UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

CAROLINA DOS SANTOS BEZERRA

SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS E MOSTOS COM ATIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA MELHORAMENTO DE VINHOS

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva
Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil
Co-orientador: Profa. Dra. Milla Alves Baffi
Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG, Brasil

São José do Rio Preto – SP
Fevereiro/2012

CAROLINA DOS SANTOS BEZERRA

SELEÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS E MOSTOS COM ATIVIDADES ENZIMÁTICAS PARA MELHORAMENTO DE VINHOS

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, SP, Brasil

Banca Examinadora

_____

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP - São José do Rio Preto
Professor Titular Doutor
Orientador

_____

Profa. Dra. Eleni Gomes
Professor Assistente Doutor
UNESP - São José do Rio Preto

_____

Prof. Dr. André Rodrigues
Professor Assistente Doutor
UNESP – Rio Claro

São José do Rio Preto, 10 de fevereiro de 2012

Bezerra, Carolina S.
Seleção de leveduras isoladas de uvas e mostos com atividade enzimática para melhoramento de vinhos / Carolina S. Bezerra - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012
68 f. : 4 il. ; 30 cm.

Orientador: Roberto da Silva
Co-orientador: Milla Alves Baffi
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Uvas. 2. Leveduras. 3. Identificação Molecular. 4. Enzimas. I. Silva, Roberto da. II. Baffi, Milla Alves. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meu caminho, por estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida

Ao meu amor, amigo, companheiro e marido Mário, pelo apoio, confiança e pelo incentivo de persistir em minha carreira

Aos meus pais, Áurea e Fernando, e minha irmã Laís, pelo carinho, amor e investimento, que me fizeram chegar até aqui. Vocês são pessoas muito especiais na minha vida, amo vocês

À Marina, mais que uma amiga, pessoa iluminada que Deus colocou na minha vida, pela ajuda nos momentos difíceis, pelas risadas, enfim, por estar sempre ao meu lado

Aos meus amigos de faculdade, Lara, Natália, Priscilla, Janayna, João Paulo “Zen”, sem vocês esta jornada seria muito mais difícil

Aos meus queridos amigos de laboratório Ariane, Ana Lúcia, Andréia, Fabiana, Márcia, Bárbaras, Gisele, Tássia, e todos que de alguma forma colaboraram para a elaboração deste trabalho, obrigada pela ajuda nos momentos de dúvida e pelos conselhos nos períodos difíceis

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pela orientação, amizade, confiança e oportunidades.

A Profa. Dra. Milla Alves Baffi, pela orientação, amizade, confiança e oportunidades

A Profa. Dra. Eleni Gomes, pelo apoio e dedicação que tem pelo nosso laboratório

Aos produtores de Jales, Sebastião e Neusa Santin, pela parceria e troca de conhecimentos.

À UNESP, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado

À FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida

MUITO OBRIGADA

RESUMO

A diversidade de espécies de leveduras presentes na filosfera de uvas e mostos em uma área produtora de uvas e vinhos artesanais na região de Jales (SP) foi estudada usando técnicas de cultivo acoplada a ferramentas moleculares com sequenciamento dos isolados. Foram realizadas duas coletas: Maio de 2009 e Agosto de 2009 obtendo um total de 132 linhagens de leveduras isoladas de duas variedades de uvas (Isabel – *Vitis labrusca* e Bordô) em suas diferentes partes (casca, engaço e baga) e também de mostos obtidos de cultivares Isabel, Niágara e Cabernet Sauvignon. A identificação molecular das espécies por Reação em Cadeia da Polimerase seguida da técnica de PCR-RFLP da região ITS incluindo o gene 5,8S e 26S do DNAr e subseqüente sequenciamento gênico foi eficiente para a identificação de 13 espécies: *Candida quercitrusa* (3), *Candida stellata* (3), *Cryptococcus flavescens* (6), *Cryptococcus laurentii* (1), *Hanseniaspora uvarum* (40), *Issatchenkia occidentalis* (2), *Issatchenkia orientalis* (10), *Issatchenkia terricola* (4), *Pichia kluyveri*(5), *Pichia quilliermondii* (7), *Pichia* sp.(4), *Saccharomyces cerevisiae* (44), *Sporidiobolus pararoseus* (2). Estes resultados mostram uma diversidade de espécies nas diferentes fases de fermentação, com uma predominância de leveduras não-*Saccharomyces* nas etapas iniciais, sendo estas substituídas consecutivamente por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* com o progresso da fermentação, semelhante ao que é encontrado na literatura. As leveduras isoladas foram analisadas quanto a produção de enzimas hidrolíticas adequadas ao processamento de vinhos. Dentre as leveduras isoladas e identificadas, apenas a espécie *Cryptococcus laurentii* (linhagem U2) apresentou atividade para β-glicosidase após fermentação submersa, utilizando celobiose a 2% como fonte de carbono. Porém, esta atividade foi baixa (0,2 U/ml após 96h de fermentação). Em coletas anteriores, realizada em 2008, obtivemos uma linhagem isolada de casca de uvas Bordô, identificada como

Aureobasidium pullulans (linhagem 1A) a qual apresentou 1,7 U/ml após 96h de fermentação nas mesmas condições. Para esta linhagem foi realizada a caracterização físico-química do extrato bruto. O pH ótimo foi 5,5 e a temperatura ótima foi 45ºC e 70ºC, indicando a possibilidade da presença de duas isoformas desta enzima. Com relação ao pH de estabilidade, esta β-glicosidase foi estável entre os pH 5,5 e 11,0 e a termoestabilidade ficou entre 30 e 45°C. Testou-se ainda o efeito da glicose e do etanol sobre a atividade β-glicosidásica da linhagem 1A, esta apresentou uma inibição de 88% na concentração de 400mM (7% de glicose) e manteve-se estável com 71% de atividade residual em 20% de etanol. Com relação à produção de xilanase, apenas a espécie *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A) foi produtora, com pico de produção em meio líquido utilizando xilana a 2% como fonte de carbono após 120h de crescimento (atividade enzimática de 51 U/ml). A enzima bruta foi caracterizada físico-quimicamente e apresentou pH ótimo de 3,5 e temperatura ótima de 45°C. Com relação ao pH de estabilidade, a enzima foi estável entre os pHs 3,0 e 8,0 e apresentou termoestabilidade entre 20°C e 50°C. No pH ótimo e temperatura ótima a atividade enzimática se apresentou maior chegando a 106,3 U/ml. A xilanase caracterizada se mostra com uma ampla faixa de atuação e estabilidade podendo ser adequada para processos de vinificação, além de potencial aplicação em processos simultâneos de sacarificação e fermentação, como por exemplo, o etanol de segunda geração. Das linhagens identificadas neste trabalho a *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A) é a que apresenta maior potencial enzimático para aplicação em etapas de processamento de uvas e vinhos.

ABSTRACT

The diversity of yeast species present in the phyllosphere of grapes and musts from Vinhos Santin winery (Jales region, Sao Paulo State, Brazil) was studied using cultivation techniques with molecular tools coupled with sequencing of the isolates. There were two collections: May 2009 and August 2009 gaining a total of 132 yeast strains isolated from two grape varieties (Isabel and Bordeaux – *Vitis labrusca*) in different parts of the grape (bark, stem and berry) and also must obtained from Isabel, Niagara and Cabernet Sauvignon cultivars. The molecular identification of species by PCR-RFLP in the region of the ITS, including 5,8S gene, and 26S rDNA gene and subsequent sequencing was useful for the identification of 13 species: *Candida quercitrusa* (3), *Candida stellata* (3), *Cryptococcus flavescens* (6), *Cryptococcus laurentii* (1), *Hanseniaspora uvarum* (40), *Issatchenkia occidentalis* (2), *Issatchenkia orientalis* (10), *Issatchenkia terricola* (4), *Pichia kluyveri*(5), *Pichia quilliermondii* (7), *Pichia* sp.(4), *Saccharomyces cerevisiae* (44), *Sporidiobolus pararoseus* (2). These results show a diversity of species in different stages of fermentation, with a predominance of non-*Saccharomyces* yeasts in the early stages, and these are replaced consecutively to yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the progress of fermentation, according to what is found in the literature. The yeasts were screened for production of hydrolytic enzymes for the processing of wine. Among the yeasts isolated and identified, only the species *Cryptococcus laurentii* (strain U2) exhibited β-glucosidase activity after submerged fermentation (SmF) using 2% cellobiose as carbon source. However, this activity was too low (0.2 U/ml after 96h of fermentation). In previous collections, held in 2008, we isolated a strain from the bark of Bordeaux grapes, identified as *Aureobasidium pullulans* (strain 1A) which showed 1.7 U/ml after 96h of fermentation

under the same conditions. For this strain was carried out physico-chemical characterization of the crude extract. The optimum pH was 5.5 and optimum temperature was 45°C and 70°C, indicating possible presence of two isoforms of this enzyme. With respect to pH stability, this β-glucosidase was stable between pH 5.5 and 11.0 and thermal stability was between 30 and 45 ° C. We tested the effect of the glucose and ethanol on β-glucosidase activity of strain 1A, it presented a 88% inhibition at a concentration of 400 mm (7% glucose) and remained stable with 71% residual activity 20% ethanol. About the production of xylanase, only the species *Aureobasidium pullulans* (strain 1A) was producer, with peak production on SmF using 2% xylan as a carbon source after 120h of growth (enzyme activity of 51 U/ml). The crude enzyme was characterized physico-chemically and presented optimum pH of 3.5 and optimum temperature of 45°C. With respect to pH stability, the enzyme was stable between pH 3.0 and 8.0 and presented thermostability between 20°C and 50°C. At the optimum pH and temperature optimum enzyme activity appeared greater reaching 106.3 U / ml. The xylanase is characterized show with a wide range of performance and stability may be suitable for wine-making processes, and potential application in cases of simultaneous saccharification and fermentation, for example, the second generation ethanol. Of the strains identified in this work, *Aureobasidium pullulans* (strain 1A) has the greatest potential to enzimatic production for application in processing steps of grapes and wines.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Hidrólise sequencial dos precursores de aroma (ARÉVALLO-VILLENA, *et al.*, 2006; HEMINGWAY, et al., 1999; LEITE et al., 2007).....20

Figura 2. Diferentes camadas encontradas na casca de uvas.....22

Figura 3. Plaqueamento por esgotamento.....25

Tabela 1. Isolados obtidos e suas respectivas origens.....31

Figura 4. Origens das linhagens e respectivas frequências.....35

Figura 5. (A) Produto de PCR da região ITS incluindo o gene 5,8S (B) Fragmentos de restrição produzidos com endonucleases *HaeIII, HinfI e CfoI*.....36

Tabela 2. Tamanho em pares de base dos produtos de PCR-RFLP e respectivas espécies de leveduras.....38

Figura 6. Frequência de espécies na coleta de Maio/2009.....40

Figura 7. Frequência de espécies em amostras de mosto em fermentação na coleta de Agosto/2009.....40

Figura 8. Frequência de espécies nas diferentes fases da fermentação – coleta de Agosto/2009.....41

Figura 9. Frequência de espécies isoladas de uvas cultivar Bordô – coleta de Agosto/2009.....41

Figura 10. Cinética de crescimento e da biossíntese de β-glicosidase por *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....42

Figura 11. pH ótimo para β-glicosidase em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....43

Figura 12. Temperatura ótima para β-glicosidase em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....44

Figura 13. pH de estabilidade para β-glicosidase em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....44

Figura 14. Termoestabilidade para β-glicosidase em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....45

Figura 15. Efeito da concentração de glicose sobre a atividade β-glicosidásica em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....46

Figura 16. Efeito da concentração de etanol sobre a atividade β-glicosidásica em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....46

Figura 17. Biossíntese de xilanase em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....47

Figura 18. pH ótimo para xilanase em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....48

Figura 19. Temperatura ótima para xilanase em *A. pullulans* (linhagem 1A).....48

Figura 20. pH de estabilidade para xilanase em *A. pullulans* (linhagem 1A).....49

Figura 21. Termoestabilidade para xilanase em *A. pullulans* (linhagem 1A).....50

Figura 22. Efeito da concentração de etanol sobre a atividade xilanásica em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).....51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....12

2. OBJETIVOS.....14

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....15

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....21

4.1. Isolamento de Microorganismos.....24

4.2. Identificação Molecular de Leveduras.....25

4.3. Sequenciamento e Processamento das Sequências 26

4.4. Produção de β-glicosidase por Fermentação Submersa.....26

4.5. Produção de Xilanase por Fermentação Submersa.....29

5. RESULTADOS.....31

5.1. Coleta e Isolamento de Leveduras.....31

5.2. Identificação Molecular de Leveduras.....35

5.3. Fermentação Submersa para produção de β-glicosidase.....42

5.3.1. Caracterização da β-glicosidase Bruta de *Aureobasidium pullulans*.....42

5.4. Produção e Caracterização físico-química de extrato bruto de xilanase de *A. pululans*.....47

6. DISCUSSÃO.....52

6.1. Diversidade de espécies.....52

6.2.Produção de enzimas extracelulares.....57

7. CONCLUSÕES.....60

8. REFERÊNCIAS.....61

1. INTRODUÇÃO

A viticultura é uma atividade econômica recente no Brasil. No mercado externo, dentre os principais países produtores destacam-se a Franca, Itália, Espanha, Portugal e Alemanha, responsáveis por mais de 50% das exportações e, recentemente, os países do Novo Mundo como EUA, Chile, Austrália, Nova Zelândia e Argentina. No Brasil, a produção de vinho está localizada, principalmente, na região das Serras Gaúchas, com 95% dos vinhos brasileiros produzidos no Rio Grande do Sul (IBRAVIN, 2007). Os importados ainda representam a maior fatia do mercado nacional, em função da taxa de cambio que favorece as importações e a preferência do consumidor brasileiro pelo produto importado, especialmente chilenos e argentinos cujos preços são competitivos com os vinhos comuns de mesa brasileiros. As exportações brasileiras de vinho ainda são pequenas. No Rio Grande Sul, algumas vinícolas se associaram para promover o vinho brasileiro através da *Wines from Brazil*, investindo na qualidade do produto, com o objetivo de competir com os vinhos importados que chegam ao mercado brasileiro, bem como buscar o mercado externo (http://www.winesfrombrazil.com). Porém, há ainda muito a fazer para se atingir um mercado externo mais amplo, como a união das empresas num projeto comum e o continuo investimento em novas tecnologias.

Em São Paulo, a expressiva produção de uvas destina-se basicamente ao consumo *in natura*. Em 2006, houve aumento expressivo na área plantada com videiras, decorrente de um esforço conjunto de varias instituições que objetivam vitalizar a vinicultura no estado. Embora predomine o cultivo de uvas de mesa, o mercado de uvas para vinhos esta em plena expansão. Atualmente, estão sendo criados projetos para colocar o Estado na liderança do setor, como “Revitalização da Cadeia Vitivinícola Paulista” e o “SP Vinho” (SATO, 2006, UVIBRA, 2007).

Essa iniciativa é muito importante para o crescimento econômico do Estado, uma vez que mais de 50% do consumo de vinho do Brasil está em São Paulo, de modo que seja produzido o suficiente para suprir essa demanda e permitir que o Estado passe a importar menos vinhos de outras regiões. Assim, o desenvolvimento de novas de tecnologias de cultivo de uvas e fabricação de vinho é de fundamental importância para colocar a qualidade dos vinhos paulistas em um patamar internacional (MELLO A, 2007). Dois pólos vitícolas destacam-se no Estado: um na Região Noroeste e outro na Região Leste. Destaca-

se no primeiro grupo, centrado nos municípios de Jundiaí, Vinhedo, Indaiatuba, Valinhos e Campinas, a produção de uva americana para mesa. No município de São Roque, estão as uvas destinadas à elaboração de vinho e no de São Miguel Arcanjo, estão as uvas finas de mesa. Na região do Noroeste Paulista, no município de Jales, a vitivinicultura ainda está em fase de expansão e vem sendo incentivada pela Prefeitura, Sindicato Rural, Cati, Embrapa e outras entidades ligadas à agricultura (MELLO B, 2007). Com base nesses dados, este projeto busca a seleção de linhagens de leveduras nativas da região de Jales (SP) com melhor potencial para vinificação, com o objetivo de melhorar a qualidade do vinho produzido na região de Jales.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a diversidade de leveduras em uvas e em mostos sob fermentação.
- Identificar utilizando técnicas moleculares as linhagens encontradas neste filoplano.
- Avaliar e selecionar linhagens de leveduras com produção de β-glicosidase e xilanase.
- Caracterizar físico-quimicamente os extratos brutos das linhagens selecionadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A Uva

A videira é uma planta pertencente à Família das *Vitaceae*, gênero *Vitis* e subgênero *Euvitis*, que corresponde a maior parte das vinhas cultivadas no mundo. Dentre elas destacam-se o ramo Euro-Asiático que contém a *Vitis vinifera L.*, conhecida como produtora de uvas finas, e ramo Americano que constitui a base para a obtenção de porta-enxertos utilizados na viticultura – *Vitis labrusca* (BOULTON et al., 1995).

Esta cultura corresponde a uma das mais antigas do mundo e foi introduzida no Brasil no século XVI no atual estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul, os primeiros vinhedos de *Vitis vinifera* foram implantados pela missão jesuítica no século XVII e as uvas americanas somente foram introduzidas nas primeiras décadas do século XIX. Neste período, surgiram as doenças fúngicas que dizimaram a viticultura colonial. Apenas cultivares resistentes às doenças, com destaque para a Isabel (*Vitis labrusca*), passaram a ser plantadas nas diversas regiões do país e tornaram-se na base do desenvolvimento da viticultura comercial nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (CATALUÑA, 1998; PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008). Este panorama modificou-se somente a partir do século XX com a reintrodução de variedades viníferas que então se difundiram principalmente na região Sul do país (CATALUÑA, 1998; PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008). Nas outras regiões, principalmente as de clima tropical, a viticultura foi efetivamente desenvolvida a partir da década de 1960 com o plantio de vinhedos comerciais de uva de mesa (CAMARGO, 2003). Estes fatos históricos associados à extensa área de vinhedos no país resultaram em uma viticultura muito diversificada e complexa, no qual se pode encontrar vários centros produtivos de uva, cada um com sua realidade climática, fundiária, tecnológica, humana e mercadológica (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008).

3.2. O Vinho

De acordo com Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL,1999), o vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto de uva sã, fresca e madura. A classificação do vinho pode ser analisada de duas formas: quanto à classe - vinho leve, vinho de mesa, espumante, vinho licoroso e vinho composto - e quanto à cor - vinho tinto, rosado ou rosé e branco. No Brasil, o vinho de mesa e seus derivados

são elaborados com a utilização de uvas americanas e híbridas da espécie *Vitis labrusca* e representam mais de 80% da comercialização total em volume (GUERRA, 2003). O elaborado a partir dessas uvas - de grande produtividade e baixo custo de produção - propicia vinhos de características ímpares de gosto e aroma frutado facilmente identificado pelos consumidores.

O mercado mundial de vinho, segundo a OIV (*Organisation Internationale de La Vigne et du Vin*), está centrado no continente europeu, sendo a França e a Itália os maiores produtores mundiais de vinho. De acordo com a OIV, no ano de 2010, a área de produção vinícola no mundo demonstrou uma queda de 7,8 milhões de hectares (Mha). Por zonas, a União Européia (UE) foi a mais afetada por este fenômeno, já que a redução na sua vinha chega a ser de 1,4%, ou seja, uma redução de 3,570 Mha. No Hemisfério Sul e nos Estados Unidos, a taxa de crescimento diminuiu, em comparação com o que foi observado por volta dos anos 2000. Em termos de produção, em 2011, o número total dos vinhos produzidos ficou entre 264,3 e 275,2 milhões de hectolitros (269,8 Mhl estimativa média). As maiores quedas foram na Grécia, Itália e Portugal, resultando para a UE a quinta menor colheita consecutiva (2007-2011 inclusive) alcançando aproximadamente valores equivalentes aos de 2010. No entanto, este cenário deve ser colocado sob perspectiva, já que nos últimos três anos a área de vinha tem diminuído de 3,792 para 3,626Mha, que é uma queda de aproximadamente 165 Milhões de hectares de vinhas.

Internacionalmente, a produção se mantém estável, mas com tendências contrastantes internamente. Por exemplo, os Estados Unidos viu a sua produção diminuir significativamente por 18,74 Mhl (-10,3% / 2010). O Chile alcançou um nível recorde com 10,6 Mhl (15,5% / 2010) e Nova Zelândia viu um novo recorde de produção com 2,3 Mhl (23,2% / 2010).

No Brasil, assim como nos países europeus, houve uma ligeira queda na produção vinícola, tendo a produção de 2010 de 321,41 milhões de litros, redução de aproximadamente de 6% em relação ao valor estimado para 2009. A explicação dada pelos órgãos controladores, como a OIV, para esta queda na produção mundial vinícola é a crise econômica que assola o mundo e, além disso, no Brasil houve fatores climáticos atuantes nas regiões produtoras que corroboraram para esta redução significativa (IBRAVIN, 2012; MELLO, 2011).

Apesar disso, o mercado brasileiro para o vinho de mesa está em ascensão, pois estes vinhos promovem um paladar suave e adocicado com o aroma muito próximo da uva. O baixo poder aquisitivo da população também influencia diretamente na opção por esse produto, visto que o preço é mais acessível quando comparado aos vinhos especiais e finos (GUERRA, 2003). Segundo Mello (2002), outra característica é o fato desses produtos não possuírem concorrentes internacionais, já que os vinhos importados possuem outras técnicas de produção e utilizam outras variedades de uva para a elaboração do vinho.

Os vinhos de mesa são produzidos nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, destacando-se o estado do Rio Grande do Sul com cerca de 90% da produção. Desse volume total, cerca de 35% é direcionado ao estado de São Paulo (MELLO, 2002).

3.3. Leveduras Envolvidas na Qualidade do Vinho

Para a obtenção de vinhos de qualidade, é necessário escolher uma cepa de levedura adequada, de modo que a qualidade do vinho pode ser considerada como uma consequência direta da evolução da microbiota do mosto durante a fermentação. Diante destas circunstâncias, o estudo dos recursos microbianos presentes nos ecossistemas vinícolas é de indubitável interesse para a aplicação desses microorganismos e de seus metabólicos na indústria. A fermentação depende da ação combinada de várias cepas que se desenvolvem espontaneamente durante o processo, a partir da carga microbiana inicial das próprias uvas (FLEET, 2003).

O estudo da diversidade microbiológica da uva e a caracterização das leveduras que competem e às vezes dirigem as fermentações de mostos inoculados com cultivos iniciadores comerciais faz-se necessário, uma vez que a biota leveduriforme e suas enzimas e metabólitos desempenham um papel relevante nas características do produto final (BARRAJÓN et al., 2009).

A maioria dos estudos se concentra principalmente nas leveduras *Saccharomyces*, que são as empregadas na fermentação alcoólica. Entretanto, durante as primeiras etapas da elaboração do vinho, há um crescimento substancial de espécies de leveduras não-*Saccharomyces* procedentes da própria uva que conferem características especiais (FLEET, 2003; TOFALO et al., 2009). Por esta razão, é interessante investigar toda a microbiota

presente nesses nichos ecológicos com relação às enzimas extracelulares de interesse produzidas por esses microorganismos.

3.4. Métodos de Identificação de Leveduras Vínicas

As leveduras podem ser identificadas por métodos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos clássicos. Entretanto, esses métodos, além de serem laboriosos, os caracteres fenotípicos podem ser influenciados pelas condições de cultivo, conduzindo em algumas ocasiões a classificações incorretas. Atualmente, numerosas técnicas de biologia molecular, mais sensíveis, têm sido aplicadas na classificação de leveduras (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2001; DANIEL; MEYER, 2003; TOFALO et al., 2009).

Métodos baseados na análise do DNA têm sido amplamente utilizados por terem a vantagem de serem independentes da expressão dos genes e das condições de cultivo, evitando ambiguidades taxonômicas (LOPES et al., 2007). A identificação molecular de espécies apresenta ainda a vantagem dos métodos serem rápidos. Dentre estes, a análise de regiões do DNA ribossômico tem sido a abordagem mais utilizada na identificação de leveduras, sendo o PCR-RFLP (*Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição*) da região ITS, associada ao sequenciamento gênico, uma das principais ferramentas usadas atualmente (BAFFI, et al., 2011a; ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999; MARTORELL et al., 2006; JEYARAM et al., 2008). Adicionalmente, a análise das sequências da região D1/D2, localizada no gene 26S, também é efetiva na identificação de leveduras por apresentar baixa variabilidade entre membros da mesma espécie e alta variabilidade entre os indivíduos de espécies diferentes (BALEIRAS COUTO et al., 2005).

3.5. Leveduras e Enzimas Envolvidas no Aroma de Vinhos

Com relação à qualidade do vinho, o aroma representa um dos atributos de maior impacto. No vinho, há interferência de um conjunto de compostos que são capazes de conferir o seu aroma característico e sabor. Estes constituintes são de duas classes, os de natureza volátil, como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos e, os precursores não voláteis, como os glicosídeos, dentre os quais se destacam os terpenos unidos a moléculas de açúcares (PALMERI; SPAGNA, 2007). O glicosídeo é formado pela aglicona (volátil quando livre) e o açúcar. A hidrólise da ligação entre o açúcar e a aglicona requer a atuação de β-glicosidases, liberando a parte aglicona livre que contribui para o aroma do vinho.

Nos últimos anos, tem sido descrita uma grande quantidade de compostos voláteis na forma glicosilada em muitas variedades de uvas, sendo os terpenos os compostos aromáticos mais importantes (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2004). Estes glicosídeos precursores se encontram nas uvas com os açúcares na forma de dissacarídeos ou monossacarídeos (MATEO; JIMÉNEZ, 2000; PALMERI; SPAGNA, 2007).

O enriquecimento do vinho pode ser realizado através da hidrólise dos glicosídeos por enzimas em duas etapas (se o açúcar for um dissacarídeo): uma α-ramnosidase ou uma α-arabinosidase e uma β-apiosidase hidrolisam a unidade de açúcar terminal do glicosídeo, liberando-se um β-D-glicopiranosídeo que atuará como substrato para uma β-glicosidase, que produzirá o terpeno livre (ARÉVALO-VILLENA et al., 2006b; PALMERI; SPAGNA, 2007) (Figura 1). As atividades enzimáticas são procedentes da própria uva e também dos microrganismos presentes no mosto (VAN RENSBURG; PRETORIUS, 2000). A β-glicosidase ideal deve ser estável a baixos valores de pH, a concentrações elevadas de glicose e à presença de etanol (10 -15%).

As β-glicosidases isoladas até o presente são procedentes de plantas, da própria uva e de microrganismos. As duas primeiras são de pouca utilidade visto que são fortemente inibidas pelo baixo pH, pela elevada concentração de açúcar e pelo teor de etanol ao final do processo fermentativo (PALMERI; SPAGNA, 2007), sendo a melhor alternativa a utilização de enzimas microbianas. Alguns fungos filamentosos e leveduras aumentam o aroma dos vinhos com precursores glicosídicos através da síntese de enzimas como a β-D-glicopiranosidase e α-L-arabinofuranosidase, α-L-ramnopiranosidase e *O*-acetilesterase (SPAGNA et al., 2001; BARBAGALLO et al., 2002, MAICAS; MATEO, 2005).

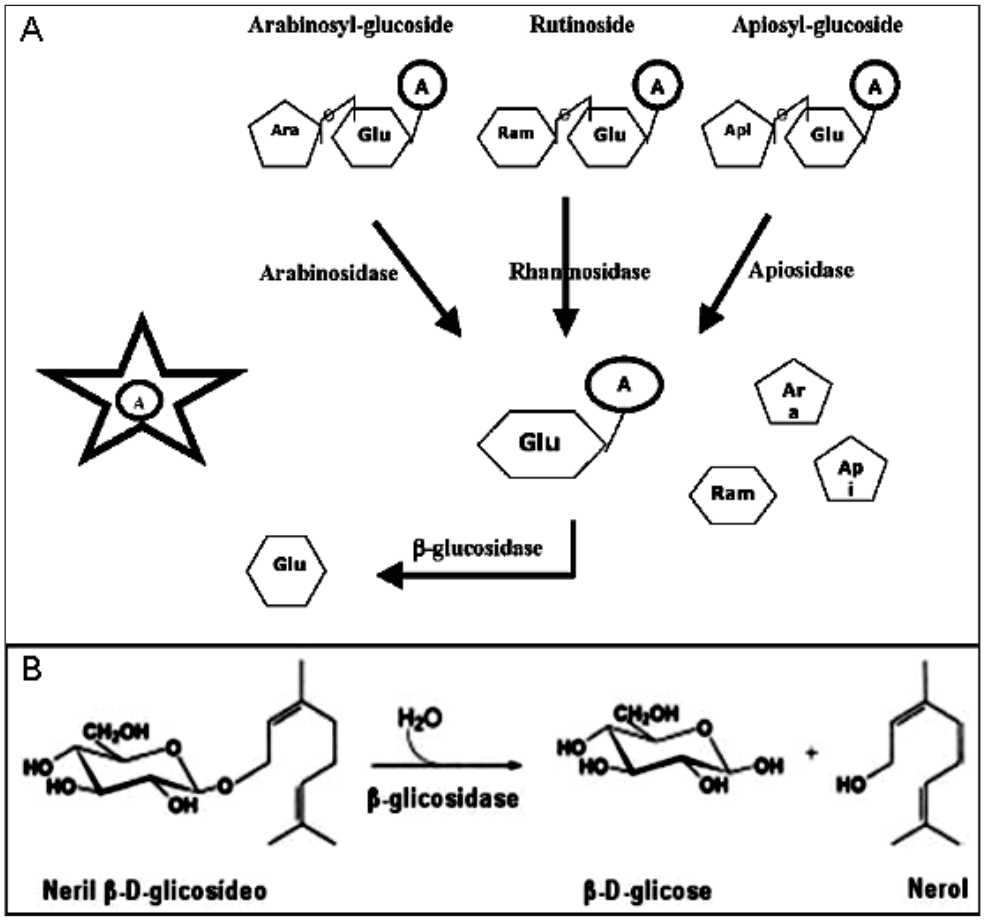

Figura 1: (A) Hidrólise sequencial dos precursores de aroma. "(A)" representa a parte aglicona, Ara - Arabinose, Glu - Glicose, Ram – Ramnose, Api – Apiose (ARÉVALO-VILLENA et al., 2006b). **(B)** Hidrólise de Neril β-D- glicosideo a nerol e β-D-glicose (HEMINGWAY, et al., 1999 citado por LEITE, 2007).

Enzimas exógenas também têm sido adicionadas ao mosto (FLEET, 1993). Devido ao sistema enzimático da uva não ser eficaz, diferentes companhias têm comercializado preparações de misturas de glicosidases inespecíficas obtidas de *Aspergillus* spp. (GUNATA et al., 1990, DUPIN et al., 1992). Entretanto, estes preparados possuem atividades colaterais, como a hidrólise de antocianinas, levando a vinhos de baixa qualidade (PALMERI; SPAGNA, 2007). Por esta razão existe um interesse crescente na busca de outras fontes de enzimas microbianas (CHAROENCHAI et al., 1997). As atividades

enzimáticas de leveduras de ecossistemas vinícolas têm sido estudadas, e algumas delas possuem atividade β-glicosidásica, hidrolisando os precursores conjugados dos mostos (CORDERO OTERO et al., 2003; MANZANARES et al., 2000; MENDES FERREIRA et al., 2001, ROY et al., 2003; STRAUSS et al., 2001).

Apesar da indiscutível importância de leveduras *Saccharomyces* sp. na fermentação do vinho, existem poucos relatos de leveduras deste gênero como produtoras de β-glicosidases. São as leveduras *não-Saccharomyces* presentes nos estágios iniciais do processo fermentativo as responsáveis pelas propriedades organolépticas do vinho. Os principais gêneros envolvidos na ativação do aroma são: *Kloeckera, Cryptococcus, Torulaspora, Hanseniaspora, Candida, Pichia, Hansenula, Zygosaccharomyces, Metschinikowia, Debaromyces, Issatchenkia* e *Rhodotorula*. Alguns trabalhos descrevem leveduras *não-Saccharomyces* como boas produtoras de β-glicosidase, tais como *Debaryomyces hansenii* (YANAI; SATO, 1999), *Candida molischiana* (GUEGUEN et al., 1996) e *Hanseriaspora uvarum* (UBEDA; BRIONES, 2000).

Além das β-glicosidase, outras enzimas podem estar envolvidas no processo de vinificação a fim de melhorar a qualidade final do produto. A presença de compostos fenólicos associados a outros compostos encontrados na uva determina qualidades no vinho como cor, paladar e potencial para promover propriedades benéficas à saúde humana. A extração de fenóis da uva para o mosto e em seguida para o vinho é, em grande parte regida pela forma como os fenóis estão vinculados e presos na casca da uva. Na casca de uvas, os fenóis podem ser encontrados (1) ligados à parede celular, ligados a polissacarídeos por interações e pontes de hidrogênio, e (2) não ligados à parede celular, sendo confinados em vacúolos de plantas e fenóis associados com o núcleo da célula (PINELO, 2006). Fenóis contidos em uvas e vinhos podem, em geral, ser classificados em dois grupos: (1) flavonóides (antocianinas, flavonóis, flavan-3-óis ou catequinas), (2) não - flavonóides (ácidos fenólicos e estilbenos) (SALAS et al., 2003).

Estudos recentes a respeito de fenóis em dicotiledônias como, por exemplo, em paredes celulares de maçãs, pétalas de flores reportaram que fenóis estariam ligados ou emaranhados nos polissacarídeos de paredes celulares, confinados em vacúolos celulares, ou estariam associados com núcleo através de diferentes ligações químicas ou uniões de natureza física dependendo da composição e disposição tanto dos fenóis quanto dos

polissacarídeos (HUTZLER et al., 1998; LE BOURVELLEC, BOUCHET; RENARD, 2005; MARKHAM, GOULD; RYAN, 2001).

A composição polissacarídica da parede celular de cascas de uvas representa de 5 a 10% do peso seco da baga de uvas e atua como uma barreira hidrofóbica para proteger as uvas de injúrias climáticas e físicas, desidratação, infecção por fungos e luz UV. As cascas de uva podem ser divididas em três camadas sobrepostas. A camada mais externa, a cutícula, é composta de ácidos graxos hidroxilados chamada cutina, coberto com ceras hidrofóbicas. A camada intermediária, epiderme, consiste de uma ou duas camadas as quais se encontram como uma fileira regular de células. A camada mais interna, hipoderme, é a mais próxima da polpa e é composta por muitas camadas de células. Nesta região encontramos a maior quantidade de fenólicos presentes em toda a casca de uva (LECAS; BRILLOUET, 1994) (Figura 2).

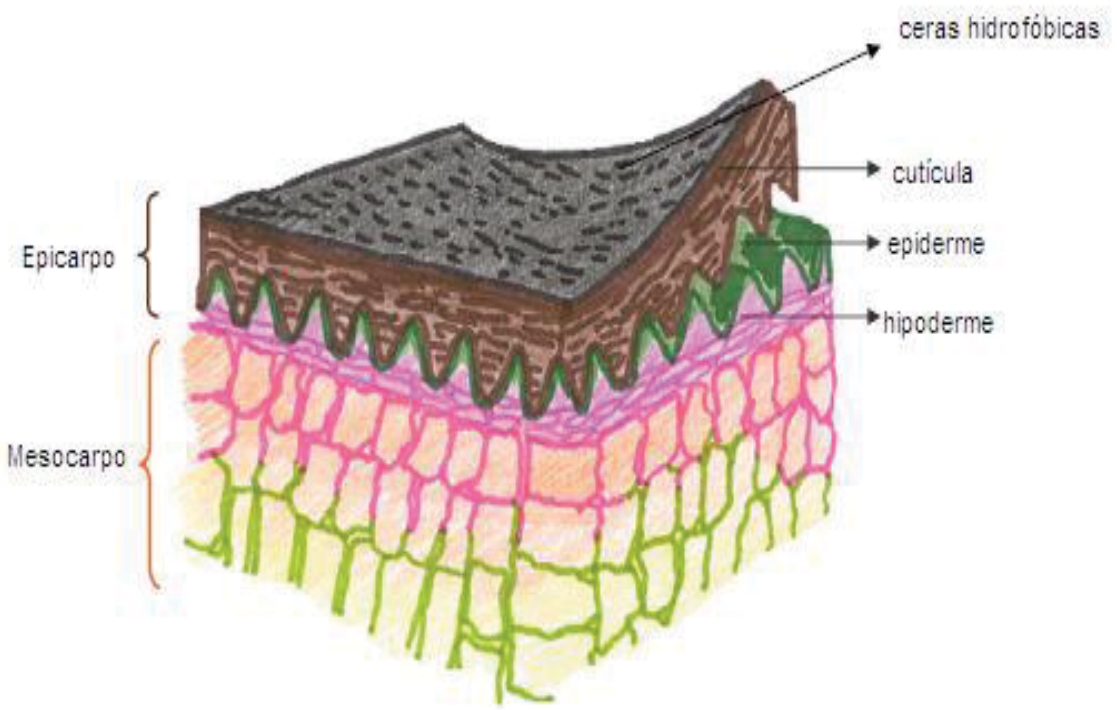

Figura 2: Diferentes camadas encontradas na casca de uvas. Figura Adaptada de Pinelo et al., 2006.

A parede celular de bagas de uvas forma uma barreira para a difusão de componentes incluindo aromas e fenóis e atuam como uma proteção contra fatores externos (DOCO *et al*., 2003).

A constituição da parede celular nas uvas é de 30% de polissacarídeos neutros como celulose, xiloglicanos, arabinanos, galactanos, xilana, e manana, 20% de substâncias pécticas (das quais 62% estão metiladas), aproximadamente 15% de proantocianidinas, e menos de 5% de proteínas estruturais (LECAS; BRILLOUET, 1994).

Assim, algumas preparações enzimáticas comerciais usadas durante a etapa de maceração são tipicamente misturas de pectinases, celulases, hemicelulases (xilanases) e outras enzimas com atividade de carboidrolases, que atuam na parede celular das uvas, composta por polissacarídeos, tais como pectina, celulose e hemicelulose. A degradação de polissacarídeos estruturais por carboidrolases pode resultar em melhora no rendimento de extração de suco, clarificação e filtrabilidade durante a produção de vinhos (LOUW et al., 2006).

A ação destas enzimas, atuantes no complexo celulósico, facilitam a liberação e solubilização de compostos fenólicos e precursores glicosilados de células da casca, sementes e da baga fresca. A extração aumentada de compostos fenólicos, como taninos, leva a mais pigmentos poliméricos formados em vinhos tintos envelhecidos, resultando em aumento da intensidade da cor, da estabilidade e do aroma. Dentre estas enzimas, destacam-se as xilanases, que atuam na hemicelulose da parede celular de uvas, liberando precursores de aroma presentes e aumentando o aroma frutado no produto final (LOUW et al., 2006).

Com base nesses dados, este trabalho teve por objetivo o isolamento, a identificação molecular de espécies de leveduras isoladas da filosfera de uvas e de mostos da região de Jales (SP) e a seleção de leveduras com atividades enzimáticas adequadas ao processamento de vinhos. O conhecimento adquirido poderá ser aplicado no desenvolvimento de projetos de integração com empresas produtoras de vinhos da região de Jales, com o intuito de contribuir para melhorar a qualidade do vinho produzido nesta região ou ainda a possível aplicação dos preparados enzimáticos em outros processos biotecnológicos, como por exemplo, processos contínuos de fermentação e sacarificação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Isolamento de Microrganismos

4.1.1. Coleta de amostras

Diferentes espécies de leveduras foram isoladas de uvas e mostos de uvas procedentes do sítio Santo Antônio, em Jales, SP, 20° 16′ 07″ S e 50° 32′ 58″ O, 500 m acima do nível do mar (de acordo com WGS84, "*World Geodetic System*" 1984), de propriedade do Sr. Sebastião Santin, produtor de uvas de mesa e que, recentemente, começou também a processar vinho. Durante o desenvolvimento desta linha de pesquisa, foram realizadas quatro coletas: Abril/2008, Setembro/2008, Maio/2009 e Agosto/2009. Foram isoladas leveduras de três variedades de uvas (Isabel, Bordô e Niágara) e em diferentes partes (casca, engaço e baga). Três lotes de cachos de uva (5 kg cada) foram amostrados seguindo um caminho em "zigue-zague" entre duas fileiras de videiras marcados em três diferentes zonas da vinha.

Além disso, foram coletadas leveduras de mostos em fermentação. Estas amostras eram de uvas Isabel e Bordô misturadas e também de uvas Isabel, Niágara ou Cabernet Sauvignon.

Uma vez no laboratório as amostras foram semeadas em meio YEPD (Extrato de Levedura 1%, Peptona 2% e Glicose 2%) estéril. As amostras foram mantidas neste meio por 24h sem aeração.

4.1.2. Isolamento de microrganismos

Após a incubação de 24h, as amostras que apresentavam meio com turvação, indicando o crescimento microbiano, foram transferidas para placas contendo meio YEPD sólido, ampicilina (25 µl/ml) e cloranfenicol (100 mg/l) como antibióticos e propionato de cálcio (0,25g/l) para inibir o crescimento de fungos filamentosos (LOPES et al., 2002). As amostras foram plaqueadas por esgotamento e mantidas em estufa a 30°C por 48h. Sucessivos subcultivos foram realizados até o isolamento completo (Figura 3). Uma colônia isolada e pura de cada placa foi transferida para tubos de ensaio contendo meio YEPD sólido inclinado e mantidas em câmara fria com repique a cada dois meses. Cada isolado foi também mantida no freezer a -80°C, em meio YEPD liquído, contendo glicerol 20%.

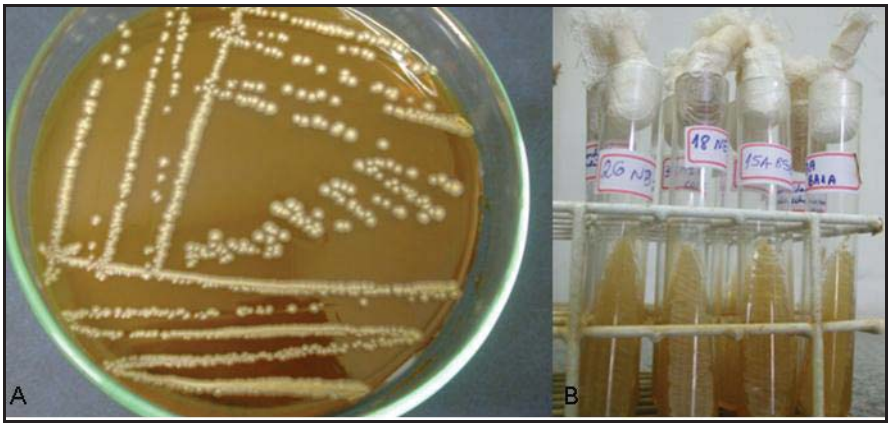

Figura 3: Exemplo de plaqueamento de uma levedura vínica por esgotamento (A); Exemplo de leveduras isoladas de vinhos mantidas em YEPD sólido (B).

4.2. Identificação Molecular de Leveduras

As linhagens de leveduras isoladas foram previamente analisadas por PCR-RFLP (*Reação em Cadeia da Polimerase* seguida de tratamento com endonucleases para obtenção de *Polimorfismos de Comprimento em Fragmentos de Restrição*), empregando-se os *primers* ITS1 (5´ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3´) e ITS4 (5´ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) que amplificam zonas variáveis e intergênicas (ITS1 e ITS2) do gene 5.8S do DNAr (DNA ribossômico) (WHITE et al., 1990). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com volume final de 50 µL contendo 1U de *DNA Taq polimerase* (Fermentas), 0,1 µM de cada *primer*, 0,1mM de cada DNTP, 1x tampão de reação, 2mM $MgCl_2$ e 10-50ng de DNA genômico como "*template*". As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador *GeneAmp 2400 PCR System*, de acordo com Fernandez *et al*., (2003). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo. Alíquotas dos produtos de PCR foram tratadas com enzimas de restrição (*HinfI, CfoI (Hha I), HaeIII*, e *HpaII*), de acordo com as instruções do fabricante (Sinapse). Os fragmentos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3% contendo brometo de etídeo. O tamanho do fragmento amplificado e o número e os tamanhos dos fragmentos de restrição permitiram uma eficiente identificação das leveduras. Utilizou-se o programa Quidy'04 Versión 1.0 (Eduardo Hernández Álvarez), desenvolvido pelo Laboratório de Biotecnologia

de Leveduras Vínicas da Universidade Castilla la Mancha – UCLM - Espanha, como banco de dados para análise dos fragmentos e conseqüente identificação dos microrganismos.

4.3. Sequenciamento e Processamento das sequências

Uma linhagem de cada perfil distinto de PCR-RFLP foi seqüenciada para a região ITS. Purificou-se os amplificados usando kit *GenElute PCR* (Invitrogen). Após purificação, os produtos de PCR passaram por sequenciamento com *primer "forward"* ITS1 e/ou o *primer* reverso ITS4 usando kit *ABI BigDye terminator cycle sequencing* em um sequenciador ABI PRISM 377. As sequências ITS obtidas foram alinhadas com programa *Biedit (Biological Sequence Alignment Editor)* (HALL et al., 1999) e comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados *GenBank* no *National Center for Biotecnology Information* (NCBI) utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e também com CBS *Yeast Database* (http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICSSequences.aspx).

Sequências com 98% de similaridade nucleotídica ou superior com a região ITS-5,8S DNAr foram consideradas a mesma espécie. Amostras cujas sequências apresentaram similaridade inferior à 98% com sequências ITS-5.8S disponíveis no banco de dados *GenBank* foram também seqüenciadas para domínios D1/D2 no gene 26S localizado no DNAr. Amplificação e seqüenciamento da região D1/D2 seguiu o protocolo de Baleiras Couto et al. (2005), utilizando o *primer "forward"* NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e o *primer* reverso NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'). As sequências obtidas foram depositadas no GenBank (os números de acessos se encontram na tabela 2).

4.4. Produção de β-glucosidase por Fermentação Submersa

Foi rastreada a atividade da enzima β-glucosidase produzida por leveduras isoladas dos ecossistemas da uva e mostos.

Cada isolado foi cultivado em meio liquido sob agitação, e a quantidade de enzima produzida extracelularmente quantitativamente avaliada (Unidades de atividade enzimática/mL de fluido extracelular). Cada linhagem foi cultivada em meio YPD por 24 horas, a 30ºC sob agitação. Após 24 horas, fez-se a contagem de células em câmara de

Neubauer em microscópio ótico com lente objetiva de 40x e inoculou-se um volume de pré-inóculo equivalente a 10^7 células/mL no meio de cultivo para fermentação submersa. Todas as linhagens cresceram sob condições similares (mesmo pH, tempo, temperatura, e meio definido), de acordo com Fernández-González et al. (2004) e Arévalo Villena et al. (2005).

Todas as linhagens isoladas foram submetidas à fermentação submersa em meio liquido YPC (com celobiose a 2% como substrato e sob aeração). As culturas foram incubadas por 120 horas a 30ºC sob agitação a 200 rpm. O tempo de crescimento no qual a síntese enzimática foi máxima foi determinado. Para tanto, o crescimento e a viabilidade celular x atividade de β-glicosidase foram avaliados em intervalos de 24h. Após o crescimento apropriado (até 120h), as culturas foram coletadas e o fluido extracelular recuperado por centrifugação, e estocado até o ensaio enzimático.

A viabilidade celular, o brotamento e a população de células foram determinados pela coloração diferencial das células com eritrosina B de acordo com a metodologia descrita por Nobre et al. (2007). Para a avaliação da viabilidade celular, uma alíquota da fermentação era retirada a cada 24 horas, diluída 20 vezes em solução salina e eritrosina B. Para cada amostra, fez-se a contagem do número de células totais, número de células em brotamento e número de células mortas ou inviáveis (coradas de vermelho).

A atividade enzimática foi determinada com 50 μL do extrato enzimático bruto, 250 μL de tampão acetato 0,1M, pH 5,0 e 250 μL de 4-nitrofenol β-D-glicopiranosideo 4mM (PNPG, Sigma), reagindo por 10 minutos a uma temperatura de 40°C, a reação enzimática foi paralisada com 2 ml de carbonato de sódio 2M e o nitrofenol liberado, quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de nitrofenol por minuto de reação (LEITE *et al*, 2008).

4.4.1. Caracterização Físico-Química da β-glicosidase

Cada preparação de fluído extracelular (extrato bruto) foi caracterizada para determinar as condições ótimas para atividade enzimática máxima, e para manter a estabilidade sob as condições experimentais. Assim, pH ótimo, temperatura ótima, pH de estabilidade e termoestabilidade foram estudados examinando uma faixa de diferentes pH e temperaturas. Os efeitos da concentração de glicose e etanol também foram examinados.

A determinação do pH ótimo sobre a atividade enzimática de β-glicosidase foi realizada incubando-se 50 μL da enzima bruta em 250 μL do substrato p-nitrofenol β-D-glicopiranosídeo-4mM (PNPG, Sigma), em diferentes valores de pH (entre 3,0 e 8,0), tampão Acetato de Sódio 0,2 M e Tris-Aminometano 0,2 M. A atividade enzimática foi quantificada a 40ºC e paralisada com carbonato de sódio 2M após 10 minutos.

O efeito da temperatura ótima sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se 50 μL da β-glicosidase nas mesmas condições descritas para a determinação da atividade, em diferentes temperaturas, variando entre 10 e 80°C. Os ensaios de atividade foram realizados em tampão acetato de sódio 0,1M no pH ótimo (ARÉVALO *et al*, 2006a).

A estabilidade referente à variação da escala de pH, foi analisada através da incubação da enzima durante 24 horas a uma temperatura de 25ºC em tampão, variando a escala de 3,0 a 11,0. Os tampões utilizados foram o tampão Acetato de Sódio 0,2 M (3,5 – 5,5) e Tris-Aminometano 0,2 M (5,5 – 8,5) e o Glicina – Hidróxido de Sódio 0,2 M (8,5 – 11,0). A atividade remanescente das enzimas foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

A termoestabilidade da enzima foi estudada incubando-a diluída em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, durante 1 hora em diferentes temperaturas, de 30 a 80ºC. Posteriormente, a atividade enzimática remanescente foi quantificada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

O efeito da glicose sobre a atividade enzimática foi determinado incubando o extrato bruto sob condições ótimas de pH e temperatura, ao meio de reação contendo várias concentrações de glicose (5– 400mM) e a atividade enzimática remanescente foi quantificada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura. A atividade máxima (100%) foi considerada no ensaio sem tratamento (0% de glicose).

O efeito do etanol sobre a atividade enzimática foi determinado da mesma maneira, adicionando-se no meio de reação várias concentrações de etanol (0 – 40%), e medindo-se a atividade enzimática remanescente nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura para determinar se ocorreu inibição. A atividade máxima (100%) foi considerada no ensaio sem tratamento (0% de etanol).

Todos os ensaios durante a caracterização físico-química foram realizados em triplicata e adotados os valores com desvio padrão $\leq 0,05$.

4.5. Produção de Xilanase por Fermentação Submersa

Realizou-se o *screening* para produção de xilanase entre as linhagens de leveduras previamente identificadas. Cada linhagem foi cultivada em meio YPD por 24 horas, a 30ºC sob agitação. Após 24h, fez-se a contagem de células em câmara de *Neubauer* em microscópio ótico com lentes objetivas de 40x e inoculou-se um volume de pré-inóculo equivalente a 10^7 células/mL no meio de cultivo para fermentação submersa. O isolado foi submetido à fermentação submersa em meio liquido YPX (com xilana – Birchwood/Sigma - 2% como substrato, sob aeração) para produção de xilanase. A cultura foi incubada por 120h a 30ºC sob agitação a 200rpm. O tempo de crescimento no qual a síntese enzimática foi máxima foi determinado. Para tanto, o crescimento e a viabilidade celular x atividade de xilanase foram avaliados em intervalos de 24h, como descrito anteriormente para β-glicosidase.

A atividade de xilanase foi medida utilizando-se 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 mL de uma solução 1% de xilana em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 (DA SILVA et al., 2005). A solução do substrato e a solução enzimática adicionada no momento exato que se inicia a contagem do tempo foram incubadas a 45ºC por 10 minutos. Ao final de 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução de DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico). A mistura foi deixada em ebulição por 10 min e depois resfriada em banho de gelo. Acrescentou-se 8 mL de água destilada e realizou-se a leitura a 540 nm. A quantificação do açúcar redutor liberado foi realizada a partir de curva padrão de xilose, usando método DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima para liberar 1 μmol de xilose por min.

4.5.1. Caracterização Físico-Química da Xilanase

Dentre as linhagens isoladas, selecionamos um isolado da espécie *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A) que apresentou produção de xilanase e realizamos a caracterização físico-química deste extrato enzimático bruto.

O fluído extracelular (extrato bruto) foi caracterizado para determinar as condições ótimas da atividade enzimática máxima e, para manter a estabilidade sob as condições experimentais. Assim, pH ótimo, temperatura ótima, pH de estabilidade e termoestabilidade foram estudados examinando uma faixa de diferentes pH e temperaturas.

A determinação do pH ótimo sobre a atividade enzimática de xilanase foi realizada incubando-se 100 μL da enzima bruta em 900 μL do substrato xilana 1% em tampão citrato-fosfato 0,1M e Tris-HCl 0,1M, em diferentes valores de pH, variando entre 3,0 e 8,0. A atividade enzimática foi quantificada a 45ºC e interrompida com 1 mL de solução de DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico). A mistura foi deixada em ebulição por 10 min e depois resfriada em banho de gelo. Acrescentou-se 8 mL de água destilada e realizou-se a leitura a 540 nm.

O efeito da temperatura ótima sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se 100 μL nas mesmas condições descritas acima, em diferentes temperaturas, variando entre 20 e 75°C. Os ensaios de atividade foram realizados em tampão citrato-fosfato 0,1M no pH ótimo.

A estabilidade referente à variação da escala de pH foi analisada através da incubação da enzima durante 24 horas a uma temperatura de 25ºC em tampão, variando a escala de 3,0 a 8,0. Os tampões utilizados foram o tampão Citrato-Fosfato 0,1M (3,0 – 7,0) e Tris-HCl 0,1 M (7,5 – 8,0). A atividade remanescente das enzimas foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

A termoestabilidade da enzima foi estudada incubando-a diluída em tampão citrato-fosfato, pH 3,5, durante 1 hora em diferentes temperaturas, de 20 a 75ºC. Posteriormente, a atividade enzimática remanescente foi quantificada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura.

O efeito do etanol sobre a atividade enzimática foi determinado da mesma maneira, adicionando-se no meio de reação várias concentrações de etanol (0 – 20%), e medindo-se a atividade enzimática remanescente nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura para determinar se ocorreu inibição. A atividade máxima (100%) foi considerada no ensaio sem tratamento (0% de etanol).

5. RESULTADOS

5.1. Coleta e isolamento de microrganismos

Diferentes espécies de leveduras (*Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*) foram isoladas de uvas e mostos de uvas procedentes do sítio Santo Antônio, em Jales, SP. Foram coletadas leveduras de duas variedades de uvas (Isabel e Bordô) e em diferentes partes da uva (casca, engaço e baga). Além disso, foram coletadas leveduras de mostos em fermentação. Estas amostras de mostos eram de uvas Isabel e Bordô misturadas e também de uvas Isabel, Niágara ou Cabernet Sauvignon. Após sucessivos subcultivos, foram isoladas 212 linhagens de leveduras, sendo que: 25 linhagens em Abril/2008, 55 linhagens em Setembro/2008, 40 linhagens em Maio/2009 e 92 linhagens em Agosto/2009. Os isolados obtidos (linhagens) e sua distribuição estão listados na tabela 1 e na figura 4.

Tabela 1: Linhagens de leveduras obtidas de uvas e mostos em fermentação.

Coleta de Abril de 2008		
Isolado	**Origem**	**Número de isolados**
1A, 2A, 3A, 4A, 5A	Casca de uvas Bordô com sinais de agrotóxico	5
6A, 7A, 8A, 9A, 10A, 11A	Casca de uvas Bordô danificadas	6
12A, 13ª, 14A, 15A	Baga de uvas Bordô saudáveis	4
16A, 17ª	Engaço de uvas Bordô	2
18A, 19ª	Pé de cuba de uvas Bordô + Isabel	2
20A, 21ª	Casca de uvas Isabel saudáveis	2

22ª	Casca de uvas Isabel com sinais de agrotóxico	1
23ª	Baga de uvas Isabel saudáveis	1
24A, 25ª	Engaço de uvas Isabel	2
Coleta Setembro/2008		
Isolado	**Origem**	**Número de isolados**
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	Mosto de uvas Isabel + Bordô	16
17, 18, 19	Engaço de uvas Niágara	3
20, 21, 22, 23	Casca de uvas Niágara saudáveis	4
24, 25, 26, 27, 28, 29, 30	Baga de uvas Niágara saudáveis	7
31, 32, 33, 34, 35, 36, 37	Engaço de uvas Bordô	7
38, 39, 40, 41, 42, 43	Baga de uvas Bordô saudáveis	6
44, 45, 46, 47, 48, 49	Casca de uvas Bordô saudáveis	6
50, 51, 52, 53, 54, 55	Mosto de uvas Niágara	6

Coleta de Maio/2009		
Código do isolado	**Origem**	**Número de isolados**
N7, N10, N22, N35	Casca de uva bordô saudável	4
N5, N18, N24	Casca de uva bordô danificada	3
N17, N38	Engaço de uva bordô saudável	2
N8, N9	Engaço de uva bordô danificada	2
N20	Baga de uva bordô saudável	1
N19	Baga de uva bordô danificada	1
N2, N13, N14, N36	Casca de uva Isabel saudável	4
N3, N4, N6, N11	Casca de uva Isabel danificada	4
N30	Engaço de uva Isabel saudável	1
N21	Engaço de uva Isabel danificada	1
N1, N16	Baga de uva Isabel saudável	2
N12, N15	Baga de uva Isabel danificada	2
N29, N31, N39	Mosto em fase 1 de fermentação	3
N26, N33, N34	Mosto em fase 2 de fermentação	3
N23, N27, N32 N25, N28, N37, N40	Mosto em fase 3 de fermentação (inferior) Mosto em fase 3 de fermentação (superior)	7

Coleta de Agosto de 2009		
Código do Isolado	**Origem**	**Número de Isolados**
S29, S30, S32, S35, S38, S39, S50, S58-1, S58-2	Mosto Cabernet Sauvignon – fase I	9
S3, S10, S11, S17, S20, S22, S25, S28, S31, S49, S53, S54, S55, S56-1, S56-2, S57, S59, S60-1, S60-2, S61, S62, S63	Mosto Cabernet Sauvignon – fase II	22
S6, S7, S8, S9, S12, S13, S14, S16, S18, S24, S26, S33, S37, S51, S52, S64, S65, S66, S67	Mosto Cabernet Sauvignon – fase III	19
S1, S2, S4, S5, S15, S19, S21, S23, S27, S34, S36, S40, S41, S42, S43, S44, S45, S46, S47, S48	Mosto Niágara – fase II	20
U20, U21	Casca de uva Bordô saudável	2
U19, U23, U24, U22	Casca de uva Bordô danificada	4
U9, U12, U13	Engaço de uva Bordô saudável	3
U14	Engaço de uva Bordô danificada	1
U1, U2, U3, U4, U5, U7, U8, U15, U18	Baga de uva Bordô saudável	9
U6, U10, U11, U16, U17	Baga de uva Bordô danificada	5

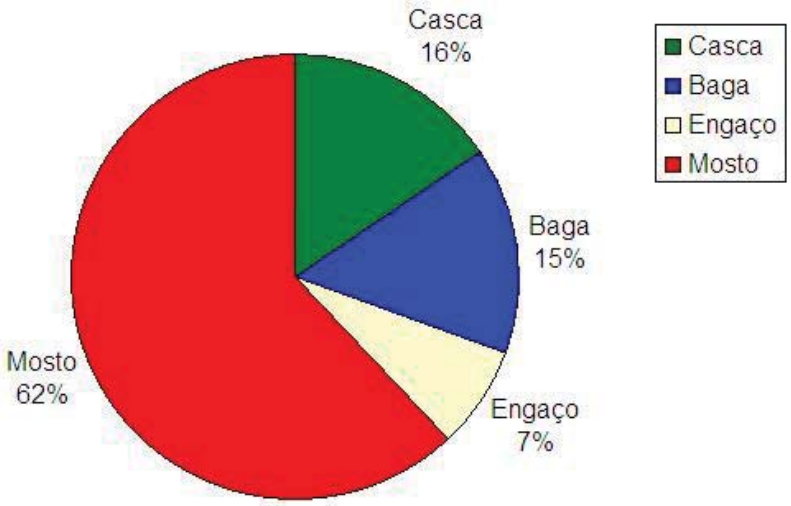

Figura 4: Frequências das linhagens de leveduras provenientes das coletas realizadas no ano de 2009.

5.2. Identificação Molecular de Leveduras

Na identificação de leveduras por meio da técnica PCR-RFLP, foi utilizada a região do DNA ribossômico ITS-5.8S, que inclui as regiões não codificadoras ITS1 e ITS2 e o gene 5,8S, havendo a amplificação e digestão com várias endonucleases de restrição. Os padrões obtidos para cada isolado foram comparados com padrões de linhagens de referência das espécies mais comuns presentes em vinhos, previamente descritas por Esteve-Zarzoso et al. (1999) e *Sabate* et al. (2002) e também através do programa Quidy´04 (Quick Identification of Yeasts 2004) versión 01. *Amplicons* compreendendo a região ITS-5,8S foram obtidos para cada linhagem. Em todos os casos, fragmentos únicos de DNA foram obtidos por PCR, mostrando variações no comprimento para diferentes espécies (Figura 5A). Observou-se uma variação de tamanho entre 450pb para *Issatchenkia terricola* e 850pb para *Saccharomyces cerevisiae*. O tamanho do fragmento amplificado e o número e o tamanho de fragmentos de restrição obtidos permitiram a correta identificação das leveduras em nível de gênero ou espécie (como exemplificado na Figura 5B).

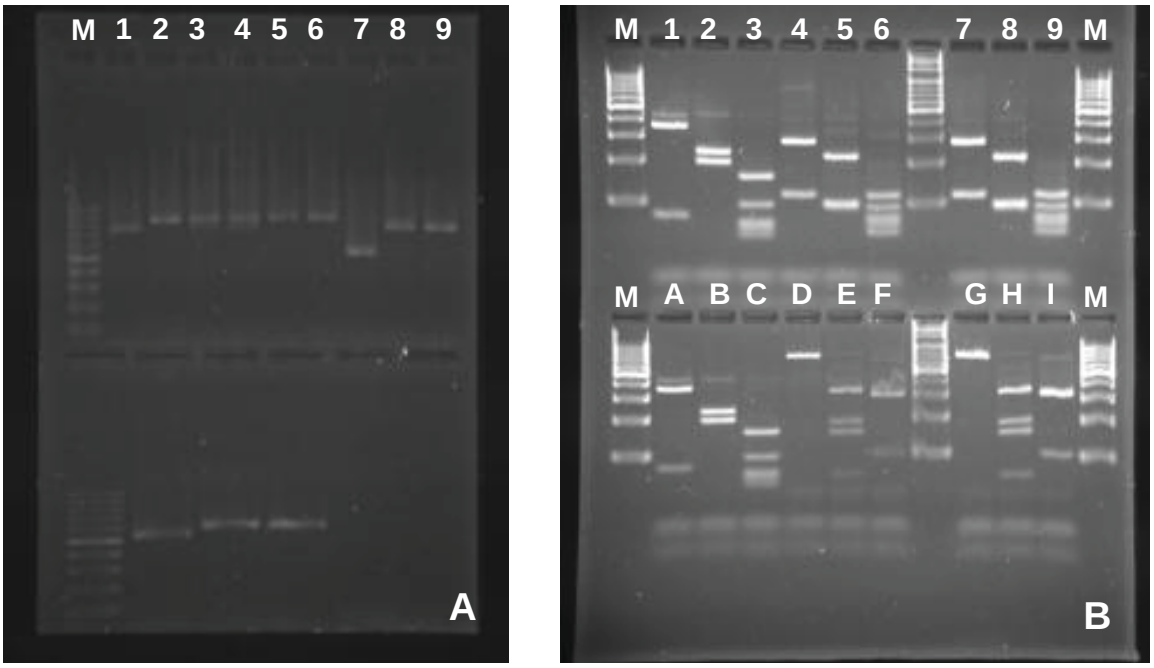

Figura 5. (A): Produto de PCR da região ITS-5,8S: 1, 8 e 9: *Hanseniaspora uvarum*; 2 a 6: *Saccharomyces cerevisiae* e 7. *Issatchenkia orientalis*. **(B)**: Fragmentos de restrição produzidos com endonucleases *Hae*III, *Hinf*I e *CfoI*: 1 a 3 e A a C: *Pichia kluyveri* com tratamentos de endonucleases na ordem referida; 4 a 6 e 7 a 9: *Issatchenkia terrícola*; D a F e G a I: *Hanseniaspora uvarum*. **(M)**: Marcador de tamanho molecular (100 bp - Fermentas).

Nos casos em que não foi possível a identificação molecular apenas por PCR-RFLP da região ITS1-5,8S-ITS2, optou-se por fazer também o sequenciamento gênico desta região, seguido além da amplificação de outra região gênica, chamada 26S do DNA ribossômico, seguido de sequenciamento gênico, permitindo assim a completa identificação em nível de gênero ou espécie.

As sequências foram analisadas através do Programa Bioedit, ferramenta *BLAST* e pelo CBS Yeast Database, como foi citado anteriormente, e em seguida foram depositadas no *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Das 132 linhagens isoladas, foram identificadas treze espécies diferentes (Tabela 2), sendo eficiente para identificação

molecular ao nível de espécie ou gênero. Suas respectivas origens e freqüências estão representadas nas Figuras 6 a 9.

Tabela 2: Tamanho em pb dos produtos de PCR-RFLP e respectivas espécies de leveduras isoladas de uvas e mostos em fermentação.

Grupo/ Nº de isolados	Isolados	Amplificado	Fragmentos de Restrição			Espécie	GenBank
			Cfo I	Hae III	Hinf I		
I (10)	N28, N39B, N40, S29, S33, S34, S36, S40, S43, S44	530	215 +185 + 80 + 70	390 + 95	235 + 165 +135	*Issatchenkia orientalis*	GQ999836, GU943497, JF927948
II (40)	N1, N2, N3, N6, N7, N10, N11, N14, N15, N21, N22, N29, N30, N34, N35, N36, N25A, N39A, S30, S31, S32, S35, S38, S39, S50, S55, S56-1, S56-2, S58-2, S60-1, S65, S66, U6, U11, U14, U17, U19, U20, U21, U24	775	330 + 320 + 120	750	350 +190 + 170	*Hanseniaspora uvarum*	GU943492, GU943493, GU943500, JF927947, JF279292
III(7)	U4, U5, U9, U12, U15, U16, U22, S58-1	650	300 + 270	400 + 120 + 70	310 + 290	*Pichia quilliermondii*	GU943504, GU943491
IV(6)	U8, U7, U10, U13, U18, U23	550	250 + 200	550	200 + 180	*Cryptococcus flavescens*	JF279291, JF279290
V (4)	N4, N12, N13, N16	500	240 + 120	320 +150	230 + 170 + 130	*Pichia sp.*	Não identificada a nível de espécie
VI(3)	N5, N8, N9	470	210 + 110 + 80 + 60	470	240 + 230	*Candida stellata*	JF279288, JF927946
VII (4)	S54, S57, S62, S63	450	120 + 110+ 100 + 90	290 + 130	240 + 110 + 100	*Issatchenkia terrícola*	GU943495, GU943498
VIII(2)	S59, S60-2	400	230 +110 + 80	310 +80 +50	270 + 120 +100	*Issatkenkia occidentalis*	GU943487, GU943501
IX (44)	N23, N24, N25B, N26, N27, N32, N37, N38, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S16, S17, S18, S19, S20, S21, S23, S25, S26, S27, S28, S41, S42, S45, S46, S47, S48, S49, S51, S52, S53, S67	850	360 + 310 + 135	310 + 240+ 180+ 140	370 + 360 + 120	*Saccharomyces cerevisiae*	GQ999834, GU943494, GU943496
X(2)	U1, U3	650	300 +300	640	265 + 175 +170	*Sporidiobolus pararoseus*	GU943489, JF279290
XI(3)	N17, N19, N20	650	290 + 210	420 +130 +80	310 + 210 + 130	*Candida quercitrusa*	GQ999840, DQ466526
XII(5)	N31, S22, S37, S61, S64	450	170 + 95 + 60 +50	370 + 70	250 + 200	*Pichia kluyveri*	GQ999835, GU943486, GU943499
XIII(1)	U2	600	600	600	340 + 260	*Cryptococcus laurentii*	GU943490, GU943503

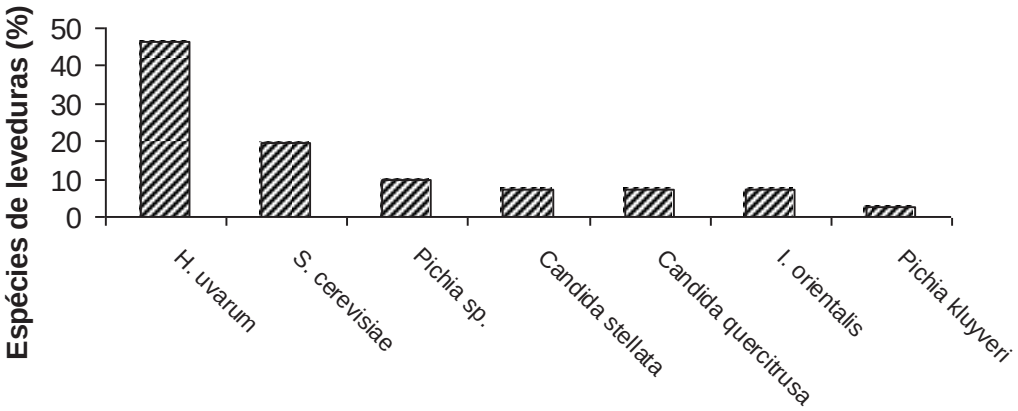

Figura 6. População de leveduras encontradas na primeira coleta (Maio/2009) a qual consiste em amostras oriundas de uvas Bordô e Isabel e de mosto em diferentes fases de fermentação (início, meio e final) de uvas bordô e Isabel.

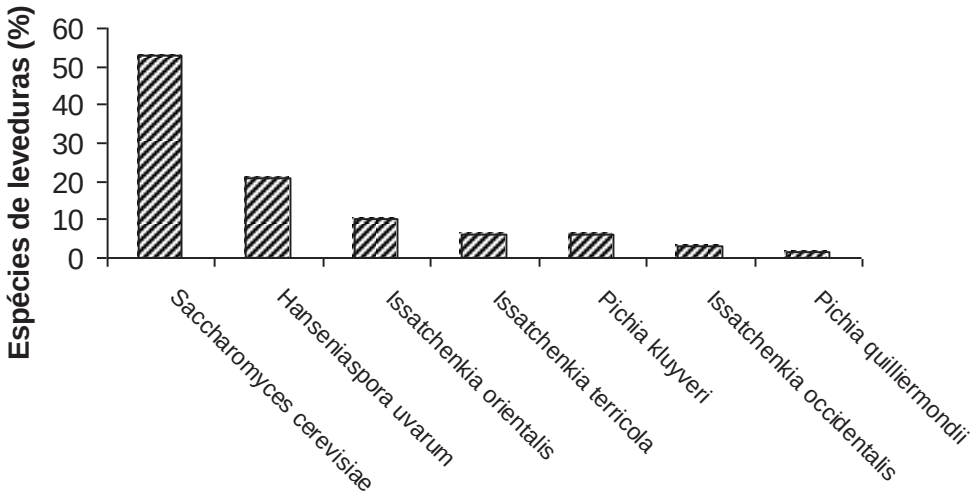

Figura 7. População de leveduras encontradas na segunda coleta (Agosto/2009). Nesta coleta todas as amostras são de mosto de uvas Cabernet Sauvignon em diferentes fases de fermentação: início, meio e final.

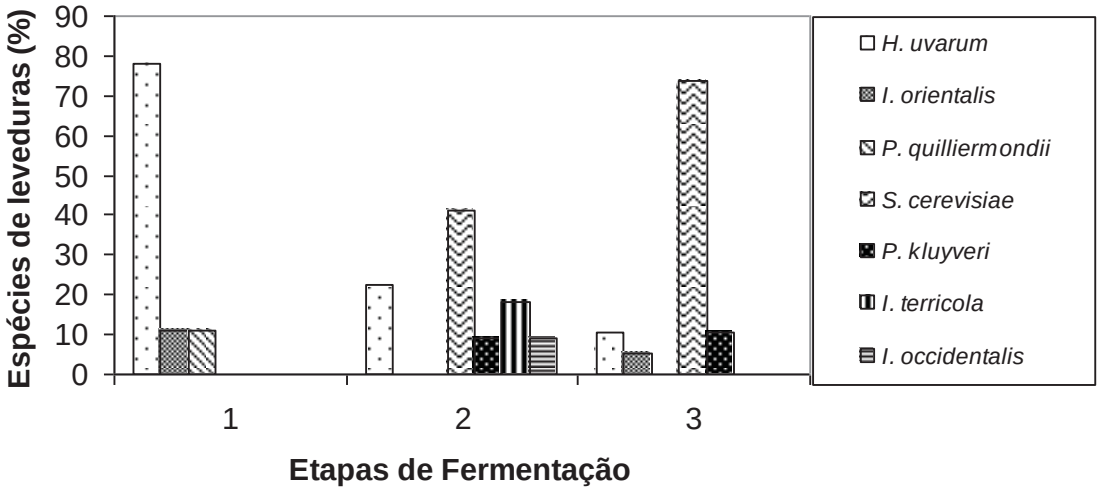

Figura 8. Diversidade de leveduras encontradas ao longo do processo de fermentação espontânea de mostos de uvas Cabernet Sauvignon obtidos na segunda coleta (Agosto/2009). Etapas: (1) Início, (2) Intermediária, (3) Final.

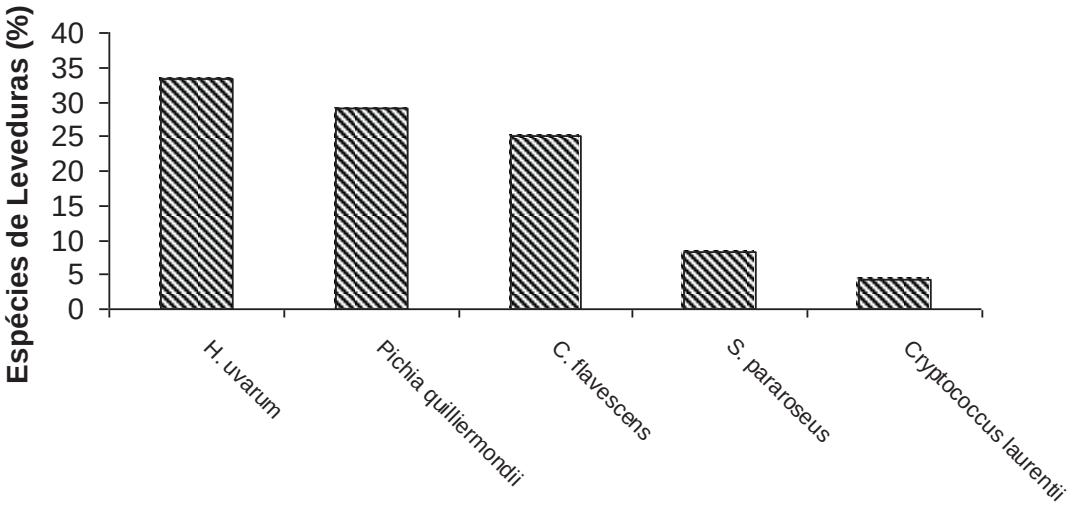

Figura 9. Diversidade de leveduras encontradas na superfície de uvas Bordô pertencentes à segunda coleta (Agosto/2009).

5.3. Fermentação Submersa para Produção de β-glicosidase

Após identificação molecular as linhagens de leveduras isoladas foram submetidas à fermentação submersa para a produção de β-glicosidase. Das 132 linhagens testadas apenas duas exibiram produção em meio líquido YPC. Identificada como *Cryptococcus laurentii*, este isolado (U2) de baga de uva saudável da cultivar Bordô apresentou atividade máxima após 96h de crescimento, porém com baixa atividade (0,21 U/ml). Com relação ao crescimento celular e viabilidade celular apresentou pico com 72h de crescimento. Outra linhagem isolada de casca de uvas Bordô, identificada como *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A), apresentou maior atividade (1,7 U/ml). O pico de atividade máxima no fluido sobrenadante foi de 96h de cultivo. Após este período (com 120h), a atividade enzimática diminuiu. O crescimento e viabilidade celular diminuíram depois de 96 horas (Figura 10).

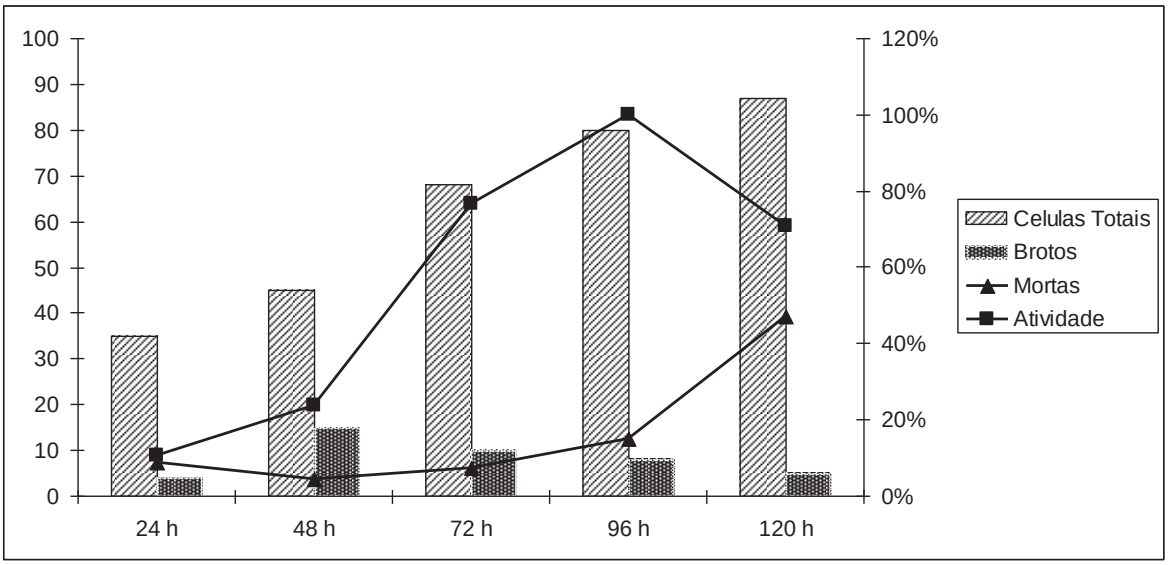

Figura 10. Cinética do crescimento e da biossíntese de β-glicosidase na linhagem 1A (*Aureobasidium pullulans*). Porcentagem de atividade relativa: (■); porcentagem de células mortas: (▲); número de células em brotamento: (▓); número de células totais (▒).

5.3.1. Caracterização da β-glicosidase Bruta de *Aureobasidium pullulans*

A β-glicosidase produzida no extrato bruto pela linhagem 1A (*Aureobasidium pullulans*) foi caracterizada físico-quimicamente, utilizando PNPG como substrato no ensaio enzimático. A enzima apresentou pH ótimo de 5,5 (Figura 11) e dois picos de

temperaturas ótimas (um a 45ºC e outro a 70ºC), indicando a possibilidade da presença de duas isoformas para esta enzima (Figura 12). Por outro lado, este gráfico mostra uma enzima com ampla temperatura de ação, o que é vantajoso sob o ponto de vista de aplicação.

Com relação à estabilidade ao pH, a enzima foi estável entre os pH 5,5 e 11,0, mantendo 79% da atividade em pH 11,0 (Figura 13). A enzima apresentou termoestabilidade entre 30 e 45°C, mantendo 76% de atividade enzimática original após incubação por 1 hora a 30°C (Figura 14). Apesar de ter apresentado duas temperaturas ótimas (45°C e 70°C), a partir de 50°C, a termoestabilidade caiu para 34%, em relação à atividade máxima.

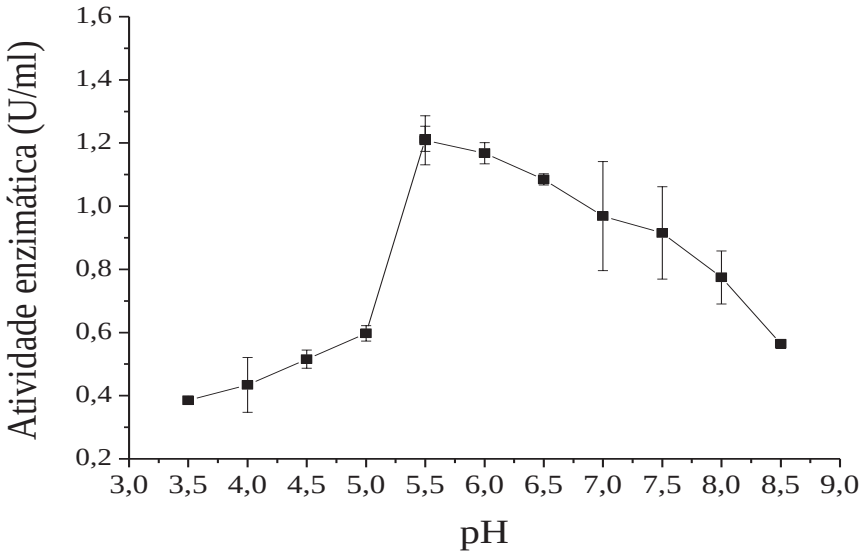

Figura 11. Efeito do pH na atividade da enzima β-glicosidase de *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).

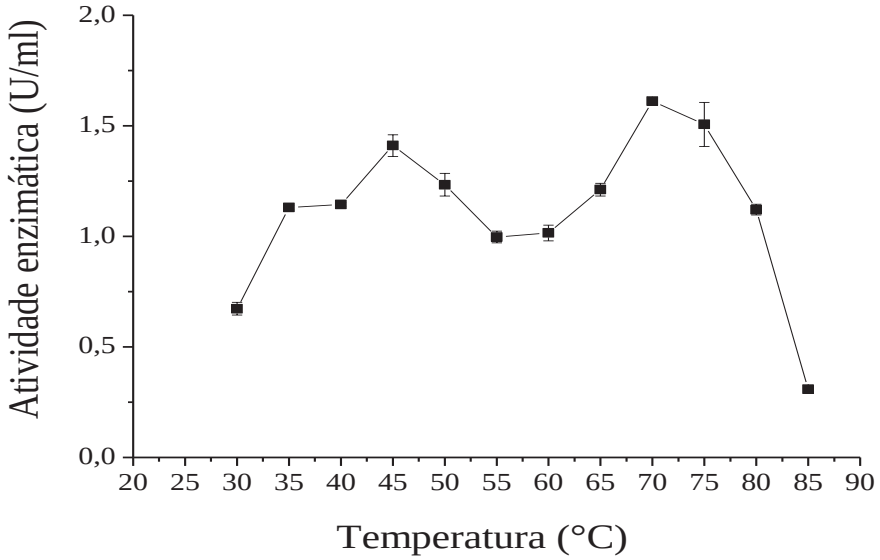

Figura 12. Efeito da temperatura na atividade da enzima β-glicosidase de *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).

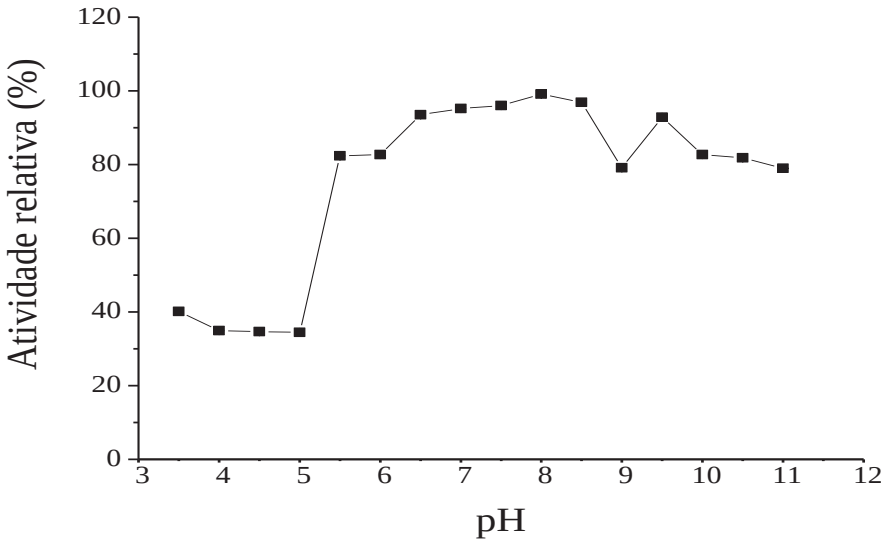

Figura 13. Estabilidade da enzima β-glicosidase de *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A) quando submetida a tratamentos com diferentes valores de pH.

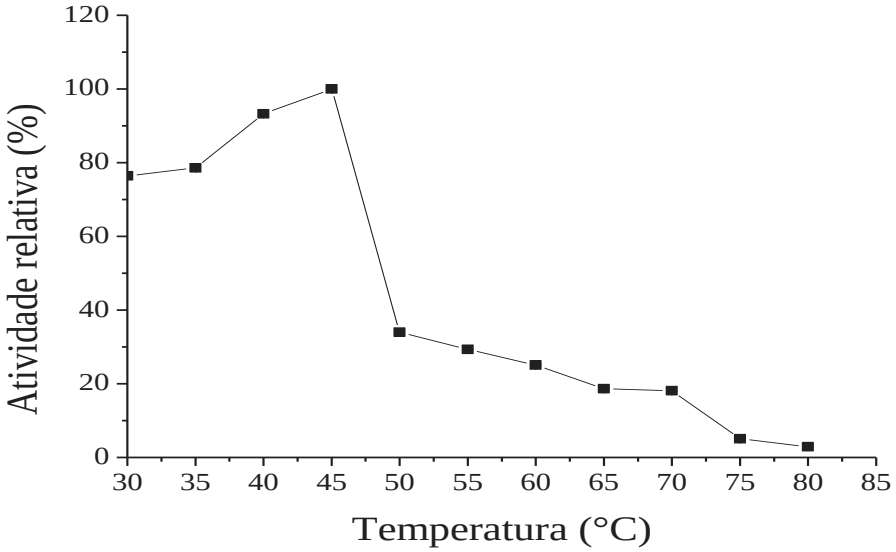

Figura 14. Termoestabilidade da enzima β-glicosidase de *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).

Com relação ao efeito da glicose, observou-se que a β-glicosidase foi inibida nas concentrações examinadas, mostrando 48% de atividade residual com 100mM de glicose (cerca de 2%) (Figura 15). Na concentração de 400 mM (aproximadamente 7 % de glicose), a atividade residual foi de 12% em relação à atividade máxima. A inibição causada por glicose é comumente observada em β-glicosidases microbianas (LEITE et al., 2008; SWANGKEAW et al., 2009; ZANOELO et al., 2004) . O efeito do etanol sobre a atividade enzimática foi também investigado e observou-se que a atividade enzimática manteve-se estável, com 94% da atividade original com 10% de etanol e 71% de atividade residual com 20% de etanol, demonstrando estabilidade enzimática em relação a esse composto (Figura 16).

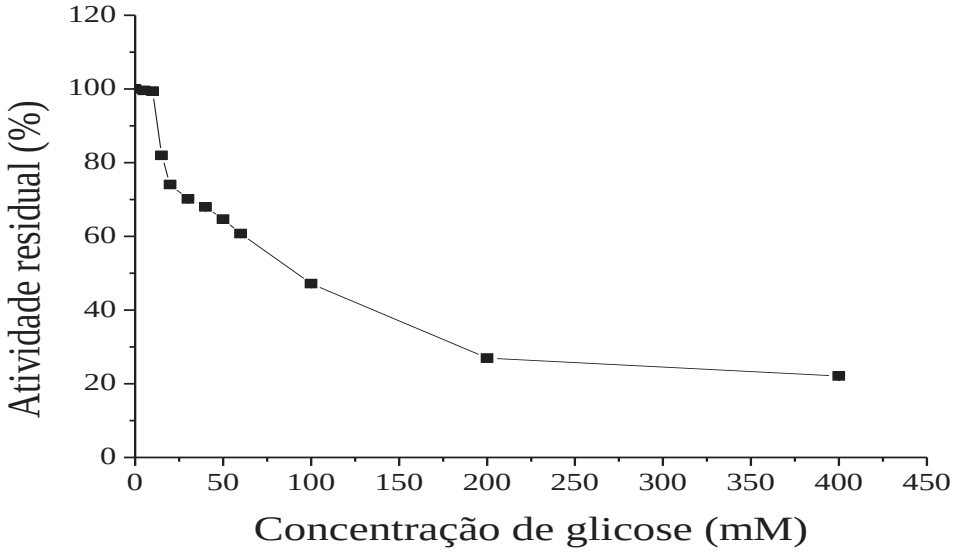

Figura 15. Efeito da concentração de glicose sobre a atividade β-glicosidásica em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).

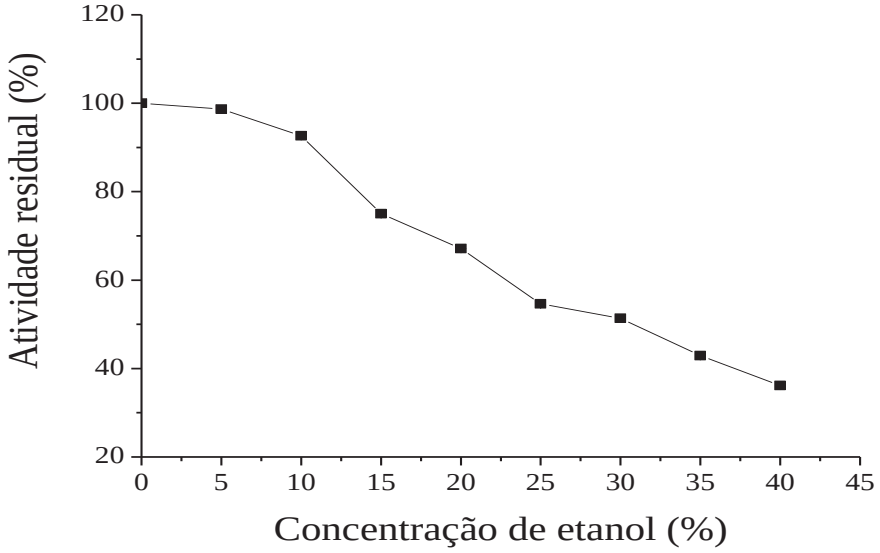

Figura 16. Efeito da concentração de etanol sobre a atividade β-glicosidásica em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).

5.4. Produção e Caracterização Físico-Química de Xilanase de *Aureobasidium pullulans*

Dentre as linhagens isoladas, selecionamos um isolado da espécie *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A) - isolada de casca de uva Bordô e Isabel e também de baga de uvas Bordô - que apresentou boa produção de xilanase, além da produção significativa β-glicosidásica, demonstrada anteriormente.

A atividade máxima foi de 51 U/ml após 120h de crescimento, quando analisada em tampão acetato de sódio 0,1M e pH 5,0 (Figura 17). A xilanase produzida no extrato bruto foi caracterizada físico-quimicamente.

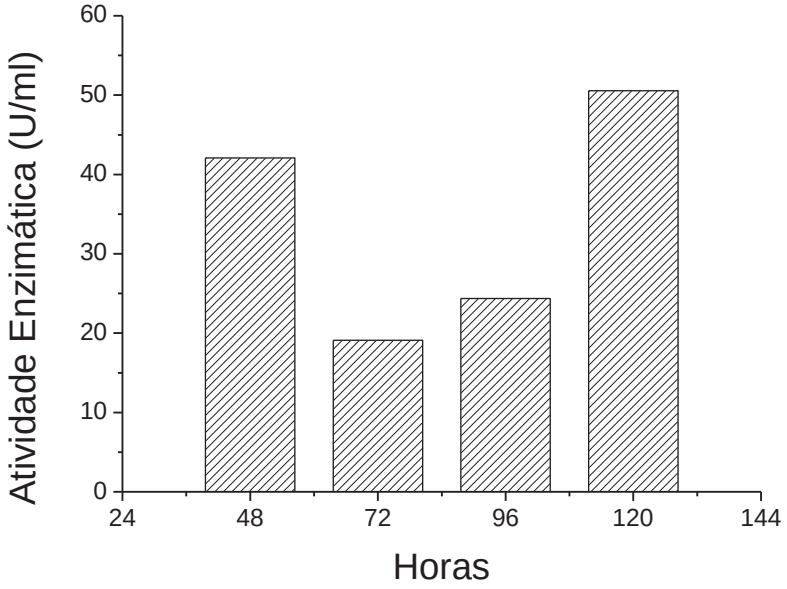

Figura 17. Curva de produção da enzima xilanase pela levedura yeast-like *Aureobasium pullulans* (linhagem 1A). A atividade enzimática do extrato bruto foi analisada em intervalos de 24h.

A enzima apresentou pH ótimo de 3.5 (Figura 18) e temperatura ótima de 45º C (Figura 19). Além disso, a enzima é atuante em ampla temperatura de ação, o que é vantajoso sob o ponto de vista de aplicação.

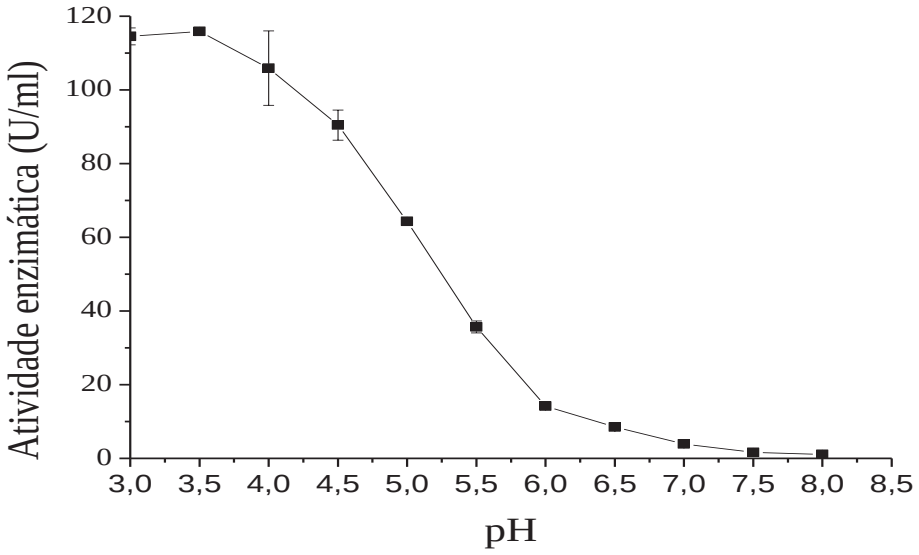

Figura 18. Efeito do pH na atividade da enzima xilanase de *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).

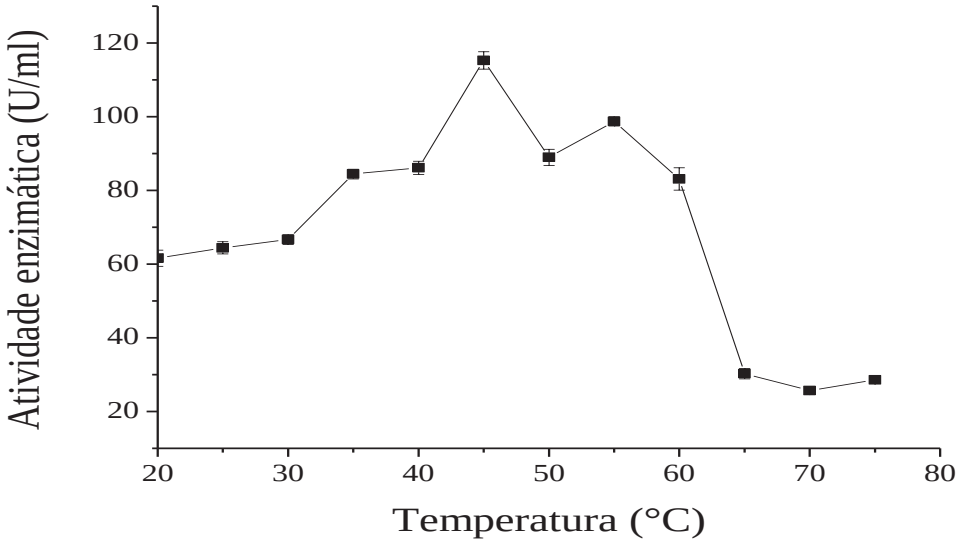

Figura 19. Efeito da temperatura na atividade da enzima xilanase de *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).

Com relação à estabilidade ao pH, a enzima foi estável entre os pH 3,5 e 8,0, mantendo 80% da atividade em pH 3,0 (Figura 20). A enzima apresentou termoestabilidade entre 20 e 50°C, mantendo 87% de atividade enzimática original após incubação por 1 hora a 20°C (Figura 21).

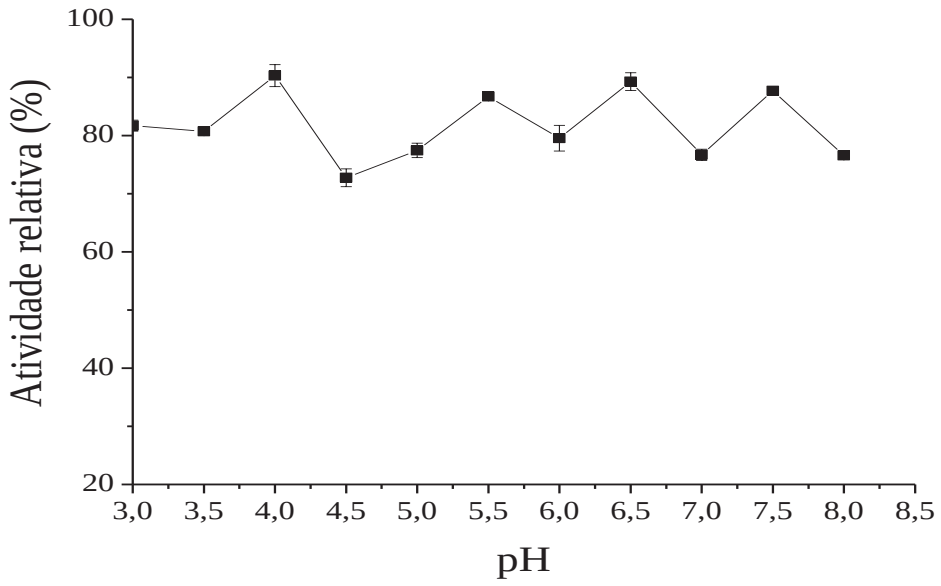

Figura 20. Estabilidade da enzima xilanase de *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A) quando submetida a tratamentos com diferentes valores de pH.

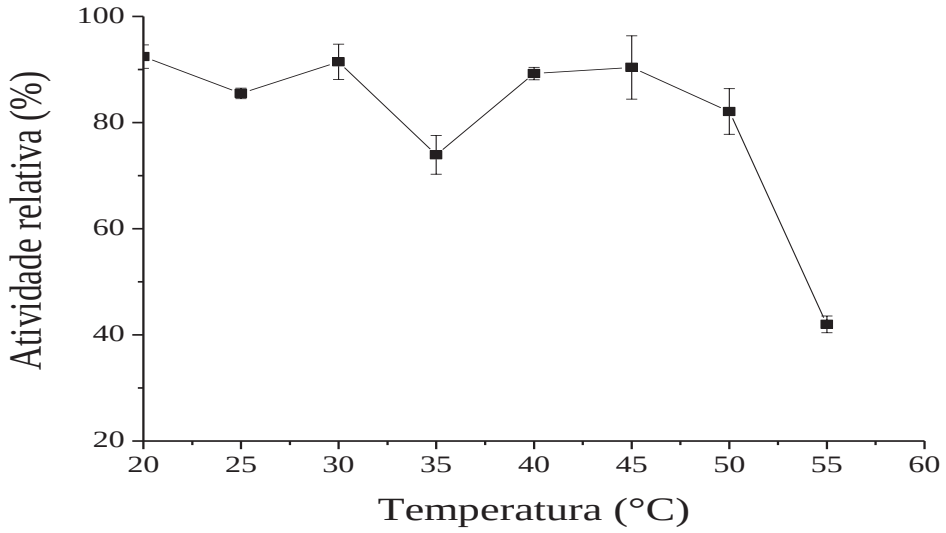

Figura 21. Termoestabilidade da enzima xilanase de *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).

Com relação ao efeito da concentração de glicose e xilose sobre a atividade enzimática de xilanase de *A. pullulans* não foi possível a realização devido à falta de métodos de determinação. Para a análise de atividade enzimática de xilanase utiliza-se o método DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico), esta técnica detecta a quantidade de açúcar redutor em solução, assim ao adicionar glicose ou ainda xilose, ambos açúcares redutores, ao tampão de reação obtém-se valores equivocados para a atividade desta enzima. O efeito da concentração de etanol sobre a atividade enzimática foi testado (Figura 22) e observou-se que a enzima manteve-se estável com 40% da atividade original na presença de 7% de etanol e 73% de sua atividade original com 3% de etanol, demonstrando alta atividade catalítica nas fases iniciais de fermentação.

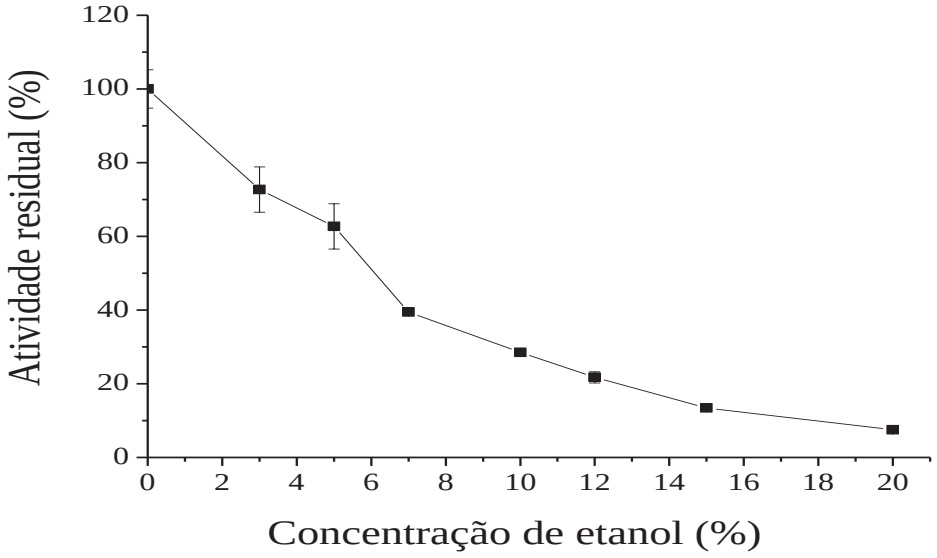

Figura 22. Efeito da concentração de etanol sobre a atividade xilanásica em *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A).

6. DISCUSSÃO

6.1. Diversidade de Espécies

A composição e o número de leveduras indígenas em uvas são influenciados por vários fatores: variedade da uva, grau de amadurecimento na coleta, condições climáticas, localização geográfica, danos físicos nas uvas e o uso de pesticidas (MORTIMER; POLSINELLI,1999), permitindo, assim, que cada vinícola tenha um produto característico de acordo com a sua localização e microbiota.

Durante a fermentação espontânea do vinho inicia-se o crescimento de espécies não-*Saccharomyces* pertencentes a gêneros como *Kloeckera*/*Hanseniaspora*, *Bretanomyces/Dekkera*, *Debaromyces*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* (ARÉVALO-VILLENA, 2005), *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Issatchenkia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes* e *Schizosaccharomyces* (RASPOR *et al*., 2006). Estas leveduras têm baixa capacidade fermentativa e baixa tolerância ao etanol, porém alguns estudos relatam a importância de leveduras não-*Saccharomyces* no aumento do *flavour* do vinho através da produção de enzimas β-glicosidases e subsequente hidrólise de precursores aromáticos, produzindo compostos voláteis livres, responsáveis pelo aroma do vinho (ARÉVALO-VILLENA, 2005). Estas leveduras estão associadas com a filosfera de uvas e também com todo o ambiente vinícola.

Técnicas moleculares na identificação de espécies de leveduras apresentam a vantagem de serem métodos rápidos e vêm sendo extremamente utilizadas para a detecção rápida de espécies de leveduras, sendo a técnica de PCR-RFLP da região ITS-5,8S do DNA ribossômico (DNAr) uma das principais técnicas usadas atualmente na identificação de espécies e, a técnica de restrição do DNA mitocondrial na discriminação de linhagens intraespecíficas (ESTEVE-ZARZOSO *et al*., 1999; 2001; MARTORELL *et al*, 2006; LOPES et al., 2007; JEYARAM et al., 2008).

A região D1/D2, localizada no gene 26S do DNAr, também é efetiva na identificação de espécies de leveduras. Apresenta baixa variabilidade entre membros da mesma espécie e alta variabilidade entre os indivíduos de espécies diferentes. Assim, com a amplificação gênica pela técnica de PCR seguido de sequenciamento genético é possível identificar cada isolado ao nível de espécie quando este apresenta 98% de similaridade com as sequências depositadas no *GenBank* ou *CBS Yeast Database*, de forma eficiente.

Neste trabalho, foram identificadas espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida, Cryptococcus, Hanseniaspora, Pichia, Issatchenkia, Saccharomyces e Sporidiobolus* por PCR-RFLP da região 5,8S ITS, seguido de sequenciamento genético das regiões 5,8S ITS e 26S do DNAr.

Foi observada uma diferença na diversidade de espécies entre as duas coletas realizadas. As espécies *Cryptococcus flavescens, Cryptococcus laurentii, Issatchenkia terricola, Issatchenkia occidentalis* e *Sporidiobolus pararoseus* foram isoladas apenas da coleta de agosto de 2009 e as espécies do gênero *Candida* sp. foram isoladas apenas da coleta de maio de 2009.

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi a mais freqüente (com 44 isolados). Esta espécie, representativa do grupo *Sacharomyces*, esteve presente na casca de uvas em baixa quantidade, porém em mostos durante as diferentes fases da fermentação alcoólica apresentou um número significativo, estando de acordo com o encontrado na literatura (MARTINI et al., 1996) . *Sacharomyces cerevisae* é a levedura mais importante na produção vinícola e é responsável pela conversão do açúcar em etanol e CO_2. Ela também tem papel significativo por atuar na formação de metabólitos secundários de importância para o vinho, como a conversão de precursores de aroma da uva em aromas varietais no vinho (JOLLY *et al*., 2006). Por esta razão *S. cerevisiae* é referida como "a levedura do vinho". Leveduras do gênero *Saccharomyces*, em especial, *S. cerevisiae*, são as principais envolvidas tanto em fermentações espontâneas, ou como cultivos iniciadores comerciais (*starters*) (FLEET, 2003). Algumas linhagens de *Saccharomyces* ainda exibem o fenótipo *killer* e atuam como agentes naturais no controle do crescimento de fungos filamentosos, bactérias e leveduras contaminantes em uvas e mostos. Outras ainda podem absorver e desativar micotoxinas durante a fermentação alcóolica (SANGORRÍN et al., 2001). Outras ainda são capazes de produzir enzimas importantes na produção e melhoramento de vinhos, tais como poligalacturonases e β-glicosidases (HERNÁNDEZ et al., 2003; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2004; 2005). Neste estudo, observamos uma predominância de *S. cerevisiae* em mostos na metade e final da fermentação, corroborando os dados da literatura que justificam esta predominância devido a esta levedura apresentar maior tolerância ao etanol e ao SO_2 (adicionado como antioxidante e conservante) e, catabolismo fermentativo mais eficiente em meios com alta concentração de açúcar (SABATE *et al*., 2002).

A espécie *Hanseniaspora uvarum*, leveduras apiculadas com baixa atividade fermentativa, foi a segunda mais freqüente (com 40 isolados), presente em uvas (maior quantidade), mas também em mostos, principalmente nas etapas iniciais (Tabela 2). Segundo Sabate et al. (2002) estas leveduras são predominantemente encontradas na superfície das uvas, representando cerca de 50-75% da população total. As leveduras apiculadas *H. uvarum* e *Kloekera apiculata* (anamórfico), leveduras não-*Saccharomyces* são encontradas em números elevados em uvas e mostos e estão como as melhores para contribuir com a qualidade dos vinhos. Estas leveduras, com baixo poder fermentativo, são importantes na produção de compostos voláteis. Caridi e Ramondino (1999) avaliaram 20 isolados de *Hanseniaspora* spp. (*Kloeckera* spp.) de origem enológica para sua habilidade de fermentação em mosto (17,9° Brix e pH 3,81). Eles encontraram que a produção de etanol aumentou de 5,02 para 8,72%, em comparação a 11,17% do controle (*S. cerevisiae*), mas a acidez volátil foi maior (0,75g/L para 2,25g/L) do que o controle (0,65g/L). Estes resultados indicam que embora algumas linhagens de *Hanseniaspora* estejam habilitadas a produzir níveis de etanol maiores do que outras linhagens, os altos níveis de acidez volátil podem ser prejudiciais para as características sensoriais do vinho.

Leveduras não-*Saccharomyces* aeróbicas, oxidativas, como *Candida sp*., *Cryptococcus* sp. e *Pichia* sp., representadas neste trabalho pelas espécies *Candida stellata*, *Candida quercitrusa* e *Issatchenkia occidentalis* (anamórfico *Candida sorbosa*), *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus laurentii*, *Pichia kluyveri*, *Pichia guilliermondii* e *Pichia* sp., são encontradas nas superfícies de uvas, equipamentos e no ambiente vinícola e, quando ocorre o esmagamento das uvas são carreadas para o mosto, sendo encontradas principalmente nas etapas iniciais de fermentação.

Alguns gêneros de *Candida* também possuem efeitos antifúngicos e atuam como importantes bioagentes no controle da contaminação de fungos filamentosos em vinhos (FLEET, 2003). Sabate et al. (2002) descreveram a predominância de linhagens *Candida sorbosa* em mostos em fermentação (com 76% dos isolados contra apenas 10% de *Saccharomyces*). Durante a fermentação e, especialmente nas espontâneas, há uma sucessão seqüencial de leveduras. Inicialmente, espécies de *Hanseniaspora (Kloeckera)*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida* (*Candida stellata*, *C. pulcherrima*, *Candida sake*) e *Cryptococcus* são encontradas em altos níveis no mosto fresco. Destas, *H. uvarum* está

presente em maior freqüência, seguida por vários gêneros de *Candida* (JOLLY *et al*., 2006). Estes dados são compatíveis com o encontrado neste estudo.

Alguns autores reportam estas leveduras oxidativas presentes no ambiente vinícola como contaminantes ao vinho por serem capazes de formar filmes na superfície em contato com o oxigênio (conhecido como véu). Associado ao seu crescimento está a formação de *off-flavors* como ácido acético, acetato de etila e acetaldeído. Dentre estas espécies encontram-se além de gêneros *Candida*, leveduras dos gêneros *Pichia* e *Hansenula* (GRBIN, 1999). No caso de *Candida stellata* já foi identificada a elevada produção de glicerol (10 a 14g/L) comparado com 4 a 10,4g/L em *S. cerevisiae*. Isto a torna o seu crescimento indesejável a menos que um equilíbrio possa ser alcançado entre a produção de glicerol e ácido acético o que não prejudicaria a qualidade do vinho.

O gênero *Issatchenkia*, representado neste estudo pelas espécies *I. orientalis* e *I. terricola*, não apresentam muitas referências sobre sua contribuição na qualidade final do vinho. González-Pombo et al. (2011), isolaram uma linhagem de *Issatchenkia terricola* de uvas Tannat produtora de β-glicosidase com características compatíveis com as encontradas em fermentações. Ela se apresenta ativa em presença de glicose (100g/L), etanol (18%) e metabissulfito (60mg/L) e também estaria estável em pH 3,0. Esta espécie também já foi isolada de mostos em fermentação de uvas Chenin Blanc (MORA & MULET, 1991) e Merlot (FLEET et al., 1993). Mas segundo Clemente-Jimenez et al. (2004), devido à sua característica de baixa fermentação e alta produção de acetato de etila, deve ser evitada na produção de vinhos. *I. orientalis* produziu vinhos com intensa cor e espuma. A cor de um vinho é um indicador da sua condição, a qualidade, a idade, e até o estilo (CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2004).

Uma provável explicação para a presença de leveduras contaminantes é a vinícola em estudo. Trata-se de um vinho artesanal, que conta com as leveduras autóctonas para propiciar a fermentação espontânea do mosto. Assim, com o esmagamento das uvas pode ocorrer o carreamento destas espécies para as etapas iniciais de fermentação. Podem ocorrer também transmissões indiretas através de insetos vetores (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

A espécie *Sporidiobolus pararoseus* encontrada neste estudo em duas linhagens, também uma levedura oxidativa, pertencente ao filo Basidiomycota, foi descrita previamente como incapaz de fermentar açúcares e sem interesse enológico representativo (RENOUF et al, 2007). Shuang-Shi Li *et al*. (2010) isolaram esta espécie de uvas Chardonnay em Wuwei – China. Em estudo prévio realizado paralelamente pela Profa. Dra. Milla Alves Baffi encontrou-se um isolado de *S. pararoseus* produtor de até 0.8 U/ml com 72 h de crescimento, temperatura ótima de 50°C e pH ótimo de 5.5. Além disso, apresentou ampla faixa de estabilidade de pH, exibiu termoestabilidade em baixas temperaturas, alta estabilidade à glicose (restando 69% de atividade residual com 11% de glicose) e ativa em concentrações de até 15% de etanol. Características interessantes para aplicação no processo de vinificação (BAFFI et al., 2011b).

A levedura *yeast-like Aureobasidium pullulans* foi encontrada apenas na 1ª coleta (abril de 2008 – linhagem 1A) e isolada de casca de uvas Bordô com sinais de agrotóxico, baga de uvas Bordô saudáveis e casca de uvas Isabel saudáveis. *Aureobasidium pullulans* é comumente encontrada na superfície de uvas saudáveis nos estágios iniciais de amadurecimento da uva e, é considerado como parte da microbiota residente de videiras (RASPOR *et al*., 2006). Sabate et al. (2002) descrevem *A. pullulans* como um habitante normal da superfície de uvas, presente em alta freqüência e isolado de diferentes partes da uva. Um recente trabalho também relata pela primeira vez a presença de *A. pullulans* em tanques em fermentação de vinícolas da Patagônia (SANGORRÍN et al., 2007).

O poder deste organismo como bioagente no controle de fungos filamentosos contaminantes em alimentos é bem conhecido (FLEET, 2003; SCHENA et al., 2003). Dimakopoulou et al., (2008) isolaram linhagens de leveduras da filosfera de uvas de uma região da Grécia e avaliaram a sua capacidade na supressão do crescimento do fungo *Aspergillus carbonarius*, causador da podridão azeda ("*sour rot*") em uvas e transmissão de ocratoxina em mostos. Estes autores selecionaram uma linhagem de *Aureobasidium pullulans* que foi tão efetiva quanto fungicidas comerciais na redução da incidência do fungo *Aspergillus carbonarius* em uvas.

Aureobasidium pullulans é classificada como uma levedura negra, dentro dos Ascomicetos e é reconhecida como uma importante levedura na indústria. O exopolissacarídeo pululana produzido por esta levedura tem inúmeras aplicações na

indústria de alimentos e madeira e, também na medicina (DESHPANDE *et al*., 1992; PUNNAPAYAK et al., 2003). Inúmeros trabalhos também descrevem o potencial desta levedura *yeast-like* na produção de enzimas hidrolíticas, como β-glicosidases e xilanases (OHTA et al., 2001; IEMBO et al., 2002; LEITE *et al*, 2007; BHADRA *et al*, 2008; LEITE et al., 2008) sendo compatíveis com os dados encontrados neste trabalho. Genes codificadores destas enzimas também têm sido isolados e expressos eficientemente em outras espécies de leveduras, tais como *Pichia* e *Saccharomyces* (LI e LJUNGDAHL, 1996; TANAKA et al., 2004).

Com base nestes dados, concluímos que a presença de linhagens de *A. pullulans* na filosfera de uvas, observada no nosso trabalho, pode contribuir positivamente na qualidade do vinho produzido em Jales. Estas leveduras podem auxiliar no controle de fungos contaminantes em vinhos, como já relatado em alguns trabalhos anteriores (SANGORRÍN *et al*, 2007; DIMAKOPOULOU *et al*, 2008).

6.2. Produção de Enzimas Extracelulares

Além de compostos de aroma voláteis, as uvas, assim como outros frutos, apresentam vários compostos precursores de aroma. Dentre eles, precursores glicosídicos representam uma importante fonte de aroma, tais como compostos terpênicos ligados a açúcares, consistindo os β-D-glicosídeos (WILLIAMS et al., 1982; ARÉVALO-VILLENA et al., 2006b). Atualmente, há um interesse crescente na exploração destes potenciais aromáticos pelo uso de enzimas produzidas por microorganismos (ÚBEDA E BRIONES, 2000; FERNANDEZ-GONZÁLEZ et al., 2003).

A hidrólise enzimática de glicosídeos ocorre em dois estágios. Em primeiro lugar, a ligação entre açúcares é clivada por arabinosidases ou raminosidases e o β-D-glicosídeo é liberado. Na segunda etapa, uma β-D-glicosidase hidrolisa a ligação glicosídica e produzindo formas voláteis livres, contribuindo para o aroma do vinho (CORDERO-OTERO et al., 2003). Este é o passo chave no processamento de vinhos, uma vez que a eficiência de hidrólise é fortemente limitada pela glicose, presente em altas concentrações no suco de uva e em vinhos doces. Neste sentido, as investigações estão focadas na busca por β-glicosidase produzidas por leveduras tolerantes à glicose, ao etanol e também que apresentem boa atividade em baixo pH (RICCIO et al, 1999).

Neste trabalho, foram isoladas 132 linhagens de leveduras originadas de mostos e uvas de três variedades provenientes da região de Jales (SP) e estudamos a habilidade destas leveduras em produzir β-glicosidase extracelulares. Todas as espécies de leveduras foram selecionadas para produção de β-glicosidase, usando meio líquido YPC: *Cândida quercitrusa*, *Cândida stellata*, *Cryptococcus flavescens*, *Cryptococcus laurentii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia occidentalis*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia terrícola*, *Pichia kluyveri*, *Pichia quilliermondii*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Sporidiobolus pararoseus*. Nossos dados mostram que pouca ou nenhuma β- glicosidase foi produzida quando utilizado apenas este meio contendo celobiose 2% como única fonte de carbono e peptona como a única fonte de nitrogênio. Alguns autores relatam atividade β-glicosidase em *S. cerevisiae* (ROSI et al., 1994; HERNANDÉZ et al., 2002), outros argumentam que enquanto a enzima pode ser sintetizada, ela se torna inativa por condições de processamento (GUNATA et al., 1986; DELCROIX et al., 1994; MATEO E DI STEFANO, 1997), e que a atividade necessária só pode ser garantida utilizando as leveduras não-*Saccharomyces* (CORDERO OTERO et al., 2003). Os relatos publicados diferem no que diz respeito aos isolados utilizados ativos constitutivamente (VASSEROT et al., 1989) *versus* síntese induzida (ROSI et al., 1994; MIKLÓSY E PÓLOS, 1995; MATEO E DI STEFANO, 1997; YANAI E SATO; 1999; MENDES-FERREIRA et al., 2001; HÉRNANDEZ et al, 2002) e localização em culturas microbianas (ROSI et al, 1994; MIKLÓSY E PÓLOS, 1995; MCMAHON et al., 1999; YANAI E SATO, 1999; MANZANARES et al., 2000; MENDES-FERREIRA et al., 2001; STRAUSS et al., 2001).

No entanto, em coleta anterior, realizada pela Profa. Dra. Milla A. Baffi, foi isolada uma linhagem de *Aureobasidium pullulans* (linhagem 1A) com boa atividade β-glicosidásica, e após as análises demonstradas anteriormente, se mostrou potencialmente aplicável à vinificação.

Com relação à produção e caracterização de xilanase pela linhagem 1A (*Aureobasidium pullulans*), em meio indutor com xilana a 2%, encontrou-se 51 U/mL em 120 horas e 106,3 U/ml nas condições ótimas de pH e T°C. A caracterização da enzima bruta apresentou pH ótimo e temperatura ótima similares às enzimas de outras leveduras vínicas (ARÉVALO-VILLENA et al., 2006), mostrou-se resistente a valores muito baixos de pH (86,85% de atividade residual a pH 4,0) e apresentou termoestabilidade entre 20 e

50ºC. Com relação ao efeito do etanol a enzima também se mostrou adequado ao processamento de vinhos, mantendo sua 40% da atividade original na presença de 7% de etanol, podendo ser importante principalmente nas fases iniciais de fermentação, atuando nos componentes da parede celular liberando compostos importantes para a qualidade final do produto. Assim, todas as condições encontradas para esta enzima são favoráveis às condições de vinificação.

A produção de xilanases por *A. pullulans* já foi observada em outros trabalhos. Ohta et al. (2001) produziram e purificaram uma xilanase de *A. pullulans* e expressaram o cDNA do gene *xynI* com sucesso em uma linhagem de *S. cerevisiae*. Tanaka et al. (2004) produziram uma xilanase de *A. pullulans* e expressaram o gene em *Pichia pastoris*. Xilanases de outras leveduras também já foram estudadas (*Candida pulcherima* por Strauss et al., 2001 e *Cryptococcus flavus*, por Parrachin et al., 2009). No nosso trabalho, nós apenas detectamos a produção de xilanase por *A. pullulans*. Nós observamos esta espécie apenas em amostras de cascas de uvas, não sendo observada em amostras de mostos. Provavelmente, esta levedura esteja contribuindo para a liberação de aroma antes da fermentação alcoólica.

Assim, concluímos que, dentre as leveduras isoladas, a que mais se destacou para potencial aplicação no melhoramento de vinhos, foi a espécie *A. pullulans* (linhagem 1A) com atividades de xilanase e β-glicosidase com características físico-químicas adequadas para vinificação.

Devido à baixa atividade enzimática encontrada para as demais leveduras isoladas e à presença de algumas espécies leveduras com potencial contaminante, uma possível etapa futura a ser realizada é a investigação de métodos de análise dos compostos prejudiciais produzidos por estas espécies, sempre com o objetivo de contribuir para a qualidade final do produto.

7. CONCLUSÕES

Este estudo avaliou a diversidade de leveduras isoladas da filosfera de uvas e mostos provenientes de uma vinícola artesanal na região de Jales (SP), com um total de treze diferentes espécies neste ecossistema. Este trabalho também mostrou o potencial de duas espécies isoladas na produção de β-glicosidases (*Cryptococcus laurentii* e *Aureobasidium pullulas*) e produção de xilanase por *A. pullulans*.

Esta pesquisa abre várias estratégias com relação à aplicação destas enzimas: (i) uso simultâneo de ambas as enzimas como enzimas exógenas suplementadas junto com as preparações enzimáticas de origem fúngica disponíveis atualmente para melhorar a liberação de compostos de aroma em meios ricos em glicose, como vinhos e sucos de fruta; (ii) construção de uma linhagem de *S. cerevisiae* expressando a atividade β-glicosidásica produzida por *Cryptococcus laurentii/Aureobasidium pullulans* ou ainda xilanásica de *A. pullulans* durante a fermentação do vinho, de modo que a levedura recombinante possa liberar compostos voláteis e assim, aumentar a qualidade sensorial do vinho; (iii) co-cultivo de *C. laurentii* e *Aureobasidium pullulans* com *S. cerevisiae* durante a fermentação do mosto para suplementar o meio com atividade glicosidásica e xilanásica.

Com relação à atividade xilanásica de *Aureobasidium pullulans* se mostrou bioquimicamente adequada para aplicação em processos fermentativos por apresentar os ótimos de atividade característicos deste ecossistema. Além disso, esta enzima pode ser utilizada outros procedimentos biotecnológicos como: sacarificação e fermentação no etanol de segunda geração, indústria de papel e celulose e ainda nas empresas têxteis.

Concluindo, esta linhagem de *A. pullulans* (linhagem 1A), isolada da superfície de uvas, na primeira etapa do trabalho, mostrou-se apta em produzir duas enzimas importantes para a produção de vinhos (uma β-glicosidase e uma xilanase), com características adequadas para o processo e que podem, futuramente, ser utilizadas em conjunto para melhorar a qualidade do vinho local produzido.

Este é o segundo estudo sobre a diversidade de leveduras selvagens de um ecossistema vinícola na região de Jales/SP. O potencial dos isolados, bem como suas enzimas, serão explorados como forma de aplicação no melhoramento dos vinhos da região. Os dados obtidos até o momento são extremamente interessantes, abrem novos caminhos e incentivam a continuidade do trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARÉVALO-VILLENA, M.; ÚBEDA-ÍRANZO, J.F.; OTERO, C.R.R.; BRIONES-PÉREZ. Optimization of a rapid method for studing the cellular location of β-glicosidase activity in wine yeasts. Journal of Applied Microbiology, v. 99, p 558-564, 2005.

ARÉVALO-VILLENA, M., ÚBEDA-IRANZO, J., BRIONES-PÉREZ, A. Enzymes biotechnology: β-glucosidase from wine yeasts and their contribution in Enology. Recent Research Development Microbiology, v. 10, p.31-55, 2006.

ARÉVALO-VILLENA, M., UBEDA IRANZO, J.F., GUNDLLAPALLI, S.B., CORDERO OTERO, R.R. AND BRIONES PEREZ, A.I. Characterization of an exocellular β-glucosidase from *Debaromyces pseudopolymorphus*. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, p.229-234, 2006b.

ARÉVALO-VILLENA, M., UBEDA IRANZO, J. F., BRIONES PEREZ, A. I. β - Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 420–425, 2007.

BAFFI, M.A., BEZERRA, C.S., ARÉVALO-VILLENA, M., BRIONES-PÉREZ, A.I., GOMES, E., DA SILVA, R. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. Ann Microbiol, v. 61, p. 75-78, 2011a.

BAFFI, M.A., TOBAL, T., LAGO, J.H.G., LEITE, R.S.R., BOSCOLO, M., GOMES, E., DA SILVA, R. ANovel β-Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and Application in Winemaking. Journal of Food Science, v. 76, p. 997-1002, 2011b.

BALEIRAS COUTO, M.M., REIZINHO, R.G., DUARTE, F.L. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. Int J Food Microbiol, v. 102, p.49–56, 2005.

BARBAGALLO R.N., SPAGNA G., ABBATE C., AZZARO G, PALMERI R. Inexpensive isolation of beta-D-glucopyranosidase from alpha-L-arabinofuranosidase, alpha-L- rhamnopyranosidase, and o-acetylesterase. Applied and Biochemical Biotechnology, v.101(1), p.1-13, 2002.

BARRAJÓN, N., ARÉVALO-VILLENA, M., RODRÍGUEZ-ARAGÓN, L.J., BRIONES, A. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. Food Control, v. 20(8), p.778-783, 2009.

BHADRA, B., SREENIVAS RAO, R., SINGH, P.K., SARKAR, P.K., SHIVAJI, S. Yeasts and Yeast-Like Fungi Associated with Tree Bark: Diversity and Identification of Yeasts Producing Extracellular Endoxylanases. Current Microbiology, v. 56, p. 489–494, 2008.

BOULTON, R.B. Teoria y práctica de la elaboración del vino. Viticultura para elaboradores de vino. Zaragoza: Acribia, p. 15-65, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.. Padrões de Identidade e Qualidade - Vinho, Derivados da Uva e do Vinho. Brasília, DF: Coordenação de Inspeção Vegetal e Serviço de Inspeção Vegetal. 25p, 1999.

CAMARGO, U. A. Impacto das cultivares brasileiras de uva no mercado interno e potencial no mercado internacional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho – Anais, p. 37-42, 2003. Disponível em http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais/cbve12/38-43.pdf. Acesso em 12 dezembro 2011.

CARIDI, A.; RAMONDINO, D. Biodiversita' fenotipica in ceppi di Hanseniaspora di origine enologica. Enotecnico, v. 45, p. 71-74, 1999

CATALUÑA, E. As uvas e os vinhos. Rio de Janeiro: Globo, 203p. 1998

CHAROENCHAI G., FLEET G.H., HENSCHKE P.A., TODD B.E.N. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. Australian Journal of Grape and Wine Research, v.3, p. 2-8, 1997.

CLEMENTE-JIMENEZ, J.F.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTINÉZ-RODRIGUÉS, S.; LAS HERAS-VÁSQUEZ, F.J., RODRÍGUEZ-VICO, F. Molecular charactherization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiology, v. 21, p. 149-155, 2004.

CORDERO OTERO, R., UBEDA- IRANZO, J., BRIONES-PEREZ, A., POTGIETER, N., ARÉVALO-VILLENA, M., PRETORIUS, S. VAN RENSBURG, P. Characterization of the β-glucosidase activity produced by enological strains of non- Saccharomyces yeasts. Journal of Food Science, v. 68, p. 2564-2569, 2003.

DA SILVA, R., LAGO, E., MERHEB, C., MACHIONE, M., PARK, Y. K., GOMES, E. Producction of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miehe. Brazilian Journal of Microbiology, v.36, p.235-241, 2005.

DANIEL, H.M., MEYER, W. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts International Journal of Food Microbiology, v. 86, p. 61– 78, 2003.

DESHPANDE, M.S., RALE, V.B., LYNCH, J.M. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. Enzyme Microbiology Technology, v.14, p.514–527, 1992.

DELCROIX, A., GUNATA, Z., SAPIS, J.C., SALMON, J.M., BAYONOVE, C. Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking, effect on the terpenol content of Muscat wine. Am. J. Enol. Viticul., v.45, p. 291-96, 1994.

DIMAKOPOULOU, M., TJAMOS, S.E, ANTONIOU, P.P., PIETRI, A., BATTILANI, P., AVRAMIDIS, N., MARKAKIS, E.A., TJAMOS, E.C. Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. Biological Control, v.46, p. 158–165, 2008.

DOCO, T., WILLIAMS, P., PAULY, M., O'NEILL, M. A., & PELLERIN, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. Carbohydrate Polymers, v. 53, p. 253-261, 2003.

DUPIN I., GUNATA Z., SAPIS J.C., BAYONOVE C. Production of β-apiosidase by *Aspergillus niger*: partial purification, properties and effect on terpenyl apiosylglucosides from grape. Journal of Agriculture and.Food Chemistry, v.40, p. 1886-1891, 1992.

ESTEVE-ZARZOSO, B., BELLOCH, C., URUBURU, F., QUEROI, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.85 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 49, p. 329-337, 1999.

FERNANDEZ-GONZALEZ, M., ESPINOSA, J.C., ÚBEDA, J.F., BRIONES, A.I. Yeasts Present During Wine Fermentation: Comparative Analysis of Conventional Plating and PCR-TTGE. Systematic and Applied Microbiology, v.24, p. 634–638, 2001.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., DI STEFANO, R. Y BRIONES, A.I. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. Food Microbiology, v. 20, p. 35-41, 2003.

FERNANDEZ-GONZÁLEZ, M., UBEDA, J. F., VASUDEVAN, T.G., CORDERO OTERO, R.R, BRIONES, A.I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. FEMS Microbiology Letters, v. 237, p. 261-266, 2004.

FERNANDEZ-GONZÁLEZ, M., UBEDA, J.F., CORDERO-OTERO, R.R., GURURAJAN, V.T., BRIONES, A.I. Engineering of an oenological *Saccharomyces*

cerevisiae strain with pectinolytic activity and its effect on wine. International Journal of Food Microbiology, v.102, p.173– 183, 2005.

FLEET, G.H. Wine microbiology and biotechnology. Hardwood Academic Publishers, Switzerland, 1993.

FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavor. Int. J. Food Microbiology, v. 86, p. 11-22. 2003

GONZÁLEZ-POMBO, P.; FARIÑA, L.; CARRAU, F.; BATISTA-VIERA, F.; BRENA, B.M. A novel extracellular β-glucosidase from Issatchenkia terrícola: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of White Muscat wine. Process Biochemistry, v. 46, p. 385-389, 2011.

GRBIN, P.R. Are indigenous yeast that important to wine production? Aust. Grapegrow. Winemaker, v. 427, p. 42-43, 1999.

GUERRA, C.C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M.C.; CAMARGO, U.A. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. EMBRAPA Uva e Vinho - CNPUV (Documentos), 2009. Bento Gonçalves, 69 p. Disponível em: < http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/documentos/doc048.pdf>. Acesso em: 20 set. 2010.

GUERRA, C.C.; ZANUS, M.C. Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado. Sistema de Produção - EMBRAPA Uva e Vinho - CNPUV, 2003. Bento Gonçalves, v.4. Versão eletrônica. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/colheita.htm>. Acesso em: 20 set. 2010.

GUEGUEN, Y., CHEMARDIN, P., JANBON, G., ARNAUD, A., GALZY, P. A very efficient h-glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. J. Agriculture Food Chemistry, v.44, p. 2336– 2340, 1996.

GUNATA, Z. , BAYONOVE, C., BAUMES, R.L, CORDONNIER, R. Stability of free and bound fractions of some aroma componentes of grapes cv. Muscat during wine processing, preliminary results. Am. J. Enol. Viticul. v. 37, p. 112-14, 1986.

GÜNATA Z., BRILLOUET J.M., VOIRIN S., BAUMES R., CORDONNIER R. Purification and some properties of an α-L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosyl glucosides. Journal of Agriculture and.Food Chemistry, v. 38, p. 772-776, 1990.

HEMINGWAY, K.M., ALSTON, M.J., CHAPPELL, C.G., TAYLOR, A.J. Carbohydrate-flavour conjugates in wine. Carbohydrate Polymers, v.38, p.283–286, 1999.

HERNANDEZ, L.F., ESPINOSA, J.C., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., BRIONES, A. β-Glucosidase activity in a Saccharomyces cerevisiae. Int. J. Food Microbiol., v. 80, p.171-76, 2002.

HERNANDEZ, L.F., ESPINOSA, J.C., FERNANDEZ-GONZALEZ, M., BRIONES, A. β-Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. International Journal of Food Microbiology, v.80, p.171– 176, 2003.

HUTZLER, P., FISCHBACH, R., HELLER, W., JUNGBLUT, T. P., REUBER, S., SCHMITZ, R., et al. Tissue localization of phenolic compounds implants by confocal laser scanning microscopy. Journal of Experimental Botany, v.49, p.953-965, 1998.

IEMBO, T., DA-SILVA, R., PAGNOCCA, F.C., GOMES, E. Production, characterization and properties of _-glucosidase and _-xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 38, p.549–52, 2002.

JEYARAM, K., MOHENDRO SINGH, W., 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, p.115–125, 2008.

JOLLY, N.P.; AUGUSTYN, O.P.H.; PRETORIUS, I.S. The role and use of non-Sccharomyces yeasts in wine production. S. Afr. J. Enol. Vitic., v. 27, n°1, p.15-39, 2006.

LE BOURVELLEC, C., BOUCHET, B., & RENARD, C. M. G. C.. Non-covalent Interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying. Biochimica and Biophysica Acta, v.1725, p.1-9, 2005a.

LE BOURVELLEC, C., BOUCHET, B., & RENARD, C. M. G. C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. Biochimica and Biophysica Acta, v.1725, p.10-18, 2005b.

LECAS, M., & BRILLOUET, J.-M. Cell wall composition of grape berry skins. Phytochemistry, v.35, p.1241-1243, 1994.

LEITE, R.S.R., GOMES, E., DA-SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified β-glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Process Biochemistry, v.42, p. 1101–1106, 2007.

LEITE, R.S.R., ALVES-PRADO, H. F., CABRAL, H., PAGNOCCA, F. C., GOMES, E., DA SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β-glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. Enzyme and Microbial Technology, v.43, p. 391–395, 2008.

LI, X.L., LJUNGDAHL, L.G. Expression of *Aureobasidium pullulans* xynA in, and secretion of the xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Environmental Microbiology, v.62, p.209–213, 1996.

LOPES, C.A., RODRÍGUEZ, M.E., SANGORRÍN, M., QUEROL, A., CABALLERO, A.C. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology, v.34, p.139–149, 2007.

LOPES, C.A., VAN BROOCK, M., QUEROL, A., CABALLERO, A.C. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. J. Appl. Microbiol., v.93, p.608–615, 2002.

LOUREIRO, V., MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. International J. Food Microbiol., v.86, p.23-50, 2003.

LOUW, C.L.A, GRANGE, D., PRETORIUS I.S., VAN RENSBURG, P. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour. Journal of Biotechnology, v.125, p. 447–461, 2006.

MAICAS, S., MATEO, J.J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. Applied and Microbiology Biotechnology, v.67, p.322-335, 2005.

MANZANARES, P., ROJAS, V., GENOVÉS S. Y VALLÉS, S. A preliminary search for anthocyanin-β-D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. International Journal of Food Science and Technology, v. 35, p. 95-103, 2000.

MARKHAM, K. R., GOULD, K. S., RYAN, K. G. Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals and its relevance to yellow flower colouration. Phytochemistry, v.58, p.403-413, 2001.

MARTINI, A., CIANI, M., SCORZETTI, G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. Am. J. Enol. Vitic., v. 47(4), 1996.

MARTORELL, P., BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA ,M., FERNANDEZ-ESPINAR, M.T.,.LOUREIRO, V., QUEROL, A. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. International Journal of Food Microbiology, v.106, p.79–84, 2006.

MATEO, J.J., DI STEFANO, R. Description of the β-Glucosidase activity of wine yeasts. Food Microbiology, v. 14, p. 583-591, 1997.

MATEO, J.J., JIMENEZ, M. Monoterpenes in grape juice and wines. Journal of Chromatography, v.881, p. 557-567, 2000.

MELLO, L.M.R. Tendências de consumo e perspectivas de mercado de vinhos no Brasil. EMBRAPA Uva e Vinho - CNPUV, 2002, Bento Gonçalves, 7p. Versão eletrônica. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/tendencia.pdf>. Acesso em: 30 set. 2010.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2006, 2007a. Artigo Técnico disponibilizado em 04/04/07 na pagina http://www.cnpuv.embrapa.br/. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

MELLO, L. M. R., Atuação do Brasil no mercado vitivinicola mundial – Panorama 2006, 2007b. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos em 23/05/07. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

MELLO, L.M.R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2008. Artigos Técnicos - EMBRAPA Uva e Vinho – CNPUV, 2008, Bento Gonçalves, 4p. Versão eletrônica. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>. Acesso em: 01 set. 2010.

MELLO, L.M.R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2009. Artigos Técnicos - EMBRAPA Uva e Vinho – CNPUV, 2009, Bento Gonçalves, 4p. Versão eletrônica. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>. Acesso em: 28 fev. 2010.

MELLO, L.M.R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2010. Artigos Técnicos - EMBRAPA Uva e Vinho - CNPUV. Bento Gonçalves, 4p. 2011. Versão eletrônica. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>. Acesso em: 24 mai. 2011.

MENDES FERREIRA, A., CLÍMACO, M.C., MENDES FAIA, A. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components-a preliminary study. Journal of. Applied Microbiology, v.91, p.67-71, 2001.

MCMAHON, H., ZOECKLEIN, B.W., FUGELSANG, K., JASINSKI, Y. Quantification of glycosidase activities in seleted yeasts and lactic acid bacteria. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., v. 23, p. 198-203, 1999.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31, 426-428, 1959.

MIKLÓSI, É., POLOS, V. Yeasts with β-Glucosidase activity: properties and possible application in winwmaking processes. Acta Alimentaria, v. 24, p. 167-80, 1995.

MORA, J.; MULET. A. Effect of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. Am. J. Enol. Vitic., v. 42, p, 133-136, 1991.

MORTIMER, R., POLSINELLI, M. On the origins of wine yeast. Research Microbiology, v.150, p. 199–204, 1999.

NOBRE, T. P., HORII, J., ALCARDE, A.R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27(1), p.20-25, 2007.

OHTA, K., MORIYAMA, S., TANAKA, H., SHIGE, T., AKIMOTO, H. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var.

melanigenum and sequence analysis of the encoding gene. Journal of Bioscience Bioengineering, v.92, p. 262–270, 2001.

PALMERI, R, SPAGNA, G. β-Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. Enzyme and Microbial Technology, v.40, p.382–389, 2007.

PARACHIN, N.S., SIQUEIRA, S., DE FARIA, F.P., GONCALVES TORRES, F.A., PEPE DE MORAES, L.M. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of *CfXYN1* in *Saccharomyces cerevisiae.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 59, p. 52-57, 2009.

PINELO, M.; ARNOUS, A., MEYER, A.S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. Trends in Food Science & Technology, v.17, p579-590, 2006.

PUNNAPAYAK, H., SUDHADHAM, M., PRASONGSUK, S., PICHAYANGKURA, S. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, v.30, p. 89–94, 2003.

PROTAS, J.F.S., CAMARGO, U.A., MELO, L.M.R. A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas, 2008. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitinicultura. Acesso em 05 nov. 2011.

RASPOR, P., MIKLIC MILEK, D., POLANC, J., SMOLE MOŽINA, S., CADEZ, N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. International Journal of Food Microbiology, 109: 97–102, 2006.

RENOUF, V., LONVAUD-FUNEL, A. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. Microbiol. Res., v. 162,p. 154-167, 2007.

RICCIO, P., ROSSANO, R., VINELLA, M., DOMIZIO, P., ZITO, F., SANSEVERINO, F., D'ELIA, A., ROSI, I. Extraction and immobilization in one step of two β-glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. Enzyme and Microbiology Technology, v. 24, p.123–129, 1999.

ROSI, I., VINELLA, M., DOMIZIO, P. Characterization of β-Glucosidase activity in yeast of enological origin. J.Appl. Bacteriol., v. 77, p. 519-527, 1994.

ROY I., GUPTA A., KHARE S.K., BISARIA V.S., GUPTA M.N. Immobilization of xylan-degrading enzymes from Melanocarpus albomyces IIS 68 on the smart polymer Eudragit L-100. Applied Microbiology Biotechnology, v. 61(4), p. 309-13, 2003.

SABATE, J., CANO, J., ESTEVE-ZARZOSO, B., GUILLAMÓN, J.M. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. Microbiology Research, v.157, p. 267–274, 2002.

SALAS, E., FULCRAND, H., MEUDEC, E., & CHEYNIER, V. Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p.7951-7961, 2003.

SANGORRÍN, M.P., ZAJONSKOVSKY, I.E., LOPES, C.A., RODRÍGUEZ, M.E., DE VAN BROOCK, M.R.G., CABALLERO, A.C. Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). Journal of Basic Microbiology, v.41(2), p.105–113, 2001.

SANGORRÍN, M. P., LOPES, C.A., GIRAUDO, M. R., CABALLERO, A.C. Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. International Journal of Food Microbiology, v.119, p. 351–357, 2007.

SATO, G. S. Vinhos Finos Brasileiros Em Busca Do Mercado Externo. Analises e Indicadores do Agronegócio, vol.1, n.8, Instituto de Economia Agrícola, 2006.

SCHENA, L., NIGRO, F., PENTIMONE, I., LIGORIO, A., IPPOLITO, A. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biology and Technology, v. 30, p. 209–220, 2003.

SHUANG-SHI LI, CHAO CHENG, ZHENG LI, JING-YU CHEN, BIN YAN, BEI-ZHONG HAN, MALCOLM REEVES. Yeast species associated with wine grapes in China. International Journal of Food Microbiology, v.138, p.85-90, 2010.

SPAGNA G., BARBAGALLO R.N., CASARINI D., PIFFERI P.G. A novel chitosan derivative to immobilize alpha-L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. Enzyme and Microbial Technology, v.28(4-5), p. 427-438, 2001.

STRAUSS, M., JOLLY, N.P., LAMBRECHTS, M., VAN RESBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non *Saccharomyces* wine yeasts. Journal of Applied Microbiology, v.91, p. 182-190, 2001.

SWANGKEAW, J., VICHITPHAN, S., BUTZKE, C.E., VICHITPHAN, K. The characterisation of a novel *Pichia anomala* β-glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. Ann Microbiol, v.59(2), p.335–43, 2009.

TANAKA, H., OKUNO, T., MORIYAMA, S., MUGURUMA, M., OHTA, K. Acidophilic Xylanase from *Aureobasidium pullulans*: Efficient Expression and Secretion in *Pichia pastoris* and Mutational Analysis. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.98(5), p. 338–343, 2004.

TOFALO, R., CHAVES-LÓPEZ, C., DI FABIO, F., SCHIRONE, M., FELIS, G.E., TORRIANI, S., PAPARELLA, A., SUZZI, G. Molecular identification and osmotolerant

profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. International Journal of Food Microbiology, v.130, p. 179–187, 2009.

TONIETTO, J. Afinal, o que é Terroir? Bon Vivant, v.8, n.98, p.8, União Brasileira de Vitivinicultura–Uvibra, 2007. Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/>. Acesso em: 10 set. 2010.

UBEDA, J., BRIONES, A. Characterization of differences in the formation of volatiles during fermentation within synthetic and grape must by wild *Saccharomyces* strains. Lebensm.-Wiss. Technology, v.33, p. 408–414, 2000.

VAN RENSBURG P., PRETORIUS I.S. Enzymes in wine-making: harnessing natural catalyst for efficient biotransformations: a review. South Africa Journal of Enology and Viticulture, v.21, p. 52-73, 2000.

VASSEROT, Y., CHERMARDIN, P., ARNAUD, A., GALZY, P. Purification and properties of a β-Glucosidase of Hanseniaspora vinea van der walt with a view to its utilization in fruit aroma liberation. J. Appl. Bacteriol., v. 66, p. 271-79, 1989.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. PCR protocols. A guide to methods and applications. In Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and With, T.J. p. 315–322. San Diego: Academic Press. 1990.

WILLIAMS P. J., STRAUSS G. R., WILSON B., MASSY-WESTROPP R. A. Novel monoterpene disaccharide glycosides of Vitis vinifera grapes and wines. Phytochemistry, v. 21, p.2013-2019, 1982.

YANAI, T., SATO, M. Isolation and properties of β-glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. American Journal of Enol. Vitic., v.50, p.231–235, 1999.

ZANOELO, F.F., POLIZELI, M.L.T.M., TERENZI, H.F., JORGE, J.A. β-Glucosidase activity from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. FEMSMicrobiol Lett., v.240, p.137–43, 2004.