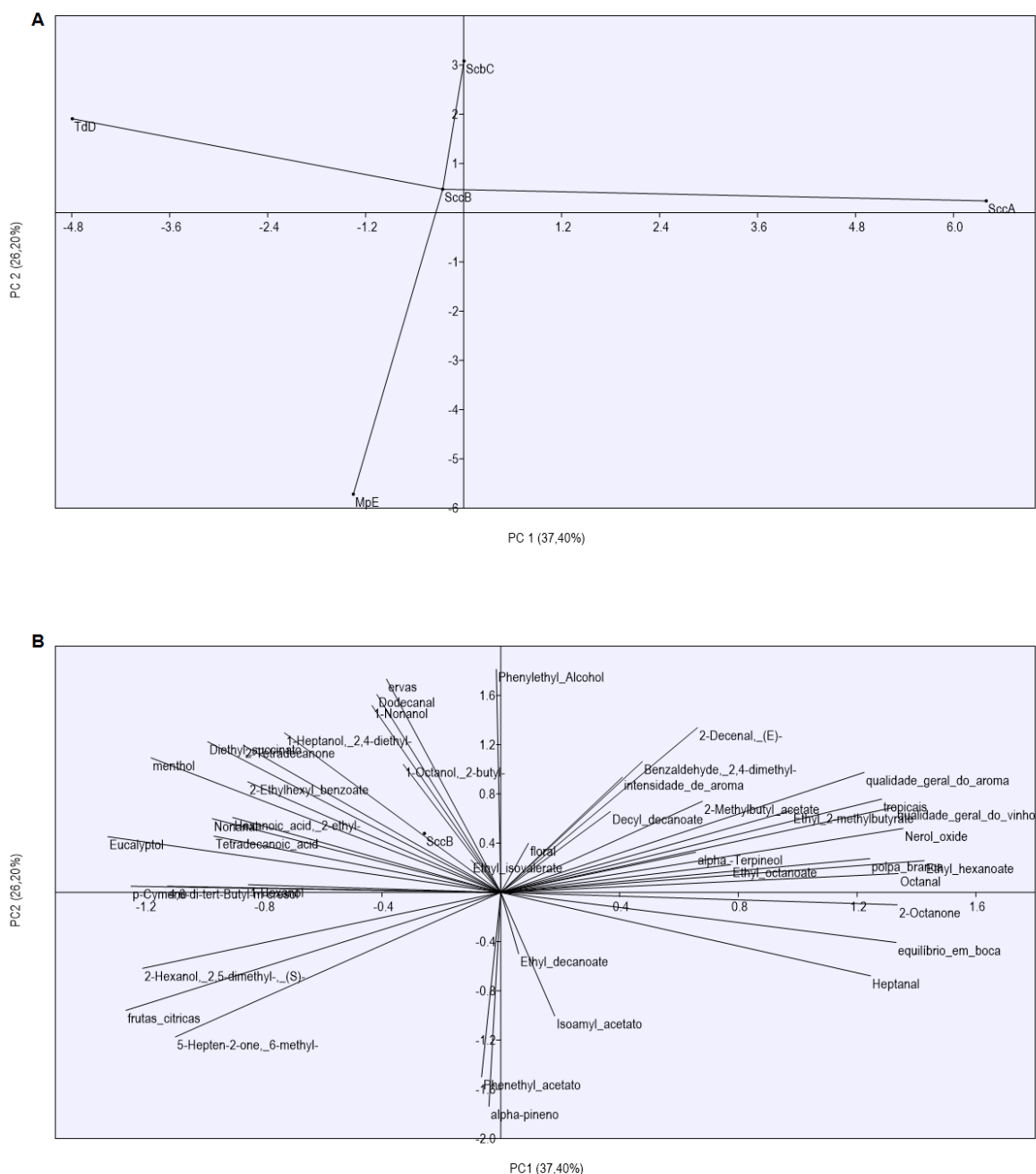


Figura 9 - *Score plot* para o modelo PCA construído com o conjunto de dados obtido da análise de compostos voláteis e análise sensorial de vinhos Gewürztraminer produzidos por leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* (A), e *loading plot* do primeiro e segundo.

*Cepas de leveduras utilizadas na fermentação: gênero *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* SccA – D47®; *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* SccB - Maxithiol® e *Saccharomyces cerevisiae bayanus* ScbC - QA23®) e gênero Não – *Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* TdD - Zymaflore Alpha® e *Metschnikowia pulcherrima* MpE – Levulia pulcherrima®) A composição volátil foi determinada por SPME-GC/MS e a avaliação sensorial por teste ADQ.

4 Conclusão e Perspectivas

Pode se concluir que:

- 1) Vinhos da variedade Gewürztraminer tem seu perfil de compostos voláteis e qualidade sensorial afetados pela levedura utilizada na fermentação;
- 2) leveduras do gênero *Saccharomyces*, especialmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae bayanus* C, gera vinhos Gewürztraminer com maior produção de compostos voláteis e isso é percebido na análise sensorial;
- 3) leveduras não – *Saccharomyces* (*Metschnikowia pulcherrima* e *Torulaspora delbrueckii*) tem capacidade de fermentação de vinhos brancos com baixos teores de acidez volátil, e podem contribuir para a complexidade de vinhos através da maior produção de alguns álcoois e ésteres, e
- 4) através dessa avaliação inicial se estabelece uma perspectiva na prospecção de isolamento e caracterização de leveduras autóctones, *Saccharomyces* e não - *Saccharomyces* para fermentação de vinhos brancos aromáticos.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil. Nº 422632/2018-0.

Referências

- Azzolini, M. *et al.* (2015) Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* **31**, 277– 293.
- Belda, I. *et al* (2017) Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *Int J Food Microbiol* **257**, 183–191
- Benito, S. *et al.* (2015) Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur Food Res Technol* **241**, 707–717
- Benito, S. (2018). The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied microbiology and biotechnology*, **102**, 3081-3094.
- Capone, D. L. *et al.* (2011) Evolution and Occurrence of 1,8-Cineole (Eucalyptol) in Australian Wine. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 953–959
- Capozzi, V. *et al.* (2015) Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research.* **181**, 75-83.
- Chen, D. Liu, S. Q. (2016) Impact of simultaneous and sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on non-volatiles and volatiles of lychee wines. *LWT Food Sci Technol* **65**, 53–61
- Comitini, F. *et al.* (2011) Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **28**, 873–882.
- Comuzzo, P. *et al.* (2006) Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. / *Food Chemistry* **99**, 217–230
- Contreras, A. *et al.* (2014) Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1670–1678

Čuš, F. and Jenko, M. (2013) The influence of yeast strains on the composition and sensory quality of Gewürztraminer wine. *Food Technology and Biotechnology*, **51**, 547-553.

Culluré, L.; Ferreira, V.; Cacho, J. (2011) Analysis, occurrence and potential sensory significance of aliphatic aldehydes in white wines. *Food Chemistry* **127**, 1397–1403

Dal Santo, S. *et al.* (2013) The plasticity of the grapevine berry transcriptome. *Genome Biology*. **14**, 54

Du Plessis, H. *et al.* (2017) Effect of *Saccharomyces*, Non-*Saccharomyces* Yeasts and Malolactic Fermentation Strategies on Fermentation Kinetics and Flavor of Shiraz Wines. *Fermentation*. **3**, 64

Dziadas, M. and Jeleń, H. H. (2010) Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach. *Analytica Chimica Acta*, **677**, 43-49.

Englezos, V. *et al.* (2018) Volatile profiles and chromatic characteristics of red wines produced with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*. **109**, 298–309

Escribano, R. *et al.* (2018) Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones. *Journal of Applied Microbiology* **124**, 1521-1531

Farina, L. *et al.* (2005) Terpene compounds as possible precursors of 1,8-cineole in red grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1633-1636.

Ferreira, V. (2007) La base química del aroma del vino: Un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. *Rev. Real Academia de Ciencias*, **62**, 7–36.

Fia, G. *et al.* (2016) Side activities of commercial enzyme preparations and their influence on the hydroxycinnamic acids, volatile compounds and nitrogenous components of white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **22**, 366–375.

Furdíková, K. *et al.* (2017) Investigation of volatile profile of varietal Gewürztraminer wines using two-dimensional gas chromatography. *Journal of Food & Nutrition Research*, **56**.

Gabbardo, M. *et al.* (2016) Aromatic characterization of brazilian sparkling wines using olfactometry and a sensory panel. *BIO Web of Conferences* **7**, 02005

Gil, J. V. *et al.* (2005) Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *Int J Food Microbiol*, **103**, 57-68.

Jacobs, S. A. (2015) Prospecção de leveduras não-*Saccharomyces* com potencial enológico oriundas de uvas finas da Região da Campanha do Estado do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas. **1**, 1-75.

Jacobs, S. A. *et al.*, (2016) Microbiological characterization of grapes in the Campanha region of Rio Grande do Sul, Brazil reveals non-*Saccharomyces* autochthonous yeasts with oenological potential. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **10**, 286-294.

Loira, I. *et al.* (2014) Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT Food Sci Technol* **59**, 915–922.

Kalua, C. M; Boss, P. K. (2010) Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruitset to harvest. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **16**, 337–348.

Hernandez-Orte P, *et al.* (2008) The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry* **107**, 1064–1077

Hernandez-Orte P, *et al.* (2006) Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Aust J Grape Wine Res*, **12**, 150-160.

Hirst, M. B. and Richter, C. L.; (2016) Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, **67**, 4.

Katarína, F. *et al.* (2014) Influence of yeast strain on aromatic profile of Gewürztraminer wine. *LWT-Food Science and Technology*, **59**, 256-262.

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

Lukić, I. *et al.* (2016) Changes in physico-chemical and volatile aroma compound composition of Gewürztraminer wine as a result of late and ice harvest. *Food chemistry*, **196**, 1048-1057.

Masneuf-Pomarede, I. *et al.* (2016) The genetics of non-conventional wine yeasts: current knowledge and future challenges. *Frontiers in microbiology*, **6**, 1563.

Noguerol-Pato, R. *et al.* (2009) Quantitative determination and characterisation of the main odourants of Mencía monovarietal red wines. *Food Chemistry* **117**, 473–484

Ortega-Heras, M., *et al.* S. (2002) Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Analytica Chimica Acta*, **458**, 85–93.

Ovalle, S., Cavello, I., Brena, B. M., Cavalitto, S. and Gonzáles-Pombo, P. (2018) Production and characterization of a b-glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. *LWT - Food Science and Technology*, **87**, 515-522.

Parr, W. V. *et al.* (2004) Exploring the nature of wine expertise: what underlies wine experts' olfactory recognition memory advantage? *Food Quality and Preference* **15**, 411–420

Renault, P. *et al.* (2009) *Genetic* characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 201–210.

Renault, P. *et al.* (2015) Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/S. cerevisiae wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International journal of food microbiology*, **207**, 40-48.

Richter C. L., Dunn B., Sherlock G. and Pugh T. (2013) Comparative metabolic footprinting of a large number of commercial wine yeast strains in Chardonnay fermentations. *FEMS Yeast Res*, **13**, 394-410.

Ribereau-Gayon, P.; Boidron, J. N.; Terrier, A. (1975) Aroma of Muscat Grape Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 6.

Robinson, A.L., Boss, P. K., Solomon, P. S., Trengove, R. D., Heymann, H. and Ebeler, S. E. (2014) Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am. J. Enol. Vitic*, **65**, 1.

Román, T. *et al.* (2018) Importance of polyfunctional thiols on semi-industrial Gewürztraminer wines and the correlation to technological treatments. *European Food Research and Technology*, **244**, 379-386.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. and Capece, A. (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, p 169-180.

Sadoudi, M. *et al.* (2012) Yeast yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*. **32**, 243-253

Serratos, M. P., Marquez, A., Moyano, L., Zea, L. and Merida, J. (2014) Chemical and morphological characterization of Chardonnay and Gewürztraminer grapes and changes during chamber-drying under controlled conditions. *Food Chemistry*, **159**, 128-136.

Swiegers J.H. and Pretorius I.S. (2005) Yeast modulation of wine flavor. *Adv Appl Microbiol*, **57**, 131-175.

Tofalo, R. *et al.* (2016) Aroma profile of Montepulciano d'Abruzzo Wine fermented by single and co-culture starters of autochthonous *Saccharomyces* and Non *Saccharomyces* yeast. *Frontiers in Microbiology*. **7**, 610.

Varela, C. *et al.*, (2009) Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with 'wild' indigenous and inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **15**, 238–248

Vásquez, L. C.; Pérez-Coello, M. S.; Cabezudo, M. D. (2002) Effects of enzyme treatment and skin extraction on varietal volatiles in Spanish wines made from Chardonnay, Muscat, Airén, and Macabeo grapes. *Analytica Chimica Acta*, **458**, 39–44.

Varela, C.; Sengler, F.; Solomon, M.; Curtin, C. (2016) Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* **209**, 57–64

Wang, Q. J.; Spence, C. (2018) Wine complexity: An empirical investigation. *Food Quality and Preference*, **68**, 238-244.

Whitener, M. E. B. *et al.* (2017) Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Aust J Grape Wine Res* **23**, 179–192.

Zhang, X-K., Lan, Y-B., Zhu, B-Q., Ziang, X-F., Duan, C-Q. and Shi, Y. (2018) Changes in monosaccharides, organic acids and amino acids during Cabernet Sauvignon wine ageing based on a simultaneous analysis using gas chromatography–mass spectrometry. *J Sci Food Agric.*, **98**, 104–112.

Zietsman, A. J. J., Klerk, D. and Rensburg, P. (2011) Coexpression of α -L-arabinofuranosidase and β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **11**, 88–103.

Ziółkowska, A., Wąsowicz, E. and Jeleń, H. H. (2016) Differentiation of wines according to grape variety and geographical origin based on volatiles profiling using SPME-MS and SPME-GC/MS methods. *Food chemistry*, **213**, 714-720.

Artigo 2: Alternative Yeast at Elaboration of South Brazilian's Gewurztraminer Wine

(Resumo publicado em forma de Poster no 41º World Congresso of Vine and Wine – Punta del Este – Uruguay, 2018)

Abstract

One of the production technology that can be an alternative to give complexity in wines, and consequently represents the possibility of production diversification at the wine's industry, is the use of different yeast species. Traditionally are used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at the wine's fermentations, however, at the last decade, some other species are being proposed to the producers like an alternative that could impact on their product's quality. This study has the objective that to analyze and evaluate the behavior of different yeast species during the Gewurztraminer's must fermentation from the Campanha Gaúcha, in the south of Brazil. The wine's elaboration was done at the experimental winery of Universidade Federal do Pampa, at the Dom Pedrito city, localized at Rio Grande do Sul. Were processing 250 kg of Gewurztraminer grape, with must extraction by destemming and press, after was made the uniform addition of oenological inputs to clean the must, and then was separated in 15 experimental units, 5 treatments in 3 repetitions, and conditioned in glass recipients. The experimental design was T1 - *Saccharomyces cerevisiae*; T2 - *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*; T3 - *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*, T4 - *Torulaspora delbrueckii*; e T5 - *Metschnikowia pulcherrima*. The fermentations occurred under temperature control in 15°C. During two weeks was made a diary monitoring of process to observe some important variables with impact direct at the final product. Next will be show the collect data. The must contained 220 g.L⁻¹ of total sugars and a pH 3,6, characteristics related with the harvest conditions at this region, with a summer dry and heat by the phenomenon *La Niña* that occurred in 2018. The most high alcohol content was at the treatment T3, *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* with 12,7% V/V and the smaller was at T4, *Torulaspora delbrueckii* with 11,9% and this show us that the non-*Saccharomyces* yeast have the smaller conversion rate. About volatile acidity, all the treatments are on the standard and legal concentrations, but we can see that the treatment T4, *Torulaspora delbrueckii*, show the value more elevated, 0,4 g.L⁻¹ of acetic acid, and the T2, *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* the lower value, 0,1 g.L⁻¹. The final reduction sugar content are on the standard to dry wines, between 0,4 and 1,8 g.L⁻¹. The average glycerol content don't show great variation, and was nearly of 6,8 g.L⁻¹ and the malolactic fermentation don't occurred keeping a concentration of malic acid nearly to 1,8 g.L⁻¹. The fermentations kinetic, the treatment that first come to under 1.000 g/cm³ density, that is, the last part of alcoholic fermentation, was the T3, *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*, in the tenth day. The last one was T4, *Torulaspora delbrueckii* that only arrive at this level on the fourteenth day. The treatment with positive highlight was the T3, *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*, by its high conversion rate associated to a fast fermentation. This work contributes to the development of the oenological field on the Brazil's south, because show the viability of yeast that can expand the complexity of the wines produced at this region. Currently, as a

complement to this evaluation, is being realized a sensory profile analysis, results of the use of different yeast species.

1 Poster

Poster N°2055

Alternative yeast at elaboration of South Brazilian's Gewurztraminer wine
 Esther Gabbardo, Lorena Quincozes, Patricia Santos, Rafael Schumacher,
 César Rombaldi, Marcos Gabbardo. (Brazil) - (Ref 2018-1963)

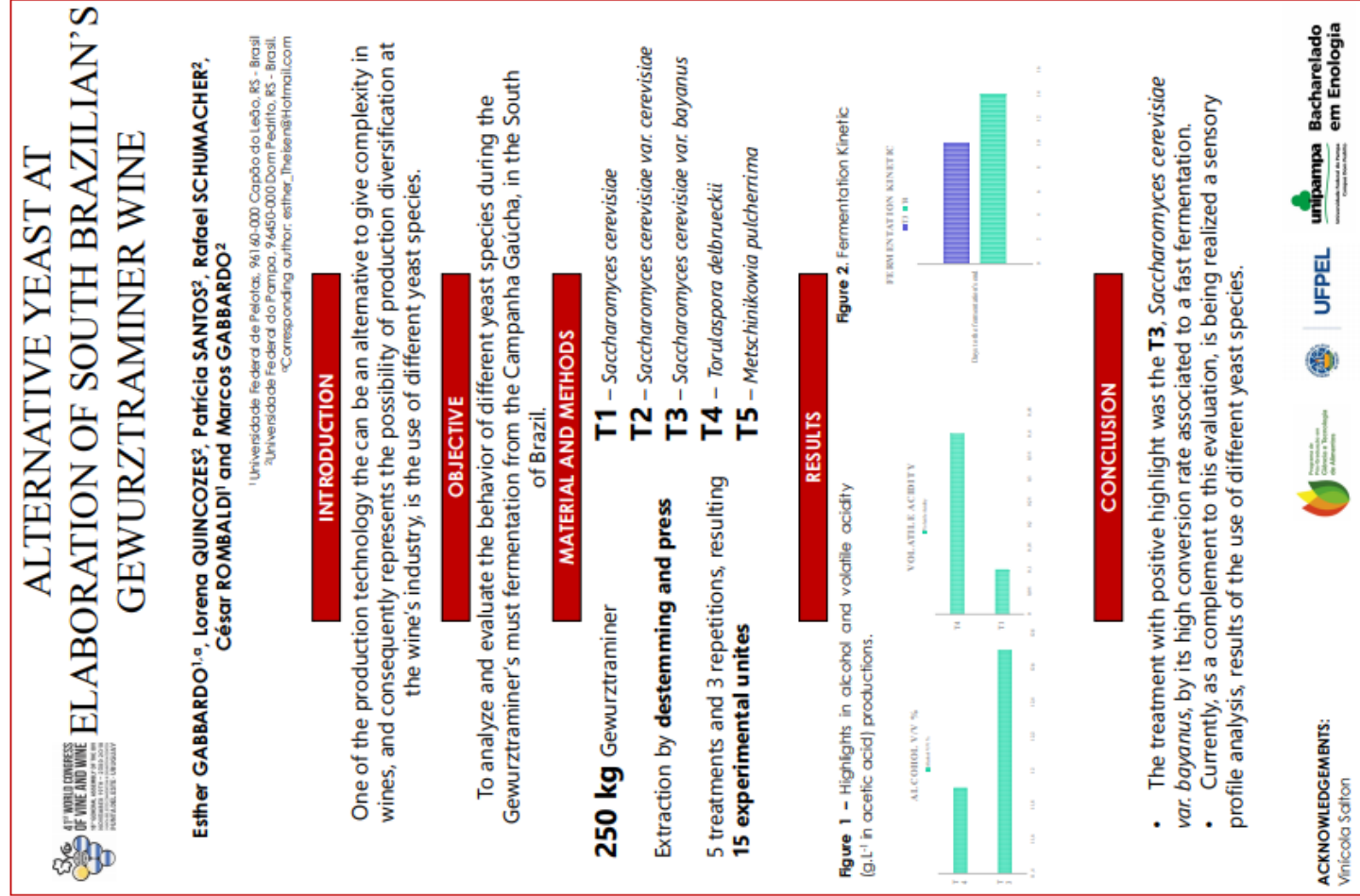


Figura 10 – Poster exposto no 41º World Congresso of Vine and Wine – Punta del Este – Uruguay, 2018.

2 Considerações Finais

Pode se concluir que:

- 1) Vinhos Gewürztraminer tem seu perfil de compostos voláteis fortemente alterado pela levedura utilizada na fermentação;
- 2) leveduras do gênero *Saccharomyces*, especialmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae bayanus*, apresentaram maior diversidade e intensidade dos picos na análise de compostos voláteis, e maiores notas na análise sensorial;
- 3) leveduras não – *Saccharomyces* podem contribuir com a complexidade em vinhos aromáticos através da produção de alguns ésteres e álcoois, e
- 4) esse estudo serve de orientação na prospecção de leveduras autóctones com potencial enológico.

Referências

- ARAPITSAS, P. *et al.* Wine metabolomics reveals new sulfonated products in bottled white wines, promoted by small amounts of oxygen. **Journal of Chromatography A**, v. 1429, p. 155-165, 2016. ISSN 0021-9673.
- BENITO, S. The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 3081-3094, 2018. ISSN 0175-7598.
- CASU, F., *et al.* The effect of linoleic acid on the Sauvignon blanc fermentation by different wine yeast strains. **FEMS Yeast Res.**, v. 16, 2016.
- CHAVES, A. M. **Efeito da enzima β -liase endozym thiol® na libertação de tióis voláteis em vinhos de Castas Portuguesas**. Dissertação (Mestrado em Viticultura e Enologia). Universidade de Lisboa, 2014.
- COMBINA, M.; *et al.* Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. **Int. J. Food Microbiol.** 99, 237–243, 2005.
- ČUŠ, F.; JENKO, M. The influence of yeast strains on the composition and sensory quality of Gewürztraminer wine. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 547-553, 2013.
- DELCROIX, A.; GUNATA, Z.; SAPIS, J.C.; SALMON, J.M.; BAYONOVE, C. Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect on the terpenol content of Muscat wine. **Am J Enol Vitic**, v. 45, p. 291–296, 1994.
- DOMBRE, C. *et al.* Aromatic evolution of wine packed in virgin and recycled PET bottles. **Food chemistry**, v. 176, p. 376-387, 2015.

DOMBRE, C.; RIGOU, P.; CHALIER, P. The use of active pet to package rosé wine: Changes of aromatic profile by chemical evolution and by transfers. **Food Research International**, v. 74, p. 63-71, 2015.

DZIADAS, M.; JELEŃ, H. H. Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 677, n. 1, p. 43-49, 2010.

EBELER, S.E. Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor. **Food Rev. Int.** 17:45-64. 2001.

ESCOTT, C.; *et al.* Formation of polymeric pigments in red wines through sequential fermentation of flavanol-enriched musts with non-Saccharomyces yeasts. **Food Chem.** v. 239, p. 975–983, 2018.

ETIÉVANT, P. X. Wine. In: **Volatile Compounds of Food and Beverages**. H. Maerse (Ed.), Marcel Dekker Inc.: New York, p.483-546, 1991.

FARKAS, J., MOHÁCSI-FARKAS, C. Safety of foods and beverages: spices and seasonings. **Encyclopedia of Food Safety**., v. 3, p. 324-330, 2014.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química e Sociedade**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERREIRA, V. La base química del aroma del vino: Un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. **Rev. Real Academia de Ciencias**. v. 62 p. 7–36, 2007.

FURDÍKOVÁ, K. *et al.* Investigation of volatile profile of varietal Gewürztraminer wines using two-dimensional gas chromatography. **Journal of Food & Nutrition Research**, v. 56, n. 1, 2017.

GIL JV, MANZANARES P, GENOVÉS S, VALLÉS S AND GONZÁLEZ-CANDELAS L. Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. **Int J Food Microbiol**, v. 103, p. 57-68, 2005.

HAZELWOOD LA, *et al.* The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, p. 2259-2266, 2008.

HERNANDEZ-ORTE P, *et al.* Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. **Aust J Grape Wine Res**, v. 12, p.150-160, 2006.

HIRST, M. B. and RICHTER, C. L.; Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 67, p. 4, 2016.

HU, K.; QIN, Y.; TAO, Y-S.; ZHU, X-L.; PENG, C-T.; ULLAH, N. Potential of Glycosidase from Non-*Saccharomyces* Isolates for Enhancement of Wine Aroma. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 4, p. 935-943, 2016.

KATARÍNA, F. *et al.* Influence of yeast strain on aromatic profile of Gewürztraminer wine. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 256-262, 2014.

LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I. S.; Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. **S. Afr. J. Enol. Vitic.**, v. 21, p. 97 – 129, 2000.

LUKIĆ, I. *et al.* Changes in physico-chemical and volatile aroma compound composition of Gewürztraminer wine as a result of late and ice harvest. **Food chemistry**, v. 196, p. 1048-1057, 2016.

MAARSE, H., AND VISCHER, C.A. Volatile compounds in food. **Alcoholic beverages. Qualitative and quantitative data**, 1989.

MARTIN, D. M.; CHIANG, A.; LUND, S. T.; BOHLMANN, J. Biosynthesis of wine aroma: transcript profiles of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase, geranyl diphosphate synthase, and linalool/nerolidol synthase parallel monoterpenol glycoside accumulation in Gewürztraminer grapes. **Planta**, v. 236, p. 919–929, 2012.

MARTINEZ, C.; GERTOSIO, C.; LABBE, A.; PÉREZ, R.; GANGA, M. A.; Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. **Electronic Journal of Biotechnology** v. 9 p. 407 – 413.

MASNEUF-POMAREDE, I. *et al.* The genetics of non-conventional wine yeasts: current knowledge and future challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1563, 2016.

MCCMAHON, H.; ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.; JASINSKI, Y. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 198–203, 1999.

MENDES-PINTO, M.M. Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 483, n. 2, p. 236–245, 2009.

MORATA, A.; LOIRA, I.; ESCOTT C.; FRESNO, J. M. DEL; BAÑUELOS, M. A.; SUÁREZ-LEPE, J. A. Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology. **Fermentation**, v. 63, n. 5, 2019.

MORENO-ARRIBAS MV AND POLO C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Springer-Verlag, New York, 2009.

ORTEGA-HERAS, M., *et al.* S. Aroma composition of wine studied by different extraction methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 85–93, 2002.

OVALLE, S.; CAVELLO, I.; BRENA, B. M.; CAVALITTO, S.; GONZÁLES-POMBO, P.; Production and characterization of a b-glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 515-522, 2018.

P. DES GACHONS, C., T. TOMINAGA, AND D. DUBOURDIEU. Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grapes by assaying S-cysteine conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 3387-3391, 2000.

PARKER, M., *et al.* Identification and quantification of a marker compound for 'pepper' aroma and flavor in Shiraz grape berries by combination of chemometrics and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem**, v. 55, p.5948-5955. 2007.

PEÑA-GALLEGO, A., *et al.* S-Cysteinylated and S-glutathionylated thiol precursors in grapes. A review. **Food Chem**, v. 131, p. 1-13, 2012.

PIGGOTT, J.R. Relating sensory and chemical data to understand flavor. **J. Sens. Stud.**, v. 4, p. 261-272, 1990.

PINU, F. R. Grape and Wine Metabolomics to Develop New Insights Using Untargeted and Targeted Approaches. **Fermentation**, v. 92, n. 4, p. 2018.

PONS, A. *et al.* Impact of *Plasmopara viticola* infection of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes on wine composition and flavor. **Food chemistry**, v. 239, p. 102-110, 2018.

PRIOR, K.J.; BAUER, F.F.; DIVOL, B. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-Saccharomyces yeasts associated with wine. **Food Microbiol.** 79, 75–84, 2019.

RENAULT, P. *et al.* Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. **International journal of food microbiology**, v. 207, p. 40-48, 2015. I

REVI, M. *et al.* Effect of packaging material on enological parameters and volatile compounds of dry white wine. **Food chemistry**, v. 152, p. 331-339, 2014.

ROBINSON, A.L.; BOSS, P. K.; SOLOMON, P. S.; TRENGOVE, R. D.; HEYMANN, H.; EBELER, S. E.; Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 65, p. 1, 2014.

RODRIGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; BROOCK, M.; VALLES, S.; RAMÓN, D.; CABALLERO, A. C.; Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. **Journal of Applied Microbiology** v. 96, p. 84–95, 2004.

ROMÁN, T. *et al.* Importance of polyfunctional thiols on semi-industrial Gewürztraminer wines and the correlation to technological treatments. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 3, p. 379-386, 2018.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A.; Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology** v. 86, p. 169-180, 2003.

ROSI I, M VINELLA, A GHERI AND M BERTUCCIOLI. 1997. Enzymatic hydrolysis of monoterpene glycosides of different grape varieties by an immobilized yeast β -glucosidase. In: **Proceedings for the 4th international symposium on cool climate viticulture and enology**, v. 6, p 84–89.

SAERENS SM, *et al.* Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb Biotechnol**, v. 3, p.165-177, 2010.

SAERENS, S.M.G., F. *et al.* Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 454-461. 2008.

SERRATOSA, M. P.; MARQUEZ, A.; MOYANO, L.; ZEA, L.; MERIDA, J.; Chemical and morphological characterization of Chardonnay and Gewürztraminer grapes and changes during chamber-drying under controlled conditions. **Food Chemistry**, v. 159, p. 128-136, 2014.

SWIEGERS JH AND PRETORIUS IS. Yeast modulation of wine flavor. **Adv Appl Microbiol** v. 57, p. 131-175, 2005.

TOMINAGA T, MASNEUF I, DUBOURDIEU D A S-cysteine conjugate, precursor of aroma of white Sauvignon. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 29, p. 227–232, 1995.

VERÍSSIMO, C. M. **Perfil volátil e caracterização sensorial de vinhos tropicais Arinto e Fernão Pires do Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 95. 2015.

VERSTREPEN KJ, *et al.* Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. **Appl Environ Microbiol** , v. 69, p. 5228-5237, 2003.

WANG, Q. J.; SPENCE, C. Wine complexity: An empirical investigation. **Food Quality and Preference**, v. 68, p. 238-244, 2018.

ZHANG, X-K.; LAN, Y-B.; ZHU, B-Q.; ZIANG, X-F.; DUAN, C-Q.; SHI, Y. Changes in monosaccharides, organic acids and amino acids during Cabernet Sauvignon wine ageing based on a simultaneous analysis using gas chromatography–mass spectrometry. **J Sci Food Agric.**, v. 98 p. 104–112, 2018.

ZIETSMAN, A. J. J.; KLERK, D.; RENSBURG, P.; Coexpression of α -L-arabinofuranosidase and β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res** v. 11 p. 88–103, 2011.

ZIÓŁKOWSKA, A.; WĄSOWICZ, E.; JELEŃ, H. H. Differentiation of wines according to grape variety and geographical origin based on volatiles profiling using SPME-MS and SPME-GC/MS methods. **Food chemistry**, v. 213, p. 714-720, 2016.

Material Suplementar do Artigo

Tabela S1. Análise Sensorial de Vinhos Gewürztraminer fermentados com leveduras *Saccharomyces* e não - *Saccharomyces*

Parâmetros	Leveduras					
	MpE	ScbC	SccA	SccB	TdD	CV%
Intensidade Aromática	4,92a*	4,75a	5,30a	4,31a	3,91a	39,82
Floral	3,70ab	4,45b	3,60ab	3,82ab	3,32a	32,64
Frutas Cítricas	3,18a	3,75a	3,53a	3,95a	3,55a	36,25
Frutas Brancas	5,66b	3,32a	5,41b	4,21a	3,73a	31,25
Frutas Tropicais	3,35a	5,55c	5,29c	3,62ab	4,57bc	30,53
Ervas	2,98a	4,02b	3,45ab	3,80b	3,93b	28,18
Qualidade Geral do Aroma	5,21a	4,60a	5,07a	4,53a	4,98a	34,06
Equilíbrio	5,02a	4,52a	4,87a	4,86a	4,89a	32,35
Qualidade Geral do Vinho	5,54a	4,52a	5,32a	4,65a	5,14a	31,39

*Diferentes letras na linha significam diferença estatística entre as leveduras ($P < 0,05$). Leveduras utilizadas na fermentação: gênero *Saccharomyces* (*S. cerevisiae cerevisiae* SccA, *S. cerevisiae* SccB e *S. cerevisiae bayanus* ScbC) e não – *Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* TdD e *Metschnikowia pulcherrima* MpE)

Tabela S2. Identificação putativa dos compostos voláteis detectados por SPME-GC-MS em vinhos Gewürztraminer fermentado com leveduras *Saccharomyces* e não - *Saccharomyces*

Metabólito	TR	Fórmula Molecular	CAS	MpE	ScbC	SccA	SccB	TdD
Álcoois								
1-Hexanol	4.95	C₆H₁₄O	111-27-3	2822947**	1091049	2954904	3179164	4473160
2-Hexanol, 2,5-dimetil-, (S)-	10.08	C₈H₁₈O	3730-60-7	369984	263857	ND***	292030	240079
Álcool Feniletílico	14.80	C₈H₁₀O	60-12-8	371842	773575	603863	679435	668280
1-Nonanol	17.93	C₉H₂₀O	143-08-8	12556	22283	18469	13885	21019
1-Octanol, 2-butil-	19.73	C₁₂H₂₆O	3913-02-8	12702	22341	12204	20541	14996
1-Heptanol, 2,4-dietil-	23.60	C₁₁H₂₄O	80192-55-8	8339	14033	9750	15507	14361
Ésteres								
Acetato de Isoamila	5.24	C₇H₁₄O₂	123-92-2	7842075	2102898	8638527	5805494	6939138
Acetato de 2-Metilbutila	5.38	C₇H₁₄O₂	624-41-9	86450	242243	593127	260606	295506
Hexanoato de Etila	10.90	C₈H₁₆O₂	123-66-0	592844	1744019	6190948	1613295	498722
Dietil succinato	17.75	C₈H₁₄O₄	123-25-1	75928	209982	145122	159169	265251
Octanoato de Etila	18.90	C₁₀H₂₀O₂	106-32-1	1073659	2395736	2075307	2580483	582195
Acetato de Feniletila	20.30	C₁₀H₁₂O₂	103-45-7	330000	131147	270212	62569	91722
Decanoato de Etila	25.72	C₁₂H₂₄O₂	110-38-3	965034	1001270	391043	906078	93092
Decanoato de decila	31.35	C₂₀H₄₀O₂	1654-86-0	16660	24680	36625	34216	194312
Benzoato 2-Etilhexila	34.50	C₁₅H₂₂O₂	5444-75-7	18029	11490	4866	5738	9784
2-metilbutirato de Etila	4.23	C₇H₁₄O₂	7452-79-1	21992	83046	118339	78642	18703
Isovalerato de Etila	4.32	C₇H₁₄O₂	108-64-5	162776	315930	206044	272649	35484
Ácidos								
Ácido 2-etilhexanóico	16.33	C₈H₁₆O₂	149-57-5	8984	7378.5	5612	20714	19252
Ácido Tetradecanóico	36.21	C₁₄H₂₈O₂	544-63-8	6364	3807	7540	5432	180247

Média das áreas relativas dos compostos por tratamento (n=3). *ND: Não Detectado. Leveduras utilizadas na fermentação: gênero *Saccharomyces* (*S. cerevisiae cerevisiae* SccA, *S. cerevisiae* SccB e *S. cerevisiae bayanus* ScbC) e não – *Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* TdD e *Metschnikowia pulcherrima* MpE)

Tabela S2. Continuação

Metabólito	TR	Fórmula Molecular	CAS	MpE	ScbC	ScCA	ScCB	TdD
<i>Benzenóides e fenóis</i>								
Benzaldeído, 2,4-dimetila-	18.48	C₉H₁₀O	15764-16-6	709228	988802	1390603	704067	1134728
4,6-di-tert-Butil-m-cresol	27.90	C₁₅H₂₄O	497-39-2	13970	15677	ND	107812	12201
<i>Aldeídos</i>								
Nonanal	15.00	C₉H₁₈O	124-19-6	547972	639305	731268	462969	6470859
2-Decenal, (E)-	20.77	C₁₀H₁₈O	3913-71-1	34322	40270	39704	41966	40275
Dodecanal	25.91	C₁₂H₂₄O	112-54-9	124576	11967	10215	10975	10371
Heptanal	6.00	C₇H₁₄O	111-71-7	510629	109592	938312	400229	103531
Octanal	10.68	C₈H₁₆O	124-13-0	128425	193676	1678544	163545	171295
<i>Cetonas</i>								
2-Octanona	7.90	C₈H₁₆O	111-13-7	68883	32393	205697	31108	32078
5-Hepten-2-ona, 6-metil-	9.96	C₈H₁₄O	110-93-0	156353	58562	ND	51105	72825
2-Tetradecanona	14.56	C₁₄H₂₈O	2345-27-9	ND	58673	ND	ND	68202
<i>Terpenóides</i>								
α-Pineno	8.12	C₁₀H₁₆	25766-18-1	32827	ND	15584	40644	12808
p-Cimeno	11.73	C₁₀H₁₄	99-87-6	26230	29434	ND	37526	29263
Eucaliptol	12.07	C₁₀H₁₈O	470-82-6	14615	20769	ND	22053	23503
Óxido de Nerol	17.10	C₁₀H₁₆O	1786-08-9	7393.5	10615	16721	10382	9917
α-Terpineol	18.20	C₁₀H₁₈O	98-55-5	10070	18141	82305	107054	18936
Mentol	17.66	C₁₀H₂₀O	1490-04-6	21197	29313	24809	27883	36763

Média das áreas relativas dos compostos por tratamento (n=3) *ND: Não Detectado. Leveduras utilizadas na fermentação: gênero *Saccharomyces* (*S. cerevisiae cerevisiae* ScCA, *S. cerevisiae* ScCB e *S. cerevisiae bayanus* ScbC) e não – *Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* TdD e *Metschnikowia pulcherrima* MpE)

Gráfico S1. Acompanhamento da densidade durante a fermentação.

