

**Fermentação espontânea e inoculada com  
*Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162 da  
polpa de gabioba para elaboração de bebida  
fermentada**

**WHASLEY FERREIRA DUARTE**

**2008**

**WHASLEY FERREIRA DUARTE**

**Fermentação espontânea e inoculada com *Saccharomyces cerevisiae*  
UFLA CA 1162 da polpa de gabioba para elaboração de bebida  
fermentada**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Duarte, Whasley Ferreira.

Fermentação espontânea e inoculada com *Saccharomyces cerevisiae*  
UFLA CA 1162 da polpa de gabioba para elaboração de bebida  
fermentada / Whasley Ferreira Duarte. – Lavras : UFLA, 2008.

100 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Gabioba. 2. Bebida fermentada. 3. Fermentação espontânea. 4.  
*Saccharomyces cerevisiae* I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.63

**WHASLEY FERREIRA DUARTE**

**Fermentação espontânea e inoculada com *Saccharomyces cerevisiae*  
UFLA CA 1162 da polpa de gabioba para elaboração de bebida  
fermentada**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 21 de julho de 2008.

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

UNILAVRAS

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres

UFLA

Dra. Cristina Ferreira Silva

UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida, da sabedoria, da perseverança e do amor: sem ele nada seria possível.

À professora, amiga e mãe Dra. Rosane Freitas Schwan pelos ensinamentos, atenção e confiança.

Ao professor Disney pela co-orientação e pelo exemplo como pessoa e profissional.

Aos meus pais, Quincas e Táta, pelo apoio constante em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã Rhayssa, pela presença constante em minha vida.

À Priscilla, pelo companheirismo, amor, paciência e confiança.

Ao Sr. Alvaci e à D. Eli, por me receberem com tanto carinho em sua família.

Às amigas Ivani e Magda, pela paciência e ajuda constantes desde a graduação.

À Cidinha, pelo apoio nas análises cromatográficas.

A todos os amigos do laboratório de microbiologia.

À Giovana e à Cristina, pela participação na banca avaliadora.

À Rafaela, Elaine, Dona Iro, Dona Du e todo pessoal do DBI, pela convivência diária.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
FERMENTADO DE FRUTAS E FERMENTAÇÃO .....	1
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	4
2.1 Cerrado .....	4
2.2 Fruteiras do cerrado .....	6
2.3 Gabiroba ( <i>Campomanesia pubescens</i> (DC.) O.Berg) .....	7
2.4 Vinho .....	9
2.4.1 Histórico .....	9
2.4.2 Processo de produção .....	11
2.4.2.1 Extração do suco e preparo do mosto .....	11
2.4.2.2 Trásfega .....	16
2.4.2.3 Filtração .....	17
2.4.2.4 Atesto .....	18
2.5 Fermentação .....	18
2.6 Microbiota presente na fermentação espontânea .....	20
2.7 Leveduras selecionadas .....	21
2.8 Compostos voláteis formadores de <i>flavour</i> .....	23
2.8.1 Etanol .....	26
2.8.2 Glicerol .....	27
2.8.3 Álcoois superiores .....	28
2.8.4 Aldeídos .....	30
2.8.5 Ésteres .....	31
2.8.6 Ácidos orgânicos .....	33
2.8.7 Compostos sulfurados .....	36
2.9 Vinho de frutas .....	37
2.10 Métodos moleculares na identificação e caracterização de leveduras .....	40
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	55
SPONTANEOUS AND INOCULATED FERMENTATION WITH <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA CA 1162 GABIROBA PULP FOR ELABORATION OF FERMENTED BEVERAGE .....	55
<b>RESUMO</b> .....	56
<b>ABSTRACT</b> .....	57
<b>1 Introduction</b> .....	59
<b>2 Material and Methods</b> .....	61
2.1 Fruits .....	61

2.2 Gabiroba must.....	62
2.3 Fermentation assays.....	62
2.4 Isolation and identification yeast from spontaneous fermentation.....	63
2.5 Electrophoretic karyotype analysis yeast from spontaneous fermentation ..	64
2.6 Molecular identification of yeast yeast from spontaneous fermentation .....	64
2.7 Substrates and metabolites .....	65
2.8 Sensory evaluation .....	66
2.9 Statistical analysis .....	67
<b>3 Results and discussion .....</b>	<b>67</b>
3.1 Yeast fermentation dynamics.....	70
3.3 Chemical analyses during fermentation .....	81
3.4 Sensory analysis of the beverage .....	89
<b>4 References .....</b>	<b>94</b>

## RESUMO

DUARTE, Whasley Ferreira. **Fermentação espontânea e inoculada com *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162 da polpa de gabioba para elaboração de bebida fermentada**. 2008. 100p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>1</sup>

A utilização de frutas para elaboração de bebidas fermentadas constitui nova alternativa para redução de perdas pós-colheita e, no caso de frutas pouco exploradas como a gabioba, nova forma de exploração econômica sustentável do ambiente tal como o bioma cerrado. Outro benefício advindo do uso de frutas na produção de bebida fermentada é a possibilidade de geração de renda. A gabioba (*Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg) é uma mirtácea e encontra-se distribuída desde Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo até o Rio Grande do Sul. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial da gabioba na produção de uma bebida fermentada, comparando a levedura selecionada UFLA CA 1162 e fermentação espontânea. Na fermentação inoculada, a população da levedura UFLA CA 1162 permaneceu estável durante os 5 dias de fermentação ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* predominaram na fermentação espontânea a partir do nono dia de fermentação, substituindo as não *Saccharomyces* (*Candida quercitrusa* e *Issatchenkia terricola*) encontradas no período inicial da fermentação. As bebidas produzidas apresentaram diferente composição quanto aos componentes voláteis presentes. Os valores para sólidos solúveis totais (Brix) e concentração de etanol foram semelhantes para as duas bebidas, sendo encontrado Brix de 5,2 e 5,0 e concentração de etanol de 38,71 e 38,72 g L<sup>-1</sup> para bebidas produzidas por fermentação espontânea e inoculada, respectivamente. Na análise sensorial, a bebida produzida por fermentação espontânea apresentou melhor aceitação para os atributos aparência, aroma, sabor e aspectos gerais.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Orientadora), Disney Ribeiro Dias - UNILAVRAS (Co-Orientador).

## ABSTRACT

DUARTE, Whasley Ferreira. **Spontaneous and inoculated fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162 in gabioba pulp for elaboration of fermented beverage**. 2008. 100 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras.<sup>2</sup>

The use of fruit for preparation of fermented beverages is a new alternative for reducing post harvest losses and, for fruit little explored as gabioba, a new form of sustainable economic exploitation of the environment of occurrence as the cerrado biome. Another benefit of using fruit for fermented beverage production of fermented beverage is the potential to generate income. The gabioba (*Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg is a myrtacea that spread in Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo to Rio Grande do Sul states of Brazil. The objective of this study was to evaluate the potential of gabioba in the production of a beverage fermented using yeast selected UFLA CA 1162 and spontaneous fermentation. In the inoculated fermentation (IN UFLA CA 1162), the population remained stable during the 5 days of fermentation ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>). Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* predominated in spontaneous fermentation from the 7<sup>th</sup> day of fermentation, replacing the non-*Saccharomyces* (*Candida quercitrusa* and *Issatchenkia terricola*) found in the initial period of fermentation. The gabioba wine (IN UFLA CA 1162 and SPON) showed different volatile composition. The values for total soluble solids (Brix) and concentration of ethanol were similar for both gabioba wines. Brix value was 5.2 and 5.0 and concentration of ethanol was 38.71 and 38.72 g L<sup>-1</sup> for beverages produced by spontaneous fermentation and inoculated, respectively. In sensory analysis, the beverage produced by spontaneous fermentation showed greater acceptance for the attributes appearance, aroma, flavor and overall.

---

<sup>2</sup> Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Major Professor), Disney Ribeiro Dias - UNILAVRAS.

## **CAPÍTULO 1**

### **FERMENTADO DE FRUTAS E FERMENTAÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A história da humanidade se confunde com a história das bebidas alcoólicas. Os primeiros indícios sobre o consumo de álcool têm um registro histórico de aproximadamente 6000 a.C. A produção de vinho é também datada deste período, sendo o vinho uma das mais antigas bebidas produzidas e consumidas pela humanidade. Pesquisas arqueológicas comprovam que os jarros de vinho encontrados nas tumbas de alguns faraós continham inscrições sobre data, origem e qualidade. Até mesmo na mitologia Grega, o vinho está presente como a bebida mais apreciada pelos deuses, a exemplo de Dionísio e Baco.

Embora a uva seja a principal matéria-prima empregada na produção de bebidas fermentadas, em muitos países, principalmente europeus, frutas como maçã, pêra, groselha e cereja também são utilizadas e seguem os mesmos processos empregados na produção do vinho de uva. Em países tropicais, frutas como laranja, goiaba, abacaxi, manga, caju e abricó já foram utilizadas para elaboração de vinhos saborosos e com boa aceitação (Muniz et al., 2002).

A produção de bebidas fermentadas a partir de frutas tem se mostrado uma alternativa promissora no aproveitamento de frutas diversas, principalmente aquelas produzidas em grandes quantidades e cujas perdas pós-colheita são elevadas. Além destas frutas, atenção especial tem sido direcionada para aquelas nativas das várias regiões brasileiras e que apresentam potencial econômico ainda pouco explorado. Destacam-se, neste contexto, as fruteiras do cerrado como a mangada, cagaita, araticum, cajuí e a gabioba.

A gabirobeira pertence à família *Myrtaceae* e ao gênero *Campomanesia*. As várias espécies estão distribuídas em diversos países como Brasil, Argentina, México, Peru, Equador e Colômbia. No Brasil, a gabioba é encontrada principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás e do Espírito Santo até o Rio

Grande do Sul. Os frutos de sabor adocicado, coloração variada (verde a amarelo) são alimento para pássaros, mamíferos e répteis, principais dispersores de suas sementes. Na alimentação humana, os frutos têm sido consumidos *in natura* e sob a forma de sucos, sorvetes, doces, geléias, licores e picolés. Popularmente, a gabioba apresenta qualidades medicinais, sendo suas folhas e frutos usados no combate à gripe e suas cascas empregadas no tratamento de problemas gastrointestinais como diarreia e problemas do trato urinário, como a cistite e a uretrite; além do uso da infusão das folhas no alívio de dores musculares (Carvalho, 2002).

A produção de bebida fermentada a partir da polpa de gabioba -- seja pela fermentação espontânea conduzida pelos microrganismos presentes naturalmente nos frutos ou com uso de leveduras selecionadas -- é uma nova forma de exploração econômica desta fruteira, seguindo as atuais tendências de aproveitamento de espécies nativas do cerrado de forma sustentável e economicamente viável, contribuindo para a preservação do bioma e para desenvolvimento econômico das regiões de ocorrência desta espécie.

O presente trabalho teve como objetivos: i) avaliar o potencial da gabioba para produção de uma bebida fermentada utilizando levedura selecionada e fermentação espontânea; ii) analisar a produção de metabólitos durante a fermentação; e iii) avaliar a composição e aceitação da bebida produzida.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

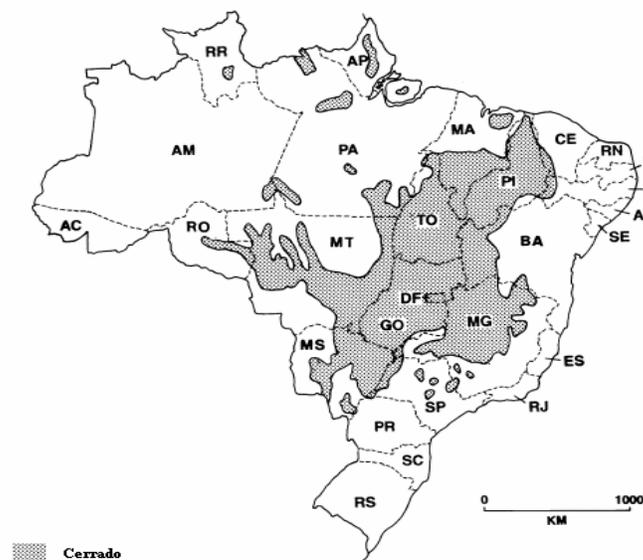
### 2.1 Cerrado

Denominado localmente como Cerrado, o ambiente savânico no Brasil é um bioma extenso e complexo, podendo ser descrito como um mosaico de tipos vegetacionais, verticalmente estruturado por espécies herbáceas, arbustivas e arborescentes (Ferreira et al., 2006). Este bioma apresenta grande diversidade de espécies, sendo considerado a savana de maior biodiversidade do mundo (IBAMA, 2008). Apresenta 10000 espécies de plantas, sendo 4400 endêmicas, 1268 espécies de vertebrados (837 de aves, 161 de mamíferos, 120 de répteis e 150 anfíbios), sendo 117 destas consideradas endêmicas (Myers et al., 2000).

O cerrado brasileiro ocupa uma área aproximada de 2 milhões de km<sup>2</sup> na região central do Brasil. Esta área representa cerca de 23% do território do país, sendo superada apenas pela floresta Amazônica, cuja área é de 3,5 milhões de km<sup>2</sup> (Ratter et al., 1997). O Cerrado está distribuído, principalmente, no Planalto Central do Brasil, nos Estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, parte de Minas Gerais, Bahia e Distrito Federal (Figura 1). Há outras áreas de cerrado, chamadas periféricas ou ecótonos, que são transições com os biomas Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga. O cerrado pode ainda, sob o ponto de vista fisionômico, ser denominado de cerradão, cerrado típico, campo cerrado, campo sujo de cerrado e o campo limpo que apresentam altura e biomassa vegetal em ordem decrescente (IBAMA, 2008) (Figura 2). A vegetação é muito variada, sendo encontradas desde pastagens densas com escassa cobertura de árvores e arbustos, até uma floresta quase fechada com dossel de 12 a 15 metros de altura (Ratter et al., 1997).

Apesar da sua grande extensão e biodiversidade, o cerrado tem sido pouco valorizado quanto à sua conservação. Estima-se que aproximadamente 40% da vegetação nativa do cerrado já tenham sido removidas, principalmente

devido à ampliação da fronteira agropecuária e ao aumento da população de forma acelerada nos últimos 40 anos (Ministério do Meio Ambiente, 2008). Os distúrbios na vegetação do cerrado têm ocorrido em vastas áreas. Hoje, menos de 3% de sua superfície está protegida em Unidades de Conservação e mais de 60% da região já foi profundamente modificada pela ocupação antrópica, ou seja, lavouras diversas, pastagens e ocupação urbana (Brasil et al., 1999).



**FIGURA 1** Distribuição do bioma cerrado no território brasileiro. Modificado de Ratter et al. (1997).



**FIGURA 2** Características da vegetação nos diferentes tipos de cerrado.  
Modificado de Ferreira et al. (2006).

## 2.2 Fruteiras do cerrado

As frutas nativas do cerrado apresentam sabor característico, elevados teores de açúcares, vitaminas, proteínas e sais minerais. Historicamente, estas frutas são exploradas pelas populações das regiões de cerrado. Todavia, a partir dos anos 40, o interesse industrial pela exploração dessas frutas registrou um aumento expressivo e entre os exemplos que podem ser citados estão frutas como a mangaba (produção de látex), babaçu, macaúba (óleo combustível) e guariroba (palmito) (Avidos & Ferreira, 2003).

As frutas nativas do cerrado têm também um papel relevante em diversas áreas, tais como na dieta alimentar, nos usos medicinais, no setor madeireiro, tintorial, ornamental, corticeira e melífera, além de serem fonte de alimento para os animais. Atualmente, aproximadamente 58 espécies são exploradas pela população que vive nas regiões de cerrado. Dentre estas, podemos citar pequi (*Caryocar brasiliense*), jatobá (*Hymenaea courbaril*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), araticum (*Annona cassiflora* Mart.), baru (*Dipteryx alata* Vog.), mangaba (*Hancornia speciosa*), buriti (*Mauritia flexuosa* Linn.), jenipapo

(*Genipa americana*) e cajuí (*Anacardium spiucearum*) (Aquino & Oliveira, 2006).

Roesler et al. (2007) avaliaram o potencial antioxidante de araticum, lobeira (*Solanum lycocarpum*), cagaita, pequi e banha de galinha (*Swartzia langsdorfii*). Concluíram que os extratos etanólico e aquoso de casca de pequi, extrato etanólico de semente de cagaita, extrato etanólico de semente e casca de araticum e extrato etanólico de casca de banha de galinha possuem excelente capacidade de seqüestrar radicais livres, ou seja, atividade antioxidante. Os autores salientam que as frutas avaliadas em seu estudo são utilizadas atualmente apenas pelas populações regionais e apresentam pouco ou nenhum valor comercial. Assim, é bastante provável que, em função da baixa valorização econômica desses recursos naturais, o bioma cerrado esteja sendo rapidamente devastado para a criação de áreas de pastagens ou plantio de oleaginosas como a soja.

Avaliando o potencial de frutas tropicais na produção de bebida fermentada, Muniz et al. (2002) constataram que o fermentado de mangaba demonstrou melhor desempenho na análise sensorial para os atributos aceitação global e intenção de compra quando este fermentado foi comparado com outros produzidos a partir de frutas como ciriguela e ata.

### **2.3 Gabiroba (*Campomanesia pubescens* (DC.) O.Berg)**

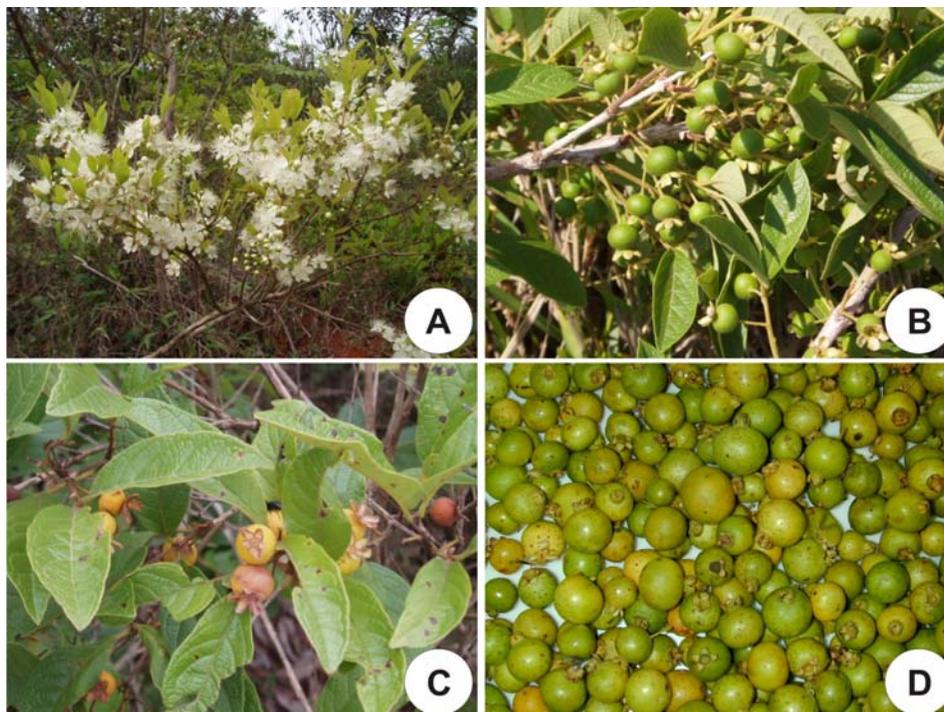
As plantas da família Myrtaceae encontram-se distribuídas nas regiões subtropicais e pantropicais, concentradas na região neotropical e na Austrália. A família é composta por cerca de 130 gêneros e 4000 espécies, sendo que no Brasil são encontrados 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies. É uma família de grande importância na produção de madeira (*Eucalyptus* spp) e na

produção de frutas com destaque para o gênero *Psidium* no qual estão incluídas a goiabeira e o araçá. Destacam-se também espécies do gênero *Myrciaria* (jabuticabeira), *Eugenia* (pitangueira), *Syzygium* (jambo e jambolão) e *Campomanesia* (gabirola e cambuci) (Souza & Lorenzi (2005).

A espécie *Campomanesia pubescens* (DC) O. Berg é popularmente conhecida por gabirola ou guabirola. O gênero *Campomanesia* é representado por árvores e arbustos, podendo ser encontrado do Norte da Argentina até Trindade, e desde a região costeira brasileira até os Andes no Peru, Equador e Colômbia (Landrum, 1986). O nome *Campomanesia* é uma homenagem ao naturalista espanhol Rodrigues de Campomanes e a palavra “gabirola” tem suas raízes na língua tupi-guarani e significa casca amarga (Carvalho, 2002).

As plantas são pouco exigentes quanto ao tipo de solo e os frutos amadurecem nos meses de setembro a novembro, apresentando formato redondo, de coloração que varia do verde-escuro ao verde-claro e amarelo (Figura 3), exalando aroma adocicado e bastante agradável. Comumente são consumidos em algumas regiões de ocorrência sendo também utilizados para produção de sorvetes, sucos, doces e picolés. As espécies do gênero *Campomanesia* se destacam como potencial recurso alimentar da avifauna e do homem (Vallilo et al., 2006).

Os frutos são empregados na alimentação humana sendo consumidos *in natura*, na forma de doces, sucos, licores, sovertes, geléias e picolés (Carvalho, 2002).



**Figura 3** Detalhes da frutificação da gabiroba. Em (A), florescimento; em (B), frutos verdes; em (C), frutos maduros; em (D), frutos maduros colhidos.

## 2.4 Vinho

Vinho é uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. O mosto simples de uva é o produto obtido pelo esmagamento ou prensagem da uva sã, fresca e madura, com a presença ou não de suas partes sólidas (Brasil, 1988). Ainda segundo Brasil (1988), os vinhos podem ainda ser classificados conforme a classe (de mesa, leve, fino, espumante, frisante, gaseificado, licoroso e composto), a cor (tinto, rosado, rosé ou clarete e branco) e teor de açúcar (nature, extra-brut, brut, seco, meio seco, suave e doce).

### **2.4.1 Histórico**

O histórico da vinificação é paralelo ao da civilização. Os primeiros relatos datam de 6000 a.C. na região de Cáucaso e Mesopotâmia. Relatos sobre o vinho também são datados de 5000 a.C. no Egito e Fenícia, 2000 a.C. na Grécia e Creta e 500 a.C. na Itália, França, Espanha, Portugal e Norte da África (Pretorius, 2000). Segundo a bíblia (Gênesis 9, 20-21), Noé plantou a videira após a inundação e produziu vinho. Ele ficou inebriado pelo vinho. Na Babilônia (2200 a.C.), o vinho era misturado a pomadas usadas em doenças cutâneas. No Egito (1500 a.C.), misturas com vinho era utilizadas no tratamento contra constipações, asma, epilepsia e prevenção de icterícia. Hipócrates (460-370 a.C.), na Grécia antiga, recomendava vinho para o tratamento de feridas, como diurético, para reforçar pessoas fisicamente desgastadas e como sedativo (Fehér et al., 2007).

Em 1530, a uva foi introduzida no México, Argentina, Peru e Chile pelos conquistadores espanhóis e, posteriormente, por volta de 1870, foi plantada na Califórnia, Austrália e Nova Zelândia. Em 1863, Louis Pasteur comprovou a presença de atividade microbiana durante a fermentação da uva e conseguiu provar que os microrganismos eram os principais catalisadores da fermentação do vinho. Com o conhecimento de que leveduras eram responsáveis pela conversão dos açúcares em álcool e dióxido de carbono, o processo de produção poderia ser controlado resultando em melhorias na qualidade e aumento da quantidade produzida de vinho. A partir do século 17, o volume produzido e a tecnologia de fermentação do vinho sofreram avanços significativos (Pretorius, 2000).

## **2.4.2 Processo de produção**

Hashizume (2001) definiu a vinificação como conjunto de operações realizadas para transformar a uva em vinho. Ainda de acordo com este autor, o processo de vinificação pode variar conforme o tipo de vinho a ser produzido, podendo as operações comuns às diferentes vinificações serem resumidas em esmagamento e desengaçamento; sulfitagem; correções do mosto; inoculação de leveduras; remontagem e refrigeração; acompanhamento da fermentação; e prensagem de bagaços. Outra maneira de listar as etapas que compõem o processo de vinificação envolve as operações envolvidas na fabricação do vinho compreendem a extração e preparo do mosto; fermentação alcoólica; trasfega; clarificação e conservação (Corazza et al., 2001). De forma semelhante e complementar, Fleet (1999) citou as mesmas etapas acrescentando a fermentação malolática por bactérias do ácido lático com uma etapa opcional do processo de vinificação.

### **2.4.2.1 Extração do suco e preparo do mosto**

Uma primeira etapa no processo de vinificação consiste no esmagamento das bagas da uva. O processo de esmagamento é realizado com o objetivo de romper as bagas liberando o suco de forma que as sementes e engaços não sejam esmagados. Esta operação visa também à obtenção de uma boa dissolução de matérias corantes e de taninos contidos na casca dilacerada (vinho tinto), além de provocar uma intensa aeração do mosto antes do início da fermentação favorecendo o desenvolvimento das leveduras (Hashizume, 2001). Segundo Cataluña (1988), o processo de esmagamento tem como vantagem permitir que a maceração durante a fermentação seja mais eficiente, possibilitando a obtenção de vinhos mais tintos, quase completamente secos em curto prazo pela regularização da fermentação.

A prática de separação da ráquis (eixo da inflorescência) das bagas é denominada de “desengace”. Esta separação é de grande importância para a qualidade do vinho, pois a presença da ráquis interfere negativamente na composição química do mosto devido ao baixo teor de açúcares, acidez e elevado teor de potássio, podendo levar ao aparecimento de sabor amargo e sensação de adstringência nos vinhos tintos devido à presença de taninos (Meneguzzo et al., 2006; Hashizume, 2001). A presença do engaço pode levar a uma redução do teor alcoólico do vinho de 0,2 a 0,4% pela água presente em sua constituição e pela absorção de parte do álcool pelo engaço (Hashizume, 2001). No entanto, Pato (1982) relatou que a adoção da prática de desengace apresenta vantagens e desvantagens, pois, no caso dos vinhos destinados à consumidores que têm preferência por uma bebida encorpada, corada e taninosa, a não retirada do engaço será desejada. Já para os vinhos suaves e delicados, o desengace se faz necessário.

O uso do anidrido sulfuroso ( $\text{SO}_2$ ) como agente antimicrobiano é uma prática que vem sendo realizada durante séculos. Primeiramente usado pelos egípcios e posteriormente pelos romanos, o  $\text{SO}_2$  era inicialmente usado para limpeza das ânforas. O seu uso na fermentação possibilitou melhoria significativa por causa do seu efeito inibitório no crescimento de leveduras e bactérias indesejáveis na fermentação (Romano & Suzzi, 1993).

O anidrido sulfuroso pode ser empregado em diferentes formas como vapor gerado pela combustão de enxofre; anidrido sulfuroso puro (líquido); e metabissulfito de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ). O emprego sob forma de vapor é o método mais antigo de uso e hoje encontra-se praticamente abandonado. Sob a forma líquida, o anidrido sulfuroso é amplamente utilizado em diversos países do mundo sendo obtido sob condição de pressão e engarrafado em cilindros de aço. O metabissulfito de potássio é comumente utilizado em pequenas indústrias devido à sua facilidade de uso. Este é um sal branco que teoricamente rende

57% do seu peso em SO<sub>2</sub> (Hashizume, 2001). Pato (1982) citou que o uso de SO<sub>2</sub> sob a forma de metabissulfito pode levar a um aumento no teor de potássio no vinho.

Segundo Romano & Suzzi (1993), as funções exercidas pelo SO<sub>2</sub> são necessárias para obtenção de um vinho de boa qualidade. Estas funções são, de acordo com Hashizume (2001), as seguintes:

- Efeito dissolvente, facilitando o efeito da dissolução da cor e dos polifenóis;
- Efeito antioxidante, por receber o oxigênio do ar protegendo o mosto e o vinho;
- Efeito antioxidásico, destruindo a enzima oxidase, catalisadora da oxidação;
- Efeito inibitório, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis como bactérias e algumas leveduras.

Segundo Pato (1982), o uso do SO<sub>2</sub> apresenta ainda ação clarificante pelo efeito coagulante sobre substâncias albuminóides, pécticas e coloidais.

Constantí et al. (1998) verificaram em seu trabalho que o uso de SO<sub>2</sub> inibiu o crescimento de leveduras como *Candida stellata* e *Hanseniaspora uvarum* e outras não *Saccharomyces*, pois estas somente estiveram presentes nos primeiros dias de fermentação quando não se utilizou o SO<sub>2</sub>. Ainda segundo estes autores, além da inibição de não *Saccharomyces*, o uso do SO<sub>2</sub> permitiu um rápido desenvolvimento de *Saccharomyces cerevisiae*. A ação inibitória do SO<sub>2</sub> sobre a população de leveduras não *Saccharomyces* também foi confirmada por Kling et al. (1998), onde, em comparação com mosto não sulfitado, não foram encontradas *Zygosaccharomyces* e *Kloeckera apiculata* quando se fez o emprego de 20 mg L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> no mosto. O SO<sub>2</sub> apresenta também efeito inibitório eficiente sobre bactérias ácido-láticas. A forma de atuação deste

composto sobre estas bactérias ainda não está bem esclarecida e estudos mais detalhados são necessários (Romano & Suzzi, 1993).

O uso de SO<sub>2</sub> na vinificação pode levar a alterações nas características da bebida final. Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta (2007) encontraram diferenças significativas na concentração de etilhexanoato entre vinhos produzidos com SO<sub>2</sub> e vinhos produzidos sem adição de SO<sub>2</sub>. Variações também foram encontradas no conteúdo total de álcoois. Kling et al. (1998) encontraram diferenças na avaliação sensorial das bebidas ao avaliarem o efeito do uso de SO<sub>2</sub> em fermentações inoculadas e não inoculadas.

Chaptalização é o termo usado para designar a operação de correção do mosto na qual se adiciona açúcar ao suco da uva (Hashizume, 2001). Esta prática vem sendo utilizada desde o século 18 e antes do uso de açúcar, a correção era feita com adição de mel (Cataluña, 1988). O açúcar a ser utilizado deve ser de boa qualidade e previamente deve ser diluído em pequena quantidade do próprio mosto.

A chaptalização é efetuada entre o segundo e o terceiro dia após iniciada a fermentação, juntamente com a remontagem; facilitando assim a homogeneização (Meneguzzo et al., 2006). Hashizume (2001) citou que a chaptalização deve ser realizada em única vez na fase tumultuosa da fermentação, ou seja, quando o mosto apresenta metade do açúcar não transformado. Rizzon & Miele (2005), avaliando o uso de açúcar mascavo e glicose de milho para chaptalização, concluíram que estes não substituem a sacarose comercial no processo de chaptalização. A correção é realizada considerando-se que a adição de 17g de açúcar por litro resultará em um acréscimo de um grau GL (Gay Lussac). Esta consideração é válida para fermentações cuja temperatura de processamento é baixa, o que não é comum na vinificação em tinto. Para condições de temperatura mais elevada, deve-se

utilizar 18 g por litro para acréscimos de 1 grau GL na bebida final (Hashizume, 2001).

A qualidade do vinho depende da composição do mosto e da tecnologia empregada na vinificação. Na vinificação, o processo de clarificação exerce influência direta nas qualidades organolépticas do vinho (Mozaz et al., 1999).

A prática de utilização de substâncias que possibilitam a remoção de partículas que provocam turbidez ao vinho é denominada colagem (Hashizume, 2001). Agentes clarificantes e outras técnicas têm sido amplamente empregados ao longo do tempo para evitar a obtenção de vinhos escurecidos (López et al., 2001).

As substâncias usadas na colagem (colas) são comumente agrupadas em substâncias albuminóides, substâncias gelatinosas e substâncias minerais (Pato 1982). Cosme et al. (2008) citam que, atualmente, diversos produtos são utilizados no processo de colagem, sendo os mais comumente empregados: a bentonite, gelatina, caseína, caseinato de potássio, albumina de ovo, ictiocolas e mais recentemente algumas proteínas vegetais. Estes autores encontraram diferenças entre a composição fenólica de vinho branco submetido à ação de diferentes agentes clarificantes. López et al. (2001) estudaram a ação do carvão ativado associado a outros agentes clarificantes, como bentonite, caseína, albumina, gelatina e caseinato de potássio e verificaram que a constituição de compostos voláteis nos vinhos foi diferente para as diferentes combinações dos agentes clarificantes em conjunto com o carvão ativado.

A bentonite destaca-se como um dos agentes colantes mais utilizados. Esta é uma cola mineral que apresenta em sua constituição montmorilonita (silicato de alumínio), cuja capacidade de intumescimento é elevada e a presença de cargas negativas lhe confere forte poder de adsorção, sendo empregada com eficiência no combate à turvação protéica de vinhos (Hashizume, 2001). Catarino et al. (2006) relataram que o uso de bentonite pode influenciar a

composição do vinho no que se refere à presença de metais na bebida. Estes autores encontraram diferentes teores de minerais como sódio, magnésio, alumínio, potássio, ferro, cobalto, entre outros, em vinho submetido à clarificação com bentonite, confirmando a influência do processo de clarificação na qualidade final do vinho.

#### **2.4.2.2 Trasfega**

O ato de transferir o vinho de uma recipiente para outro de forma a possibilitar a eliminação da borra depositada é denominada trasfega (Meneguzzo et al., 2006; Cataluña, 1988). Segundo Hashizume (2001), a remoção desta borra se faz necessária porque esta pode conter microrganismos e ser local de ocorrência de reações químicas que provocam alterações no vinho, resultando em odor desagradável ao mesmo tempo em que deprecia a bebida.

A realização desta prática se faz necessária para obtenção de vinho de qualidade. Pato (1982) relatou que, conforme as características do vinho, a trasfega pode ser realizada com arejamento, sem arejamento e em conjunto com a sulfitagem. A trasfega sem arejamento é comumente empregada para aqueles vinhos cuja acidez volátil tem tendência a aumentar, mas apresentam boa qualidade. A trasfega com aeração deve ser empregada no caso de vinhos que apresentam características de gás sulfuroso presente em excesso, prejudicando assim seu paladar e cheiro. A realização da trasfega com passagem do vinho pelo sulfurador é uma prática antiga e atualmente pouco empregada. O número de trasfegas a serem feitas é dependente do tamanho das pipas (Meneguzzo et al., 2006). A realização da primeira trasfega deve ocorrer por volta de uma semana após término da fermentação e com aeração (Hashizume, 2001; Pato, 1982). Se a deposição de borra ainda for verificada após a realização da primeira

trasfega, faz-se necessária a realização de uma segunda trasfega 45-60 dias após a primeira (Hashizume, 2001).

### **2.4.2.3 Filtração**

A clarificação do vinho é completa com a realização da colagem e posteriormente a filtração, que consiste na passagem do vinho por elementos filtrantes com porosidade reduzida de forma a torná-los brilhantes e cristalinos (Pato, 1982; Hashizume, 2001). Os diferentes tipos de filtros existentes para vinhos são normalmente aqueles cujo princípio é a tamisação ou adsorção. A filtração por tamisação é geralmente empregada para vinhos turvos com impurezas de grande dimensão, enquanto os filtros com funcionamento por adsorção são usados para vinhos já quase limpos, os quais se pretendem tornar mais límpidos e brilhantes (Hashizume, 2001). Segundo Meneguzzo et al. (2006), os filtros podem ser classificados em três tipos:

- Filtro com terra: são aqueles cujo elemento filtrante é a terra de diatomáceas ou perlite. A terra de diatomáceas é obtida a partir de algas marinhas calcinadas e a perlite é proveniente de rochas vulcânicas. Filtros deste tipo são muito utilizados na primeira filtração.

- Filtro de placa: este tipo de filtro é constituído de três tipos de placas. As primeiras são grandes e retêm as partículas de maiores tamanhos; o segundo tipo são as placas intermediárias, de porosidade variável e que recebem o vinho previamente filtrado pelas placas grandes; as últimas são as placas esterilizantes utilizadas pouco antes do engarrafamento.

- Filtro de membrana: - este tipo de filtro é instalado logo antes da enchedora de garrafas e é constituído de ésteres de celulose e uma camada de

pré-filtragem com porosidade variável. Sua finalidade é a remoção de leveduras e bactérias.

#### **2.4.2.4 Atesto**

Atesto é o termo que se refere ao ato de preencher o espaço vazio do recipiente com o vinho. Este espaço vazio é normalmente formado devido à evaporação do vinho, uma vez que o armazenamento é, na maioria das vezes, realizado em recipientes de madeira (Hashizume, 2001). Segundo Pato (1982), este procedimento deve ser adotado logo após a última trasfega, a intervalos de 20 dias, para vasilhas de madeira, sendo que a taxa de evaporação varia de acordo com as condições de temperatura a que estão sujeitos os locais de armazenamento. Meneguzzo et al. (2006) complementaram citando que o atesto deve ser realizado semanalmente dependendo do tamanho do recipiente.

A não permanência do espaço vazio pelo atesto impede o desenvolvimento de microrganismos aeróbios que podem causar danos ao vinho. O atesto deve ser realizado com cuidado de forma que o vinho usado deve apresentar a mesma qualidade daquele que está na pipa, evitando assim que todo o recipiente seja contaminado (Hashizume, 2001; Meneguzzo et al., 2006).

### **2.5 Fermentação**

O termo fermentação é derivado do verbo latim *fervere* que significa ferver, descrevendo a aparência do mosto de frutas ou grãos maltados sob fermentação pela ação de leveduras. Bioquimicamente, o termo se refere à geração de energia com o catabolismo de compostos orgânicos. Entretanto, industrialmente é empregado de forma mais ampla (Stanbury, 1995).

De acordo com Stryer (1996), a fermentação consiste em um processo gerador de ATP e foi descoberta por Pasteur que a descreveu como “la vie sans air” (“a vida sem ar”). Lehninger (2006) define a fermentação como a denominação geral para a degradação anaeróbica da glicose ou outros nutrientes orgânicos com o objetivo de obter energia e conservá-la na forma de ATP.

O processo de fermentação da glicose em etanol e CO<sub>2</sub> pelas leveduras vem sendo explorado há muitos anos na panificação e produção de vinho. Em 1940, as diversas descobertas sobre este processo culminaram com a descrição completa da via de quebra da glicose pelos pesquisadores Gustav Embden, Otto Meyerhof e Jacob Parnas. Esta via foi denominada glicólise ou via Embden-Meyerhof-Parnas como homenagem aos responsáveis pela descoberta (Voet et al., 2000). Na glicólise, a molécula de glicose é rompida em uma série de reações catalisadas por 10 enzimas liberando ao final dois ATPs e duas moléculas de piruvato (Lehninger, 2006; Voet et al., 2000).

Em condições anaeróbicas, o piruvato formado na glicólise pode ser convertido a lactato (fermentação homolática) ou descarboxilado para produzir CO<sub>2</sub>, acetaldeído e etanol, sendo que o acetaldeído produzido é reduzido a etanol, oxidando NADH a NAD<sup>+</sup>, que será novamente utilizado na glicólise (Voet et al., 2000). Ainda segundo estes autores, nas leveduras sob condições anaeróbicas, o NAD<sup>+</sup> para a glicólise é regenerado em um processo constituído de duas reações consecutivas, sendo que na primeira, pela ação da piruvato descarboxilase, o piruvato é descarboxilado, formando acetaldeído e CO<sub>2</sub>; na segunda reação, catalisada pela enzima álcool desidrogenase, ocorre a redução do acetaldeído a etanol em presença de NADH, regenerando assim o NAD<sup>+</sup> oriundo da oxidação do NADH para a glicólise.

As leveduras, entre os microrganismos que realizam fermentação, constituem o grupo de maior importância devido à sua grande exploração comercial (Romano et al., 2006). Segundo Reed & Pepler (1973), uma grande

porcentagem da glicose catabolizada pelas leveduras é convertida em etanol e CO<sub>2</sub> pela glicólise, enquanto uma pequena quantidade de compostos como glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores são formados.

## **2.6 Microbiota presente na fermentação espontânea**

As fermentações espontâneas são aquelas produzidas de maneira natural, ou seja, realizadas pelas leveduras provenientes das uvas ou outras frutas, sem nenhum tipo de inoculação. Isto faz com que as fermentações espontâneas não sejam produtos da ação de uma única espécie de levedura, mas sim uma sucessão ou diversidade de espécies de leveduras diferentes ao longo do processo (Torija, 2002).

As leveduras utilizadas na produção de bebidas alcoólicas são geralmente *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, um grande número de espécies de leveduras pode estar presente nas fermentações espontâneas (Reed & Nagodawithana, 1991).

A fermentação do suco de uva em vinho é um processo microbiológico complexo no qual tem se verificado interações entre leveduras, bactérias e fungos filamentosos. Destacam-se entre estes microrganismos, as leveduras que desempenham papel central no processo de fermentação. Os gêneros mais comumente encontrados na uva são *Kloeckera* e *Hanseniaspora*, representando de 50 a 75% do total da população de leveduras, sendo seguidas pelos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyeromyces* e *Hansenula*. Após três a quatro dias da fermentação, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* começa a predominar e ao final da fermentação prevalece sobre as demais leveduras devido principalmente ao aumento da concentração de etanol (Fleet & Heard, 1993).

Segundo Querol et al. (2003), a fermentação alcoólica é umas das principais etapas da vinificação e normalmente é conduzida por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Estas leveduras são especializadas e evoluíram de modo que todo o seu potencial pode ser utilizado nos mais variados ambientes ou nichos ecológicos. Estas leveduras têm se desenvolvido bem em diversas condições de estresse durante a fermentação alcoólica.

A fermentação de frutas e suco de frutas ocorre naturalmente e espontaneamente e tem sido praticada há muitos anos. Durante a fermentação natural de mosto de uva, ocorre uma sucessão de leveduras pertencentes aos gêneros *Kloekera*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* e *Torulasporea delbrueckii*, sendo estas substituídas por *Saccharomyces cerevisiae* no decorrer do processo fermentativo (Reed & Nagodawithana, 1991).

## **2.7 Leveduras selecionadas**

Na viticultura moderna, tem-se utilizado, preferencialmente, leveduras selecionadas de forma a garantir um produto final com a qualidade desejada. Estas leveduras são selecionadas com base em determinadas características desejáveis como, por exemplo, resistência a elevadas concentrações de açúcares (Querol et al., 1992).

A espécie *S. cerevisiae* é a levedura comumente usada na produção de vinho, sendo conhecida como “levedura do vinho”. Desde o início dos anos 80 até os dias atuais, a *S. cerevisiae* tem sido extensivamente utilizada como iniciadora no processo de fermentação, pois possibilita fermentações rápidas e confiáveis, além de reduzir o risco de contaminações microbianas (Valero et al., 2005). Quanto ao uso de leveduras selecionadas, Guimarães, et al. (2006) relataram que o uso de *S. cerevisiae* é uma estratégia que possibilita a manutenção da qualidade e assegura a reprodutibilidade das características do

vinho. O uso de estirpes isoladas a partir de determinadas regiões constitui um fator interessante, pois estas estirpes apresentam elevada adaptação às condições climáticas e o vinho produzido normalmente possui características peculiares que são associadas às regiões produtoras específicas.

Nurgel et al. (2002a) encontraram uma taxa de fermentação de mosto de uva maior nas fermentações onde se utilizou *S. cerevisiae* selvagem e comercial. A fermentação espontânea foi mais lenta, com término do processo ocorrendo 4 dias após o término da fermentação inoculada. Os autores também encontraram diferenças significativas na composição de compostos formadores de “flavour” e etanol entre as bebidas.

Verificando a influência da população de leveduras na produção de vinho em fermentação espontânea e inoculada, Blanco et al. (2008), constataram que a bebida produzida a partir da fermentação inoculada apresentou um maior teor alcoólico e menor acidez que aquela obtida por fermentação espontânea do mosto de uva Lado.

Avaliando o comportamento da população de leveduras na fermentação do vinho, Egli et al. (1998) verificaram que o uso de estirpe “vigorosa” de *S. cerevisiae*, usada como iniciadora, limitou eficientemente a população de leveduras não *Saccharomyces*, quando comparada a uma estirpe de *S. cerevisiae* menos “vigorosa”. Na análise sensorial, as bebidas produzidas com uso de *S. cerevisiae* diferiram daquela produzida a partir da fermentação espontânea.

Em vinho produzido a partir de uva cultivar Emir grown, Nurgel et al. (2002b) encontraram valores de etanol superiores para vinho produzido por fermentação inoculada com *S. cerevisiae* comercial e *S. cerevisiae* selvagem em comparação com o vinho obtido por fermentação espontânea. Quanto à concentração total de compostos voláteis, os autores relataram que a adição de leveduras selecionadas não implicou diferenças significativas. No entanto, analisando-se cada composto individualmente, foi possível encontrar diferenças

entre o vinho produzido por fermentação espontânea e aquele no qual se utilizou *S. cerevisiae*.

## 2.8 Compostos voláteis formadores de *flavour*

Segundo Abbas (2006), na análise de alimentos deve-se levar em consideração que o gosto percebido pela boca é função de constituintes não voláteis e o aroma percebido pelo nariz é atribuído aos componentes voláteis. Nas bebidas alcoólicas, aproximadamente 400 compostos estão envolvidos nas características de aroma (Quadro 1).

**Quadro 1** Compostos determinantes de aroma nas bebidas alcoólicas

<b>Composto</b>	<b>Número</b>
Álcoois	38
Ácidos	80
Ésteres	118
Compostos carbonílicos	41
Acetais	17
Fenóis	41
Compostos nitrogenados	18
Compostos sulfurados	11
Lactonas	17
Açúcares	4
Hidrocarbonos	11
Compostos não classificados	11

Para o vinho, o termo *aroma* é empregado para descrever vinhos de cheiro fresco, jovem, com aspectos de frutas frescas, enquanto o termo *bouquet* é utilizado para vinhos mais velhos, com menor frescor e menos doce. As características descritas para o *aroma* são originadas durante a fermentação,

enquanto aquelas descritas para *bouquet* são consideradas originárias do envelhecimento do vinho na garrafa (Swiegers et al., 2005). Ainda de acordo com estes autores, o termo *flavour* para o vinho engloba um conjunto de características relacionadas às sensações de doçura, acidez, amargura, salgado que estão diretamente ligadas ao corpo e textura da bebida e são facilmente influenciadas por diversos fatores como teor alcoólico e taninos que conferem sensações de calor e secagem, respectivamente. Romano et al. (2003) citaram que o *flavour* do vinho é formado por uma série de compostos que apresentam diferentes propriedades aromáticas. De acordo com estes autores, no caso do vinho, os compostos aromáticos podem ser originários da uva, do processo de preparo do mosto (*flavour* pré-fermentativo), do metabolismo de leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica e malolática (*flavour* fermentativo) e do processo de envelhecimento (*flavour* pós-fermentativo).

De acordo com Fleet (2003), a qualidade do vinho é resultado de interação entre as características de composição da uva e compostos produzidos por microrganismos, seja no campo de produção da uva pela ação de fungos e bactérias patogênicas, durante a fermentação pela ação de bactérias e leveduras e durante o envelhecimento pela ação de bactérias, leveduras e fungos. Atenção especial é dada às leveduras, pois estas causam grande impacto sobre a qualidade das bebidas. Os mecanismos de ação dos diferentes microrganismos sobre a qualidade do vinho são resumidos no Quadro 2.

**Quadro 2** Mecanismos de ação de diferentes microrganismos sob a qualidade do vinho

<b>Leveduras</b>	<b>Bactérias</b>	<b>Fungos</b>
Afetam a qualidade da uva antes da colheita e são usadas no biocontrole de fungos	Condução da fermentação malolática	Deterioração das uvas
Condução da fermentação alcoólica	Deterioração do vinho durante o envelhecimento na adega e após o engarrafamento	Produção de vinho botritizados ou nobres
Conversão de componentes da uva em compostos ativos no <i>flavour</i> do vinho	Crescimento nos barris de madeira e formação de manchas na cortiça	Produção de micotoxinas nas uvas e sua transferência para o vinho
Influência sobre o sabor do vinho pela autólise celular	Deterioração de uvas ainda no campo	Produção de metabolitos que podem inibir o crescimento de leveduras e bactérias
Bioadsorção de componentes do mosto	Atraso na fermentação alcoólica	Crescimento na cortiça e barris de madeira e alteração na qualidade do vinho
Influenciam o crescimento de bactérias na fermentação malolática		
Deterioração dos vinhos durante o armazenamento		

As leveduras promovem a conversão dos açúcares em produtos como etanol, glicerol, aldeídos, cetonas, ésteres e ácidos e estes compostos contribuem para formar as características de *flavour* do vinho (Reed & Pepler, 1973). As diferentes espécies de leveduras que se desenvolvem ao longo do processo de fermentação têm a capacidade de converter os componentes do mosto (principalmente açúcares) a um grande número de compostos voláteis e não voláteis em diferentes concentrações, interferindo fortemente no aroma e sabor dos vinhos (Romano et al., 2003).

### **2.8.1 Etanol**

Em quantidade, o etanol é o componente de maior importância do vinho, sendo somente superado pela água (Hashizume, 2001). Este composto é formado na via glicolítica em um mecanismo de duas reações. Na primeira reação, o piruvato é descarboxilado, produzindo acetaldeído e liberado CO<sub>2</sub>. Em uma segunda reação, o acetaldeído é reduzido para produzir o etanol (Lehninger, 2006).

De acordo com Brasil (1997), os vinhos de mesa devem apresentar um teor alcoólico de 10 a 13° GL (Gay Lussac) e os fermentados de fruta, um teor alcoólico de 4 a 14° GL.

O etanol pode reduzir a viabilidade celular que se reflete na desorganização da membrana citoplasmática, alterando sua integridade. Como consequência, ocorre a liberação de metabólicos importantes para o meio externo, bem como a entrada de substâncias, através da membrana, de forma não seletiva (Jones, 1988).

A presença de etanol é essencial para reforçar as características sensoriais dos outros componentes do vinho. O excesso de etanol, no entanto, pode interferir na percepção global do aroma e sabor do vinho (Swiegers et al.,

2005). O etanol determina a viscosidade (corpo) do vinho e atua como fixador de aroma (Mingorance-Carzola et al., 2003).

### **2.8.2 Glicerol**

O glicerol é um composto formado em grandes quantidades nas fermentações realizadas por *Saccharomyces cerevisiae*. Sua presença no vinho confere maior viscosidade, textura e doçura (Abbas, 2006). Este composto desempenha importante papel na viabilidade celular de leveduras como o fornecimento de precursores para a síntese de fosfolipídios, que são componentes das membranas celulares durante o período de crescimento da levedura; proteção osmótica das leveduras em condições de alta concentração de açúcar; contribuição para a manutenção do equilíbrio redox da célula e geração da energia (ATP) necessária para o crescimento celular (Swiegers et al., 2005).

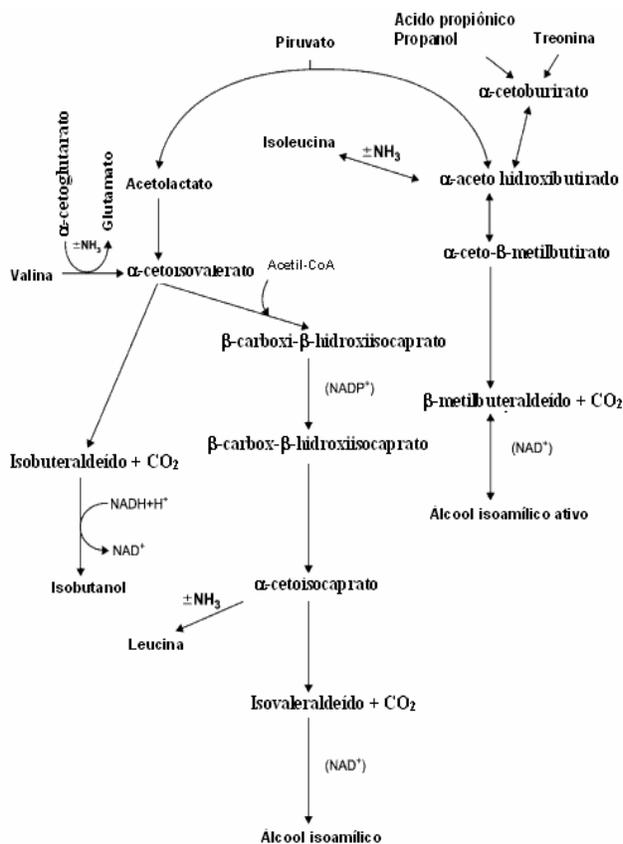
Cerca de 4-10% de todas as fontes de carbono fermentadas são convertidas em glicerol, resultando em níveis que são cerca de 7-10% da concentração de etanol. O glicerol é produzido pela conversão de dihidroxicetona fosfato em glicerol 3 fosfato pela ação da glicerol 3 fosfato desidrogenase. Posteriormente, ocorre uma reação de defosforilação catalisada pela enzima glicerol 3 fosfatase. Uma vez produzido, o glicerol pode sair da célula por difusão passiva ou transporte facilitado através dos canais proteicos FPS 1. A limitação na taxa de formação do glicerol é influenciada pela conversão de dihidroxicetona em glicerol 3 fosfato e pela eliminação do glicerol formado para o meio (Abbas, 2006).

### 2.8.3 Álcoois superiores

Os álcoois superiores constituem um grupo de compostos encontrados em grande número nas bebidas alcoólicas nas quais exercem papel importante no aroma e *flavour*. Devido ao seu mecanismo de formação, são também chamados de álcoois de fusel e os principais encontrados nas bebidas são *n*-propanol, isobutanol, 2-feniletanol, álcool isoamílico, hexanol (Nykänen & Soumalainen, 1983; Reed & Peppler, 1973; Giudici et al., 1990; Boulton et al., 1998; Abbas, 2006). Segundo Berry & Slaughter (2003), a produção dos álcoois de fusel ocorre a partir de esqueletos de carbono dos aminoácidos devido à descarboxilação ou desaminação, que ocorre simultaneamente, mas desviando-se da rota degradativa para a rota biossintética quando os aminoácidos do meio já tenham sido metabolizados. Na via catabólica de Ehrlich, primeiramente o aminoácido é transaminado, originando um  $\alpha$ -cetoácido em uma reação catalisada por uma aminotransferase. O  $\alpha$ -cetoácido formado é convertido a aldeído pela ação de uma piruvato descarboxilase e o aldeído é posteriormente convertido ao álcool superior correspondente ao aminoácido em uma reação catalisada por uma álcool desidrogenase (Swiergers & Pretorius, 2005). A Figura 4 ilustra a formação de alguns álcoois a partir do seu aminoácido correspondente.

A produção destes compostos é influenciada por uma série de fatores como o tipo de leveduras presente, temperatura, presença de compostos nitrogenados, aminoácidos presentes no mosto e substituição de açúcares como maltose pela glicose (Berry & Slaughter, 2003; Reed & Peppler, 1973). A influência do tipo de levedura na formação de álcoois de fusel foi constatada por Giudici et al., (1990). Estes autores testaram 100 isolados de *S. cerevisiae* e encontram valores variáveis para *n*-propanol (4,98 a 58,33 mg L<sup>-1</sup>), isobutanol (3,18 a 11,29 mg L<sup>-1</sup>) e álcool isoamílico (5,58 a 18,23 mg L<sup>-1</sup>) para os isolados testados. Quando presentes em concentrações muito baixas, álcoois de fusel

proporcionam características desejáveis às bebidas. No entanto, concentrações elevadas resultam em aroma forte e sabor picante (Amerine & Cruess, 1960; Swiegers et al., 2005). Segundo Mateo et al. (2001), concentrações menores que 300 mg L<sup>-1</sup> de álcoois superiores contribuem com o aroma, enquanto concentrações superiores a 400 mg L<sup>-1</sup> influenciam negativamente a qualidade.



**FIGURA 4** Formação de álcoois superiores a partir de aminoácidos em leveduras fermentativas. Modificado de Swiegers & Pretorius (2005).

#### 2.8.4 Aldeídos

Nas bebidas alcoólicas, vários compostos carbonílicos cuja influência sobre as qualidades sensoriais é de grande importância estão presentes. Dentre os compostos carbonílicos, destacam-se os aldeídos que são intermediários na formação de álcoois superiores, comumente associados ao aroma desagradável mesmo quando presentes em pequenas quantidades (Berry & Slaughter, 2003; Swiegers & Pretorius, 2005; Abbas, 2006). Segundo Swiegers et al. (2005), aldeídos contribuem para formação de características de aroma e sabor, cuja sensação em análise sensorial está relacionada com aspecto de “maças pisadas” e “castanhas”, além de serem associados à oxidação de vinhos. Estes compostos podem também estar associados ao sabor picante das bebidas (Etiévant, 1991).

No caso do vinho, atenção especial é dada ao acetaldeído, pois este é o aldeído encontrado em maior quantidade nesta bebida e sua concentração podem variar de 10 a 300 mg L<sup>-1</sup>, podendo em algumas bebidas corresponder a 90% da fração aldeído (Nykänen & Soumalainen, 1983; Swiegers & Pretorius 2005). Assim como a maioria dos aldeídos, o acetaldeído é formado durante a fermentação alcoólica, podendo também ser formado a partir da oxidação enzimática do etanol, degradação oxidativa de Strecker de aminoácidos, degradação de composto do lúpulo (cerveja) e autooxidação de ácidos graxo. Na via glicolítica, o acetaldeído é o último precursor do etanol e sua conversão é catalisada pela álcool desidrogenase (Reed & Pepler, 1973; Nykänen & Soumalainen, 1983; Swiegers & Pretorius, 2005).

Na fase de envelhecimento do vinho o etanol pode ser convertido a acetaldeído. Após o engarrafamento a formação de aldeídos pode continuar pela autooxidação de compostos fenólicos o que no caso do vinho branco pode provocar alteração na cor (Pisarnitskii, 2001). Aranda et al. (2002) citaram que em vinhos envelhecidos com ação de leveduras foram encontradas concentrações de acetaldeído variando de 400 a 600 mg L<sup>-1</sup>.

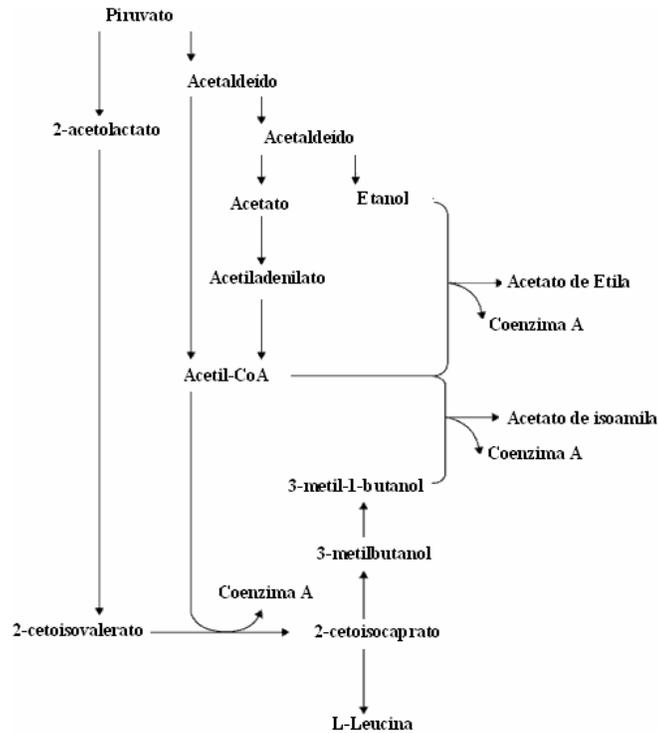
### 2.8.5 Ésteres

Os ésteres são compostos cuja presença nas bebidas alcoólicas está direta e fortemente ligada ao aroma, sendo considerados os compostos produzidos por leveduras exercendo maior influência sobre o aroma das bebidas (Berry & Slaughter, 2003; Abbas, 2006). Swiegers et al. (2005) relataram que vários ésteres estão relacionados ao aroma frutado dos vinhos e entre os que mais se destacam estão o acetato de etila (aroma frutado-solvente), acetato de isoamila (aroma de pêra), acetato de isobulita (aroma de banana), etilcaprato (aroma de maçã) e 2-fenilacetato (aroma de mel, flores, frutas). Dos ésteres presentes no vinho, destaca-se o acetato de etila, pois este frequentemente é encontrado em maiores concentrações (Etiévant, 1991).

Abbas (2006) citou que os ésteres podem ser agrupados com base em seu ponto de ebulição. Este agrupamento engloba três grupos: ésteres leves, ésteres médios e ésteres pesados. Os leves são aqueles que apresentam aroma frutado e ponto de ebulição mais baixo que do álcool isoamílico, como os etil, isobutil e isoamil ésteres. O grupo dos ésteres médios compreende aqueles ésteres que eluem durante a destilação entre etilcaprato e álcool feniletil. Os ésteres pesados são aqueles cuja eluição se dá após a eluição do álcool feniletil. Segundo (Etiévant, 1991), os ésteres de baixo ponto de ebulição são voláteis à temperatura ambiente e mesmo em pequenas quantidades sua presença é facilmente constatada em análises sensoriais.

Os ésteres são formados pelas leveduras durante a fermentação pela ação da acil-CoA, a qual tem grande importância na formação de ácidos orgânicos (Berry & Slaughter, 2003). A síntese dos ésteres envolvem um ácido graxo, um álcool e uma CoA. A acetil-CoA presente na formação do acetato de etila é obtida pela descarboxilação oxidativa do piruvato, mas outras acil-CoA são formadas por reação de acilação da CoASH catalisada pela acil-CoA sintetase (Swiegers & Pretorius, 2005). Ainda segundo estes autores, existem dois

estágios de indução na síntese de ésteres durante a fermentação. Em um primeiro estágio, a síntese de ésteres é lenta, pois nesta fase há uma grande demanda de acetil-CoA para o crescimento das leveduras. Nesta fase, o acetil-CoA e o oxigênio são empregados na síntese de ácidos graxos e esteróis. Ao final da síntese de ácidos graxos e esteróis, o nível celular de acetil-CoA é elevado, ocorrendo então o segundo estágio de indução de síntese de ésteres. A primeira indução ocorre 8 horas após a fermentação e a segunda indução, durante a qual ocorre a maior taxa de síntese de acetato de etila, 20 a 30 horas do início da fermentação. A Figura 5 ilustra a formação do acetato de etila e acetato de isoamila.



**FIGURA 5** Rota de formação dos ésteres acetato de etila e acetato de isoamila em leveduras fermentativas. Modificado de Swiergers & Pretorius (2005).

### 2.8.6 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são compostos de grande importância, pois têm influência sobre diversas propriedades organolépticas como aroma, sabor e cor das bebidas alcoólicas. Estes compostos também estão relacionados ao controle da estabilidade microbiológica das bebidas (Mato et al., 2005).

Os ácidos orgânicos presentes nas bebidas são divididos em dois grupos, os voláteis e os não voláteis. A distinção entre estes dois grupos é realizada com

base em métodos analíticos (Reed & Pepler, 1973). No mosto de uva, os ácidos não voláteis encontrados em maior quantidade são ácidos tartárico e ácido málico, representando aproximadamente 90% da acidez titulável. Os ácidos voláteis apresentam cadeia de carbono curta e no vinho o principal representante deste grupo é o ácido acético, cuja quantidade geralmente encontrada pode corresponder a 90% do conteúdo de ácidos voláteis (Swiegers et al., 2005). Ácidos com cadeia de carbono variando entre C3 e C16 são sintetizados pelas leveduras durante a fermentação alcoólica e têm influência sobre o aroma. O aroma das bebidas alcoólicas recebe interferência principalmente dos ácidos graxos de cadeia curta como o ácido isobutírico, ácido butírico, ácido propiônico, ácido isovalérico, ácido hexanóico, ácido octanóico e ácido capríco. (Abbas, 2006).

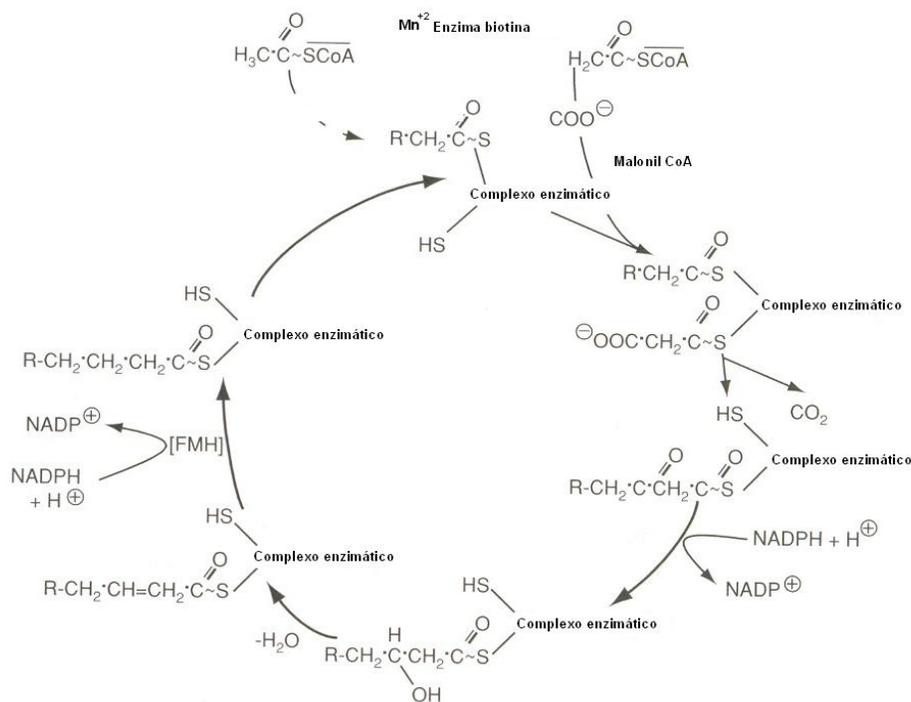
No vinho de uvas, os ácidos como málico, tartárico, succínico e cítrico são provenientes do mosto, sendo os dois primeiros presentes em maior quantidade que os dois últimos. Na fermentação, são originados os ácidos láctico, acético e succínico e, em menores quantidades, ácidos como pirúvico, galacturônico, glucurônico, citromálico, dimetilglicérico e cetoglutárico (Mato et al., 2005).

A quantidade de ácidos voláteis dos vinhos pode variar entre 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup> correspondendo a 10-15% do conteúdo total de ácidos e, dependendo do tipo e concentração em que estão presentes, o seu impacto pode ser positivo ou negativo no sabor e aroma do vinho. A ação dos ácidos pode também influenciar o crescimento e sobrevivência de microrganismos, a eficiência do tratamento com bentonite, reações de oxidação, polimerização de pigmentos, solubilidade de proteínas e sais de tartarato, “frescor” de alguns vinhos, eficiência de antimicrobianos e enzimas adicionadas (Swiegers et al., 2005).

Segundo Berry & Slaughter (2003), ácidos de cadeia média são secretados pelas leveduras durante a fermentação quando o pH decresce para 3,5

– 4,0. Este fato está relacionado ao aroma cáprico presente nas bebidas. Os ácidos de maior peso molecular não são excretados pelas células, mas sim incorporados por estas à sua estrutura celular sob forma de fosfolipídios. Nas leveduras, a síntese de ácidos graxos se inicia pela formação da acetil-CoA pela descarboxilação oxidativa do piruvato obtido na glicólise e envolve um complexo de enzimas (Abbas, 2006). A Figura 6 ilustra a síntese de ácidos graxos. De acordo com Lynen (1972), em uma primeira etapa é formada acetil-CoA. Logo em seguida, ocorre a formação de um intermediário N-carboxibiotinil, seguida pelo acoplamento do grupo carboxil com a acetil-CoA formando o malonil-CoA. Posteriormente, dois átomos de carbono vindos do malonil-CoA são adicionados em ciclos sucessivos a acil-CoA. Assim, os ácidos cuja cadeia apresenta número par de carbonos são formados. Para os ácidos que apresentam número ímpar de átomos tem-se a propanoil-CoA na etapa inicial, em lugar da acetil-CoA.

A produção de ácidos graxos é estimulada quando há elevados níveis de fósforo, magnésio e biotina disponíveis (Berry & Slaughter, 2003).



**FIGURA 6** Rota de formação de ácidos graxos em leveduras fermentativas. Modificado de Abbas, (2006).

### 2.8.7 Compostos sulfurados

Os compostos sulfurados quando presentes são geralmente associados ao aroma desagradável, tendo efeito negativo (aroma de ovo podre, alho, cebola, couve e borracha) sobre a qualidade do vinho, mas alguns podem contribuir de forma positiva conferindo aroma de maracujá e morango (Swiegers et al., 2005). Com base em sua estrutura química, estes compostos são divididos em cinco categorias, os tióis, os sulfetos, polisulfetos, compostos heterocíclicos e os tioésteres e são derivados da degradação dos aminoácidos cisteína e metionina (Swiegers & Pretorius, 2005; Abbas, 2006). A grande maioria dos compostos

sulfurados encontrados em bebidas alcoólicas é proveniente do mosto. Uma pequena porção é formada durante a fermentação pelas leveduras. O H<sub>2</sub>S pode ser formado na degradação da cisteína e metionina liberadas durante a autólise das leveduras ou a partir do enxofre inorgânico presente no meio. Estudando a influência de leveduras na produção de H<sub>2</sub>S, Neto & Mendes-Ferreira (2005) verificaram que leveduras não *Saccharomyces* produziram quantidades superiores de H<sub>2</sub>S quando comparadas com leveduras *Saccharomyces*. Estes autores relacionaram também a constituição do meio com a produção de H<sub>2</sub>S e concluíram que a composição do meio exerce influência na produção de H<sub>2</sub>S. Outro composto que pode ser formado pela ação das leveduras é o dimetil sulfeto. Como precursores para este composto são utilizados o S-metil-metionina e D-dimetil-sulfóxido presentes no meio (Berry & Slaughter, 2003).

## **2.9 Vinho de frutas**

A produção mundial de frutas no ano de 2006 foi de aproximadamente 521 milhões de toneladas. No Brasil, a produção, neste mesmo ano, foi de aproximadamente 38 milhões de toneladas, fazendo com que o país ocupasse a posição de 3º maior produtor mundial (FAOSTAT, 2006).

O termo vinho é utilizado para designar a bebida produzida a partir da fermentação do mosto de uva. A aplicação deste termo pode também ser realizada no caso daquelas bebidas fermentadas obtidas pela fermentação de outras frutas, desde que o termo “vinho” seja acompanhado do nome da matéria-prima que deu origem à bebida (Santos et al., 2005).

Segundo Brasil (1997), fermentado de fruta é a bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura. O fermentado de fruta pode ser adicionado de açúcares, água e outras substâncias.

Quando adicionado de dióxido de carbono, o fermentado de fruta será denominado fermentado de fruta gaseificado. O fermentado de fruta pode ainda ser classificado como licoroso, quando apresenta graduação alcoólica de quatorze a dezoito por cento em volume, a vinte graus Celsius, sendo adicionado ou não de álcool etílico potável de origem agrícola, caramelo e sacarose. O fermentado de frutas composto pode apresentar graduação alcoólica de quinze a vinte por cento em volume, a vinte graus Celsius, podendo ser adicionado de macerados ou extratos de plantas amargas ou aromáticas, adicionado ou não de álcool etílico potável de origem agrícola, caramelo e sacarose.

Em geral a uva tem sido a principal matéria-prima utilizada na produção de vinhos nas últimas décadas (Reddy & Reddy, 2005). Nos últimos anos, vem crescendo o número de trabalhos de pesquisa relativos ao emprego de outras frutas na produção de vinhos, destacando-se o kiwi (Soufleros et al., 2001), banana (Akubor et al., 2003), cajá (Dias, 2003), manga (Reddy & Reddy, 2005), acerola (Santos et al., 2005), jabuticaba (Chiarelli, 2005), cacau (Dias, 2007) e laranja (Corraza et al., 2001; Selli, 2007). A maioria das frutas pode ser utilizada para produção de bebidas fermentadas, mantendo-se suas características típicas desde que sejam feitas as devidas correções de umidade, açúcares e sais nutritivos para as leveduras (Santos et al., 2005, Corazza et al., 2001). A produção de frutas no Brasil ocorre praticamente durante todo o ano e além da abundância da produção, há também uma enorme perda (Santos et al., 2005). Ainda segundo estes autores, frutas como a manga, jabuticaba, goiaba, amoras e acerola nativas ou plantadas em pomares comerciais são perdidas em grande quantidade quando poderiam ser utilizadas para a produção de geléias, sucos e vinhos, representando uma alternativa na alimentação e geração de renda familiar. Soufleros et al. (2001) avaliaram a qualidade sensorial e a constituição de voláteis do vinho de kiwi e constataram que o conteúdo de componentes aromáticos da bebida foi menor quando comparado com o vinho de uva e que,

na avaliação sensorial, o atributo doçura apresentou maior aceitação. De modo geral, o vinho de kiwi foi mais aceito quando este continha 10% de etanol, mais de 30 gramas de açúcares por litro e 0,5 bar de CO<sub>2</sub>. Como característica indesejável, o vinho de kiwi apresentou alta concentração de metanol, o que, de acordo com os autores, ocorreu devido ao uso de enzimas pectolíticas no preparo do mosto.

Estudando o uso de frutas tropicais na produção de bebidas fermentadas, Muniz et al. (2002) utilizaram mosto de ata, mangaba e ciriguela corrigidos a 16° Brix e inoculados com levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* var *bayanus*. Os resultados da análise sensorial demonstraram que a bebida de mangaba se destacou nos atributos aceitação global e intenção de compra. A concentração final de etanol para as bebidas de ata, mangaba e ciriguela foram 8,4°, 9,8° e 10,0° GL, respectivamente. Os autores concluíram que a mangaba foi a fruta mais indicada para produção de bebida fermentada.

Avaliando o uso da banana para produção de vinho, Akubor et al. (2003) obtiveram bebida cujos valores de proteína, cinzas, pH e acidez titulável foram semelhantes àqueles previamente descritos na literatura para outras bebidas de frutas. Estes autores ainda constataram que, na avaliação sensorial, o vinho de banana foi semelhante a um vinho de uva para os atributos aparência, sabor e aceitação global.

Dias et al. (2003) estabeleceram uma metodologia para elaboração de bebida fermentada a partir do mosto de cajá e relataram que o uso desta fruta na produção de vinho é uma alternativa para utilização dos excedentes de safras, pois a bebida produzida foi aceita pelos provadores durante a análise sensorial. Ainda segundo estes autores, a metodologia estabelecida se mostrou simples, podendo ser implantada em um pequeno espaço e utilizada pela indústria ou pequenos produtores. Reddy & Reddy (2005), trabalhando com 6 diferentes variedades de manga, verificaram que o vinho obtido a partir da fermentação

desta fruta apresentou características de sabor e aroma semelhantes aos do vinho uva. Baseados nos baixos custos de produção, os autores relataram ainda que, a manga se mostrou um bom substrato para produção de vinho e o seu aproveitamento sob forma de bebida fermentada pode contribuir para economia daqueles países produtores desta fruta.

Dias et al. (2007) encontraram valores de metanol, álcoois superiores, acetaldeído e ésteres no vinho de cacau próximos àqueles estabelecidos para o vinho de mesa. Com base nas características de composição da bebida e com a boa aceitação verificada na análise sensorial os autores concluíram que o uso da polpa de cacau na produção de vinho é uma nova e viável alternativa para utilização do fruto de cacau.

No vinho de melão, uma grande variação no conteúdo de compostos voláteis foi encontrada por Gómez et al. (2008). Os autores concluíram que correções feitas no pH do mosto contribuíram para redução no teor de metanol e acetaldeído presentes no destilado. Além disso, os autores afirmaram ainda que a produção de bebida constitui uma boa alternativa industrial para utilização dos frutos, reduzindo suas perdas.

## **2.10 Métodos moleculares na identificação e caracterização de leveduras**

As leveduras são tradicionalmente identificadas pelo uso de técnicas morfológicas e fisiológicas, mas estas técnicas além de demoradas são normalmente onerosas (Barnett et al., 1990; Granchi et al., 1999).

Na produção de vinho, objetivando obter qualidade com reprodutibilidade, o uso de leveduras selecionadas como *S. cerevisiae* isoladas tem sido comum e, em alguns casos, este uso tem ocorrido na própria região produtora. Como a maioria das *S. cerevisiae* utilizadas pertence ao mesmo grupo e sua distinção e diferenciação não é possível pelas técnicas microbiológicas

tradicionais, recentemente tem-se empregado técnicas moleculares como análise de restrição do DNA mitocondrial e análise eletroforética de cromossomos para estudar a dinâmica de leveduras em fermentações inoculadas ou espontâneas (Querol & Ramón, 1996).

Os recentes avanços na biologia molecular têm levado ao desenvolvimento de novas técnicas para identificação de leveduras baseados na similaridade ou dissimilaridade de DNA, RNA ou proteínas (Esteve-Zaroso, et al., 1999).

Técnicas baseadas na biologia molecular são alternativas aos métodos tradicionais de identificação, pois permitem uma análise do genoma independente das condições fisiológicas da célula. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas com o uso das ferramentas oferecidas pela biologia molecular e muitas delas são úteis para identificar e caracterizar leveduras ao nível molecular (Fernández-Espinar et al., 2006).

De acordo com Fernández-Espinar et al. (2006), as técnicas preferencialmente empregadas para leveduras podem ser aquelas para identificação em nível de espécies como análise de regiões ribossomais com destaque para o sequenciamento de regiões ribossomais e análise de restrição de regiões ribossomais; PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), onde fragmentos de comprimento semelhante, mas com diferentes seqüências são separados em gel de poliacrilamida sob gradiente desnaturante de uma mistura de uréia e formamida; Real-time PCR, cujo princípio baseia-se na detecção e quantificação de um doador fluorescente cujo sinal aumenta em proporção direta com a quantidade de produto PCR na reação. A diferenciação quanto à estirpe é comumente feita com uso de técnicas como eletroforese em campo pulsado (PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis), onde cromossomos são forçados a migrar no gel pela ação de campo elétrico; análise de restrição do DNA mitocondrial (RFLP (Restriction

Fragment Length Polymorphism) mtDNA) para verificação do grau de variabilidade do mtDNA; PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); PCR microssatélites; AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e amplificação de seqüências  $\delta$ .

A amplificação de regiões do DNA com uso de primers curtos com seqüências arbitrárias que em baixas temperaturas hibridizam em regiões distribuídas aleatoriamente no genoma, caracteriza a técnica de RAPD. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para discriminar linhagens industriais de leveduras (Gomes et al., 2002).

A técnica de RFLP consiste no rompimento do DNA por enzimas de restrição em regiões com determinadas seqüências de bases e a separação dos fragmentos resultantes por eletroforese. Diferentes perfis de bandas, ou polimorfismos, podem ser observados diretamente sob luz ultravioleta, após coloração do gel com brometo de etídio ou, indiretamente, após transferência das bandas para membranas, sobre as quais se faz hibridação com sondas específicas de DNA ou RNA marcado. A análise de restrição do DNA mitocondrial tem tido uma grande aplicação no estudo de leveduras por originar um pequeno número de fragmentos (quando comparado com o DNA genómico), conduzindo a eletroferogramas pouco complexos e devido ao elevado polimorfismo dos perfis obtidos. Este último aspecto tem-se revelado bastante útil na diferenciação de estirpes empregadas na produção de vinho (Casal et al., 2004).

A eletroforese em gel de agarose é a técnica mais difundida para separação de moléculas de DNA com relação ao tamanho. Uma matriz formada pela agarose atua como filtro molecular, cuja porosidade é inversamente proporcional à concentração do gel de agarose. Durante a eletroforese, a dificuldade de transpor a matriz de agarose em direção ao pólo positivo é inversamente proporcional ao tamanho de cada molécula. As menores migram

mais rapidamente possibilitando a separação por tamanho ou peso molecular. Assim, quanto maior a molécula, maior o tempo de migração, possibilitando a separação dos fragmentos, qualquer que seja o tamanho (Magalhães et al., 2005).

No genoma de *S. cerevisiae* existem cerca de 150-300 seqüências repetidas com tamanho de 300 pb, designadas por seqüências  $\delta$ . Com uso de primers adequados, é possível promover a amplificação de DNA localizado entre duas seqüências  $\delta$  adjacentes. O resultado da reação de PCR é uma mistura de fragmentos de tamanhos entre 200 a 2000 pb. Uma vez que o perfil de distribuição de seqüências  $\delta$  é muito variável entre diferentes estirpes de *S. cerevisiae*, esta técnica molecular tem sido utilizado para distinguir estirpes enológicas (Casal et al., 2004).

Devido à sua confiabilidade, reprodutibilidade e relativa simplicidade, a cariotipagem eletroforética foi amplamente utilizada para acompanhamento da dinâmica de leveduras nas fermentações do vinho (Códon et al., 1998).

Pérez-Coello et al. (1999) isolaram 392 leveduras de diferentes locais e submetem estes isolados à análise de cariotipagem eletroforética (PFGE) e encontraram um total de 174 perfis distintos. Segundo estes autores, a técnica de PFGE permite a separação de grandes fragmentos de DNA, o que simplifica consideravelmente a genotipagem.

Com base na análise de PFGE, Jemec et al. (1999) diferenciaram 46 perfis para *S. cerevisiae* de um total de 937 isolados, concluindo que, na fermentação espontânea estudada, *S. cerevisiae* foi a levedura presente em maiores proporções a partir do período mediano da fermentação com 3 isolados representando 50-60% da biomassa presente.

Guillamón et al. (1998) concluíram que a técnica de RFLP se mostrou rápida e eficiente na determinação da população de leveduras presentes principalmente no início da fermentação.

Ao investigar a autenticidade de leveduras comerciais, Espinar et al. (2001) constataram que de um total de 45 diferentes *Saccharomyces*, 17 apresentaram mesmo perfil quando submetidas à análise de restrição do mtDNA. Entre os 28 restantes, somente foram observados 8 perfis diferentes. Estes foram posteriormente submetidos à análise de cariotipagem eletroforética e amplificação das seqüências  $\delta$  por PCR. Este procedimento confirmou que o melhor resultado para a distinção entre as leveduras avaliadas foi obtido pela combinação entre as técnicas, sendo encontrados 13 diferentes perfis entre os 28 isolados.

Lonpadic et al. (2008) usando as técnicas de RAPD e RFLP constataram que na fase inicial da fermentação espontânea do mosto de uva foram encontrados 9 diferentes gêneros de leveduras, sendo *Hanseniaspora* e *Metschnikowia* presentes em maior freqüência. *S. cerevisiae* e *S. bayanus* var. *uvarum* estiveram presentes durante todo o processo de fermentação. Espinar-Fernández-Espinar et al. (2001).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, C. A. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeast. In: QUEROL, A; FLEET, H. (Ed.) **Yeast in food and beverages**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. cap. 10. 50 p.
- AKUBOR, P. I.; OBIO, S. O.; NWADOMERE, K. A.; OBIOMAH, E. Production and quality evaluation of banana wine. **Plants Foods for Human Nutrition**, Netherlands, v. 58, n. 5, p. 1-6, Sept.2003.
- AMERINE, M. A.; CRUESS, W. V. **The technology of winemaking**. Westport: The Avi Publishing Company, 1960. 709 p.
- AQUINO, F. G.; OLIVEIRA, M. C. Reserva legal no bioma cerrado: uso e preservação. **Documentos** : Embrapa Cerrados. Brasília: Embrapa Cerrados, 2006. 25 p.
- ARANDA, A.; QUEROL, A. ; OLMO, M. del. Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 177, n. 4, p. 304-312, Feb. 2002.
- AVIDOS, M. F. D.; FERREIRA, L. T. Frutos dos cerrados. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 2003. Brasília, p. 36-41.  
Disponível em: < <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio15/frutos.pdf>>.  
Acesso em: 28 mar. 2008.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts** : characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University, 2000. 1139 p.
- BERRY, D. R.; SLAUGHTER, J. C. Alcoholic beverage fermentation. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. (Ed.) **Fermented beverage production**. 2. ed. New York: Kluwer Academic, 2003, cap. 2, p. 25-38.
- BLANCO, P.; VÁZQUEZ-ALÉN, M.; LOSADA, A. Influence of yeast population on characteristics of the wine obtained in spontaneous and inoculated fermentations of must from *Vitis vinifera* Lado. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 35, n.3, p. 183-188, Mar. 2008.

BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F.; KUNKEE, R. E. **Principles and practices of winemaking**. New York: Springer, 1998. 604 p.

BRASIL. Decreto n. 2314 – 04 set. 1997. Regulamenta a lei nº 8918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1010>>. Acesso em: 28 mar. 2008.

BRASIL. Lei n. 7678 – 08 nov. 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=189>>. Acesso em: 28 mar. 2008.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Ações prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal**. Brasília: Ventura Comunicações e Cultura, 1999. 24 p.

CARVALHO, P. E. R. de. **Gabiroba, a fruta do mato, 2002**. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC380084-1641,00.html>>. Acesso em: 29 mar. 2008.

CASAL, M.; SCHULLER, D.; PAIS, C. Métodos moleculares de identificação de leveduras do vinho. In: CASAL, M. (Coord.) Microbiologia e genética molecular microbiana : manual de laboratório. **Copissaurio, 2004** : unidade 7. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1822/2237>>. Acesso em: 22 jul. 2008.

CATALUÑA, E. **As uvas e os vinhos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 207 p.

CATARINO, S.; MADEIRA, M.; MONTEIRO, F.; CURVELO-GARCIA, A. S.; SOUSA, R. B. de. Release of contaminant elements from bentonites to wine: a contribution to achieve a test solution. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Lisboa, v. 21, n. 1, p. 17-31, 2006.

CHIARELLI, R. H. C.; NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. C. Fermentados de jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg): processos de produção, características físico-químicas e rendimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 277-282, out./dez. 2005.

CODÓN, A. C.; BENÍTEZ, T.; KORHOLA, M. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 49, n. 2, p. 154-163, Feb. 1998.

CONSTANTÍ, M.; REGUANT, C.; POBLET, M.; ZAMORA, F.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 169-175, June 1998.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 449-452, jul./ago. 2001.

COSME, F.; SILVA, J. M. R. da.; LAUREANO, O. Interactions between protein fining agents and proanthocyanidins. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 536-544, Jan. 2008.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; FREIRE, E. S.; SERÔDIO, R. S. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 319-329, Mar. 2007.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, set./dez. 2003.

EGLI, C. M.; EDINGER, W. D.; MITRAKUL, C. M.; HENICK-KLING, T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effects on the sensory character of Riesling and Chardonnay wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 5, p. 779-789, Nov. 1998.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n.1, p. 329-337, 1999.

ETIÉVANT, P. X. Wine. In: MAARSE, H. (Ed.) **Volatile compounds in food and beverages**. New York: CRC, 1991. p. 483-547.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Database collection** : agricultural data. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. >. Acesso em: 29 mar. 2008.

FEHÉR, J.; LENGYEL, G.; LUGASI, A. The cultural history fo wine-theoretical background to wine therapy. **Central European Journal of Medicine**, v. 2, n. 4, p. 379-391, Dec. 2007.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; MARTORELL, P. ; LLANOS, R de.; QUEROL, A. Molecular methods to identify and characterize yeast in foods and beverage. In: QUEROL, A; FLEET, H. (Ed.) **Yeast in food and beverages**. Berlin Heidelberg: Spring-Verlag, 2006. cap. 3, 28 p.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; LÓPEZ, V.; RAMÓN, D.; BARTRA, E.; QUEROL, A. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 1/2, p. 1-10, Oct. 2001.

FERREIRA, M. E.; FERREIRA, L. G.; HUETE, A. R.; PECCININI, A. A. Análise comparativa dos produtos modis ecologia para o monitoramento biofísico ambiental do bioma cerrado. **Revista Brasileira de Geofísica**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 251-260, abr./jun.2006.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1/2, p. 11-22, Sept. 2003.

FLEET, H.; HEARD, G. M. Yeast growth during fermentation. In: FLEET, G. H. (Ed.) **Wine microbiology and miotechnology**. London: Harwood Academic, 1993. p. 27-57.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**. v. 50, n. 1/2, p. 101-117, Sept. 1999.

GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of SO<sub>2</sub> on the formation and evolution of volatile compounds in wines. **Food Control**, v. 18, n. 12, p. 1501-1506, Dec. 2007.

- GIUDICI, P.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v. 36, n.1, p. 61-64, Jan. 1990.
- GOMES, F. C. O.; PATARO, C.; GUERRA, J. B.; NEVES, M. J.; CORREA, S. R.; MOREIRA, E. S. A.; ROSA, C. A. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian *cachaça*. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v. 48, p. 399-406, 2002.
- GOMÉZ, L. F. H.; ÚBEDA, J.; BRIONES, A. Characterisation of wines and distilled spirits from melon (*Cucumis melo* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 644-650, Apr. 2008.
- GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VINCENZINI, M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 6, p. 949-956, Dec. 1999.
- GUILLAMÓN, J. M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, Canada, v. 169, n. 5, p. 387-392, 1998.
- GUIMARÃES, T. M.; MORIEL, D. G.; MACHADO, I. P.; PICHETH, C. M. T. F.; BONFIM, T. M. B. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 119-126, jan./mar. 2006.
- HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Ed.) **Biotechnologia industrial** : biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, p. 21-68.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Ecosistema cerrado**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm>>. Acesso em: 29 mar. 2008.
- JEMEC, K. P.; CADEZ, N.; ZAGORC, T.; BUBIC, V.; ZUPEC, A.; RASPOR, P. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. **Food Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 247-259, June 2001.

JONES, R. P. Intracellular ethanol-accumulation and from yeast and other cell. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 239-258, 1998.

KLING, T.H.; EDINGER, W.; DANIEL, P.; MONK, P. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast population and sensory characteristics of wine. **Journal of Applied Microbiology**. v. 84, n. 5, p. 865-876, June 1998.

LANDRUM, L. R. *Campomanesia, pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica Monograph**, New York, v. 45, p. 1-179, 1986.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

LOPANDIC, K.; TIEFENBRUNNER, W.; GANGL, H.; MANDL, K.; BERGER, S.; LEITNER, G.; ABD-ELLAH, G. A.; QUEROL, A.; GARDNER, R. C.; STERFLINGER, K.; PRILLINGER, H. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. **FEMS Yeast Research**, Netherlands, p. 1-13, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00385.x>> . Acesso em: 28 mar. De 2008.

LÓPEZ, S.; CASTRO, R.; GARCÍA, E.; PAZO, J. A. S.; BARROSO, C. G. The use of activated charcoal in combination with other fining agents and its influence on the organoleptic properties of sherry wine. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 212, n. 6, p. 671-675, p. April. 2001.

LYNEN, F. Proceedings of the biochemical society. Enzymes systems for fatty acids synthesis. **The Biochemical Journal**, v. 128, n. 1, p. 1-2, 1972.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 155-161, jul./dez. 2005.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M.; PASTOR, A. HUERTA, T. Yeast starter cultures affecting wine fermentations and volatiles. **Food Research International**, v. 34, n. 4, p. 307-314, 2001.

MATO, I.; SUAREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, v. 38, n. 10, p. 1175-1188, Dec. 2005.

MENEGUZZO, J.; MANFROI, L.; RIZZON, L. A. **Vinho, 2006**: sistema de produção. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/VinhoTinto/index.htm> > Acesso em: 13 abr. 2008.

MINGORANCE-CARZOLA, L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; HERAS-VÁSQUEZ, F. J. Las. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Netherlands, v.19, n. 3, p. 297-304, April. 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Primeiro relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/arquivos/cap1.pdf> > Acesso em: 29 mar. 2008.

MOZAZ, S. R.; SOTRO, A. G.; SEGOVIA, J. G.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Influence of decantation of viura must on the cation content. Evolution during wine fermentation and stabilization. **Food Research International**, v. 32, n. 10, p. 683-689, Dec.1999.

MUNIZ, C. R.; BORGES, M. de F.; ABREU, F. A. P. de.; TIEKO, R. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 309-322, jul./dez. 2002.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 275-278, abr./jun. 2005.

NURGEL, C.; ERTEN, H.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T.; SELLI, S. Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to fermentation and flavour compounds in wines from cv. kalecik karasi grape. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 108, n. 1, p. 68-72, 2002a.

NURGEL, C.; ERTEN, H.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T.; SELLI, S. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strain on fermentation and flavor compounds of white wines made cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 28-33, April. 2002b.

NYKÄNEN, L.; SOUMALAINEN, H. **Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages**. Berlin: Springer, 1983. 424 p.

PATO, O. **O vinho: sua preparação e conservação**. 7. ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1982. 433 p. (Coleção Técnica Agrária).

PÉREZ-COELLO, M. S.; PÉREZ, A. I. B.; IRANZO, J. F. U.; ALVAREZ, P. J. M. Characteristics of wines fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from the La Mancha region. **Food Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 563-573, Dec. 1999.

PISARNITSKII, A. F. Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 552-560, Nov. 2001.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMON, D. Molecular monitoring of wine fermentation conducted by active dry yeast strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2849-2953, Sept. 1992.

QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; OLMO, M. L. del.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1/2, p. 3-10, Sept. 2003.

QUEROL, A.; RAMÓN, D. The application of molecular techniques in wine microbiology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n.3, p. 73-78, Mar. 1996.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, n.3, p. 223-230, Sept.1997.

- REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Production and characterization of wine from mango fruit (*Mangifera indica* L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Netherlands, v. 21, n. 8-9, p. 1345-1350, Dec. 2005.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. 2. ed. New York: Avi, 1991. 454 p.
- REED, G.; PEPPLER, H. J. **Yeast Technology**. Westport: The Avi, 1973. 378 p.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A. Correção do mosto da uva Isabel com diferentes produtos na Serra Gaúcha. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 35, n. 2, p. 450-454, mar./abr. 2005.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas de cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan./mar.2007.
- ROMANO, P.; CAPECE, A.; JESPERSEN, L. Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeast. In: QUEROL, A; FLEET, H. (Ed.) **Yeast in Food and Beverages**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006 cap. 2 . 40 p.
- 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, n. 1/2, p. 169-180, Sept. 2003.
- ROMANO, P.; SUZZI, G. Sulfur dioxide and wine microorganisms. In: FLEET G.H. (Ed.) **Wine Microbiology and Biotechnology**. London: Harwood Academic, 1993. p. 272-395.
- SANTOS, C. S.; ALMEIDA, S. S.; TOLEDO, A. L.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. de. Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v. 10, n. 181, p. 47-50, 2005.
- SELLI, S. Volatile constituents of orange wine obtained from moro orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). **Journal of Food Quality**, v. 30, n.4, p. 330-341, Aug. 2007.

SOUFLEROS, E. H.; PISSA, P.; PETRIDIS, D.; LYGERAKIS, M.; MERMELAS, K.; BOUKOUVALAS, G.; TSIMITAKES, E. Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine; sensory evaluation and optimisation of its composition. **Food Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 487-500, Dec. 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática** : guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

STANBURY, P. F. **Principles of fermentation technology**. Oxford: Butterworth Heinemann, 1995. 356 p.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.

SWIEGERES, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 139-173, Jun. 2005.

SWIERGERS, J. H.; PRETORIUS, I. S. Yeast modulation of wine flavour. **Advances In Applied Microbiology**, v. 57, p. 131-175, 2005.

TORIJA, M. J. **Ecologia de levaduras** : selección y adaptación a fermentaciones vínicas. 2002. 260 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona.

VALERO, E.; SCHULLER, D.; CAMBON, B.; CASAL, M.; DEQUIN, S. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard : a large-scale, three-years study. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 10, p. 959-969, July 2005.

VALLILO, M. I.; BUSTILLOS, O. V.; AGUIAR, O. T. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg – Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.18, p. 15-22, Dez. 2006.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 931p.

## **CAPÍTULO 2**

### **SPONTANEOUS AND INOCULATED FERMENTATION WITH *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162 IN GABIROBA PULP FOR ELABORATION OF FERMENTED BEVERAGE**

## RESUMO

DUARTE, Whasley Ferreira. **Fermentação espontânea e inoculada com *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162 da polpa de gabioba para elaboração de bebida fermentada.** 2008. cap. 2, p. 55-100. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.<sup>3</sup>

A gabioba *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg ou guabioba é encontrada no cerrado brasileiro sendo utilizada de diversas formas pela população local. Os objetivos deste trabalho foram a produção de um fermentado a partir da polpa de gabioba, isolar microrganismos presentes na fermentação espontânea, analisar o perfil de compostos voláteis presentes durante a fermentação e na avaliar a qualidade sensorial das bebidas produzidas. A polpa de gabioba foi diluída com xarope de sacarose na proporção de 1:1 de modo que o grau Brix final fosse 10 e o pH foi ajustado para 4,5. A fermentação foi realizada a 22° C. A população de leveduras aumentou de  $5.5 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> para  $1.4 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> durante os 14 dias de fermentação espontânea. A presença de múltiplos perfis de PFGE foi verificada nos primeiros 7 dias de fermentação. Após o 7º dias, predominou um perfil semelhante ao de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos com o sequenciamento da região ITS permitiram a identificação de *Candida quercitrusa*, *Issatchenkia terricola* e *Saccharomyces cerevisiae*. A bebida fermentada produzida pela fermentação espontânea apresentou alta concentração residual de glicose (1.94 g L<sup>-1</sup>) quando comparada com a bebida produzida com a levedura selecionada (0.49 g L<sup>-1</sup>). As bebidas apresentaram alta concentração de álcoois superiores, os quais são usualmente responsáveis pelo *flavour* das bebidas alcoólicas. Compostos como ácido oxálico, málico, tartárico, succínico, acético, láctico, cítrico, hexanóico, octanóico, 2-etilcapróico, propionico, 2,3 butanediol, álcool isoamílico, 2-feniletanol, acetoina, acetato de etila, acetaldeído e dietilsuccinato foram identificados e quantificados nas bebidas. A análise sensorial revelou elevado grau de aceitação por parte dos provadores

---

<sup>3</sup> Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Orientadora), Disney Ribeiro Dias - UNILAVRAS (Co-Orientador).

## ABSTRACT

DUARTE, Whasley Ferreira. **Spontaneous and inoculated fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162 in gabioba pulp for elaboration of fermented beverage.** 2008. cap. 2, p. 55-100. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology)<sup>4</sup>.

The gabioba *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg or guabioba fruit is found in the Brazilian cerrado being used in various ways by the local population. The objectives of this study were to produce a fruit wine from the must of gabioba, isolate the microbial population during the process of spontaneous fermentation, analyze the volatile compounds profile present during the process of fermentation, and evaluate the sensory quality of the final beverage produced. The gabioba pulp was diluted with sucrose syrup at a proportion of 1:1 until the final degrees Brix was 10 and the pH was adjusted to 4.5. The fermentation was performed at 22 °C. The yeast population increased from  $5.5 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> to  $1.4 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> during 14 days of spontaneous fermentation. The presence of multiple PFGE profiles was verified in the first 7 days of fermentation. After the 7<sup>th</sup> day, there was a higher frequency of a similar *Saccharomyces cerevisiae* profile. The results obtained from sequencing of the ITS region allowed for the identification of *Candida quercitrusa*, *Issatchenkia terricola* and *Saccharomyces cerevisiae*. The wine produced by spontaneous fermentation showed a greater residual concentration of glucose (1.94 mg L<sup>-1</sup>) compared to wine produced with a selected strain (0.49 mg L<sup>-1</sup>). There was a greater concentration of higher alcohols, which are usually responsible for the flavour found in alcoholic beverages. Compounds such as oxalic, malic, tartaric, succinic, acetic, lactic, citric, hexanoic, octanoic, 2-ethylcaproic and propionic acids, 2,3-butanediol, isoamyl and 2-phenylethanol alcohols, acetoin, ethyl acetate, acetaldehyde, and diethylsuccinate were identified and quantified in the wines, amongst other compounds. Sensory analysis revealed a high degree of acceptance amongst the great majority of tasters.

---

<sup>4</sup> Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan – DBI/UFLA (Major Professor), Disney Ribeiro Dias – UNILAVRAS.

**SPONTANEOUS AND INOCULATED FERMENTATION WITH  
*Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA1162 IN GABIROBA PULP FOR  
ELABORATION OF FERMENTED BEVERAGE**

(Preparado de acordo com as normas da revista *FEMS Yeast Research* – artigo  
enviado para publicação)

Whasley Ferreira Duarte<sup>1</sup>, Disney Ribeiro Dias<sup>2</sup>, Gilberto Vinicius de Melo  
Pereira<sup>1</sup>, Ivani Maria Gervásio<sup>2</sup> and Rosane Freitas Schwan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Biology, Federal University of Lavras (UFLA);* <sup>2</sup> *Unilavras,  
Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brazil.*

\* *Author to whom correspondence should be addressed. Tel.: +55-35-3829-  
1614, Fax: +55-35-3829-100, email: rschwan@ufla.br*

Running head: Spontaneous and inoculated fermentation of gabiropa pulp

## **Spontaneous and inoculated fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162 in gabirola pulp for elaboration fermented beverage**

### **Abstract**

The objectives of this study were to evaluate the potential of gabirola (*Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg) in the production of a beverage fermented using selected yeast UFLA CA 1162 and wild yeasts from spontaneous fermentation, analyze the volatile compounds profile present during the process of fermentation and, evaluate the sensory quality of the final beverage produced. Throughout the process of fermentation, when *S. cerevisiae* UFLA CA 1162 was inoculated, there were stable viable populations around  $10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . During spontaneous fermentation, yeast population increased from  $5.5 \times 10^3$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  to  $1.4 \times 10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  after 14 days. The diversity and dynamics of the yeast population during spontaneous fermentation observed by PFGE analysis showed five different karyotyping profiles in the first days of fermentation. After the 7<sup>th</sup> day, there was a higher frequency of a similar *Saccharomyces cerevisiae* profile. The yeast non-*Saccharomyces* were identified by sequencing of the ITS region as *Candida quercitrusa* and *Issatchenkia terricola*. Inoculated fermentations yielded a higher amount of alcohol than spontaneous ones, indicating the efficiency of selected strains. There was also a greater concentration of higher alcohols, which are usually responsible for the flavour found in alcoholic beverages. Based on the characteristics of the pulp and acceptance in the sensory analysis, gabirola fruits showed good potential for use in the production of fermented beverage.

## 1 Introduction

The specie *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg, popularly known as gabirola or guabirola, belongs to the family Myrtaceae. The genus *Campomanesia*, represented by shrubs and trees, can be found from northern Argentina to Trinidad as well as from the Brazilian Coast to the Andes and Peru, Ecuador, and Colombia (Landrum, 1986, Valillo et al., 2006). The gabirola fruits are commonly consumed in the producing regions and are highlighted as a potential food resource for both avifauna and man (Vallilo et al., 2006); people use gabirola in the production of homemade ice cream, jam, juices, and sweets. However, not all of the harvest finds its destination in the market, because most of the fruits are damaged during post-harvesting. New forms of use or processing of the production must be developed, in order to prevent losses, generate profits and, favor sustainable exploitation of the resources of the cerrado biome by encouraging conservation. One of the alternatives is its use in fermented beverage production.

Grapes have been used as the main raw material in the production of wine. However, a number of researches found other suitable fruits for wine production. Over the years, fruit wine has been prepared from several different fruits, such as kiwi (Soufleros et al., 2001), cajá (Dias et al., 2003), banana (Akubor et al., 2003), pupunha (Andrade et al., 2003), mango (Reddy & Reddy, 2005), acerola (Santos et al., 2005), jaboticaba (Chiarelli et al., 2005) and cocoa (Dias et al., 2007).

The fermentation process for elaboration of the beverage depends on the performance of yeast to convert the sugars into alcohol and esters. Different species of yeast that develop during fermentation determine the characteristics of the flavor and aroma of the final product. Due to the differences in fruit composition, yeast strains used for fermentation have to

adapt to different environments (e.g. sugar composition and concentrations, presence of organic acids, etc). In addition, the applied yeast has to compete for sugar utilization with other microorganisms present in the mashes, e.g., other yeast species or bacteria, depending on the fruit of choice and varying climatic conditions. Natural grape fermentation involves a succession of yeasts, with *Saccharomyces cerevisiae* as the dominant species (Fleet, 2003). The presence and permanence of different yeast species throughout fruit fermentation, and consequently, their influence on the final product, is determined by the fermentation conditions, such as inoculum of *S. cerevisiae* starter culture, the temperature of the fermentation, and the fruit juice composition (Dias et al., 2007). In the present study, we have investigated the yeast population and the fermentation kinetics during spontaneous and inoculated fermentation of gabiropa juice and their influences on the analytical and sensory properties of the final beverage.

## **2 Material and Methods**

### **2.1 Fruits**

The gabiropa fruits, *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg, were collected in November and December of 2006 and 2007 in the cerrado areas present in the cities of Ijaci, Ingai and Lavras, Minas Gerais, Brazil. The fruits were washed in clean water to remove the residues of calyx. The fruit pulp was extracted manually by mechanical pressure and stored in polystyrene bags at -20 °C. The fruits were then analysed in relation to total weight, size, diameter, and seed:pulp weight ratios. Samples were taken from the gabiropa pulp and were

characterised in relation to soluble solids (AOAC, 1992), total (Yemm & Willis, 1954) and reducing sugars (Miller, 1959), total titratable acidity and pH (AOAC, 1992), pectins (McCready & McComb, 1952) and phenolics, pectinametilsterase (Buescher & Furmanski, 1978), peroxidase (Matsuno & Uritani, 1972), polifenoloxidase (Wisseemann & Lee, 1980) e poligalacturonase (Buescher & Furmanski, 1978).

## **2.2 Gabiroba must**

The gabiroba must was prepared according to Dias et al. (2003) and Dias et al. (2007), with minor modifications. To prepare the fermenting must, gabiroba pulp was defrosted at room temperature. The initial Brix value was, on average, 14 and the pH was 4.1. The gabiroba pulp was diluted with a sucrose solution to adjust the sugar concentration to 10%. CaCO<sub>3</sub> was added to increase the pH value to 4.5. Due to the viscous aspects of the gabiroba pulp, pectinolytic enzymes were also added to aid the clarification of the juice. Ultrazym<sup>®</sup> AFP-L (Novozymes, Novo Nordisk Ferment LTd, Fuglebakken, Denmark) was added to 0.7 ml.l<sup>-1</sup>. Sulphur dioxide was added up to 200 mg of K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> per litre, to inhibit bacteria growth. One percent bentonite was added to the must to facilitate sedimentation of the non-fermentable solids. The bentonite was suspended in water at a 10% concentration to facilitate the dispersion of the clay in the must.

## **2.3 Fermentation assays**

Four fermentations were performed: two of them were inoculated with 10<sup>8</sup> cells ml<sup>-1</sup> of *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162 (IN CA 1162 A e IN CA 1162 B) and the other two (SPON 1A e SPON 1B) were allowed to ferment spontaneously with the gabiroba pulp. After the pulp Brix decreased to 3° Brix

in either inoculated or spontaneous fermentation, there was an addition of gabirola pulp plus sucrose until the Brix in fermentation flasks reached 10° Brix. All vinifications were carried out in 2 litres flasks in a cold room at 22 °C and the fermentation was monitored by the daily measurement of Brix value, CO<sub>2</sub>, and temperature. The maximal fermentation rate was determined by the maximum ethanol production and decrease in sugar content. The fermentation was considered complete when the Brix level was stable. Samples were taken at the indicated points for microbiological and chemical analysis. At the end of fermentation, the vats were transferred to a 10 °C incubator to aid the sedimentation of solid material from the gabirola pulp. After 10 days at this temperature, the wine transfer was carried out with some aeration and the beverage was incubated at 10 °C for another 30 days. After that period, another transfer without aeration was carried out and the fruit wine was left for another 10 days at 10 °C, prior to filtration. The gabirola wine was then filtered using cellulose filters and stored at 10 °C in glass bottles fully filled to avoid oxygen entrance.

#### **2.4 Isolation and identification yeast from spontaneous fermentation**

Samples were taken from each fermentation flask during fermentation and the dilution series was plated out onto Petri dishes using two different media: YPD- agar medium (1% yeast extract; 2% peptone, 2% glucose and 2% agar) supplemented with 100 mg l<sup>-1</sup> of chloramphenicol and 50 mg l<sup>-1</sup> of chlortetracycline to inhibit bacterial growth for yeast counts and nutrient agar (0.3% meat extract; 0.5% peptone and 1.5% agar) supplemented with 4 mg l<sup>-1</sup> of cycloheximide for bacterial counts. Plates were incubated at 28 °C for 2 days to allow colony development. Following incubation, the number of colony-forming

units (CFU) was recorded, the morphological characteristics of each colony type were recorded, and counts were made for each type. For each colony type, a number of colonies corresponding to the square-root of the number of colonies of each type were re-streaked and purified on YPD. The purified isolates were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in YPD broth containing 20% (v/v) glycerol.

## **2.5 Electrophoretic karyotype analysis yeast from spontaneous fermentation**

Analysis of yeast chromosome polymorphism was performed as described by Bernardi et al. (2008). After electrophoresis, gels were stained with 1% ethidium bromide for 1 h and rinsed twice with MilliQ water for 15 min. The gels were visualized in u.v. transillumination and documented with a Polaroid camera. The yeast *S. cerevisiae* UFLA CA 1162 was used as reference strain. Cluster analysis of the band profile obtained by electrophoretic karyotyping analysis was performed using the software NTSYS 2.11f<sup>®</sup>.

## **2.6 Molecular identification of yeast from spontaneous fermentation**

The yeast DNA from the pure cultures was extracted according to the method described by Makimura et al. (1999). Sequencing of portions of the ITS region was used for identification of representative yeast isolates to species level. For amplification of the ITS region, the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') were used. PCR was performed according to the method described by Naumova et al. (2004) and was conducted in a model Thermo PCYL220 thermal cycler (Electron Corporation USA). The

amplification products were separated by electrophoresis on a 0.5% agarose gel at 60-65 V in 0.5x TAE for 1 h. The sequencing of portions of the ITS region was accomplished by MACROGEN, Korea. Sequence similarity searches were performed using the BLAST database from GenBank.

## **2.7 Substrates and metabolites**

Alcohols (ethanol and glycerol), organic acids (acetic acid, lactic acid, malic acid, succinic acid, tartaric acid, and citric acid), and carbohydrates (glucose, sucrose, and fructose) were obtained from pulp extracts and analyzed (Schwan et al., 2001). Analyses were carried out with a high-performance liquid chromatography system (HPLC) (Shimadzu, model LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japan), equipped with a dual detection system consisting of a UV detector and a refractive index detector (RID – 10A SPD-10Ai). A Shimadzu ion exclusion column (Shim-pack SCR-101H, 7.9 mm X 30 cm) operated at a temperature of 50 °C was used to achieve chromatographic separation. Water-soluble acids, sugars (fructose, glucose, and sucrose), and ethanol were eluted with 100 mM of perchloric acid at a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup>. The acids were detected via UV absorbance (210 nm) and RI, while sugars and ethanol were only detected via an RID. Individual sugars, acids, and ethanol were identified and their concentrations were determined by comparison with retention times and amounts of authentic standards. All samples were examined in triplicate. The coefficient of variation was less than 5% in each case. Higher alcohols (1-propanol, isobutanol, 1-butanol, isoamyl alcohol, amyl alcohol, and hexanol), acetaldehyde, methanol, and esters (ethyl acetate and methyl acetate) were analyzed by gas chromatography (GC) using a Shimadzu model 17A, equipped with an FID (flame ionization detector) and using a capillary column of silica

HP FFAP (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$  (J&W Scientific). For GC analysis, 100  $\mu\text{l}$  of each sample (non-distilled) was diluted 20 fold in milli-Q water and filtered using a nitrate-cellulose membrane (0.20  $\mu\text{m}$  pores) before injection in the GC. Operating conditions were as follows: oven temperature was kept at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 3 min, programmed to 75  $^{\circ}\text{C}$  at 2  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , kept at 100  $^{\circ}\text{C}$  for 3 min, programmed to 184  $^{\circ}\text{C}$  increasing 3  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , then kept at 184  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min and then programmed to 220  $^{\circ}\text{C}$  in 15 min. Injector and detector temperature were kept at 240  $^{\circ}\text{C}$  and the carrier gas ( $\text{N}_2$ ) was kept at a flow rate of 1.2  $\text{ml min}^{-1}$ . The identification of volatile compounds was done by comparison of their retention times with those of standards. One sample, which contained the internal standard and the standard compounds at concentrations similar to those found in the wine, was also treated in the same way as the wine samples and the final calculations are described on the basis of the concentration of this reference solution. Evaluation of the different compounds was performed in triplicate.

## **2.8 Sensory evaluation**

The final beverage was evaluated by 50 panellists, males and females, 18 to 55 years of age (staff and students of the Universities UNILAVRAS and UFLA). The panellists were selected for participation on the basis of their preference for dry (less than 5  $\text{g l}^{-1}$  of sugar) wines, interest, and availability. Randomized, refrigerated (10  $^{\circ}\text{C}$ ) samples of 20–25 ml were served in clear, tulip-shaped glasses with a volume of 100 ml; these were marked with three digit random numbers and covered with plastic petri dishes. Distilled water was provided for rinsing of the palate during the testing. Evaluations took place in the mornings between 9:00 and 10:00 a.m. and were conducted at room temperature (20–22  $^{\circ}\text{C}$ ) under white light.

The gabiroba wines were evaluated for taste, clarity, colour, and general acceptability according to the hedonic scale (Moraes, 1993). This scale consists of the comparison, punctuation, and classification of foods and beverages of the same class or origin according to their qualities and defects. A card containing six parameters (visual examination, smelling intensity, smelling quality, taste intensity, taste quality, and harmony) was provided, accompanied by a scale of nine categories: Dislike Extremely = 1, Dislike Much = 2; Dislike Moderately = 3; Dislike Slightly = 4, Neither Dislike nor Like = 5, Like Slightly = 6; Like Moderately = 7; Like Much = 8 , Like Extremely = 9. The sensory analysis was performed in two sensory sessions, each lasting 1 h. The wines were evaluated in duplicate in each session and the mean score of wines for each quality attribute was computed.

## **2.9 Statistical analysis**

The statistical analysis was performed using SISVAR ® software version 4.5. Data from gabiroba must fermentation underwent statistical analysis (Principal component analysis – PCA) using The Unscrambler ® 9.7 (CAMO) software.

## **3 Results and discussion**

The gabiroba fruits and pulp were chemically characterized before initiating the fermentation process. The averages of the results in triplicate are found in Table 1. The gabiroba pulp had on average pH of 4.1, which characterized it as an acidic fruit. The total and reducing sugars concentration was 12.5% and 7.6% respectively. With these amounts of sugars, the gabiroba

pulp could be compared with other tropical fruits, such as cocoa, with potential for use in the beverage industry (Alves et al., 2000). The total soluble solid concentration in the pulp of gabirola, determined as its Brix value, was 14.1 (Table 1). As the determination of °Brix by refractrometry indicates total soluble solids, which are not necessarily constituted of only sugars, the final alcohol yield might appear to be low if based on the Brix value.

When pH, water content, and total sugars are considered, the results of gabirola characterization in this study were similar to those described for the genus *Campomanesia* (Vallilo et al., 2006). The concentration of ascorbic acid (vit. C) found in the species *C. pubescens* (1000 mg/100 g), when compared with other species of the family Myrtaceae, was equivalent to that found in acerola (984 mg/100 g) and was superior to those described for red guava (60mg/100g), Pitanga (24 mg/100 g), and jaboticaba (16 mg/100g) (TACO, 2006) as well as those observed in two other species of *Campomanesia*, both *C. adamantium* (234 mg/100 g) (Vallilo et al., 2006).

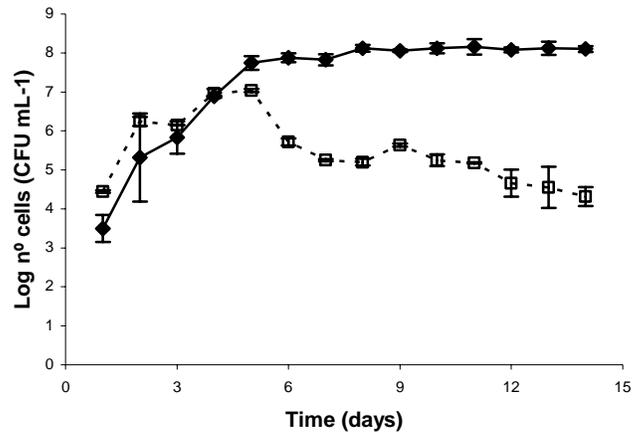
**Table 1** Physico-chemical characterisation of mature gabiropa pulp

<b>Characteristics</b>	<b>Mean</b>	<b>± SD</b>
Total weight (g)	47,00	2,51
Rind (%)	43,69	0,88
Seed (%)	6,43	0,50
Pulp (%)	51,95	1,59
Moisture (%)	79,73	0,64
Dry matter (%)	20,27	0,64
pH	4,14	0,10
Total titratable acid (%)	0,16	0,01
Reducing Sugars (%)	7,61	0,34
Total sugars (%)	12,52	0,63
Sucrose (%)	4,66	0,29
Total soluble solids (°Brix)	14,07	0,12
Soluble pectin (%)	2,27	0,17
Total pectin (%)	3,38	0,27
Solubilization (%)	67,20	0,31
Starch (%)	1,18	0,05
Vitamin C (mg/100g)	1090,0	10
Phenolics soluble in water (%)	0,70	0,03
Phenolics soluble in methanol 50% (%)	0,68	0,02
Phenolics soluble in methanol (%)	0,96	0,05
Crude fiber (%)	1,94	0,10
Neutral detergent fiber (%)	3,32	0,16
Acid detergent fiber (%)	3,00	0,03
Cellulose (%)	0,32	0,14
Hemicellulose (%)	1,40	0,06
Lignin (%)	1,68	0,04
Polyphenoloxidase (mmol/g.mim)	272,91	6,00
Peroxidase (mmol/g.mim)	116,51	2,64
Pectin methyl esterase (mmol/g.mim)	208,00	6,93
Polygalacturonase (mmol/g.mim)	23,85	1,00

The bentonite introduced into the gabirola must during the pre-fermentative phase provided better clarification of the beverage by facilitating sedimentation of the must solid, thereby improving decanting and filtering in later stages (Catarino et al, 2007). Similar results have described the improvement of the appearance of fruit wine produced from caja and cocoa pulp (Dias et al., 2003; Dias et al., 2007). The presence of endogenous pectinases is relatively common in fruits; however, the natural activity of pectinases was low (28.8 mmol/g·min, Table 1) in the gabirola pulp. Therefore, addition of the enzymatic complex (Ultrazym AFP-L (New Nordish) was necessary to reduce the viscosity of the pulp and aid the clarification of the beverage (Dias et al., 2007). The addition of exogenous enzymes, such as protease, pectinases, and glucanases, is a common practice in the production of wine to reduce problems during filtration and improve the aroma (glycosidases). The pH of the must was adjusted slightly to 4.5 to encourage the activity of the enzyme complex. The acidic pH is unfavorable for the growth of bacteria and promotes the growth of yeast (Viljoen, 2006). The addition of  $K_2S_2O_5$  in the must (200 mg l<sup>-1</sup>) of gabirola before spontaneous fermentation contributed to the reduction of the bacterial population (Fig. 1). When counting the viable cell population during the period of inoculated fermentation, the presence of bacteria was not observed, indicating that metabisulphite was efficient in the control of the bacterial growth during the inoculated fermentative process (data not shown). Dias et al. (2007) found that the use of SO<sub>2</sub> in the elaboration of fruit wine was effective for inhibition of undesirable bacteria during fermentation. It was also observed that once the fermentation had started, its course was not affected by sulphite, as also described by Gerbaux & Meurgues (1995).

### 3.1 Yeast fermentation dynamics

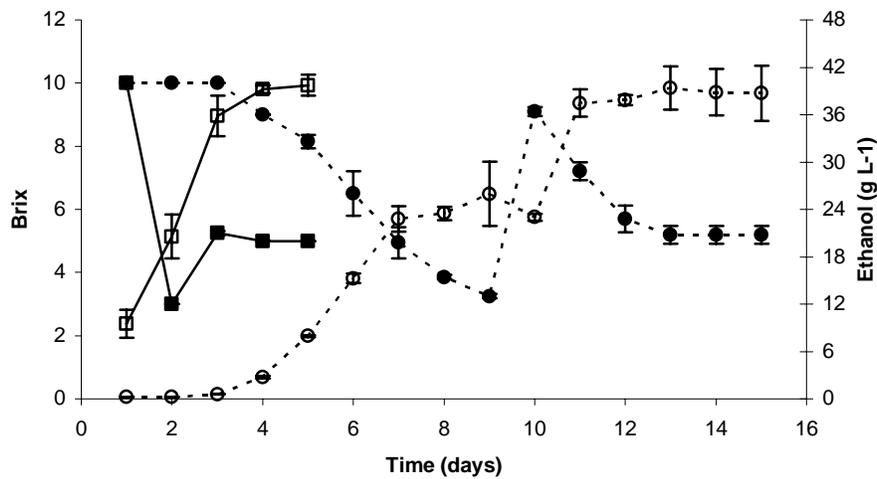
The viable counts of yeasts and bacteria during spontaneous fermentation of gabirola pulp are shown in Fig. 1. At the beginning of the spontaneous fermentation, the fresh gabirola pulp exhibited a total yeast count on YPD medium of  $3.5 \log \text{CFU ml}^{-1}$ , while bacteria populations were almost 3 times higher (Fig. 1).



**Figure 1** Viable counts of (—◆—) yeasts and (---■---) bacteria during spontaneous gabirola pulp fermentation.

Yeast counts increased during the spontaneous process and after five days of fermentation, they were greater in number than bacteria. At this time, the maximum number of yeasts,  $8 \log \text{CFU ml}^{-1}$ , was reached. The bacterial population showed a small increase during at the first days of fermentation and then decreased to  $3.2 \log \text{CFU ml}^{-1}$  in the late phases. The increase in yeast

population and decrease in bacterial population could be explained by ethanol concentrations found in the fermenting must (Fig. 2). The increase in the Brix value observed after 2 days in inoculated fermentation and after 9 days in spontaneous fermentation was due to an addition of gabirola must at 10 Brix to increase the ethanol production and enhance the fruit flavour (Fig. 2).



**Figure 2** Consumption of soluble solids and ethanol production in gabirola pulp fermentation. (---●---) Brix (SPON); (—■—) Brix (IN UFLA CA 1162); (···○···) Ethanol (SPON); (---□---) Ethanol (IN UFLA CA 1162). Inoculated fermentation finished after five days; Spontaneous fermentation finished after fourteen days.

Throughout the process of fermentation, when *S. cerevisiae* UFLA CA 1162 (IN CA 1162 A and CA 1162 B) was inoculated, there were stable viable populations around  $10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . The cell viability was high throughout the fermentation process, showing slight decreases at the end of 2% to 4%.

According to Fleet (1999), the inoculation of selected yeasts reduces the growth of native yeasts. Egli et al. (1998) also observed a reduction in yeast diversity during the middle and end of fermentation when yeast was used as starter culture.

According to the morphological characterization of colonies during spontaneous fermentation (SPON 1A and 1B), 6 morphotypes were found during the 14 days of fermentation (Fig. 3).



1– small, convex surface, regular margin, smooth, gray, circular format; 2 – small, convex surface, regular margin, smooth, creamy white, circular format; 3 – medium size, raised at centre, regular margin, smooth, brown, circular format; 4 – small, raised at centre, regular margin, rough, brown, circular format; 5 – large, raised at centre, regular margin, smooth, brown, circular format, slimy; 6 – large, slimy with folding, irregular margin, rough, creamy white.

**Figure 3** Different morphologies of colonies present during spontaneous fermentation gabiropa pulp.

These isolates were evaluated microscopically (data not shown), it was found that the same colony morphotype could be a different cell type. According to Kuthan (2003), colonies of *S. cerevisiae* may change their morphology under

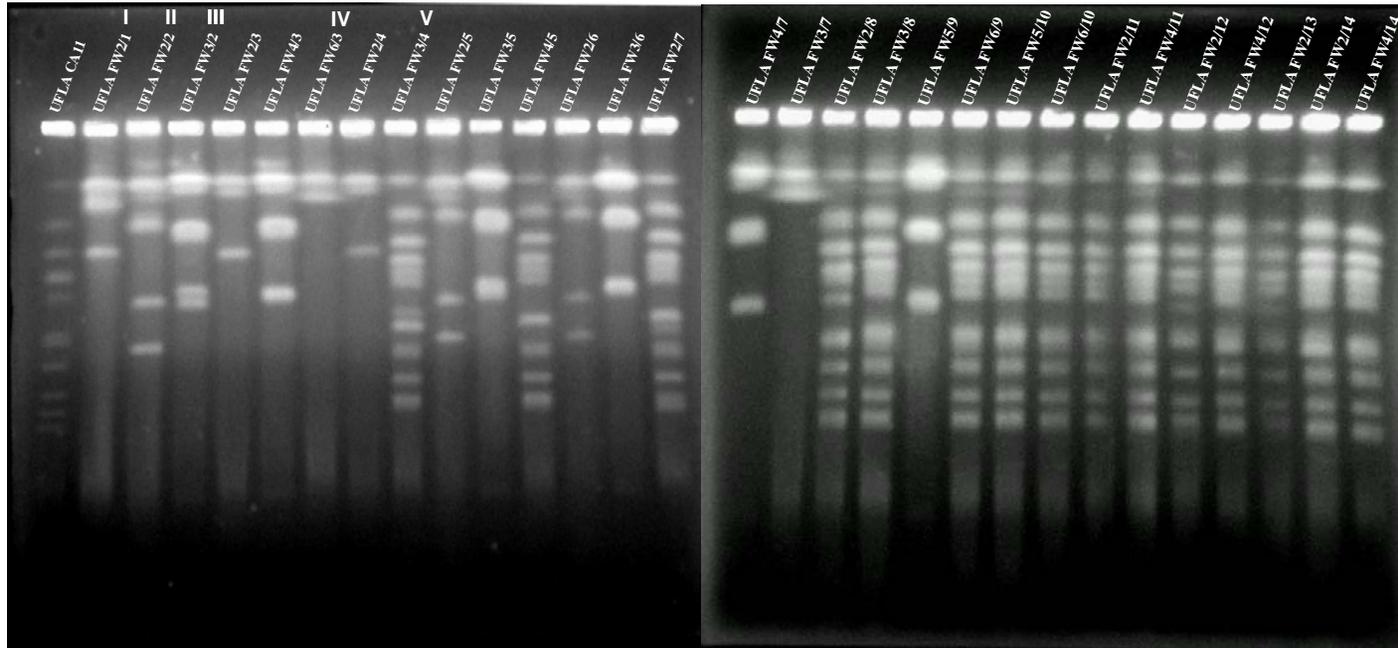
different environmental conditions. Laffey & Butler (2005) observed that *Candida parapsilosis*, which is mainly composed of single cells, formed smooth colonies, while colonies whose cells have hyphae or pseudo hyphae showed crepe and concentric colony morphologies. Each yeast morphotype presented variable distribution during the fermentation; however morphotype 2 was present during the entire period of fermentation.

The distribution of morphotypes found during spontaneous fermentation is presented in Table 2. Morphotype 1 was only detected in the first day of fermentation and morphotype 5 was found on the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days, while the morphotypes 2 and 4 were found all through the fermentation.

**Table 2** Viable counts of yeast population, profile obtained by PFGE and species identification during the spontaneous fermentation of gabirola pulp

Morphotype	Days of fermentation	Mean of CFU ml <sup>-1</sup>	Profile PFGE	Sequencing identification	% Similarity /accession n°
1	1	5,50x10 <sup>3</sup>	V	<i>S. cerevisiae</i>	99% <u>AY235811.1</u>
2	1-8,11-14	4,75x10 <sup>8</sup>	I II V	<i>Candida quercitrusa</i> unidentified <i>S. cerevisiae</i>	99% <u>AM158924.1</u> 99% <u>AM900394.1</u>
3	2, 4, 5, 6, 7 and 8	1,85x10 <sup>8</sup>	III V	<i>Issatchenkia terricola</i> <i>S. cerevisiae</i>	99% <u>AY235808.1</u> 99% <u>AY235811.1</u>
4	3, 5, 7, 11, 12 and 14	1,46x10 <sup>8</sup>	III V	<i>Issatchenkia terricola</i> <i>S. cerevisiae</i>	99% <u>AY235808.1</u> 99% <u>AY235811.1</u>
5	9 and 10	1,10x10 <sup>8</sup>	III V	<i>Issatchenkia terricola</i> <i>S. cerevisiae</i>	99% <u>AY235808.1</u> 99% <u>AY235811.1</u>
6	3, 9, 10, 13 and 14	2,50x10 <sup>8</sup>	IV V	<i>Candida quercitrusa</i> <i>S. cerevisiae</i>	100% <u>AM160627.1</u> 99% <u>AY235811.1</u>

A total of 32 isolates were analyzed by PFGE. The diversity and dynamics of the yeast population during spontaneous fermentation observed by PFGE analysis showed five different karyotyping profiles in the first days of fermentation (Fig. 4).

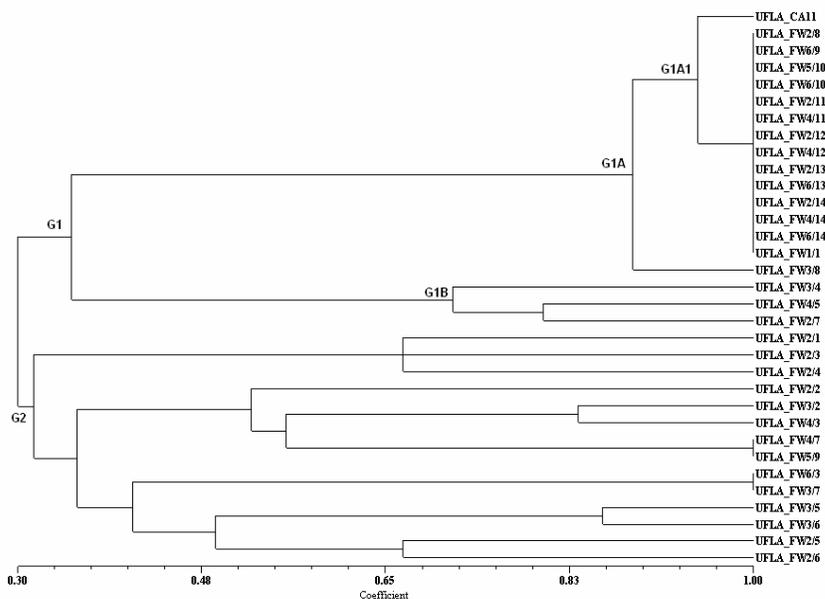


**Figure 4** Electrophoretic karyotypes (profiles) of isolates during spontaneous fermentation gabiropa pulp. Lines: 1- *S. cerevisiae* UFLA CA 11; 2-30 yeasts isolated at 24 h intervals during 14 days of fermentation; 2-4 - isolates from 2<sup>nd</sup> day; 5-7 - isolates from 3<sup>rd</sup> day; 8-9 - isolates from 4<sup>th</sup> day; 10-12 - isolates from 5<sup>th</sup> day; 13-14 - isolates from 6<sup>th</sup> day; 15-17 - isolates from 7<sup>th</sup> day; 18-19 - isolates from 8<sup>th</sup> day; 20-21 - isolates from 9<sup>th</sup> day; 22-23 - isolates from 10<sup>th</sup> day; 24-25 - isolates from 11<sup>th</sup> day; 26-27 - isolates from 12<sup>th</sup> day, 28- isolates from 13<sup>th</sup> day; 29-30 - isolates from 14<sup>th</sup> day of fermentation. Numbers I, II, III, IV and V refer to different karyotyping profiles.

During the first days of fermentation it was observed a diversity of karyotyping, however, from the 7<sup>th</sup> day, the profile V dominated until the end of fermentation (Table 2 and Fig. 4). The profile V was similar to yeast reference used, indicating they were strains of *S. cerevisiae* (Fig. 4). The other profiles were found to be different, since it had fewer bands and may be considered species (or genus) distant to *S. cerevisiae* (Bernardi et al., 2008). In the early stages of wine fermentation, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, and *Kluyveromyces* are frequently found, but they will gradually die, which is dependent on their tolerance to low ethanol concentrations (Fleet, 1999). These yeasts are replaced by *S. cerevisiae*, which tolerates high ethanol concentrations. Schwan et al. (2001) reported that the yeast strains of *S. cerevisiae* were the only ones in the final phase of fermentation of sugar cane and that the conditions of low pH, concentration of sugars, and increasing concentrations of ethanol favor their dominance in the fermentation must. Torija et al. (2001) and Jemec et al. (2001) also found predominant yeast populations that were not *Saccharomyces* in the early stages of fermentation, while *Saccharomyces* dominated the middle and end of fermentation.

The dendogram (Fig. 5) that was developed based on coefficient Dice, shows a group of 32 isolates that were found in spontaneous fermentation. Two large groups were observed (G1 and G2) based on PFGE profiles. The G1 group had a similarity of > 36% and the profiles were similar to the one of *S. cerevisiae* UFLA CA11 (Bernardi et al., 2008). The G1 group was subdivided into two sub-groups showing a similarity above 71% (G1A e G1B). The subgroup G1A was comprised of all isolates with 95% similarity. These isolates dominated the fermentation process after the 9<sup>th</sup> day of fermentation. The G2 was a group of 14 isolates that demonstrated less similarity with UFLA CA11. These isolates were present in the spontaneous fermentation until the 7<sup>th</sup> day,

except UFLA FW5/9, which was also detected on the 9<sup>th</sup> day of fermentation. The isolates UFLA FW4/7 and UFLA FW3/7 showed 100% similarity with UFLA FW5/9 and UFLA FW6/3, respectively.



**Figure 5** Cluster analysis of the profiles obtained by PFGE of the yeast isolated from the spontaneous fermentation gabiropa pulp

The construction of dendrograms based on the presence and intensity of bands has been used to evaluate the similarity among yeasts (Schmid et al., 1990). The high incidence of chromosomal differences between yeast isolates makes the electrophoretic karyotyping technique an efficient technique to distinguish different strains (Jeyaram et al., 2008). Isolates of *S. cerevisiae* evaluated by PFGE have been found to have 13 chromosomes with a size ranging between 200 and 2000 kb (Briones et al., 1996). The main source of variation in yeast chromosomal structure growing under stressful conditions may be due the transposons (Dunham et al., 2002). Chromosomal rearrangements due

to reciprocal translocation during meiosis may be the reason for an association of more than two chromosomes counterparts (Fischer et al., 2000).

A representative strain was chosen from the 5 electrophoretic profiles for sequencing. The results obtained from sequencing of the ITS region (ITS1 and ITS2 5.8S rRNA) allowed for the identification of different yeasts species. The isolated UFLA FW1/1 was identified as *S. cerevisiae* with 99% identity with the closest relative accession number AY235811.1. The isolates UFLA FW2/8, UFLA FW3/8, UFLA FW6/9, UFLA FW5/10, UFLA FW6/10, UFLA FW2/11, UFLA FW2/12, UFLA FW2/13, UFLA FW2/14, and UFLA FW4/14 were also identified as *S. cerevisiae*. The isolate UFLA FW2/1 (profile I) showed 99% similarity with *Candida quercitrusa* and was present during the first days of spontaneous fermentation. The isolate UFLA FW4/3 (profile III) was identified as *Issatchenkia terricola* and this species was found from the second until the ninth day of fermentation. The isolates UFLA FW2/2, UFLA FW2/5, and UFLA FW2/6 found in the second, fiftieth, and sixtieth days, of fermentation, respectively, could not be identified by either traditional methods or sequencing. Non-*Saccharomyces* yeasts were often found in the first 10 days of spontaneous fermentation; however, *Saccharomyces* isolates dominated after this period of fermentation. Our results were similar to those reported by Fleet (2003), who observed that species of *Candida*, *Issatchenkia* and *Pichia* persisted well into the middle stage of grape fermentation.

The non-*Saccharomyces* yeasts isolated showed low ethanol tolerance (data not shown). These results are in agreement with those reported by Jemec et al. (2001). *Issatchenkia terricola* demonstrated a slow ability to ferment glucose and sucrose; this strain has not been used in mixed fermentations due to the high production of ethyl acetate (Clemente-Jimenez et al., 2005). *Candida quercitrusa* is usually associated with insects (Molnár et al., 2008) and fruits,

such as mango, banana, pineapple, longan, and rambutan (Chanchaichaovivat et al., 2007).

### **3.3 Chemical analyses during fermentation**

The chemical compounds produced by microbial activity were analyzed throughout the process of fermentation. The decrease in soluble solids and the increase the content of ethanol are shown in Fig. 2. The final values for ethanol concentration and soluble solids (Brix) either spontaneous (SPON) or inoculated (IN CA 1162) fermentation process was similar (Fig. 2). The fermentation performed with the yeast *S. cerevisiae* UFLA CA 1162 was 30% faster than the spontaneous fermentation. The final pH value was approximately 3.7 for both fermentative processes. The rapid decrease in sugar content and increase the concentration of ethanol during the inoculated fermentation (Fig. 2) was also observed by Domizio et al. (2007) during fermentation of grape must under controlled temperature conditions. This confirms that the use of selected yeast promotes a rapid increase in the concentration of ethanol, besides these strains dominate the fermentation process. Nurgel et al. (2002) found that using selected yeast ( $5.0 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) in the fermentation of non pasteurized grape was completed in 6 days, while spontaneous fermentation lasted 10 days. These authors also found that the values of pH were similar (approximately 3.8) for both beverages produced by spontaneous or inoculated fermentation. Similar results were shown in this study where the pH value was 3.73 in the spontaneous and 3.77 in the inoculated fermentations.

The results of chemical analysis showed variations of the different compounds during the fermentation processes (SPON and IN CA 1162) and in the final beverages. Small differences in the composition of fruit wine were also

found between the first period of fruit wine elaboration (10 days after the end of fermentation) and the final beverages (Tables 3 and 4). Inoculated fermentations yielded a higher amount of alcohol than spontaneous ones, indicating the efficiency of selected strains.

**Table 3** Organic compounds determined by HPLC and GC during fermentation and in the wine elaborated by spontaneous fermentation

Compound	Days of fermentation							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Acetaldehyde (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	28,05 ± 1,63	34,87 ± 6,65	40,93 ± 13,09
2-Furaldehyde (mg L <sup>-1</sup> )	nd	89,21 ± 3,17	170,89 ± 10,53	188,06 ± 2,00	192,35 ± 1,70	221,01 ± 12,55	250,00 ± 38,29	307,21 ± 35,24
Ethyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	135,79 ± 1,68	142,02 ± 8,92	140,82 ± 1,80	127,32 ± 10,05	144,22 ± 2,39	132,03 ± 5,48	158,87 ± 1,63	149,14 ± 1,01
Phenyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	4,51 ± 5,21	18,91 ± 4,66	16,02 ± 2,17	8,40 ± 1,39	7,25 ± 0,35	7,04 ± 0,22
Diethyl succinate (mg L <sup>-1</sup> )	nd	225,09 ± 5,50	287,31 ± 16,06	301,50 ± 5,30	271,67 ± 7,24	204,28 ± 33,28	46,13 ± 11,33	nd
2,3-butanediol (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	267,88 ± 1,24	274,47 ± 3,16	283,66 ± 4,73	317,89 ± 13,28
1,2-propanediol (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,90 ± 0,14	4,90 ± 0,16
2-phenylethanol (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	14,15 ± 7,89	26,55 ± 2,19	33,83 ± 2,08
Isoamyl alcohol (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	26,17 ± 2,19	38,02 ± 1,15	85,62 ± 10,14	121,67 ± 31,56
Hexanoic acid (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Octanoic acid (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-ethylcaproic acid (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Propionic acid (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	6,42 ± 0,28	7,03 ± 0,78	11,21 ± 2,14	25,61 ± 4,19	35,72 ± 3,22	41,75 ± 2,46
Acetic acid (g L <sup>-1</sup> )	0,41 ± 0,11	0,43 ± 0,12	0,43 ± 0,08	0,68 ± 0,10	0,52 ± 0,01	1,51 ± 0,18	1,41 ± 0,62	3,33 ± 0,34
Lactic acid (g L <sup>-1</sup> )	nd	nd	0,13 ± 0,15	0,75 ± 0,03	0,69 ± 0,04	0,53 ± 0,16	0,82 ± 0,02	0,96 ± 0,13
Citric acid (g L <sup>-1</sup> )	1,39 ± 0,22	1,33 ± 0,18	2,54 ± 1,23	2,42 ± 0,25	2,47 ± 0,28	1,96 ± 0,13	2,03 ± 0,07	3,48 ± 0,11
Malic acid (g L <sup>-1</sup> )	2,13 ± 0,12	1,92 ± 0,09	0,87 ± 1,00	3,32 ± 0,21	2,93 ± 0,18	1,98 ± 0,31	2,51 ± 0,03	nd
Tartaric acid (g L <sup>-1</sup> )	0,50 ± 0,05	0,76 ± 0,06	0,68 ± 0,11	2,37 ± 0,00	5,67 ± 0,06	5,00 ± 0,18	5,46 ± 0,44	0,91 ± 0,02
Succinic acid (g L <sup>-1</sup> )	5,15 ± 0,16	4,95 ± 0,25	4,74 ± 0,22	8,61 ± 0,17	7,59 ± 1,45	4,90 ± 0,57	5,47 ± 0,55	8,90 ± 0,06
Oxalic acid (g L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,16 ± 0,02
Acetoin (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glucose (g L <sup>-1</sup> )	13,75 ± 1,11	18,17 ± 0,53	22,85 ± 2,34	37,07 ± 2,01	27,77 ± 4,16	14,05 ± 5,22	8,11 ± 1,07	3,00 ± 0,89
Sucrose (g L <sup>-1</sup> )	50,01 ± 2,51	44,66 ± 3,25	28,28 ± 0,60	nd	nd	nd	nd	nd
Fructose (g L <sup>-1</sup> )	17,36 ± 3,30	18,49 ± 0,99	22,95 ± 2,16	42,54 ± 2,40	36,95 ± 3,42	25,23 ± 5,18	16,93 ± 1,80	3,13 ± 0,14
Glycerol (g L <sup>-1</sup> )	0,08 ± 0,02	0,13 ± 0,09	0,15 ± 0,02	0,43 ± 0,07	0,87 ± 0,03	1,20 ± 0,04	1,56 ± 0,20	1,67 ± 0,17
Ethanol (g L <sup>-1</sup> )	0,28 ± 0,00	0,24 ± 0,03	0,58 ± 0,04	2,73 ± 0,19	7,90 ± 0,13	15,24 ± 0,61	22,77 ± 1,60	23,51 ± 0,86

nd (not detected), ± - Standard deviation

(Continued on next page)

Table 3 (continued)

Compound	Days of fermentation						TRA*	Wine**
	9	10	11	12	13	14		
Acetaldehyde (mg L <sup>-1</sup> )	50,07 ± 9,89	50,99 ± 12,86	42,48 ± 11,28	38,04 ± 3,79	44,18 ± 9,60	44,41 ± 7,77	37,26 ± 5,15	33,74 ± 6,14
2-Furaldehyde (mg L <sup>-1</sup> )	329,62 ± 42,99	325,10 ± 32,38	376,27 ± 59,86	366,12 ± 42,30	383,75 ± 21,24	369,72 ± 31,97	308,66 ± 11,96	290,45 ± 31,17
Ethyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	144,07 ± 1,87	154,16 ± 7,48	161,36 ± 41,88	206,61 ± 11,00	171,76 ± 13,16	130,23 ± 2,19	114,30 ± 12,37	141,77 ± 16,08
Phenyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	6,52 ± 8,42	nd	18,60 ± 1,49	6,06 ± 2,32	2,80 ± 3,29	6,06 ± 2,51	8,95 ± 1,40	8,67 ± 1,42
Diethyl succinate (mg L <sup>-1</sup> )	nd	239,93 ± 51,83	32,18 ± 3,99	nd	nd	nd	nd	nd
2,3-butanediol (mg L <sup>-1</sup> )	322,47 ± 8,14	326,58 ± 1,84	334,25 ± 7,37	331,65 ± 5,22	331,46 ± 4,68	337,11 ± 4,88	354,75 ± 3,56	341,66 ± 7,71
1,2-propanediol (mg L <sup>-1</sup> )	5,02 ± 0,25	5,12 ± 2,51	10,95 ± 1,50	7,30 ± 0,40	11,50 ± 2,1	6,99 ± 0,17	19,59 ± 6,94	20,66 ± 4,05
2-phenylethanol (mg L <sup>-1</sup> )	40,18 ± 3,56	44,26 ± 5,64	50,35 ± 3,93	58,70 ± 4,89	61,57 ± 5,29	60,11 ± 4,47	61,55 ± 16,18	63,79 ± 3,80
Isoamyl alcohol (mg L <sup>-1</sup> )	122,33 ± 22,57	98,20 ± 9,01	132,80 ± 4,63	145,40 ± 3,51	159,52 ± 1,60	159,93 ± 4,75	159,04 ± 5,62	136,73 ± 2,39
Hexanoic acid (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	79,79 ± 5,34	nd	nd	nd	nd	nd
Octanoic acid (mg L <sup>-1</sup> )	148,18 ± 1,22	149,92 ± 2,37	125,09 ± 2,72	126,02 ± 0,14	nd	50,91 ± 0,93	nd	nd
2-ethylcaproic acid (mg L <sup>-1</sup> )	29,89 ± 1,11	18,65 ± 0,35	33,79 ± 0,43	nd	nd	nd	nd	nd
Propionic acid (mg L <sup>-1</sup> )	44,40 ± 6,94	69,29 ± 3,67	83,59 ± 11,97	98,53 ± 14,91	95,90 ± 13,58	95,80 ± 10,28	73,60 ± 11,76	74,61 ± 12,48
Acetic acid (g L <sup>-1</sup> )	3,41 ± 0,19	2,58 ± 0,85	2,93 ± 0,80	2,59 ± 0,30	2,44 ± 0,59	2,04 ± 0,40	1,49 ± 0,07	1,64 ± 0,14
Lactic acid (g L <sup>-1</sup> )	1,07 ± 0,02	0,97 ± 0,24	0,83 ± 0,05	0,79 ± 0,04	0,81 ± 0,03	0,90 ± 0,09	1,89 ± 0,23	1,14 ± 0,41
Citric acid (g L <sup>-1</sup> )	3,63 ± 0,25	2,52 ± 0,63	3,11 ± 0,35	2,31 ± 0,45	2,79 ± 0,51	2,60 ± 0,22	2,03 ± 0,40	4,04 ± 0,22
Malic acid (g L <sup>-1</sup> )	nd	3,54 ± 0,87	2,57 ± 0,03	1,59 ± 0,00	nd	nd	nd	nd
Tartaric acid (g L <sup>-1</sup> )	0,98 ± 0,04	0,95 ± 0,19	0,79 ± 0,00	0,78 ± 0,00	0,83 ± 0,00	0,73 ± 0,00	1,19 ± 0,34	1,25 ± 0,40
Succinic acid (g L <sup>-1</sup> )	9,09 ± 0,38	5,30 ± 0,56	6,24 ± 0,02	5,61 ± 0,04	5,82 ± 0,25	6,01 ± 1,10	4,90 ± 0,45	6,20 ± 0,34
Oxalic acid (g L <sup>-1</sup> )	0,16 ± 0,03	0,03 ± 0,00	nd	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	nd	nd
Acetoin (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10,35 ± 3,35
Glucose (g L <sup>-1</sup> )	3,39 ± 0,64	25,38 ± 2,90	12,63 ± 1,89	4,55 ± 0,67	3,15 ± 0,22	3,37 ± 0,44	2,01 ± 0,16	1,94 ± 0,26
Sucrose (g L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fructose (g L <sup>-1</sup> )	1,09 ± 0,10	31,72 ± 3,66	22,64 ± 2,79	9,73 ± 2,19	3,00 ± 0,65	1,46 ± 0,12	0,88 ± 0,01	0,85 ± 0,12
Glycerol (g L <sup>-1</sup> )	1,63 ± 0,19	1,73 ± 0,25	1,76 ± 0,14	1,94 ± 0,33	1,90 ± 0,09	1,88 ± 0,09	2,06 ± 0,31	2,05 ± 0,18
Ethanol (g L <sup>-1</sup> )	25,96 ± 4,06	23,04 ± 0,43	37,46 ± 1,74	37,85 ± 0,61	39,36 ± 2,74	38,85 ± 2,94	42,32 ± 1,80	39,08 ± 1,13

nd (not detected), ± - Standard deviation

\* TRA: gabiroba wine ten days after the end of fermentation.; \*\* Gabiroba wine - forty days after the end of fermentation.

**Table 4** Organic compounds determined by HPLC and GC during fermentation and in the final product of gabiroba must inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA 1162

Compound	Days of fermentation					TRA*	Wine**
	1	2	3	4	5		
Acetaldehyde (mg L <sup>-1</sup> )	43,61 ± 1,03	23,23 ± 1,59	39,94 ± 2,64	81,21 ± 2,70	89,98 ± 0,82	119,44 ± 1,42	71,31 ± 2,33
2-Furaldehyde (mg L <sup>-1</sup> )	248,83 ± 3,21	256,75 ± 0,83	221,43 ± 0,95	269,84 ± 2,06	238,62 ± 4,12	167,29 ± 3,76	151,48 ± 2,33
Ethyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	181,95 ± 4,03	180,82 ± 0,03	151,33 ± 8,59	207,45 ± 1,77	190,81 ± 4,12	110,61 ± 1,97	115,55 ± 2,60
Phenyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Diethyl succinate (mg L <sup>-1</sup> )	191,69 ± 4,66	nd	nd	12,34 ± 0,52	18,65 ± 0,56	nd	nd
2,3-butanediol (mg L <sup>-1</sup> )	300,85 ± 5,15	293,78 ± 5,76	365,13 ± 4,94	384,43 ± 6,61	315,54 ± 6,12	311,74 ± 3,42	308,42 ± 0,13
1,2-propanediol (mg L <sup>-1</sup> )	6,75 ± 0,71	25,10 ± 0,45	71,19 ± 0,37	50,32 ± 1,43	47,77 ± 2,18		
2-phenylethanol (mg L <sup>-1</sup> )	34,00 ± 0,84	30,42 ± 2,28	76,59 ± 3,44	92,18 ± 0,21	36,95 ± 3,85	36,19 ± 4,11	39,87 ± 6,05
Isoamyl alcohol (mg L <sup>-1</sup> )	36,53 ± 1,86	141,15 ± 1,48	244,14 ± 0,98	291,14 ± 3,20	296,48 ± 3,15	248,04 ± 1,80	214,28 ± 13,02
Hexanoic acid (mg L <sup>-1</sup> )	90,23 ± 1,94	72,74 ± 2,38	149,53 ± 2,06	102,92 ± 0,04	96,64 ± 2,50	nd	nd
Octanoic acid (mg L <sup>-1</sup> )	166,38 ± 2,09	110,19 ± 1,74	247,38 ± 2,19	188,30 ± 0,14	111,06 ± 2,07	nd	nd
2-ethylcaproic acid (mg L <sup>-1</sup> )	33,43 ± 3,14	20,79 ± 0,30	22,06 ± 1,35	11,24 ± 0,52	nd	nd	nd
Isobutyric acid (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	2,55 ± 0,32	2,31 ± 0,29	1,92 ± 0,07	nd	nd
1-hexanol (mg L <sup>-1</sup> )	1,37 ± 0,01	nd	nd	1,22 ± 0,02	1,64 ± 0,02	nd	nd
Butyric acid (mg L <sup>-1</sup> )	23,61 ± 1,44	nd	27,36 ± 0,02	28,06 ± 3,68	29,62 ± 0,91	nd	nd
Propionic acid (mg L <sup>-1</sup> )	5,96 ± 0,048	5,50 ± 0,01	10,44 ± 0,03	16,61 ± 0,01	7,51 ± 0,01	7,46 ± 0,05	7,45 ± 0,01
Acetic acid (g L <sup>-1</sup> )	1,29 ± 0,22	1,78 ± 0,07	2,34 ± 0,39	2,35 ± 0,48	2,10 ± 0,40	1,36 ± 0,23	1,21 ± 0,09
Lactic acid (g L <sup>-1</sup> )	nd	nd	0,61 ± 0,10	0,59 ± 0,08	0,51 ± 0,03	nd	nd
Citric acid (g L <sup>-1</sup> )	1,72 ± 0,40	1,62 ± 0,16	2,46 ± 0,18	2,39 ± 0,51	2,19 ± 0,26	2,71 ± 0,07	3,13 ± 0,25
Malic acid (g L <sup>-1</sup> )	2,79 ± 0,42	1,95 ± 0,24	2,08 ± 0,01	2,22 ± 0,22	1,80 ± 0,29	3,46 ± 0,39	2,70 ± 0,13
Tartaric acid (g L <sup>-1</sup> )	0,78 ± 0,05	0,74 ± 0,01	0,85 ± 0,02	0,84 ± 0,01	0,72 ± 0,03	1,37 ± 0,30	1,02 ± 0,11
Succinic acid (g L <sup>-1</sup> )	7,32 ± 2,62	5,28 ± 0,50	7,78 ± 1,68	8,44 ± 2,43	6,98 ± 2,76	10,32 ± 2,15	8,73 ± 0,41
Oxalic acid (g L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,26 ± 0,06
Acetoin (mg L <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Glucose (g L <sup>-1</sup> )	15,24 ± 1,42	0,60 ± 0,06	0,08 ± 0,03	0,06 ± 0,00	0,10 ± 0,03	0,22 ± 0,08	0,49 ± 0,02
Sucrose (g L <sup>-1</sup> )	0,00 ± 0,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Fructose (g L <sup>-1</sup> )	29,01 ± 0,61	nd	0,67 ± 0,01	nd	0,56 ± 0,03	1,01 ± 0,12	0,85 ± 0,01
Glycerol (g L <sup>-1</sup> )	0,69 ± 0,11	1,18 ± 0,01	1,45 ± 0,10	1,58 ± 0,02	1,40 ± 0,28	1,72 ± 0,12	1,65 ± 0,08
Ethanol (g L <sup>-1</sup> )	9,50 ± 1,77	20,55 ± 2,78	35,83 ± 2,59	39,24 ± 0,47	38,72 ± 1,32	43,81 ± 2,65	37,16 ± 0,64

nd (not detected), ± - Standard deviation

\* TRA: gabiroba wine ten days after end of fermentation.; \*\* Gabiroba wine forty days after end of fermentation.

The highest ethanol concentration was achieved after 4 days of fermentation in the inoculated process and after more than 14 days during spontaneous fermentation (Fig. 2). For the final beverages, the results shown in Tables 3 and 4 were grouped according to the chemical compounds group and data were subjected to analysis of variance 5% Tukey's test. When the chemical compounds groups were compared, the produced gabirola wines (IN CA 1162 and SPON) showed similar values, regardless of the type of fermentation, with the exception of the total concentration of aldehydes (324.19 mg l<sup>-1</sup> for SPON and 222.79 mg l<sup>-1</sup> for IN CA 1162), ketones (10.76 mg l<sup>-1</sup> for SPON), and sugars (2.79 g l<sup>-1</sup> for SPON and 1.36 g l<sup>-1</sup> for IN CA 1162) (Table 5).

**Table 5** Averages of compounds by chemical group present in gabirola wine

<b>Compound</b>	<b>SPON</b>	<b>UFLA CA 1162</b>
Esteres (mg L <sup>-1</sup> )	150,44 <sup>a</sup>	115,55 <sup>a</sup>
Alcohols (mg L <sup>-1</sup> )	562,84 <sup>a</sup>	562,57 <sup>a</sup>
Aldehyde (mg L <sup>-1</sup> )	324,19 <sup>b</sup>	222,79 <sup>a</sup>
ketones (mg L <sup>-1</sup> )	10,76 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>
Acids (g L <sup>-1</sup> )	15,03 <sup>a</sup>	17,79 <sup>a</sup>
Sugars (g L <sup>-1</sup> )	2,79 <sup>b</sup>	1,36 <sup>a</sup>
Glycerol (g L <sup>-1</sup> )	2,10 <sup>a</sup>	1,65 <sup>a</sup>
Ethanol (g L <sup>-1</sup> )	38,71 <sup>a</sup>	38,72 <sup>a</sup>
pH	3,73 <sup>a</sup>	3,77 <sup>a</sup>

Values identified by the same letters are not significantly different at the 0.1 level (Tukey test).

However, when the components isolated (via HPLC and GC) from the final beverage and during the fermentation process are considered, there were differences between the beverages depending on the method used to conduct the fermentation: the use of selected yeast or spontaneous process (Table 6).

**Table 6** Averages of chemical compounds present in gabirola wine

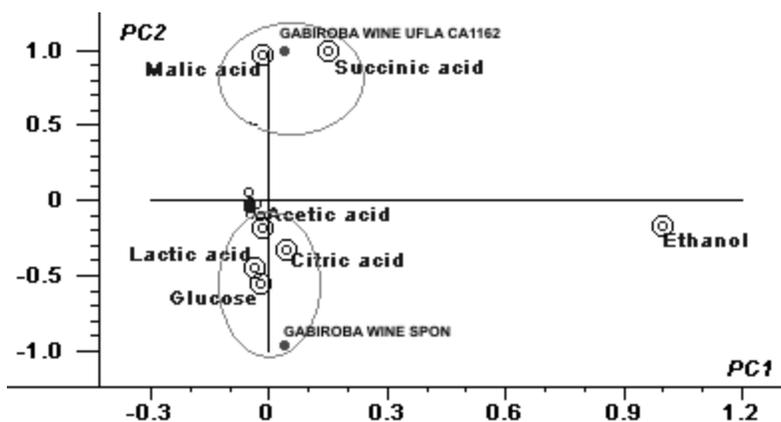
Compound	SPON	UFLA CA 1162
Acetaldehyde (mg L <sup>-1</sup> )	33,74 <sup>a</sup>	71,31 <sup>b</sup>
2-furaldehyde (mg L <sup>-1</sup> )	290,46 <sup>b</sup>	151,48 <sup>a</sup>
Ethyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	141,77 <sup>a</sup>	115,65 <sup>a</sup>
Phenyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	8,67 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>
2,3-butanediol (mg L <sup>-1</sup> )	341,67 <sup>b</sup>	308,42 <sup>a</sup>
1,2-propanediol (mg L <sup>-1</sup> )	20,66 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>
2-phenylethanol (mg L <sup>-1</sup> )	63,79 <sup>b</sup>	39,87 <sup>a</sup>
Isoamyl alcohol (mg L <sup>-1</sup> )	136,74 <sup>a</sup>	214,28 <sup>b</sup>
Propionic acid (mg L <sup>-1</sup> )	74,61 <sup>a</sup>	74,51 <sup>a</sup>
Acetic acid (g L <sup>-1</sup> )	1,64 <sup>a</sup>	1,22 <sup>a</sup>
Lactic acid (g L <sup>-1</sup> )	1,14 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>
Citric acid (g L <sup>-1</sup> )	4,05 <sup>b</sup>	3,13 <sup>a</sup>
Malic acid (g L <sup>-1</sup> )	0,00 <sup>a</sup>	2,70 <sup>b</sup>
Tartaric acid (g L <sup>-1</sup> )	1,26 <sup>a</sup>	1,02 <sup>a</sup>
Succinic acid (g L <sup>-1</sup> )	6,21 <sup>a</sup>	8,73 <sup>b</sup>
Oxalic acid (g L <sup>-1</sup> )	0,00 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>
Glucose (g L <sup>-1</sup> )	1,94 <sup>b</sup>	0,49 <sup>a</sup>
Fructose (g L <sup>-1</sup> )	0,85 <sup>a</sup>	0,85 <sup>a</sup>
Acetoin (mg L <sup>-1</sup> )	10,76 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>
Glycerol (g L <sup>-1</sup> )	2,05 <sup>a</sup>	1,65 <sup>a</sup>
Ethanol (g L <sup>-1</sup> )	38,71 <sup>a</sup>	38,72 <sup>a</sup>

Values identified by the same letters are not significantly different at the 0.1 level (Tukey test).

This difference in the composition of the beverage depending on the type of inoculum was also reported by Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta (2006), which evaluated the contribution of wild and selected yeasts to the formation of volatile compounds in the fermentation of grapes. These authors found that the use of a selected strain led to the production of different concentrations of total acids and esters than the ones found in spontaneous fermentation. Vilanova & Sieiro (2006), assessing the fermentation of grape must cv. Albariño, concluded that the wine produced by spontaneous fermentation showed higher alcohols and

acetates when compared to the wine produced by inoculation of the must with a selected strain of *S. cerevisiae*.

Principal component analysis (PCA) was carried out with organic compounds produced during spontaneous and inoculated fermentations. Figure 6 shows the similarities between the two fermentations processes according to the variables analyzed. The formation of two groups could be observed in relation to the type of yeast inoculum. The beverage produced by spontaneous fermentation was characterized mainly by the presence of lactic, citric, and acetic acid as well as glucose, while the fruit wine produced using *S. cerevisiae* UFLA CA 1162 was characterized by concentrations of malic and succinic acids.



**Figure 6** Principal components analysis (PCA) of organics chemical compounds in gabirola wine

The presence of acetoin was detected in the gabirola wine produced by spontaneous fermentation. This compound is formed during fermentation by microbial activity, such as lactic acid bacteria and yeast, and this compound is

important for formation of the wine flavor. Acetoin is also related to the biosynthesis of 2, 3-butanediol and diacetyl (Romano & Suzzi, 1996). *Saccharomyces* strains generally do not produce significant amounts of acetoin, which is a characteristic of *Kloeckera* and *Hanseniaspora* yeasts (Romano & Suzzi, 1996; Ciani et al., 2006). Similar results to these were published by Valles et al. (2005), who found higher concentrations of acetoin in cider that was fermented spontaneously.

In the beverage produced with UFLA CA 1162, there was a decrease in the acetaldehyde concentration. The oxidation reactions that occur during aging can contribute to conversion of acetaldehyde into 5-hydroxy-2-methyl-1, 3-dioxane. During the aging of wine, the concentration of cis and trans isomers of 5-hydroxy-2-methyl-1, 3-dioxane increased, unlike the acetaldehyde concentration. Around 30-40% of acetaldehyde is converted into cis and trans isomers 5-hydroxy-2-methyl-1, 3-dioxane by acetylation in a proportion of 75 and 25%, respectively (Ferreira et al., 2002).

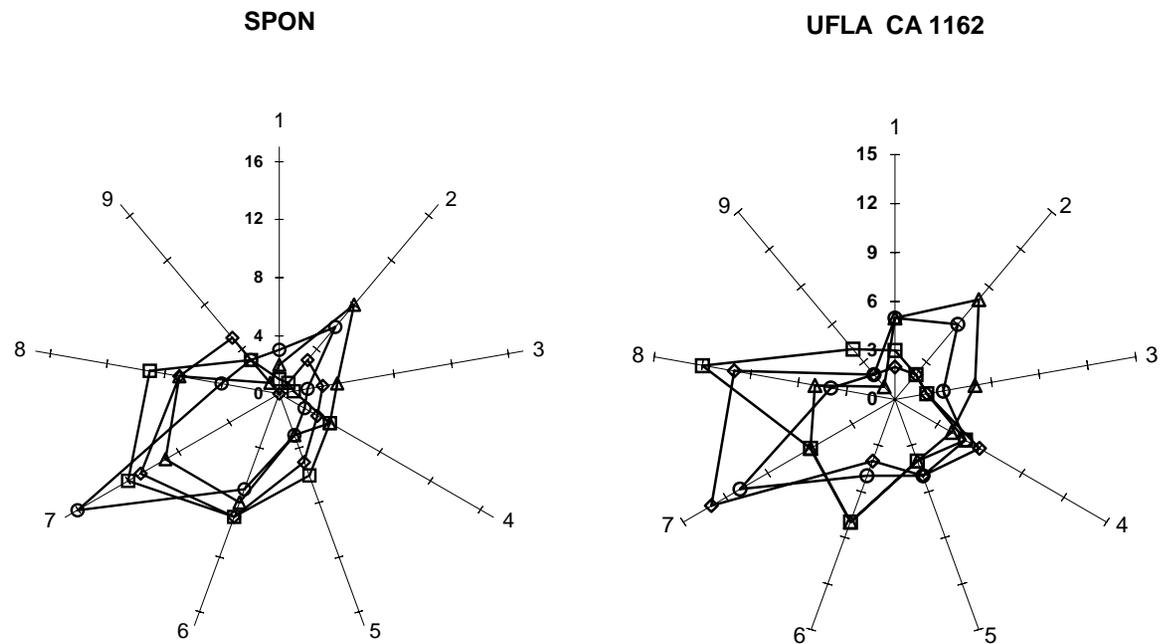
### **3.4 Sensory analysis of the beverage**

After the chemical analyses, the beverage was subjected to sensory analysis to assess its acceptance among the consumers. Table 7 presents percentage of acceptance attributed to the beverage by 50 un-trained tasters, designated based upon the 9-point hedonic scale. For all attributes assessed, the beverage produced by spontaneous fermentation showed greater acceptance when compared with the beverage produced with a selected strain of *S. cerevisiae* UFLA CA 1162.

**Table 7** Percentage of acceptance of the gabioba wine produced by spontaneous and inoculated fermentation

<b>Attribute</b>	<b>SPON</b>	<b>UFLA CA 1162</b>
Appearance	69,57	63,04
Aroma	71,74	65,22
Taste	54,35	43,48
Overall	65,22	47,83

The distribution of individual notes for each point on the hedonic scale for different attributes that were evaluated is illustrated in Figure 7. It was possible to observe that a greater average number of panelists chose values above five in the hedonic scale for the beverage fermented spontaneously.



**Figure 7** Distribution of number of panellists in sensory analysis. Numbers 1 to 9 range from the disliked extremely (1) to liked extremely (9). (—◇—) Appearance; (—□—) Aroma; (—△—) Taste; (—○—) Overall.

According to Nurgel et al. (2002), specific compounds present in wine are responsible for the typical characteristics of smell and taste. The main source of these compounds is the metabolism of yeast during fermentation; however, some compounds in wine are from the grapes. In general, the gabirola wine produced by spontaneous fermentation showed higher concentrations of certain compounds, when compared to that produced by inoculation of yeast UFLA CA 1162 (Table 3). The differences in sensory analysis found for these two beverages analyzed here may be the result of the different compositions of these final products. According to Soufleros et al. (2001), 2-phenylethanol is related to the pleasant aroma of rose and glycerol that gives the softness to the wine. Swiegers et al. (2005) reported that the aroma of wine is due to the presence of chemical compounds with low boiling points, which are volatile and detectable by humans. Variations in small quantities of these compounds may lead to differences in the quality of fermented beverage. The beverages produced in this study had high concentrations of 2,3-butanediol and, according to Romano et al. (1998), this high concentration can influence the bouquet of wine, because of its slightly bitter taste and can also change the body of the beverage because of its viscosity.

From the data reported in this experiment, comparing spontaneous and inoculated fermentation, it can be concluded that the processes normally used in fermented beverage manufacturing could be adapted for the elaboration of the fermented gabirola pulp. The dilution of gabirola pulp with sucrose solution, to improve the fluidity of must, diminished the concentration of marker compounds of the beverage's aroma, but did not interfere with the production of ethanol, since the formation of ethanol follows a different pathway. The use of the enzymatic complex and the solution of bentonite during all the fermentative process brought satisfactory results for the clarification of the beverage as well as the SO<sub>2</sub>, which in the applied concentration, inhibited the growth of bacteria

and did not interfere with the quality of the final beverage. The sensory analysis revealed good acceptance, mainly when taking into account the fact that the tasters were not familiar with the gabioba-derived beverage. The methodology described here is simple and can be applied in a relatively small space without high cost. Based on the characteristics of the pulp and acceptance in the sensory analysis, gabioba fruits showed good potential for use in the production of fermented beverage. It was observed that, from the acceptability of the beverage, this technology can be an alternative for the use of the tropical fruit pulp, and may provide a new industrial outlet for this fruit.

### **Acknowledgements**

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support and scholarships.

#### 4 References

- AKUBOR, P. I.; OBIO, S. O.; NWADOMERE, K. A.; OBIOMAH, E. Production and quality evaluation of banana wine. **Plants Foods for Human Nutrition**, Netherlands, v. 58, n. 5, p. 1-6, Sept.2003.
- ALVES, R. E.; FILGUEIRAS, H. C. A.; MOURA, C. F. H. (Ed.). **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal: [s.n] , 2000. v. 9, p. 15-18. (Série Frutas Nativas). .
- ANDRADE, J. S.; PANTOJA, L.; MAEDA, R. N. Melhoria do rendimento e do processo de obtenção da bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 34-38, dez. 2003. Suplemento.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 12. ed. Washington, 1992. 1015 p.
- BERNARDI, T. L.; PEREIRA, G. V. M.; CARDOSO, P. G.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. F. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of cachaca: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Netherlands. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/u3j08220j843p174/fulltext.html>>. Acesso em: 28 mar. 2008.
- BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 34, p. 330-334, 1962.
- BRIONES, A. I.; UBEDA, J.; GRANDO, M. S. Differentiation of *accharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 369–377, Jan. 1996.
- BUESCHER, R. W.; FURMANSKI, R. J. Role of pectinesterase and polygalacturonase in the formation of woolliness in peaches. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 264-266, Jan. 1978.

CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B.  
Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables :  
potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum*  
*capsici*). **Biological Control**, v. 42, n. 3, p. 326-335, Sept. 2007.

CHIARELLI, R. H. C.; NOGUEIRA, A. M. P; VENTURINI FILHO, W. C.  
Fermentados de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg): processos de produção,  
características físico-químicas e rendimento. **Brazilian Journal of Food**  
**Technology**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 277-282, out./dez. 2005.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic  
interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of**  
**Food Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 239-245, Apr. 2006.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTINEZ-  
RODRÍGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ, F. J. L.; RODRÍGUEZ-VICO, F.  
Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated  
during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food**  
**Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 149-155, Apr. 2004.

DIAS, D. R. ; SCHWAN, R. F.; FREIRE, E. S.; SERÔDIO, R. S. Elaboration of  
a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **International Journal of Food**  
**Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 319-329, Mar. 2007.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de  
fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**,  
Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, set./dez. 2003.

DOMIZIO, P.; LENCIONI, L.; CIANI, M.; DI BLASI, S. ; PONTREMOLESI,  
C.; SABATELLI, M. P. Spontaneous and inoculated populations dynamics and  
their effects on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process  
conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 281-  
289, Apr. 2007.

DUNHAM, M. J.; BADRANE, H.; FEREA, T.; ADAMS, J.; BROWN, P. O.;  
ROSENZWEIG, F.; BOTSTEIN, D. Characteristic genome rearrangements in  
experimental evolutions of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the**  
**National Academy of Sciences**, v. 99, n. 25, p.16144–16149, Nov. 2002.

EGLI, C. M.; EDINGER, W. D.; MITRAKUL, C. M.; HENICK-KLING, T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effects on the sensory character of Riesling and Chardonnay wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 5, p. 779-789, Nov. 1998.

FERREIRA, A. C. S.; BARBE, J. C.; BERTRAND, A. Heterocyclic acetals from glycerol and acetaldehyde in port wines: evolution with aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50 n. 9, p. 2560-2564, Apr. 2002.

FISCHER, G.; JAMES, S.A.; ROBERTS, I.N.; OLIVER, S.G.; LOUIS, E. T. Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 451-453, May 2000.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1/2, p. 101-117, Sept. 1999.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n.1/2, p. 11-22, Sept. 2003.

GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research and Technology**, Heidelber, v. 222, n. 1-2, p. 15-25, Jan. 2006.

GERBAUX, V. ; MEURGUES, O. Influence du sulfitage et du débourage des moûs sur l'élaboration et la qualité des vins de chardonnay. **Revue des Enologues**, v. 78, p. 15-18, 1995.

GRASSIN, C.; FAUQUENBERGUE, P. Fruit juices. In: GODFREY, T. ; WEST, S. (Ed.). **Industrial Enzymology**. 2. ed. Hampshire, UK: Macmillan, 1996. p. 225-264.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v. 1, 533 p.

JEMEC, K. P.; CADEZ, N.; ZAGORC. T.; BUBIC, V.; ZUPEC, A.; RASPOR, P. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. **Food Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 247-259, June 2001.

JEYARAM, K.; SINGH, W. M.; CAPECE, A.; ROMANO, P. Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' : a traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 115-125, May 2008.

KUTHAN, M.; DEVAUX, F.; JANDEROVÁ, B.; SLANINOVA, I.; JACQ, C.; PALKOVÁ, Z. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 745-754, Feb. 2003.

LAFFEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 151, p. 1073-1081, 2005.

LANDRUM, L. R. *Campomanesia, pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma* (Myrtaceae). **Flora Neotropica Monograph**, New York, v. 45, p. 1-179, 1986.

MAKIMURA, K.; TAMURA, Y.; MOCHIZUKI, T.; HASEGAWA, A.; TAJIRI, Y.; HANAZAWA, R.; UCHIDA, K.; SAITO, H.; YAMAGUCHI, H. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 920-924, 1999.

MARKOVIC, O.; HEINRICOVÁ, K.; LENKEY, B. Pectolytic enzymes from banana. **Collection Czechoslovak Chemistry Community**, London, v. 40, p. 769-774, 1975.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behaviour of peroxidase isoenzymes in sweet potato root issue injured by cutting black root. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972, Dec. 1972.

MCCREADY, R. M.; MCCOMB, E. A. Extration and determination total pectin material in fruits. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24. n. 12, p. 1586-1588, Dec. 1952.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOLNÁR, O.; WUCZKOWSKI, M.; PRILLINGER, H. Yeast biodiversity in the guts of several pests on maize; comparison on three methods: classical isolation, cloning and DGGE. **Mycological Progress**, Heidelberg, v. 7, n. 2, p. 11-123, May. 2008.

MORAES, M. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 8. ed. Campinas: Unicamp, 1993. 93 p.

NAUMOVA, E. S.; IVANNIKOVA, Y. U. V. NAUMOV, G. I. Genetic differentiation of the sherry yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 578-582, 2004.

NURGEL, C.; ERTEN, H.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T.; SELLI, S. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strain on fermentation and flavor compounds of white wines made cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 28-33, April. 2002.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Production and characterization of wine from mango fruit (*Mangifera indica* L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Netherlands, v. 21, n. 8-9, p. 1345-1350, Dec. 2005.

ROMANO, P.; BRANDOLINI, V.; ANSALONI, C.; MENZIANI, E. The production of 2,3-butanediol as a differentiating character in wine yeasts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Netherlands, v. 14, n. 5, p. 649-653, Oct. 1998.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 309-315, Feb. 1996.

SCHWAN, R. F.; MENDOÇA, A. T.; SILVA, J. J.; SILVA, J. R. da; RODRIGUES, V. WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 79, n. 1, p. 89-96, Jan. 2001.

SANTOS, C. S.; ALMEIDA, S. S.; TOLEDO, A. L.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. de. Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v. 10, n. 181, p. 47-50, 2005.

SCHMID, J.; VOSS, E.; SOLL, D. R. Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1236-1243, 1990.

SOUFLEROS, E. H.; PISSA, P.; PETRIDIS, D.; LYGERAKIS, M.; MERMELAS, K.; BOUKOUVALAS, G.; TSIMITAKES, E. Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine; sensory evaluation and optimisation of its composition. **Food Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 487-500, Dec. 2001.

SWIEGERES, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 139-173, 2005.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS, 2006.  
Disponível em: <[www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco)>. Acesso em: 05 mar. 2008.

TORIJA, M. J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Yeast population in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. **Antonie van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 79, n. 3-4, p. 345-352, Sept. 2001.

VALLES, B. S.; BEDRIÑANA, R. P.; TASCÓN, N. F.; GARCIA, A. G.; MADRERA, R. R. Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juice. **Food Science Technology**, v. 38, n. 5, p. 455-461, Aug. 2005.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A. GARBELOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg' fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 805-810, out./dez. 2006.

VILANOVA, M.; SIEIRO, C. Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 33, n. 11, p. 929-933, Nov. 2006.

VILJOEN, B. C. Yeast ecological interactions yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast-fungi interactions and yeast as biocontrol agents. In: QUEROL, A; FLEET, H. (Ed.) **Yeast in food and beverages**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. cap. 4, 27 p.

WISSEMAN, K. W.; LEE, C. Y. Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 31, n. 3, p. 206-211, 1980.

YEMM, W. E.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.