

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS AUTÓCTONES A PARTIR DE FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DE UVAS CV. TANNAT DO MUNICÍPIO DE DOM PEDRITO-RS

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AUTÓCHTHONOUS YEASTS FROM SPONTANEOUS FERMENTATION OF TANNAT GRAPES FROM DOM PEDRITO-RS REGION

Tiago Stein

Graduando em Enologia
Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito - RS, Brasil
tiago.stein@outlook.com

Bruno Jacobs

Bacharel em Química Ambiental
Técnico Administrativo em Educação na Universidade Federal do Pampa
Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito – RS, Brasil
brunojacobs@unipampa.edu.br

João Pedro da Rosa

Graduando em Enologia
Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito - RS, Brasil
joao.pedro_rosa@hotmail.com

Gabriela Hermann Pötter

Engenheira Agrônoma
Diretora Técnica na Guatambu Estância do Vinho
Guatambu Estância do Vinho
Dom Pedrito - RS, Brasil
gabriela@estanciaguatambu.com.br

Fernando Zocche

Médico Veterinário, Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Professor Adjunto da Universidade Federal do Pampa
Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito, Brasil
fernandozocche@unipampa.edu.br

Renata Gimenez Sampaio Zocche

Engenheira Agrônoma, Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Professora Adjunta na Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito - RS, Brasil
renatazocche@unipampa.edu.br

Suziane Antes JacobsBacharel em Química, Doutora em Biotecnologia
Professora Adjunta na Universidade Federal do Pampa
Dom Pedrito - RS, Brasil
suzianeantes@unipampa.edu.br* **Recebido em: 28/07/2017*** **Aceito em: 17/08/2018**

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar os grupos de leveduras que se desenvolvem nas diferentes etapas do processo de fermentação alcoólica espontânea de uvas cv. Tannat, produzidas no município de Dom Pedrito-RS. Os processos de colheita e microvinificação foram conduzidos de forma a não contaminar o material de estudo. Parcelas de 2 μ L de amostra do mosto, mosto em fermentação e vinho final foram semeadas em placas de Petri contendo meio Yeast Extract Peptone Dextrose (YEED) suplementado com cloranfenicol, e incubadas a 29°C. Após, foi realizado o isolamento das colônias. Foram realizados testes de tolerância à temperatura e capacidade fermentativa para 52 cepas isoladas. Entre as leveduras analisadas, destacaram-se as isoladas no vinho, onde 70% apresentou alta capacidade fermentativa, enquanto as leveduras isoladas do mosto e do mosto em fermentação apresentaram entre muito baixa e média capacidade fermentativa. Sabendo-se que leveduras do tipo não-*Saccharomyces* são capazes de fermentar, produzindo no máximo 6-8% de álcool, enquanto cepas de *Saccharomyces* são capazes de atingir 14-18% de álcool, pode-se concluir que no mosto predominam cepas do tipo não-*Saccharomyces* e que, com o aumento da graduação alcoólica vão dando espaço às *Saccharomyces*, sendo estas responsáveis pela conclusão da fermentação alcoólica.

Palavras-chave: Capacidade Fermentativa; *Saccharomyces*; Microvinificação.

ABSTRACT

The objective of the present work was to isolate and characterize the yeasts groups that develop in the different stages of the spontaneous alcoholic fermentation process of 'Tannat', produced in Dom Pedrito-RS region. The collection and microvinification processes were conducted in a way that did not contaminate the study material. Plots of 2 μ L of wort sample, must in fermentation and final wine were seeded on Petri plates containing Yeast Extract Peptone Dextrose (YEED) medium supplemented with chloramphenicol and incubated at 29 °C. Afterwards, the colonies were isolated. Temperature tolerance and fermentative capacity tests were performed for 52 isolates. Among the analyzed yeasts were those isolated in the wine, where 70% presented high fermentative capacity, while the yeasts isolated from the must and the fermenting must presented between very low and medium fermentative capacity. Knowing that yeasts of the non-*Saccharomyces* type are capable of fermenting, producing at most 6-8% alcohol, while *Saccharomyces* strains are capable of reaching 14-18% alcohol, it can be concluded that in the must predominate strains of type non-*Saccharomyces* and that, with the increase of the alcoholic degree, give space to the *Saccharomyces*, being these responsible for the conclusion of the alcoholic fermentation.

Keywords: Fermentative Capacity; *Saccharomyces*; Microvinification.

1. INTRODUÇÃO

A Campanha Gaúcha é uma região relativamente extensa, situada a uma latitude média de 31° S na fronteira com o Uruguai. É parte de duas províncias geomorfológicas – o Planalto Meridional, ao Oeste, e a Depressão Central, a Leste. Caracteriza-se por campos limpos, formados por tapetes herbáceos baixos e densos com a presença de matas – galerias remanescentes e, em parte, por zona agrícola de uso intensivo de verão. A paisagem predominante é o pampa, formando coxilhas com altitudes que geralmente variam entre 100 e 200m. A rocha mãe é o arenito, e os solos são de média a alta profundidade e medianamente férteis (MALUF, 2000; CAMARGO, 1991).

Como alternativa de diversificação da matriz produtiva, a viticultura apresenta-se com potencial e destaque frente a outras culturas já consagradas, como por exemplo, a sojicultura. A metade sul do Rio Grande do Sul está situada no paralelo 31°, assim como as regiões mundialmente conhecidas como produtoras de vinhos de excelente qualidade (ZOCHE et al, 2016). O clima se destaca por ser seco e quente nos meses de Novembro a Março, meses que antecedem a colheita, condição essencial para a maturação, o que confere qualidade às uvas.

Hoje em dia, uma das principais metas do setor vinícola é melhorar a qualidade do vinho, elaborando vinhos que satisfaçam a demanda dos consumidores e ampliando a oferta de vinhos de qualidade. A expressão “*terroir*”, definida como um ecossistema no qual a videira está condicionada aos fatores ambientais (solo e clima) afetando a qualidade e a tipicidade do vinho produzido em determinada região, refere-se ao conceito básico durante a degustação (JIANG et al., 2013; STYGER; PRIOR; BAUER, 2011). Diversos fatores econômicos e sociais, como a concorrência internacional no mercado do vinho e demandas dos consumidores por vinhos com estilos inovadores, estão oferecendo novos desafios na vinificação. Neste contexto, produtores de vinho estão convencidos de que a qualidade do vinho “*premium*” é dada por meio de métodos tradicionais baseados na fermentação espontânea utilizando leveduras autóctones, que podem originar vinhos de características únicas e inovadoras, particularmente apreciados pelos consumidores especializados.

Além da tipicidade, outros fatores influenciam a utilização de cepas nativas para vinificação, como a produção de vinhos orgânicos e/ou biodinâmicos. O alimento orgânico biodinâmico apresenta alta qualidade biológica, sendo isento de substâncias nocivas à saúde humana, visando à sustentabilidade econômica, social, cultural e ambiental, proveniente do sistema de cultivo que observa as leis da natureza e todo o manejo agrícola está baseado no respeito ao meio ambiente (Brasil, 1999). Segundo o Instituto Biodinâmico – IBD (2017), que é uma das instituições que certificam esses alimentos no Brasil, o mercado brasileiro desse tipo de alimento teve taxas de crescimento de 30% a 50% ao ano, e já é a segunda maior área de agricultura orgânica do mundo.

No Brasil, uma das principais regiões para a produção de vinhos finos é a Campanha, participante do Pampa Gaúcho (Latitude 30° S, Longitude 54° W; altitude de 100-300m). A região se caracteriza por ter solo arenoso, com boa drenagem, clima temperado com verões quentes e secos, pluviosidade média anual de 1.370 mm, amplitude térmica média no verão de 17 °C, e radiação total média de 2.372h (INMET, 2017). Os vinhos oriundos dessa região têm tido destaque no cenário nacional e internacional, no entanto, há necessidade de investir-se na elaboração de produtos com características únicas. A caracterização e identificação de leveduras com potencial enológico na região do Pampa Gaúcho entra nesse cenário como um elemento inovador, para serem utilizadas individualmente ou em associação com outras leveduras, agregando valor ao vinho.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A conversão do mosto da uva em vinho é promovida por um processo de fermentação, que ocorre naturalmente pela ação de leveduras autóctones, e que contribuem significativamente para as características químicas e organolépticas do produto final (FLEET, 2003). A função principal das leveduras enológicas é garantir a conversão rápida e completa do açúcar de uva em etanol, dióxido de carbono, e metabólitos secundários, evitando a produção de defeitos (JIMÉNEZ-MARTÌ et al., 2011). Embora muitos compostos do vinho estejam relacionados diretamente às uvas, parte essencial do sabor do vinho é alcançada durante o processo de fermentação alcoólica (ILIEVA et al., 2015). É amplamente conhecido que a diversidade de leveduras autóctones é responsável pela produção de vinhos com qualidade diferenciada por originar produtos de sabor peculiar, pois desempenham um papel central no desenvolvimento de sabor e aroma do vinho, como resultado de seus mecanismos bioquímicos e metabólicos (FLEET, 2003; LOIRA et al., 2015; MEDINA et al., 2013).

Para o processo de vinificação, um dos mais importantes avanços tecnológicos tem sido o uso de culturas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* para a inoculação em mosto de uva. Isto porque o controle microbiológico do processo de fermentação permite uma melhor gestão da fermentação alcoólica, garantindo qualidade e predição das suas características (MOLINA et al., 2009). No entanto, são as espécies não-*Saccharomyces* que dominam a fase inicial de processo de vinificação, e podem persistir durante outros estádios da vinificação, sendo também responsáveis pela fermentação alcoólica, podendo afetar o estilo do produto final (CONTRERAS et al., 2015).

Leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* (SC) está incluída no Domínio *Eukaryota*, Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae*, Gênero *Saccharomyces* e espécie *cerevisiae*. São fungos unicelulares diplóides que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou sexuada por esporulação (meiose, segregação e formação de haplóides). *S. cerevisiae* consiste em células com aproximadamente 3µm de diâmetro que são capazes de dividirem-se a cada 90 minutos em condições nutricionais adequadas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003; SUÁREZ-LEPE e IÑIGO LEAL, 2004).

O gênero *Saccharomyces* teve inúmeras mudanças taxonômicas ao longo dos anos. Atualmente, de acordo com a última revisão taxonômica, 14 espécies são aceitas dentro do gênero *Saccharomyces*, as quais estão classificadas em três grupos. O complexo *Saccharomyces sensu lato* inclui *Saccharomyces barnettii*, *Saccharomyces castellii*, *Saccharomyces dairenensis*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces rosinii*, *Saccharomyces servazzii*, *Saccharomyces spencerorum*, *Saccharomyces transvaalensis* e *Saccharomyces unisporus*. O segundo grupo inclui *Saccharomyces kluyveri*. O terceiro grupo, o qual inclui espécies de interesse biotecnológico, consiste do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, compreendendo *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, todos associados com fermentação industrial, e *Saccharomyces paradoxus*, a única espécie *Saccharomyces sensu stricto*, tipicamente isolada a partir de habitat natural (insetos, árvores e exsudatos). Recentemente, três novas espécies isoladas a partir de habitat natural, *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzvi* e *Saccharomyces mikatae*, têm sido incluídas dentro do grupo *Saccharomyces sensu stricto* (QUEROL E BELLOCH, 2003).

Segundo Querol et al. (2003), a fermentação alcoólica é uma das principais fases da produção de vinho e é geralmente conduzida por leveduras pertencentes a espécies de *Saccharomyces cerevisiae*. As cepas nativas e industriais de *S. cerevisiae* são organismos altamente especializados, que evoluíram para utilizar todo o seu potencial nos diferentes

ambientes ou nichos ecológicos. Assim, durante a fermentação alcoólica, as leveduras foram adaptadas aos diferentes tipos de condições, tais como o estresse oxidativo, osmótico e etanólico. Condições extremas como essas, podem conduzir a uma redução na velocidade de crescimento e taxa de sobrevivência e, portanto, tendem a reduzir a eficiência de fermentação. A melhor e mais rápida levedura é capaz de adaptar-se às mudanças no ambiente, aumentando a probabilidade de ser espécie dominante durante o processo de vinificação.

Para espécies não-*Saccharomyces* (NS), podem ser citadas como representativas no processo enológico *Torulasporea delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplinina*, *Lachancea thermotolerans* e *Hanseniaspora uvarum* (RODRÍGUEZ et al, 2010; COMITINI et al, 2011; MEDINA et al, 2012.; SADOUDI et al, 2012.; GOBBI et al, 2013; MEDINA et al., 2013).

Recentemente, tem havido um interesse crescente na valorização de cepas não-*Saccharomyces* em cultura mista com *S. cerevisiae* para produção de vinho (COMITINI et al., 2011; SADOUDI et al., 2012; GOBBI et al., 2013; MEDINA et al., 2013). Estes estudos demonstraram que as espécies não-*Saccharomyces* poderiam ter tanto influências benéficas como negativas sobre as características de fermentação de vinhos. Para o aspecto benéfico, algumas espécies não-*Saccharomyces* foram testados para modificar positivamente a composição química do vinho, contribuindo especialmente para as características sensoriais (WHITENER et al., 2015). Como impacto negativo, o crescimento de certas cepas não-*Saccharomyces* em mostos de uvas podem causar o desenvolvimento e interações antagonistas entre leveduras, e levarem a excessivo acúmulo de vários metabólitos indesejáveis, tais como ácido acético, acetato de etila, aldeído, e de acetoina. Outra preocupação é que, algumas espécies não-*Saccharomyces*, quando se desenvolvem durante a fermentação, diminuem o poder de fermentação, bem como a tolerância ao etanol e/ou dióxido de enxofre (SO₂), havendo a necessidade de se conduzir cofermentação. Portanto, o emprego de cepas não-*Saccharomyces* ainda não é uma prática comum, sendo que novos e mais exaustivos estudos são necessários para o conhecimento da influência de inoculação microbiana no início da elaboração de vinhos.

3. MÉTODO

3.1. Matéria-prima

Para a elaboração do vinho, foram utilizadas uvas da cv. Tannat, produzidas na região da Campanha do RS, em vinhedo localizado em latitude 30°559.089'S, longitude 54°27.257' W. A colheita das uvas foi realizada ao acaso, no estádio de maturação industrial, baseada nas análises de acidez total e açúcares, onde se preconiza o máximo de açúcares e o mínimo de acidez necessários. As uvas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis.

3.2. Elaboração do Vinho

Para a elaboração do vinho foram utilizados materiais esterilizados e todo procedimento foi conduzido em câmara de fluxo laminar, previamente higienizada com álcool 70% e luz UV por 25 minutos. O vinho foi elaborado através do método clássico de vinificação. As uvas foram desengaçadas e esmagadas manualmente e colocadas em erlenmeyer com capacidade para 2 litros, em triplicata. Os recipientes foram tampados com buchas apropriadas e colocados em “shaker” (70 rpm e 29°C) para iniciar a fermentação. Após o início da fermentação, os recipientes foram retirados do shaker e acondicionados em local com temperatura controlada (22°C). Foram realizadas três remontagens diárias até o 6º dia, quando realizou-se a descuba. Após, os vinhos continuaram o processo fermentativo até a

total conversão dos açúcares em álcool.

Isolamento das culturas

Foram coletadas alíquotas de 1 μ L, para isolamento dos microrganismos, nas seguintes etapas de elaboração do vinho: obtenção do mosto, mosto em fermentação e vinho final.

As amostras foram semeadas em meio Yeast Extract Peptone Glycerol (YPG) e incubadas a 30°C por 72 horas. Após esse período, foi realizada a seleção de 5 a 10 colônias típicas de leveduras que foram posteriormente semeadas em meio YPG suplementado com 6 g/L ácido tartárico e incubadas. As colônias foram cultivadas em meio YPG suplementado com 30 mg/ml de cloranfenicol e incubadas a 30°C por 72 horas. As colônias isoladas foram cultivadas e conservadas em placas contendo YPG a 4°C.

3.3. Teste de tolerância à temperatura

Os isolados e a levedura controle foram semeadas em placas de Petri contendo meio sólido Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) e colocadas em estufas com diferentes temperaturas durante 72 horas. Para verificar o efeito da temperatura no crescimento foram empregados 29°C, 35°C e 42°C (Adaptado de Guimarães, 2006).

3.4. Teste de Capacidade fermentativa

A capacidade fermentativa das leveduras isoladas, foi verificada em tubos de ensaio contendo tubos de Durham invertidos, 10 mL de mosto para fermentação e, um volume de inóculo das leveduras isoladas contendo 10⁷ unidades formadoras de colônia (UFC) (Adaptado de Anchorena-Matienzo, 2002).

4. RESULTADOS

As leveduras isoladas a partir do mosto apresentaram 100% de crescimento a 29°C e crescimento nulo a 42°C, e todas tiveram baixa ou nula capacidade fermentativa. Das leveduras isoladas a partir do mosto em fermentação, 100% apresentou crescimento a 29°C e destas, 30% foram capazes de crescer a 42°C, 54% apresentou baixa ou nula capacidade fermentativa, 25% apresentou média capacidade fermentativa e 21% apresentou alta capacidade fermentativa. Para as leveduras isoladas do vinho final, 100% apresentou crescimento a 29°C e 40% para 42°C, 30% apresentou média capacidade fermentativa e 70% apresentou alta capacidade fermentativa (Tabela 1). Marsit e Dequin (2015) afirmam que mesmo em fermentações espontâneas, leveduras do tipo *Saccharomyces* dominam a fermentação e é são principal espécie responsável pela conversão de açúcares em etanol e CO₂.

O processo de fermentação alcoólica envolve uma série de reações bioquímicas para a transformação do açúcar em álcool. Durante esse processo, que é exotérmico, as temperaturas podem aumentar muito influenciando o desempenho das leveduras que não possuem tolerância a temperaturas mais elevadas. Flanzly (2003) observou que as temperaturas afetam numerosas atividades enzimáticas, onde as altas temperaturas induzem a uma mortalidade exponencial de leveduras. No Brasil, segundo a legislação vigente, vinhos tranquilos devem apresentar entre 8,6 e 14% de álcool (v/v), e espumantes entre 10 e 13% de álcool (v/v) (BRASIL, 1988). Assim, leveduras que atingem essas concentrações são consideradas aptas para uso comercial. Com base nessas informações as leveduras que foram isoladas do vinho final, possuem potencial para sua utilização comercial devido a sua tolerância à temperatura e sua capacidade fermentativa, no entanto, são necessários outros testes como forma de poder

concluir que essas leveduras são realmente aptas ao processo de vinificação comercial.

TABELA 1. Testes de tolerância à temperatura e capacidade fermentativa de leveduras isoladas a partir de fermentação espontânea

Isolados	Teste de Tolerância à temperatura	Teste de Capacidade Fermentativa
Controle	2	2
MT1	0	0
MT2	0	0
MT3	0	0
MT4	0	0
MT5	0	0
MT6	0	0
MT7	0	0
MT8	1	0
MT9	0	0
MT11	0	0
MT13	0	0
MT14	1	0
MT16	1	0
MT17	1	0
MT18	0	0
MFT1	1	1
MFT2	0	0
MFT3	0	0
MFT5	2	1
MFT6A	2	2
MFT6C	2	2
MFT7	1	1
MFT8	0	0
MFT9	1	0
MFT10	0	0
MFT11	1	1
MFT12	1	0
MFT14	0	1
MFT15	1	2
MFT17	0	0
MFT18	0	0
MFT21	2	2
MFT23A	1	2
MFT23B	0	1
MFT25	1	0
MFT28	2	0
MFT29	1	0
MFT32	0	0

MFT33	0	0
VT1A	2	2
VT1D	2	1
VT2	2	2
VT3	2	2
VT4A	2	1
VT4B	2	2
VT5	2	2
VT6	1	2
VT7	2	2
VT8	2	1
VT11	0	2
VT12A	2	2
VT12C	2	1

MT – mosto Tannat; MFT – mosto em fermentação Tannat; VT – vinho Tannat
2: Alta; 1: Média; 0: Baixa/Nula.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final deste estudo, percebeu-se que no mosto, predominam cepas do tipo não-*Saccharomyces*, que, com o início da fermentação alcoólica e aumento da graduação alcoólica do mosto em fermentação, vão dando espaço para as *Saccharomyces*, que possuem mais condições em suportar graduações alcoólicas maiores, concluindo assim a fermentação alcoólica.

O isolamento de leveduras demonstrou que, a maioria das leveduras isoladas não estão aptas a processos comerciais de fermentação e elaboração de vinhos, por não possuírem capacidade fermentativa adequada, prejudicando assim o processo da fermentação alcoólica.

Em minoria, foram encontradas leveduras aptas a processos comerciais de fermentação, por possuírem alta capacidade fermentativa e de tolerância a temperatura, tendo em vista que nos processos fermentativos existe aumento de graduação alcoólica e variação de temperatura. Estas leveduras foram isoladas do vinho final, resistindo todas as condições que se apresentam durante o processo fermentativo, no entanto, são necessárias análises tecnológicas complementares, morfológicas e moleculares para identificação das espécies e para que as leveduras selecionadas neste estudo sejam utilizadas no processo comercial de elaboração de vinhos.

Os resultados encontrados são de grande importância, como forma identificar leveduras com potencial de serem utilizadas em processos produtivos comerciais, podendo assim, expressar de maneira mais eficaz no vinho, o “*terroir*” da região da Campanha Gaúcha, possibilitando revelar a tipicidade das variedades cultivadas nessa região.

REFERÊNCIAS

ANCHORENA-MATIENZO, P. Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares. 65f. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

BRASIL. Instrução normativa nº 7, de 17 de maio de 1999. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 mai. 1999. Seção 1, p. 11.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 dez. 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/1980-1988/L7678.htm#art9>. Acesso em: 28 set. 2017.

CAMARGO, A.P. de. Classificação climática para zoneamento de aptidão agroclimática. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, Viçosa, MG. **Anais...**, Viçosa: Sociedade Brasileira de Agrometeorologia/Universidade Federal de Viçosa, 1991. p.126-131.

COMITINI, F. et al. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v.28, p.873–882, 2011.

CONTRERAS, A. et al. The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. **International Journal Food Microbiology**, v.205, p.7–15, 2015.

FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos y tecnológicos**. Mundi-Prensa: Madrid. 2003. 797 p.

FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal Food Microbiology**. v.86, p.11–22, 2003.

GOBBI, M. et al. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. **Food Microbiology**. v.33, p.271–281, 2013.

GUIMARÃES, T.M. et al. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.119–126, 2006.

IBD CERTIFICAÇÕES. Disponível em: <<http://www.ibd.com.br/pt/IBDNews.aspx>>. Acesso em: 22 de Setembro de 2017.

ILIEVA, F. et al. The impact of some wine-making practices on the quality of Vranec red wines from Macedonia produced by the newly-selected local strain “F-78”. **Food Chemistry**, v.194, p.1123-1131, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>>. Acesso em: 22 de Setembro de 2017.

JIANG, B.; XI, Z.; LUO, M.; ZHANG, Z. Comparison on aroma compounds in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from four wine grape-growing regions in China. **Food Research International**, n. 51, p. 482–489, 2013.

JIMÉNEZ-MARTÍ, E. et al. Towards an understanding of the adaptation of wine yeasts to must: relevance of the osmotic stress response. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89(5), p.1551-1561, 2011.

LOIRA, I. et al. Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulasporea delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. **Food Research**

International, v.76, p.325-333, 2015.

MALUF, J. R. T. Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.8, n.1, p.141-150, 2000.

MARSIT, S., DEQUIN, S. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. **FEMS Yeast Research**, v.15, n.7, p.1-12, 2015.

MEDINA, K. et al. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.157(2), p.245-250, 2012.

MEDINA et al. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. **Food Chemistry**, v.141(3), p.2513-2521, 2013.

MOLINA, A. et al. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. **Food Chemistry**, v.117(2), p.189-195, 2009.

QUEROL, A., BELLOCH, C. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. **International Microbiology**, v.6, p.201-205, 2003.

QUEROL, A. et al. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p.3-10, 2003.

RIBÉREAU- GAYON, P., DUBORDIEU, D., DONÈCHE, B., LONVAUD, A. **Tratado de Enología: Microbiología del vino, Vinificaciones**. Mundi Prensa: Madrid. 2003. 655p

RODRÍGUEZ, M.E. et al. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. **International Journal of Food Microbiology**, v.138 (1-2), p.19-25, 2010.

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

STYGER, G.; PRIOR, B.; BAUER, F. F. Wine Flavor and Aroma. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.38, p.1145– 1159, 2011.

SUÁREZ-LEPE, J. A., ÍÑIGO LEAL, B. (2004). **Microbiología Enológica: Fundamentos de vinificación**. Mundi Prensa: Madrid. 3ª Ed. 716p.

WHITENER, M. E. B. et al. Early fermentation volatile metabolite profile of non-*Saccharomyces* yeasts in red and white grape must: A targeted approach. **LWT - Food Science and Technology**, v.64, p.412-422, 2015.

ZOCHE, R. G. S. et al. Characterization of ‘Cabernet Sauvignon’ wine made with grapes from Campanha- RS Region. **African Journal of Agricultural Research**, v.11(42), p.4262-4268, 2016.