

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ADSORÇÃO DE ANTOCIANINAS POR LEVEDURAS E SUA  
INFLUÊNCIA NA COLORAÇÃO DE VINHOS**

**MORGANA MENEGOTTO**

CAXIAS DO SUL

2021

**MORGANA MENEGOTTO**

**ADSORÇÃO DE ANTOCIANINAS POR LEVEDURAS E SUA  
INFLUÊNCIA NA COLORAÇÃO DE VINHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutora em Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Longaray Delamare

**Coorientador:** Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

CAXIAS DO SUL

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M541a Menegotto, Morgana

Adsorção de antocianinas por leveduras e sua influência na coloração de vinhos [recurso eletrônico] / Morgana Menegotto. – 2021.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

Orientação: Ana Paula Longaray Delamare.

Coorientação: Sergio Echeverrigaray Laguna.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Vinho - Coloração. 2. Pigmentos - Absorção e adsorção. 3. Leveduras. 4. Fermentação. 5. Sobrevivência celular. I. Delamare, Ana Paula Longaray, orient. II. Laguna, Sergio Echeverrigaray, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 663.2-035.67

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

# **Adsorção de antocianinas por leveduras e sua influência na coloração de vinhos**

**Morgana Menegotto**

Tese submetida a banca examinadora designada pela coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em 15 de dezembro de 2021.

## **Banca Examinadora**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Longaray Delamare  
Universidade de Caxias do Sul – UCS

---

Prof. Dr. Sergio Echeverigarray  
Universidade de Caxias do Sul – UCS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Rossi Marcon  
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Baldasso  
Universidade de Caxias do Sul – UCS

---

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon  
Universidade de Caxias do Sul – UCS

## AGRADECIMENTOS

Ao finalizar esta tese de doutorado, agradeço a todos, que de alguma forma fizeram parte da realização deste trabalho.

À Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio da bolsa taxa concedida.

Aos meus familiares, pelo apoio contínuo.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos proporcionados durante a realização do doutorado.

Aos orientadores, Ana Paula Longaray Delamare e Sergio Echeverrigaray, pelos ensinamentos oportunizados durante o período de orientação e desenvolvimento da tese.

Aos colegas pelo apoio e momentos de descontração.

Muito obrigada!

"Existe mais filosofia numa garrafa de vinho do que em todos os livros."

Louis Pasteur



"O bom vinho é um camarada bondoso e de confiança, quando tomado com sabedoria."

William Shakespeare

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .	14
3.1 PROCESSOS DE ELABORAÇÃO DE VINHOS .....	14
3.1.1 Leveduras na elaboração de vinhos .....	16
3.1.2 Fermentação alcoólica na elaboração de vinhos .....	19
3.2 ANTOCIANINAS E COLORAÇÃO NOS VINHOS .....	20
3.3 PRÁTICAS ENOLÓGICAS E A COLORAÇÃO DOS VINHOS .....	27
3.4 EFEITOS DE LEVEDURAS NA COLORAÇÃO DE VINHOS.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1 CAPÍTULO 1 .....	32
<b>A SIMPLE AND RELIABLE METHOD FOR THE QUANTITATIVE EVALUATION OF ANTHOCYANIN ADSORPTION BY WINE YEASTS</b>	
4.2 CAPÍTULO 2 .....	44
<b>ANTHOCYANIN ADSORPTION BY SACCHAROMYCES CEREVISIAE DURING WINE FERMENTATION IS ASSOCIATED TO THE LOSS OF YEAST CELL WALL/MEMBRANE INTEGRITY</b>	
5. CONCLUSÕES GERAIS .....	62
6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES .....	63

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Table 1</b> - Color intensity and relative pigments adsorption (means and standard deviations) of twenty commercial wine yeast strains on musts from three red grape varieties.....	41
--	----

### CAPÍTULO 2

<b>Table 1</b> - Cell viability, relative pigment adsorption, and adsorbed anthocyanins by control and death/permeabilized yeast cells.....	56
---	----



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fluxograma do processo clássico de vinificação em tintos .....	15
<b>Figura 2</b> – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . A) Aspectos macroscópicos da cultura; B) Micrografia eletrônica de varredura do estágio de reprodução assexuada por brotamento; C) Estrutura celular.....	17
<b>Figura 3</b> – Estrutura molecular básica das antocianinas .....	22
<b>Figura 4</b> – Pigmentos derivados de antocianinas encontrados em vinhos tintos.....	23
<b>Figura 5</b> – Metabólitos de leveduras envolvidos na transformações de antocianinas .....	24
<b>Figura 6</b> – Equilíbrio entre as diferentes formas estruturais de antocianinas em vinhos tintos.....	25

### CAPÍTULO 1

**Figure 1** - An example of an yeast pigments adsorption plate showing high reproducibility, and variation among yeast strains in musts from two grape varieties (Ives – *V. labrusca*, and Merlot – *V. vinifera*), and yeast background color in a white must (Niagara). Yeast strains (columns; rows): Red Fruit (1–3; A,D,G), Rouge (4–6; A,D,G), Y904 (7–9; A,D,G), QA23 (10–12; A,D,G), EC1118 (1–3; B,E), UCD522 (4–6; B,E), F15 (7–9; B,E), Spark (10–12; B,E), BP725 (1–3; C,F), Elegance(4–6; C,F), TPI-4 (7–9; C,F), CY3079 (10–12; C,F)..... 37

**Figure 2** - Two main factors that influence the evaluation of relative pigments adsorption: (A) the effect of cell number per sample (A): Red Fruit (light grey) and F33 (dark grey), and (B) the effect of yeast population (open circles) and yeast pigments adsorption (close circles) along wine fermentation. Data represent means and standard deviations from three replications..... 39

**Figure 3** - Relation between (A) red (red squares), green (green squares), blue (blue squares) values and RGB means, and (B) between red, green, blue, and RGB (open circles) and wine color intensity. Data are mean values of twelve commercial wine yeast strains..... 40

## CAPÍTULO 2

**Figure 1** - Flow cytometry of anthocyanin adsorbing (high fluorescent) and nonadsorbing (low fluorescent) yeast cells (50:50 mixture) with an excitation wavelength of 488 nm, and filters 533/30 (FL1), 585/42 (FL2), and long pass 670 nm (FL3)..... 50

**Figure 2** - Wine fermentation profile (lines) and relative pigment adsorption (bars) of a high (A- Red Fruit) and a low (B- Rouge) anthocyanin adsorbing strains..... 51

**Figure 3** - Fluorescence (anthocyanin adsorption) of yeast cells throughout the fermentation of red wine (Tannat Merlot): A- Red Fruit, and B-Rouge..... 52

**Figure 4** - Anthocyanin adsorption of yeast cells (A) and yeast color (B) of five wine yeast strains after 16 days fermentation of a Tannat-Merlot must..... 53

**Figure 5** - Relation between the percentage of pigment adsorbing cells (high fluorescent cells) and cell viability (Trypan Blue staining) along Red Fruit red wine fermentation (A), and high/medium/low yeast adsorbing strains at the end of alcoholic fermentation (B)..... 54

**Figure 6** - Yeast cell fluorescence and Trypan Blue staining of Red Fruit (A) and Rouge (B) cells at the middle of a Tannat-Merlot must fermentation (7 days). Green arrows- fluorescent/Trypan Blue colored cells; black arrows- non-fluorescent/Trypan blue uncolored cells.....54

## RESUMO

A intensidade e a tonalidade de coloração de vinhos tintos estão entre os principais atributos de qualidade do produto final. A coloração dos vinhos tintos é dependente da concentração de pigmentos, principalmente as antocianinas, que são extraídas das cascas das uvas durante o processo de fermentação. As leveduras podem reduzir a intensidade da cor e modificar a tonalidade do vinho por meio da adsorção direta de pigmentos, entretanto a forma como esse processo ocorre ainda precisa ser elucidado. Além disso, os métodos existentes atualmente para a avaliação da capacidade de adsorção de pigmentos por leveduras são limitados, em geral são demorados e inadequados para um grande número de linhagens. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um método para a avaliação da adsorção de pigmentos por leveduras em vinhos, e elucidar os fatores que determinam a adsorção diferencial desses pigmentos por diferentes linhagens de leveduras durante a fermentação vínica. Inicialmente, 22 linhagens de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae*, três linhagens não comerciais *S. cerevisiae* e uma linhagem não comercial de levedura *Torulaspora delbrueckii* foram utilizadas em micro fermentações de mostos das variedades de uva Merlot, Cabernet Sauvignon e Ives. As fermentações (800 µL) foram conduzidas em placas com 96 poços de cultura de células (com capacidade de 2,2 mL) e mantidas a 25°C, sob agitação em vórtex uma vez por dia. Ao final da fermentação (14 dias) as células foram removidas por centrifugação, o vinho foi transferido para uma placa de 96 poços e a intensidade e a tonalidade de cor foram avaliadas em leitor de microplaca (420 e 520 nm). E as células foram transferidas para placa de cultura de células com 96 poços, após a placa foi digitalizada em escâner e analisada em programa gráfico para determinação da adsorção de pigmentos. A partir destes resultados, foram selecionados três grupos de leveduras para avaliação da capacidade de células individuais em adsorver pigmentos por citometria de fluxo. A integridade da membrana celular das leveduras foi avaliada por exclusão de Tripán Blue. Os resultados mostraram correlação negativa significativa entre adsorção de pigmentos por leveduras e intensidade da cor do vinho. A adsorção de pigmentos ocorre da metade ao final da fermentação, indicando alterações na parede celular e/ou modificações das antocianinas durante o processo. Foram observadas diferenças significativas na adsorção de antocianinas e na intensidade de cor do vinho entre linhagens de leveduras, independentemente da variedade da uva, e as leveduras puderam ser agrupadas em baixa, média e alta adsorção. O método proposto mostrou alta reprodutibilidade e permite a avaliação de um grande número de linhagens de leveduras. Observou-se que as linhagens com alta capacidade de adsorção de antocianinas apresentaram fluorescência suficiente para serem diferenciadas por citometria de fluxo. A fluorescência das células foi negativamente correlacionada com a viabilidade das mesmas. Independentemente do potencial de uma linhagem de levedura em adsorver antocianinas, células viáveis apresentaram baixa capacidade de adsorção, enquanto células permeabilizadas apresentaram alta capacidade de adsorção de antocianinas. O trabalho contribuiu com alternativas para a determinação da capacidade de adsorção de pigmentos por leveduras, além de mostrar que a integridade de parede/membrana é a principal variável envolvida na capacidade de adsorção de antocianinas por leveduras.

**Palavras-chave:** coloração de vinhos, antocianinas, leveduras, fermentações, adsorção de pigmentos, viabilidade celular.

## ABSTRACT

The intensity and color tone of red wines are among the main quality attributes of the final product. The color of red wines is dependent on the concentration of pigments, mainly anthocyanins, which are extracted from the skins of the grapes during the fermentation process. The yeasts can reduce the color intensity and modify the wine hue by the direct adsorption of pigments, however, the way how this process occurs still needs to be elucidated. In addition, the currently existing methods for the evaluation of the adsorption capacity of pigments by yeasts are limited and, in general, they are time-consuming and inadequate for a large number of strains. Therefore, the objective of this study was to develop a method to assess the adsorption of pigments by yeasts in wines and to elucidate the factors that determine the differential adsorption of pigments by different yeast strains during wine fermentation. Initially, 22 commercial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*, three commercial yeast strains of *S. cerevisiae*, and one commercial yeast strain of *Torulasporea delbrueckii* were used in microfermentation of musts of Merlot, Cabernet Sauvignon, and Ives grape varieties. The fermentations (800  $\mu$ L) were conducted in plates with 96 cell culture wells (2.2 mL capacity), kept at 25°C, and vortex agitated once a day. At the end of the fermentation (14 days), the cells were removed by centrifugation and, the wine was transferred to a 96-well plate and the intensity and tonality evaluated in a microplate reader (420 and 520 nm). The cells were transferred to a 96-well cell culture plate, then the plate was digitized in a scanner and analyzed in a graphic program to determine the adsorption of pigments. From these results, three groups of yeasts were selected to assess the capacity of individual cells to adsorb pigments by flow cytometry. The integrity of the cell membrane of the yeasts was validated by the exclusion of Trypan Blue. The results show a significant negative correlation between adsorption of pigments by yeasts and wine color intensity. The adsorption of pigments occurs at the end of the fermentation, indicating alterations in the cell wall and/or modifications of the anthocyanins during the process. Significant differences were observed in the adsorption of anthocyanins and in the wine color intensity between yeast strains, regardless of the grape variety, and the yeasts could be grouped into low, medium, and high adsorption. The proposed method showed high reproducibility and allows the evaluation of a large number of yeast lines. It was observed that the strains with high anthocyanin adsorption capacity showed sufficient fluorescence to be differentiated by flow cytometry. The fluorescence of the cells was negatively correlated with the viability of the same. Regardless of the potential of a yeast line to adsorb anthocyanins, living cells show low adsorption capacity, whereas permeabilized cells show high anthocyanin adsorption capacity. The work contributed with alternatives for the determination of the adsorption capacity of pigments by yeasts, in addition the data showed that the integrity of the wall/membrane is the main variable involved in the adsorption capacity of anthocyanins by yeasts.

**Key-words:** wine coloring, anthocyanins, yeasts, fermentations, pigment adsorption, cell viability.

## 1. INTRODUÇÃO

---

O vinho é uma bebida elaborada para ser consumida e apreciada, sendo a avaliação sensorial uma forma de definir a sua qualidade. Portanto, o aspecto visual é um atributo importante na avaliação sensorial de um vinho, particularmente em tintos, definindo como parte de sua qualidade. A coloração e a tonalidade de um vinho tinto determinam um comportamento primário na avaliação do produto final. Os vinhos com coloração mais intensa são considerados como tendo maior volume, corpo e taninos macios, ou seja, maior concentração de compostos fenólicos. Por outro lado, um vinho com menor coloração é considerado como sendo um vinho com menor concentração de compostos fenólicos.

O espectro de cor dos vinhos é função de três elementos principais: a concentração de antocianinas, a concentração de pigmentos polimerizados e a concentração de cofatores que se ligam às antocianinas. Diversos fatores afetam estes três elementos principais: a variedade e a maturação da uva, a safra (temperatura, pluviosidade, dentre outros), as práticas agrícolas, o sistema de extração, a fermentação, tempo e condições de envelhecimento. Entre os fatores enológicos determinantes na coloração dos vinhos, o fator microbiológico vem sendo estudado e considerado um fator importante na determinação desta propriedade.

É de consenso geral que leveduras envolvidas na fermentação alcoólica e bactérias lácticas que participam da fermentação malolática podem interferir de forma positiva ou negativa na coloração dos vinhos. Os mecanismos pelos quais as leveduras modificam a intensidade, estabilidade e tonalidade de cor em vinhos são pouco conhecidos, mas estudos realizados recentemente mostram variações significativas de acordo com a linhagem de levedura empregada no processo fermentativo. Por sua vez, estas variações têm sido atribuídas a diversos fatores, principalmente, a adsorção de antocianinas pela levedura, a atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase, a produção de cofatores de copolimerização de antocianinas e a produção ou degradação de compostos fenólicos envolvidos na polimerização, entre outros menos relevantes.

Diversos métodos têm sido propostos para a avaliação da capacidade de adsorção de pigmentos por leveduras durante as fermentações. Esses métodos em geral envolvem a extração dos pigmentos das leveduras e avaliação por métodos cromatográficos, sistemas que

apresentam alta sensibilidade, entretanto apresentam problemas para serem aplicados em um grande número de leveduras, pois requerem muito tempo para serem realizados.

Este trabalho buscou o desenvolvimento de uma nova metodologia para determinar a capacidade de adsorção de pigmentos por leveduras durante a fermentação vínica, visando o potencial de avaliação de um grande número de amostras de forma rápida e consistente. Além disso, visou à determinação de fatores envolvidos no processo de adsorção de pigmentos por leveduras durante as fermentações.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de leveduras vínicas em adsorver pigmentos durante a fermentação de vinhos tintos e determinar os fatores envolvidos nas diferenças de capacidade de adsorção de pigmentos observadas entre diferentes linhagens de leveduras, durante as fermentações vínicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma metodologia simples, rápida e confiável para a avaliação da adsorção de antocianinas por leveduras.
- Avaliar a adsorção de antocianinas de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* durante as fermentações a partir de mostos de diferentes variedades de uvas.
- Avaliar a adsorção de antocianinas em células individuais de leveduras com diferentes comportamentos de adsorção, por citometria de fluxo.
- Identificar os fatores envolvidos na alteração de cor por diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.
- Investigar a perda de integridade da parede celular/ membrana plasmática de leveduras durante a fermentação do vinho, por microscopia de fluorescência.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.1 PROCESSOS DE ELABORAÇÃO DE VINHOS

O processo de elaboração de vinhos é definido como o conjunto de procedimentos e processos empregados para a transformação da uva madura em vinho. Para que este processo de elaboração ocorra são necessários os agentes biológicos da vinificação, conhecidos como leveduras.

As leveduras, por meio de um processo bioquímico denominado fermentação alcoólica, transformam os açúcares do mosto da uva em etanol, CO<sub>2</sub> e outros compostos químicos (Mesas & Alegre, 1999), em menor volume, como o glicerol e ácidos orgânicos. O vinho não é consequência da mistura de diversas matérias-primas, por isso não é um produto fabricado e sim um produto elaborado (Lona, 2006).

A matéria-prima da indústria vinícola é a uva, a partir da qual se obtém o mosto para a elaboração do vinho. A composição das uvas influencia a estrutura do vinho, não simplesmente pelo teor de açúcar fornecido para a fermentação, como também pelo seu teor de nitrogênio, potássio, acidez, seus aromas vegetativos e seu estado sanitário (Zoecklein *et al.*, 2001).

Existem no mundo diversas variedades de uva, sendo a maioria delas pertencente à espécie *Vitis vinifera*, também conhecida como uvas finas, originária do Cáucaso, de onde foi difundida por toda a costa mediterrânea há centenas de anos, seja para o consumo "*in natura*", ou como matéria-prima para a elaboração de vinhos. A vitivinicultura brasileira, a partir de meados do século XX, começou a elaborar vinhos finos, com diversas uvas da variedade *V. vinifera* (Camargo, 2009).

Os principais açúcares presentes nas uvas das cultivares de *V. vinifera* são glicose e frutose que, geralmente, são responsáveis por 99% dos carboidratos no mosto e por 12 a 27% ou mais do peso das uvas maduras. A sacarose é o principal açúcar translocado das folhas para os frutos em videiras, mas glicose e frutose predominam nas uvas em todos os estágios do desenvolvimento (Daudt & Simon, 2001).

No Brasil, onde é produzido um volume considerável de vinho tinto, cerca de 138,5 milhões de litros, sendo que o Rio Grande do Sul responde por mais de 90% da produção



brasileira (Mello & Machado, 2020), observa-se, atualmente, um potencial para a elaboração de vinhos tintos jovens. A maceração carbônica e a termovinificação são processos tecnológicos alternativos para a elaboração desses vinhos. Além disso, possibilitam a obtenção de produtos com características sensoriais diferenciadas em relação aos elaborados pelo processo clássico, contribuindo para melhorar a qualidade dos vinhos finos brasileiros (Rizzon *et al.*, 1999).

Na elaboração do vinho tinto pelo processo clássico, a fermentação alcoólica e a maceração ocorrem simultaneamente. Nessa fase, os constituintes da parte sólida da uva, principalmente da película, passam para o mosto através dos fenômenos de dissolução e de difusão (Ubigli, 1988), visando à extração de cor, taninos, aromas, entre outros compostos.

O processo clássico de vinificação em tintos envolve várias etapas, sendo representado pela Figura 1.



**Figura 1** – Fluxograma do processo clássico de vinificação em tintos.

A utilização do processo de maceração carbônica é recomendável quando se dispõe de uva inteira, sadia, com baixo teor de tanino e elevada concentração de ácido málico, açúcar e antocianinas (Usseglio-Tomasset, 1986; Rizzon *et al.*, 1999). Em condições anaeróbicas, a maceração carbônica transmite aos vinhos algumas características diferenciadas, dadas as reações enzimáticas que ocorrem na uva intacta (André *et al.*, 1967; Flanzy *et al.*, 1970; Arfelli, 1990; Rizzon *et al.*, 1999). Nesse processo, a uva sofre uma fermentação intracelular, em que o ácido málico, principal composto metabolizado, é transformado em álcool etílico e em outras substâncias (Càstino, 1984; Versini *et al.*, 1984; Ubigli, 1986; Spagnolli, 1987; Villa, 1988; Rizzon *et al.*, 1999).

A termovinificação é um processo indicado para uvas tintas com pouca matéria corante e baixa sanidade (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1976; Rizzon *et al.*, 1999). Consiste

principalmente na extração, pelo aquecimento da uva, das antocianinas e de outros compostos fenólicos responsáveis pela coloração dos vinhos tintos. O processo deve ser conduzido de modo a inativar as enzimas oxidativas, preservando aquelas com atividades proteolíticas e pectinolíticas (Rizzon *et al.*, 1999).

Segundo Venturini Filho (2010), a termovinificação consiste no aquecimento da uva tinta esmagada e desengaçada à temperatura de 65 a 70°C, e após alguns minutos, procede-se rápido resfriamento a 20°C. Após ocorre a adição de anidrido sulforoso e leveduras para a fermentação. Em seguida, o processo continua igualmente ao método clássico. O autor destaca, também, que nesse processo, utilizando os equipamentos adequados, produz-se um vinho mais estruturado, mas ao mesmo tempo harmônico, denso, aveludado, com aroma agradável e com maior extração de cor da uva.

O processo de termovinificação, dependendo também do microrganismo e parâmetros de vinificação utilizados, acontece um evento não favorável ao produto final, onde a cor é instável. Durante a fermentação, as leveduras reduzem a cor do vinho por meio da atividade de enzimas que modificam as antocianinas, produção de metabólitos que reduzem e afetam a polimerização de antocianinas e pela adsorção destes compostos e seu arraste com o microrganismo empregado.

### 3.1.1 Leveduras na elaboração de vinhos

Sobre a superfície das uvas, existe uma série de gêneros e espécies de leveduras, da mesma forma que um grande número de microrganismos vive sobre outras plantas, animais, no ar e no solo. Assim sendo, as uvas constituem uma fonte primária de leveduras, que possuem estreita relação com o processo de elaboração de vinho. As leveduras podem ser benéficas ou prejudiciais para a qualidade dos produtos vinícolas. Consequentemente, a procura de informações sobre a população de leveduras presentes nas uvas é importante para a elaboração de vinhos de alta qualidade e atributos representativos. Diversas pesquisas foram realizadas sobre a microbiota de leveduras em diferentes regiões produtoras de vinho (Pretorius *et al.*, 1999; Sabaté *et al.*, 2002; Combina *et al.*, 2005; Raspor *et al.*, 2006; González *et al.*, 2007; Nisiotou & Nychas, 2007; Chavan *et al.*, 2009).

Alguns estudos verificaram que o mosto de uva contém uma diversidade de espécies de leveduras, principalmente dos gêneros *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia* e

*Kluyveromyces*. Ocasionalmente, espécies de outros gêneros, como *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Dekkera*, *Schizosaccharomyces* e *Saccharomyces* também foram isolados de uvas viníferas de várias áreas produtoras de vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Fleet *et al.*, 2002; Fleet, 2003; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Jolly *et al.*, 2006; Fleet, 2008). Estas espécies de leveduras realizam atividades bioquímicas no mosto, influenciando de forma positiva ou negativa a qualidade do vinho.

A população de leveduras sobre a superfície das uvas varia de acordo com a cultivar, posição geográfica do vinhedo, clima, práticas culturais e estágio de maturação da mesma. Uvas maduras podem conter concentrações de leveduras da ordem de  $10^4$  a  $10^6$  células/cm<sup>2</sup> (Fleet *et al.*, 2002). A sobrevivência das leveduras sobre os cachos de uva depende da camada de cera que o reveste, sendo esta composta por 60 a 80% de ácido oleanólico, de álcoois livres (C<sub>20</sub>-C<sub>34</sub>), de ácidos livres (C<sub>14</sub>-C<sub>32</sub>), além de seus aldeídos e ésteres (Radler, 1965). Brechot *et al.* (1971) sugeriram que o ácido oleanólico é um fator de crescimento importante para leveduras.

As leveduras são os microrganismos responsáveis pela transformação do açúcar contido no mosto em etanol. Atuando dessa forma, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a que melhor desempenha esta função, pois tem a capacidade de transformar os açúcares da uva em etanol e outros compostos, como glicerol e ácidos voláteis. A levedura *S. cerevisiae* (Figura 2) pertence ao filo *Ascomycota*, a ordem *Saccharomycetales* e a família *Saccharomycetaceae*. Apresenta reprodução assexuada por brotamento multilateral podendo se reproduzir sexuadamente formando até quatro ascósporos nos ascos (Alexopoulos *et al.*, 1996).



**Figura 2-** *Saccharomyces cerevisiae*. A) Aspectos macroscópicos da cultura; B) Micrografia eletrônica de varredura do estágio de reprodução assexuada por brotamento; C) Estrutura celular.

Fonte: Adaptado de University of Kent Biosciences.

Devido ao reconhecido desempenho de *S. cerevisiae*, como espécie padrão para utilização em processos fermentativos visando à produção de vinhos, frequentemente se busca identificar linhagens desta espécie, em estudos que envolvam a caracterização e a seleção de leveduras nativas de uma determinada região que são capazes de executar adequadamente o processo de produção de vinhos.

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras movem muitos setores importantes, tais como as indústrias de alimentos, de bebidas fermentadas, de biocombustíveis, de produtos químicos, de enzimas industriais, de produtos farmacêuticos, de produtos agrícolas e do meio ambiente. Outras utilizações práticas das leveduras são na produção de aminoácidos, vitaminas e substâncias com fins terapêuticos, como hormônios, antibióticos e vacinas (Reale *et al.*, 2013).

*S. cerevisiae* é um microrganismo amplamente utilizado industrialmente na produção microbiana de proteínas, substâncias químicas e metabólitos. Isso ocorre porque a *S. cerevisiae* possui capacidade fermentativa e é tolerante ao etanol, e as ferramentas para esse processo são potencialmente conhecidas quando comparadas com outros microrganismos. *S. cerevisiae* é o eucarioto unicelular mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido, dessa forma, sendo utilizado como microrganismo industrial para produção bioquímica e expressão de proteínas heterólogas (Mattanovich *et al.*, 2014).

Diante desse contexto, muitos estudos envolvem a seleção de linhagens da levedura *S. cerevisiae* e também de outras espécies de leveduras que apresentam características metabólicas potenciais, com larga utilização por indústrias de biotecnologia em processos para elaboração de produtos. Com relação à indústria vinícola, na moderna enologia, são utilizadas leveduras selecionadas, as quais são inoculadas no mosto de fermentação como leveduras secas ativas previamente hidratadas, simplificando o processo de fermentação alcoólica. A levedura inoculada é geralmente responsável pela fermentação e constitui a maioria da população de levedura ao final do processo. Esta prática de inoculação de leveduras tem algumas vantagens, cabe destacar: a diminuição da fase *lag*, a redução significativa da influência de leveduras nativas indesejáveis, a rápida e completa fermentação do mosto e ainda permite a manutenção do padrão e da qualidade do produto final (Zuzuarregui & Olmo, 2004). Ainda pode reduzir a formação de ácidos que elevam a acidez volátil de vinhos (Silva & Muratore, 2003).

A utilização de leveduras selecionadas no processo de vinificação é importante para obtenção de vinhos com aromas intensos, delicados e persistentes. Esta virtude se encontra em leveduras isoladas em diversas regiões vitivinícolas do mundo e selecionadas conforme os critérios de seleção para elaboração de vinhos. Existe uma grande variedade de leveduras em oferta no mercado brasileiro. Todas elas são importadas de outros países e disponíveis aos viticultores. Desse modo, o conhecimento das características potenciais das leveduras de uma determinada região produtora de uvas e de vinho e sua utilização no processo de vinificação desta mesma região constitui uma estratégia importante e promissora com o intuito de aportar características peculiares e personalidade própria aos vinhos.

### 3.1.2 Fermentação alcoólica na elaboração de vinhos

A fermentação alcoólica constitui uma das etapas mais importantes para produção de vinhos e bebidas fermentadas por leveduras. Mesmo que, em maior ou em menor quantidade, possa intervir certo número de espécies e inclusive de gêneros de leveduras, o papel principal é desempenhado pela *S. cerevisiae* (Barre *et al.*, 2000). Esta fermentação se desenvolve em condições de parcial anaerobiose, sendo que o metabolismo da *S. cerevisiae* em tais condições é fermentativo.

Na fermentação do vinho, os principais açúcares presentes no mosto são glicose e frutose, e estes são fermentados, levando à produção de etanol e liberação de gás carbônico, assim como formação de outros metabólitos (Berthels, 2004), não menos importantes, como glicerol e compostos aromáticos.

A transformação do açúcar em etanol e gás carbônico envolve, no mínimo, doze reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está localizado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa. Essas enzimas, referidas como “glicolíticas”, sofrem a ação de diversos fatores (nutrientes minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura, entre outros) alguns que estimulam, outros que reprimem a ação enzimática, afetando assim o desempenho da levedura. Convém ressaltar, que a levedura do gênero *Saccharomyces* é um microrganismo aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto a condições de aerobiose como de anaerobiose. Os produtos finais da degradação do açúcar dependem das condições ambientais em que a

levedura se encontra. Assim, enquanto uma porção do açúcar é transformada em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO<sub>2</sub>, em anaerobiose (Lima, 2001), sendo o etanol, o principal produto da fermentação alcoólica.

### 3.2 ANTOCIANINAS E COLORAÇÃO NOS VINHOS

Os compostos fenólicos são responsáveis pela cor dos vinhos e podem ser divididos em flavonoides e não flavonoides. Os compostos não flavonoides são os ácidos fenólicos e os estilbenos. Os ácidos fenólicos são os ácidos hidroxibenzoicos encontrados nas cascas, e geralmente representados pelo ácido gálico e os ácidos hidroxicinâmicos, encontrados na forma de ésteres tartáricos, como o ácido caftárico e o ácido cutárico, encontrados tanto na casca como na polpa da uva. Entre os estilbenos, destacam-se o resveratrol, o piceid e a astringina. O resveratrol é produzido principalmente nas cascas das uvas como resposta ao estresse causado por infecção microbiana ou dano mecânico da mesma (Abe *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2015).

Os flavonoides podem ser divididos em três grupos. O primeiro, os flavanois que são a catequina, a epicatequina, a epigalocatequina, e são geralmente responsáveis pela adstringência de vinhos e sucos. O segundo grupo é formado por flavanois que são o canferol, a quercetina, a miricetina, e são geralmente incolores ou de coloração amarelo claro, cuja principal função no fruto é a proteção contra a radiação UV. O terceiro grupo, representado pelas antocianinas está presente principalmente nas cascas das uvas e na terceira e quarta primeiras camadas das células hipodérmicas e conferem as cores entre azul e vermelho. Em uvas tintas, as antocianinas constituem a maior percentagem de compostos fenólicos (Abe *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2015).

Diante desse cenário, a cor do vinho sempre foi considerada como sendo um dos principais atributos sensoriais percebidos pelo consumidor. Esta característica foi originalmente associada à presença de um importante grupo de pigmentos fenólicos solúveis em água, chamadas antocianinas. As antocianinas originais em uvas tintas são: cianidina, petunidina, peonidina, delphinidina e malvidina. A principal fonte de cor vermelha nos vinhos são as antocianinas e seus derivados, os quais são extraídos das uvas ou formados durante o processo de vinificação.

As antocianinas, também conhecidas como antocianos, são pigmentos flavonoides que, dependendo do pH, e em alguns casos de agentes complexantes, outorgam aos vinhos cores distintas como vermelho, púrpura ou azul. A concentração de antocianinas livres em vinhos tintos jovens é de 500-2000 mg.L<sup>-1</sup>, dependendo da variedade, sistema de cultivo, sistema de extração, práticas enológicas, entre inúmeros outros fatores (Burns *et al.*, 2002; Mazza & Francis, 2005; Busse-Valverde *et al.*, 2011).

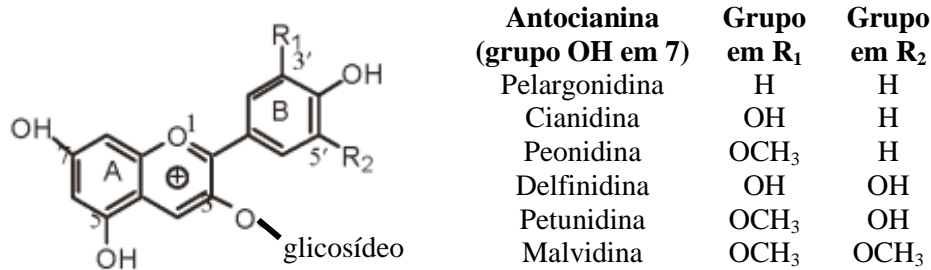
Em geral, as antocianinas encontram-se localizadas, principalmente, na película da uva e são extraídas durante o processo de maceração que ocorre simultaneamente com a fermentação alcoólica em processos de vinificação clássica de vinhos tintos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). As antocianinas passam para o mosto por meio dos fenômenos de dissolução e de difusão (Ubigli, 1988).

Durante a fermentação e nos anos subsequentes de maturação do vinho, as antocianinas sofrem uma série de reações e associações que determinam mudanças de cor e são essenciais na estabilidade da mesma, de tal forma que apesar das antocianinas monoméricas decaírem constantemente, os vinhos mantêm essencialmente a sua coloração vermelha (Brouillard *et al.*, 2003; He *et al.*, 2012). Além disso, apesar de serem basicamente inodoras e insípidas, as antocianinas podem interagir com outras substâncias e influenciar as características de aroma e sabor dos vinhos (Dufour & Sauvaitre, 2000).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm mostrado o benefício das antocianinas e seus derivados à saúde humana, os quais estão associados principalmente à capacidade de varredura de ROS (espécies reativas de oxigênio) e atividade antioxidante (De Pascual-Teresa & Sanchez-Ballestra, 2008).

As antocianinas monoméricas em maior concentração em vinhos de *V. vinifera* são: pelargonidina-3-O-glicosídeo (calistefina), cianidina-3-O-glicosídeo (curomanina), delphinidina-3-O-glicosídeo (mirtilina), peonidina-3-O-glicosídeo (peonina), petunidina-3-O-glicosídeo (petunina) e malvidina-3-O-glicosídeo (oenina) (He *et al.*, 2012). Dentre estas, a encontrada em maior concentração e a que apresenta coloração mais vermelha é a malvidina-3-O-glicosídeo, que pode representar 42% das antocianinas totais presentes em vinhos tintos viníferas ao término da fermentação alcoólica (Puértolas *et al.*, 2011). Outras antocianinas monoméricas relevantes encontradas em uvas, mostos e vinhos incluem antocianinas

acetiladas no radical glicosídico (He *et al.*, 2012). A Figura 3 mostra a estrutura básica do pigmento de antocianina.



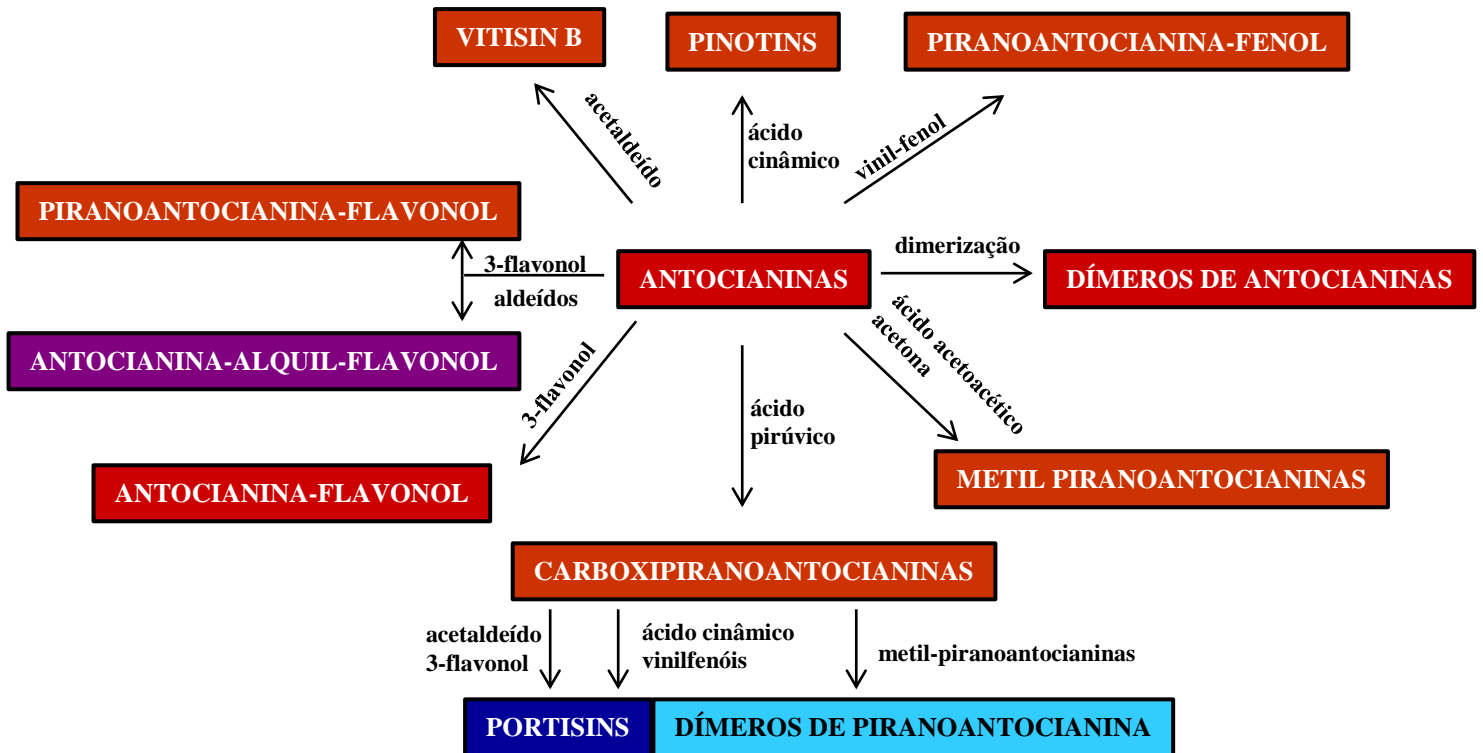
**Figura 3** – Estrutura molecular básica das antocianinas (Lee *et al.*, 2005).

Em vinhos tintos jovens, as antocianinas livres ou monoméricas são as principais responsáveis pela cor, mas estas não são particularmente estáveis. Assim sendo, estas antocianinas dão lugar gradativamente a seus derivados, incluindo pigmentos poliméricos e copigmentos, responsáveis em parte pela mudança da cor vermelho/púrpura dos vinhos jovens para as cores vermelho/laranja dos vinhos envelhecidos (Jackson, 2008).

Os pigmentos de antocianinas são gradualmente substituídos por outros pigmentos derivados de antocianinas durante o armazenamento e envelhecimento do vinho, contribuindo para um progressivo deslocamento de cor vermelho/púrpura do vinho tinto jovem para uma cor de vinho tinto vermelho/laranja envelhecido. As transformações químicas das antocianinas para formar novos pigmentos estáveis e sua relevância para a cor do vinho têm sido estudadas em soluções modelo de vinho tinto.

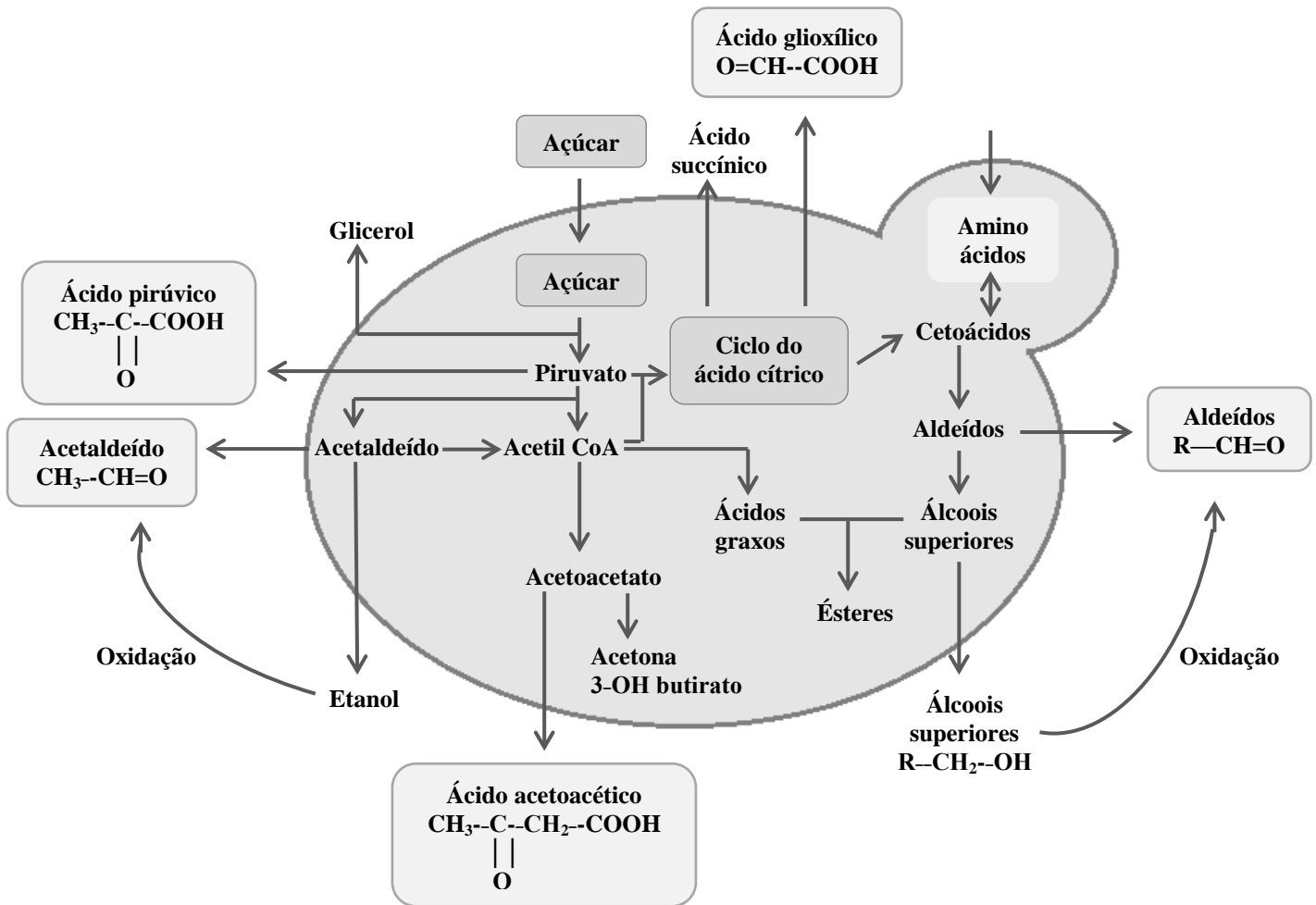
Foi somente com o desenvolvimento de ferramentas analíticas que muitas estruturas anteriormente propostas, algumas delas sugeridas na década de setenta por Somers (1971), puderam ser devidamente identificadas e atribuídas às estruturas do vinho tinto (Figura 4).





**Figura 4** – Pigmentos derivados de antocianinas encontrados em vinhos tintos (Freitas & Mateus, 2011).

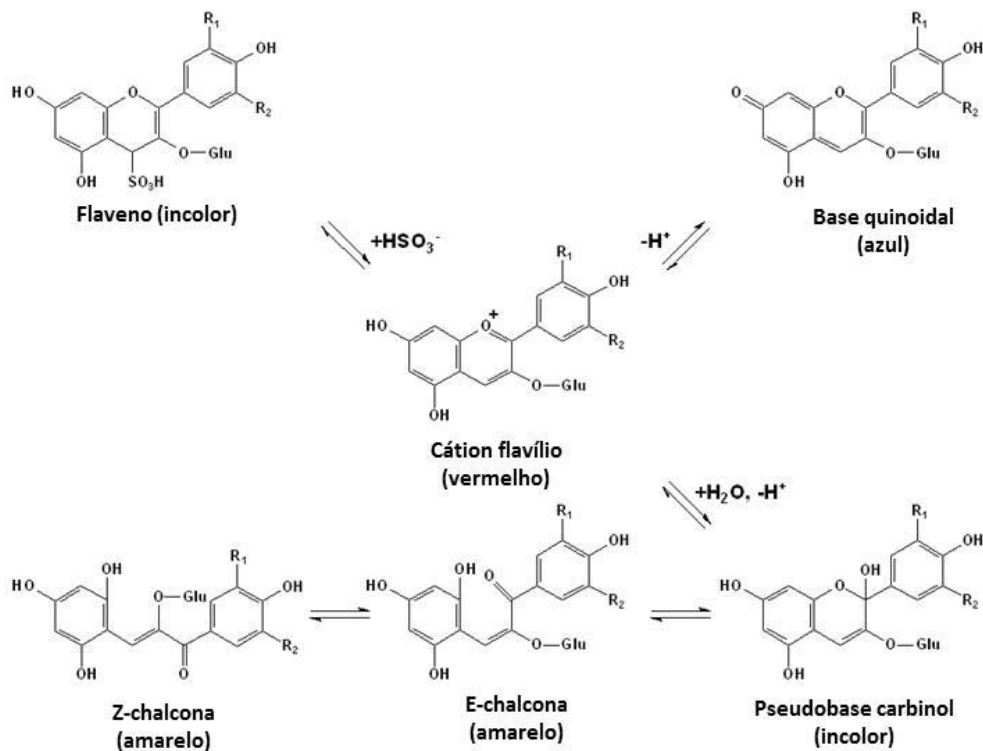
Algumas das mais importantes piranoantocianinas encontradas em vinhos tintos resultam da reação entre antocianinas originais e metabólitos de leveduras liberados durante a fermentação, por exemplo, piruvato (como ácido pirúvico), ácido acetoacético e acetaldeído (Figura 5) (Bakker & Timberlake, 1997; Fulcrand *et al.*, 1998; Hayasaka & Asenstorfer, 2002; He *et al.*, 2006), o último dos quais também pode ser encontrado em vinhos como resultado da oxidação do etanol.



**Figura 5** – Metabólitos de leveduras envolvidos nas transformações de antocianinas (Freitas & Mateus, 2011).

No vinho, as antocianinas encontram-se em equilíbrio dinâmico entre cinco formas moleculares: a base quinoidal, o cátion flavílio, a pseudobase carbinol, a chalcona e o flaveno, formado na presença de bissulfito.

O cátion flavílio é central no equilíbrio que envolvem reações ácido-base e hidratação (Figura 6). A conversão do cátion flavílio na base quinoidal ocorre por transferência de próton, e o equilíbrio entre o cátion flavílio e a pseudobase carbinol envolve hidratação seguida de transferência de próton. As conversões flavílio/base quinoidal e flavílio/pseudobase carbinol ocorrem rapidamente. Já a abertura do heterociclo e rearranjo da pseudobase carbinol para formação da chalcona ocorre lentamente (He *et al.*, 2012).



**Figura 6** - Equilíbrio entre as diferentes formas estruturais de antocianinas em vinhos tintos (adaptado de He *et al.*, 2012).

Os principais fatores que afetam a distribuição das distintas formas moleculares das antocianinas e conseqüentemente, a cor de vinhos jovens, são o pH, a temperatura e a quantidade de sulfito livre. O baixo pH leva ao aumento do cátion flavílio e retarda o processo de hidrólise das antocianinas, e pH elevados, levam ao aumento de formas incolores ou azuis. Já o sulfito livre pode levar a redução de cor pela sua incorporação na posição C4 do anel aromático C das antocianinas (Jackson, 2008).

A quantidade de antocianinas monoméricas diminui significativamente durante a maturação dos vinhos tintos. Esta redução está diretamente relacionada com a combinação ou condensação das antocianinas entre si ou com outros compostos fenólicos, gerando pigmentos mais estáveis e complexos, e em menor escala com a degradação, oxidação, precipitação ou formação de compostos incolores, que em alguns casos podem atuar como reservas de antocianinas (Jackson, 2008; He *et al.*, 2012).

A combinação entre antocianinas ocorre tanto por interações hidrofílicas entre os componentes glicídicos das mesmas, como por repulsão hidrofóbica entre os núcleos aromáticos e a água (He *et al.*, 2012). Assim, a associação entre antocianinas pode ser

considerada como uma forma de copigmentação. De acordo com González-Manzano *et al.* (2008), a associação entre antocianinas produz um deslocamento para adsorção máxima em comprimentos de onda menores que leva ao aumento da intensidade de cor sem afetar de forma clara a tonalidade. Segundo estes autores, a associação entre antocianinas ocorre apenas em concentrações superiores a 1 mmol.L<sup>-1</sup> de antocianinas monoméricas, sendo limitada pela presença de etanol.

A copigmentação pode ocorrer por arranjos intramoleculares nas antocianinas (copigmentação intramolecular) ou por associações entre antocianinas e outros compostos (copigmentação intermolecular) (He *et al.*, 2012b). No primeiro caso, as estruturas são geradas pela interação hidrofóbica do núcleo planar polarizado da antocianina com o resíduo aromático da própria molécula. Já no segundo caso, a interação ocorre entre o anel B da antocianina e o anel B de uma molécula que atua como cofator. Os cofatores mais importantes em vinhos tintos jovens são os flavonoides (catequina, epicatequina, epigallocatequina, canferol, quercetina, rutina, miricetina), os não flavonoides (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido elágico, floroglucinol) e os aminoácidos (arginina e prolina) (Jackson, 2008).

Comparada com a associação entre antocianinas, a copigmentação é mais importante nas modificações de cor em vinhos jovens, promovendo o aumento da adsorção à  $\lambda=520$  nm e causando um desvio para intensidades de coloração maiores (Boulton, 2001). As antocianinas no complexo copigmentado encontram-se protegidas de processos de hidratação, reduzindo assim a formação de moléculas incolores (chalcona e pseudobase carbinol), fato que explica o aumento de intensidade.

Vários fatores afetam a copigmentação, principalmente o pH, a temperatura, o etanol e a concentração e estrutura de cofatores e de pigmentos presentes. Assim, o pH mais apropriado para copigmentação encontra-se em torno de 3,5. As temperaturas baixas de fermentação e estocagem favorecem a copigmentação e maiores concentrações de etanol desestabilizam os copigmentos (He *et al.*, 2012). Neste sentido, as altas temperaturas utilizadas na termovinificação podem desestabilizar as associações entre antocianinas e a copigmentação, e a extração insuficiente de compostos fenólicos e polifenólicos durante a curta extração a altas temperaturas pode reduzir a formação de pigmentos poliméricos. Estes fatores podem explicar a perda de cor em vinhos termovinificados (Abyari *et al.*, 2006; Parisa *et al.*, 2007).

### 3.3 PRÁTICAS ENOLÓGICAS E A COLORAÇÃO DOS VINHOS

O tipo e a concentração de antocianinas presentes no vinho dependem de diversos fatores vitícolas, como: a variedade da uva, as práticas vitícolas, as condições climáticas, o estágio de maturação, a sanidade das uvas, entre outros fatores enológicos, como: condições de maceração e fermentação, utilização de enzimas, levedura empregada, fermentação malolática, sistema de clarificação, compostos adicionados, dentre outros.

A maceração a baixa temperatura (5 a 15°C) proporciona a fermentação, conhecida como maceração a frio, e tem sido preconizada como uma prática para o aumento da extração de pigmentos, taninos e aromas, fato que tem sido confirmado por diversos trabalhos que mostram maior concentração de antocianinas e maior estabilidade de cor (Marais, 2003; Sacchi *et al.*, 2005; Perez-Lamela *et al.*, 2007).

No sistema convencional de maceração e fermentação simultânea, a difusão das antocianinas e outros compostos fenólicos das cascas para o mosto/vinho dependem do tempo e temperatura de maceração, frequência e forma de remontagem, níveis de etanol e sulfito. As temperaturas elevadas (28-30°C) resultam em maior extração de antocianinas, e a maior extração de pigmentos ocorre com macerações de 5 a 6 dias (Zimman *et al.*, 2002; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Bautista-Ortín *et al.*, 2007).

O processo de copigmentação e polimerização ocorrem ao longo da fermentação, mas é afetado negativamente pelo aumento da concentração de etanol (Gutierrez, 2003). Normalmente, durante uma vinificação tradicional, a concentração de antocianinas monoméricas possui um decaimento após atingir seu nível máximo, pois parte das antocianinas extraídas são adsorvidas pelas paredes de leveduras, precipitadas com os sais tartáricos ou, no final do processo, retiradas pela filtração e afinamento (Romero-Cascales *et al.*, 2005).

A maceração carbônica envolve a maceração de uvas inteiras, com ambiente rico em gás carbônico e promovendo uma fermentação anaeróbica. Comparada com o sistema tradicional, a maceração carbônica leva à produção de vinhos leves e frutados com baixa concentração de antocianinas, principalmente, monoglicosídeos, e baixa concentração de fenóis totais, mas alta concentração de flavan-3-ols e proantocianidinas oligoméricas e poliméricas (Gómez-Míguez & Heredia, 2004).

A adição de enzimas pectolíticas pode facilitar a extração de antocianinas, mas a presença de atividade  $\beta$ -glicosidase, eventualmente associada a alguns preparados enzimáticos, pode levar à hidrólise da ligação antocianina-glicosídeo e desestabilização da cor. A adição de taninos, também preconizada como prática para melhoria da cor e estabilidade, não auxilia na extração, mas pode contribuir na formação de pigmentos poliméricos. Porém, a eficiência e mesmo efeito positivo da adição de taninos é altamente dependente da qualidade e principalmente, da concentração de taninos hidrolisáveis (Bautista-Ortín *et al.*, 2005).

A adição de cofatores prévios à fermentação alcoólica pode facilitar a extração de antocianinas e a copigmentação, entretanto, os resultados neste sentido são apenas experimentais e dependentes do cofator utilizado (He *et al.*, 2012).

### 3.4 EFEITOS DE LEVEDURAS NA COLORAÇÃO DE VINHOS

É de consenso geral que as leveduras, direta ou indiretamente, participam no processo de extração de antocianinas, e conseqüentemente, coloração de vinhos tintos (Balik, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Alguns estudos têm sido realizados visando estabelecer o efeito da linhagem de leveduras sobre a coloração de vinhos tintos, particularmente, no que se refere à concentração, polimerização e condensação de antocianinas e adsorção de pigmentos. Trabalhos envolvendo distintas linhagens de leveduras mostram resultados conflitantes ou ambíguos. Por exemplo, enquanto Zoecklein *et al.* (1999) não observaram diferenças de coloração em vinhos jovens e envelhecidos obtidos com quatro linhagens de *Saccharomyces* sp., Caridi *et al.* (2004) mostraram que vinhos obtidos com leveduras distintas apresentam importante diferença na intensidade e tonalidade.

Sabe-se, claramente, que a linhagem de levedura influencia o conteúdo de compostos fenólicos em vinhos, sendo responsáveis em geral por redução do mesmo (Castino, 1982). Este mecanismo pode ser exclusivamente físico, envolvendo interações fracas e reversíveis entre antocianinas (e outros compostos fenólicos) e a parede celular das leveduras, através de um processo de adsorção (Vasserot *et al.*, 1997). Segundo trabalho realizado por

Morata *et al.* (2005), distintas linhagens de leveduras podem adsorver entre 1,6 e 5,9% das antocianinas.

A adsorção de antocianinas pela parede das leveduras é um dos fatores que pode levar à redução da coloração dos vinhos e mudança da tonalidade. Distintas linhagens de leveduras possuem diferenças quantitativas e qualitativas na adsorção de antocianinas (Medina *et al.*, 2005).

A parede celular das leveduras é composta por proteínas, lipídios e polissacarídeos, que possuem regiões com propriedades de troca iônica, fornecendo uma série de grupos funcionais capazes de desencadear o processo de adsorção de compostos (Aksu, 2005). Um estudo recente mostrou que compostos fenólicos de chás foram adsorvidos por *S. cerevisiae* (Jilani *et al.*, 2015).

O estudo de Morata *et al.* (2003), mostram que antocianinas acetiladas e metoxiladas são mais adsorvidas do que as não acetiladas e hidroxiladas, enquanto as piranoantocianinas são pouco adsorvidas pelas paredes de leveduras. A adsorção de determinados grupos de antocianinas leva a um aumento da tonalidade amarela e redução da tonalidade azul dos vinhos. A diferencial adsorção pode estar associada a interações hidrofóbicas e varia consideravelmente dependendo da linhagem de levedura, tornando a seleção e a escolha de leveduras enológicas um fator relevante, não unicamente nas características olfativas e gustativas, mas também nas características visuais de vinhos tintos (Morata *et al.*, 2003).

Um estudo de análise de progênes, realizado por Caridi *et al.* (2007), mostrou que a capacidade de adsorção de antocianinas por leveduras *Saccharomyces* sp. é herdável e poligênica. Porém, dados experimentais com leveduras formadoras de “flor” (película) indicam que estas apresentam maior capacidade de adsorção de antocianinas do que outras linhagens (Merida *et al.*, 2005), no sentido de genes relacionados à hidrofobicidade da parede celular (ex. *Flo11*) como responsáveis pela adsorção.

Morata *et al.* (2003) determinaram o perfil de adsorção de antocianinas pela parede celular de distintas linhagens de *Saccharomyces* sp. isoladas da região de denominação de origem La Rioja, Navarra e Ribera del Duero na Espanha, e mostraram que os derivados acetilados de antocianinas (acetil e cumaril) são adsorvidos de forma mais intensa do que os não acetilados e que a peonidina-3-O-glicosídeo é adsorvida com a mesma intensidade que os derivados acetilados. Resultados semelhantes foram obtidos por Medina *et al.* (2005), mas

estes autores mostraram que não há relação entre a concentração de antocianinas totais e a intensidade de cor dos vinhos após a fermentação, sendo este fato relacionado com a formação de derivados de antocianinas durante o processo fermentativo, já que a soma de derivados de antocianinas está diretamente relacionada com a cor por distintas linhagens de *Saccharomyces* sp.

De fato, as leveduras podem adsorver tanto flavenos como antocianinas, mostrando alta afinidade por flavonóis (Ummarino *et al.*, 2001), de tal forma que após uma semana de contato em vinho sintético, as proantocianidinas decrescem em 70%, os taninos totais em 38%, e as antocianinas, 14,7% (Mazauric & Salmon, 2005).

Além da adsorção, vários metabólitos produzidos pela levedura durante a fermentação, como o ácido pirúvico e o acetaldeído (Liu & Pilone, 2000; Lopez-Toledano *et al.*, 2004), são capazes de reagir com distintas classes de compostos fenólicos, formando complexos que aumentam a estabilidade de pigmentos antociânicos durante a maturação e envelhecimento de vinhos. Por outro lado, a hidrólise enzimática decorrente da atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase de leveduras pode levar à redução da coloração (Delcroix *et al.*, 1994; Manzanares *et al.*, 2000).

A estabilidade da cor de vinhos tintos pode ser aumentada pela combinação das antocianinas com polissacarídeos, em particular, manoproteínas oriundas da parede celular de leveduras (Feuillat, 2003).

Diante deste cenário, o trabalho buscou desenvolver um método para avaliar a adsorção de pigmentos em diferentes linhagens de leveduras, bem como determinar a intensidade e tonalidade do vinho em um único experimento com alta reprodutibilidade. O trabalho buscou também elucidar os fatores que determinam a adsorção diferencial desses pigmentos por diferentes linhagens de leveduras e identificar a principal causa deste fenômeno que ocorre durante a fermentação da uva madura em vinho.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Os resultados e discussão serão apresentados em dois artigos, que já foram publicados, sendo eles:

Capítulo 1 - Sergio Echeverrigaray, Morgana Menegotto, Ana Paula Longaray Delamare. A simple and reliable method for the quantitative evaluation of anthocyanin adsorption by wine yeasts. *Journal of Microbiological Methods*, Volume 157, 2019, Pages 88-92, ISSN 0167-7012, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.12.016>.

Capitulo 2 - Sergio Echeverrigaray, Fernando Joel Scariot, Morgana Menegotto, Ana Paula Longaray Delamare. Anthocyanin adsorption by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation is associated to the loss of yeast cell wall/membrane integrity. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 314, 2020, 108383, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108383>.

## 4.1 CAPÍTULO 1

Neste capítulo está descrito o artigo intitulado - *A simple and reliable method for the quantitative evaluation of anthocyanin adsorption by wine yeasts* – que foi publicado na revista *Journal of Microbiological Methods*, sendo que sua finalidade consistiu na obtenção de uma metodologia simples e confiável de avaliação da adsorção de antocianinas por leveduras vínicas.

### **A SIMPLE AND RELIABLE METHOD FOR THE QUANTITATIVE EVALUATION OF ANTHOCYANIN ADSORPTION BY WINE YEASTS**

Sergio Echeverrigaray<sup>1</sup>, Morgana Menegotto<sup>1</sup>, Ana Paula Longaray Delamare<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Enologia e Microbiologia Aplicada da Universidade de Caxias do Sul

#### **Abstract**

Yeast pigments adsorption can modify wine color intensity and is considered an important trait in wine yeasts. The existing methods for the evaluation of yeast adsorption are laborious, time consuming, need confirmation experiments, or are difficult to apply for a large number of strains generated in breeding programs. In this study, a new test is proposed to measure yeast pigments adsorption and wine color in a single experiment. The optimized method included the microfermentation of grape musts obtained by thermal extraction, digital determination of yeast biomass color, and spectrophotometric wine intensity evaluation. Results showed significant negative correlation between yeast pigments adsorption and wine color intensity. Pigments adsorption occurs from the middle to the end of fermentation, indicating cell wall changes and/or anthocyanins modifications over the process. Significant differences were observed on anthocyanins adsorption and wine intensity among yeast strains independent of the grape variety, and yeasts could be grouped as low, medium and high adsorption strains. The proposed method showed high reproducibility and allows the concomitant screening of hundreds of yeast strains in a short period of time.

**Keywords:** Pigments adsorption, Color intensity, *Saccharomyces*, Microvinification.

## 1. Introduction

Color intensity and tonality are among the main quality attributes of red wines and a matter of concern of winemakers (Jackson, 2014). The initial color of wines is due to pigments, mainly anthocyanins, extracted from grape skins during the maceration process (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Anthocyanins in must and wines are present as free (monomeric), polymerized, and co-polymerized pigments. Monomeric anthocyanins are water soluble glycosides of anthocyanidins, mainly malvidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside and petunidin-3-O-glucoside, prevalent in young wines, while polymerized and co-polymerized pigments increase during fermentation, maturation, and ageing (He *et al.*, 2012a and He *et al.*, 2012b).

Wine color intensity and tonality are affected by agricultural (grape variety, maturation, vintage, agricultural practices, among others), and enological (extraction system, maceration conditions, alcoholic and malolactic fermentation, yeast strains, ageing) factors. During and after alcoholic fermentation, yeasts can positively contribute for red wine color by: (1) the production of metabolites, like pyruvic acid and acetaldehyde, which can interact with anthocyanin; (2) the release of mannoproteins and other cell wall components, particularly during the autophagic/autolytic process; and (3) the bioconversion of grape precursors generating reactive molecules that interact with anthocyanins increasing pigments polymerization and stability (Morata *et al.*, 2016). However, yeasts can also reduce color intensity and modify wine tonality through deglycosylation of anthocyanins by specific  $\beta$ -glycosidases or anthocyanidases (Manzanares *et al.*, 2000), and the direct adsorption of pigments on yeasts cell surface (Morata *et al.*, 2003, 2005, 2016; Caridi *et al.*, 2007).

The relevance of anthocyanin adsorption by yeasts on wine color has been a matter of discussion for decades due conflicting results obtained by different groups. However, in the last years, its influence on wine color and anthocyanin concentration and stability has been confirmed (Morata *et al.*, 2003, 2005, 2016; Medina *et al.*, 2005; Caridi *et al.*, 2007). Anthocyanin adsorption by yeasts depend on yeast cell wall constitution and the proportion of the different anthocyanins in grape must and wine (Medina *et al.*, 2005; Morata *et al.*, 2003, 2005, 2016). In general, yeast cell wall makes up 15 to 30% of the dry weight of the cell and is mostly composed of mannoproteins,  $\beta$ -1,3-glucans,  $\beta$ -1,6-glucans, and chitin (Lipke and

Ovalle, 1998), and its thickness and composition varied among species, strains, and in response to growth conditions (Aguilar-Uscanga and François, 2003).

Yeast pigments adsorption capacity in *Saccharomyces cerevisiae* has been evaluated between 1.6 and 5.8% of total anthocyanins depending on strains (Morata *et al.*, 2005), and exhibits a polygenic inheritance (Caridi *et al.*, 2007). In this context, yeast anthocyanins adsorption is pointed out as an important trait on yeast selection and improvement for wine production (Pretorius, 2000; Fleet, 2008; Bisson and Karpel, 2010).

Several methods have been proposed for the evaluation of yeast pigments adsorption capacity. Morata *et al.* (2003) analyzed yeast adsorption by a method that involves red wine fermentation, anthocyanins extraction from yeast cells, and anthocyanins analysis by HPLCDAD-MS. Although time consuming and not appropriate for large number of samples, this method is considered as standard by the International Vine and Wine Organization (OIV, 2012). Medina *et al.* (2005) developed a model red grape juice for the indirect determination of yeast adsorption by the analysis of wine anthocyanins using HPLC-DAD. To evaluate a higher number of yeast stains, Caridi, 2006, Caridi, 2013, Caridi *et al.*, 2015 proposed a method that involves yeast growth on a solid “grape skin agar” medium on Petri dishes, evaluating their adsorption capacity (WCA- wine color adsorption) by photographing yeast biomass and measuring their red, green, and blue color intensity by a computing-assisted evaluation.

Although efficient, these methods have several limitations for the analysis of the large number of yeasts strains generated in breeding program, the evaluation of yeast adsorption in fermentative conditions, the analysis of yeast strains adsorption capacity on must from different grape varieties, and the concomitant evaluation of yeast adsorption and its effect on wine color. To solve these limitations, we developed and optimize a simple and reliable method that involves microvinification followed by yeast adsorption and wine color analyses that can be applied for the evaluation of hundreds of strains at a time in a short period.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strains and growth conditions

Twenty two commercial yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*) EC1118, QA23, QD145, CY3079, Cross Evolution, Elegance (Lallemand, Canada); Maurivin B, AWRI-R2, AWRI-350, AWRI-796, BP725, UCD522, Pris de Mousse (PDM) (Maurivin, Australia); VL-1, VL2, VL-5, Spark, F33, F15 (Laffort, France), Y904 (COATEC, Brazil); Rouge (Fermol, Italy), Red Fruit (Enartis, Italy), and three *S. cerevisiae* (MPF, LAMF, LACF) and one *Torulasporea delbrueckii* (TPI-4) isolated from Brazilian vineyard, were used in the experiments.

YEPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), or solidified with 2% agar when required, was used for yeast maintenance and multiplication.

Yeast cell enumeration for inoculum determination and the evaluation of yeast population during alcoholic fermentation was carried out by microscopic cell counting using a Neubauer chamber.

### 2.2. Microfermentations

Small scale fermentations were undertaken using *Vitis vinifera* vr. Merlot and Cabernet Sauvignon, and *Vitis labrusca* vr. Ives musts. Musts were obtained by liquefying the berries (3 pulses of 30 s), heating at 70 °C for 30 min, filtering through cheesecloth, and autoclaving at 121 °C for 30 min. Musts were conserved under refrigeration (4 °C) in the dark. Previous to the experiments musts were centrifuged (6000×g, 10 min) and filter (45 µm) to remove particles. Yeasts were inoculated ( $1-2 \times 10^7$  cels/mL) from a pre-culture of 48 h at 25 °C in YEPD.

Fermentations (800 µL) were conducted in 96 deep wells storage plates with 2.2 mL capacity (Scientific Specialties Inc., USA) sealed with Platemax sealing films (Axygen, USA). Fermentations were maintained stationary at 25 °C, and vortexed (IKA MS3 vortexer, Germany) once a day (1 min, 1500 rpm) to increase cell/must contact.

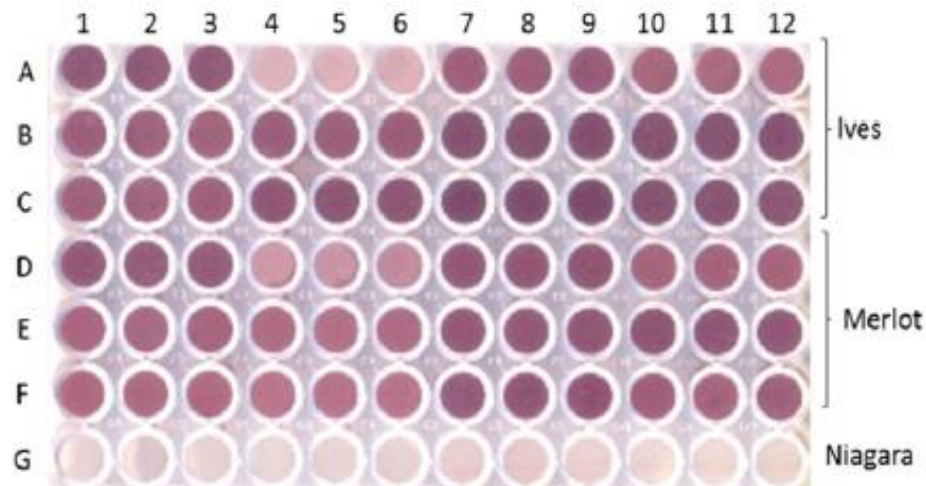
At the end of fermentation (14 days), plates were centrifuged at 3600 rpm, 4 °C, for 5 min. Wines (50 µL) were transferred to 96 wells Elisa-plates (TPP, Switzerland) for the evaluation of wine color intensity and tonality, while cell pellets were washed twice with water, and suspended in 200 µL of 10% ethanol solution in 20 mM tartrate buffer (pH 3.6) for the analysis of yeast pigments adsorption.

### 2.3. Wine color density and tint

Wine samples were diluted (1:4) with a 10% ethanol solution in 20 mM tartrate buffer (pH 3.6) (150 µL), and evaluated in an ASYS Expert Plus microplate reader (Biochrom, UK). Absorbance at 420, 520, and 620 nm were used to calculate wine color intensity ( $A_{420}+A_{520}+A_{620}$ ), and color hue ( $A_{420}/A_{520}$ ). Using the 1:4 dilution the adsorption values varied between 0.3 and 0.9.

### 2.4. Yeast pigments adsorption

Washed yeast cell suspensions (200 µL) were transferred to 96 wells Elisa-plates (TPP, Switzerland) and centrifuged at 3600 rpm, 4 °C, for 5 min. The plates (Fig. 1) were digitalized using a scanner, and analyzed with Adobe Photoshop CS2 Version 9.0 for Windows. Each spot region was delimited and their red (R), green (G), blue (B), and mean RGB values computed. Each value, ranging from 0 (black) to 255 (white), was used to calculate Relative Yeast Pigments Adsorption [ $RYP A = - (RGB \text{ control} - RGB \text{ yeast sample})$ ]. RGB control is the mean value of three independent non inoculated must samples processed and analyzed in the same way as the fermented ones. RGB control values varied between 245 and 251 among experiments (almost white), indicating very low interference of residual colored particles. Moreover, yeasts samples from white must fermentation showed RGB values of 252–254, indicating noninterference of yeast cell background on pigments adsorption determination (Fig. 1).



**Fig. 1.** An example of an yeast pigments adsorption plate showing high reproducibility, and variation among yeast strains in musts from two grape varieties (Ives – *V. labrusca*, and Merlot – *V. vinifera*), and yeast background color in a white must (Niagara). Yeast strains (columns; rows): Red Fruit (1–3; A,D,G), Rouge (4–6; A,D,G), Y904 (7–9; A,D,G), QA23 (10–12; A,D,G), EC1118 (1–3; B,E), UCD522 (4–6; B,E), F15 (7–9; B,E), Spark (10–12; B,E), BP725 (1–3; C,F), Elegance(4–6; C,F), TPI-4 (7–9; C,F), CY3079 (10–12; C,F). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

## 2.5. Statistical analysis

Descriptive parameters (means and standard deviations), One-Way ANOVA, means comparison (Tukey's HSD test,  $p < .05$ ), and Pearson correlations were performed using the IBM SPSS 20.0 Statistics program for Windows.

## 3. Results and discussion

In order to determine the effect of different parameters and optimize the evaluation of yeast pigments adsorption, wine intensity and tint by the proposed method, we developed several experiments using *S. cerevisiae* Red Fruit and F33, and a Merlot must. Yeast strains were selected based on their high and medium adsorption capacity, respectively, and Merlot must considering variety importance in Brazilian red wine production.

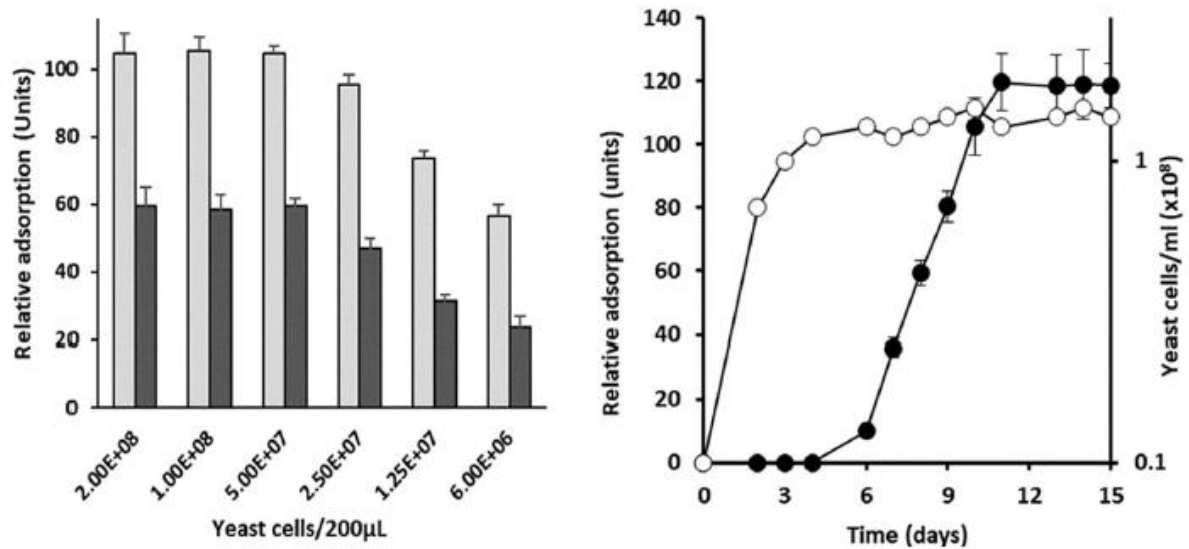
A first experiment was designed to evaluate the effect of ethanol and pH on wine and pigments adsorption values. Thus for, distilled water, PBS (10 mM phosphate buffer, pH 7.0), 10% ethanol (pH 7.0), and 10% ethanol (20 mM tartrate buffer, pH 3.6) were used to dilute wine samples, and to wash and suspend yeast cells. The results (data not shown) indicated

that 10% ethanol (pH 3.6) maintained wine color intensity and tint, and increase the red adsorption by yeast cells when compared with water, PBS and ethanol (pH 7.0). Low pH and ethanol guarantee the equilibrium between red (flavilium cations), blue (quinoidal) and yellow/colorless (chalcone) forms of anthocyanins currently found in wines (He *et al.*, 2012a). Low pH and 10–12% ethanol has been used to evaluate wine color and the determination of the chromogenic characteristic of wines (Pérez-Caballero *et al.*, 2003).

In order to evaluate the effect of cell number per sample on the relative adsorption data, a serial dilution of Red Fruit and F33 yeast cells obtained after fermentation (14 days) of a Merlot must were deposited on Elisa plates and evaluated. The results (Fig. 2A) showed that independent of their differences on pigments adsorption capacity, both strains exhibited constant relative adsorption (RYPA) values above  $5 \times 10^7$  cells/sample (200  $\mu$ L). This fact can be attributed to the formation of a homogenous cell layer in high cell densities reducing light interference by transparence during scanning. Under wine fermentation conditions, wine yeast strains of *Saccharomyces* reach between 0.8 and  $2.5 \times 10^8$  cells/mL, such that a fermentation of 800  $\mu$ L is sufficient to generate the number of cells necessary for the determination of yeast pigments adsorption.

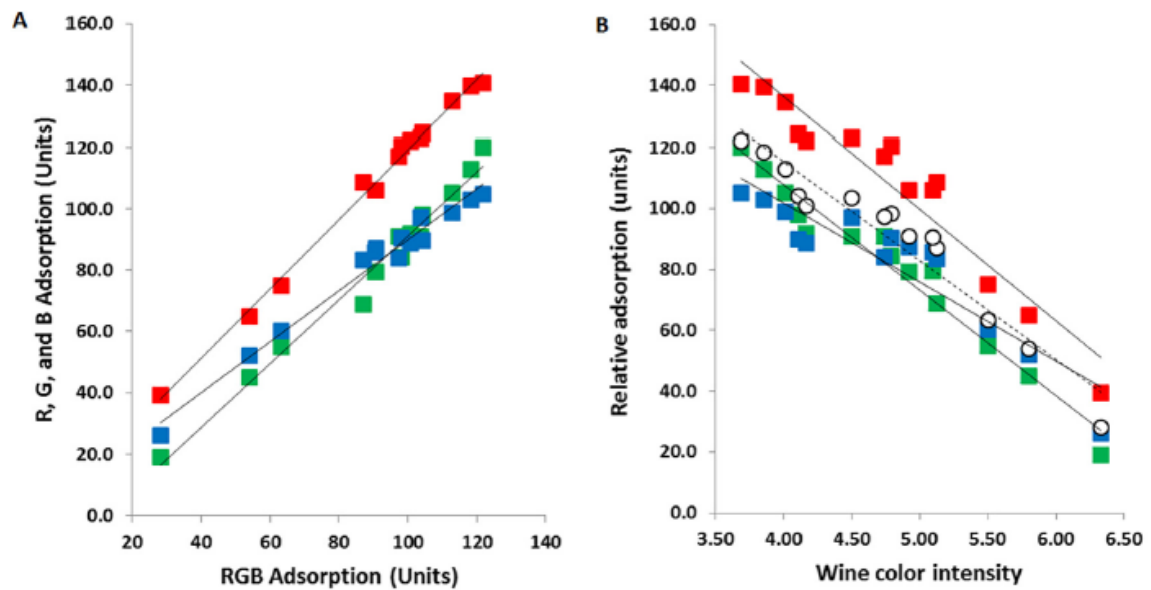
To determine yeast pigments adsorption along wine fermentation, 400 mL experiment was conducted with Red Fruit strain on Merlot must collecting samples at different intervals and standardizing yeast cell number per sample ( $2 \times 10^8$  cell/200  $\mu$ L) for the evaluation of RGB values. As can be observed in Fig. 2B, yeast pigments adsorption started after 6 days, three days after yeast population reached stationary phase, and increased until day 11, remaining stable on the following days. Based on these results yeast adsorption capacity should be evaluated at the end of fermentation, that correspond to 12 to 15 days under the experimental conditions. Yeast adsorption behavior during wine fermentation may be associated with the increase of acylated anthocyanins during fermentation, as these derivatives are more strongly adsorbed by yeasts (Morata *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005; 2018), and the modification of yeast cell wall composition and affinity (Aguilar- Uscanga and François, 2003).





**Fig. 2.** Two main factors that influence the evaluation of relative pigments adsorption: (A) the effect of cell number per sample (A): Red Fruit (light grey) and F33 (dark grey), and (B) the effect of yeast population (open circles) and yeast pigments adsorption (close circles) along wine fermentation. Data represent means and standard deviations from three replications. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

The image analysis of yeast cells allow to computed the red (R) green (G), and blue (B) colors, and a RGB mean of the samples. To define the relation between these data and the wine color intensity, an experiment with fifteen wine yeast strains fermenting a Merlot must was developed. The results (Fig. 3A) showed that the mean of RGB can be used as a general “relative adsorption” value, as it highly correlated with Red ( $R=0.88$ ), Green ( $R=0.92$ ), and Blue ( $R=0.73$ ) individual mean values. Moreover, as can be observed in Fig. 3B, the R, G, B, and RGB values significantly correlated with wine color intensity ( $R=-0.897$ ), confirming the role of yeast anthocyanin adsorption on the reduction of wine color during the fermentation process (Morata *et al.*, 2003, 2005; Morata *et al.*, 2016). It is worth pointing out that while red and green values are almost linear all along the distribution, blue values had a linear behavior just in low and middle adsorption strains.



**Fig. 3.** Relation between (A) red (red squares), green (green squares), blue (blue squares) values and RGB means, and (B) between red, green, blue, and RGB (open circles) and wine color intensity. Data are mean values of twelve commercial wine yeast strains. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Based on the above results, twenty commercial wine yeast strains were evaluated on three musts obtained from two *Vitis vinifera* (Mertot and Cabernet Sauvignon) and a *Vitis labrusca* (Ives) varieties, to determine the effect of grape variety on the adsorption capacity and its relation with wine color intensity. The results (Table 1) showed significant variation of anthocyanins adsorption and wine color intensity among yeast strains and among grape varieties. However, interaction between yeast strains and grape varieties was not-significant, and yeast strains grouped as low, medium and high adsorption capacity were constant. Thus, independent of grape must, yeast strains with lowest adsorption were Rouge, VL-1, VL-2, VL-5, AWRI-R2, and F33, and those with high adsorption were TPI-4 (*T. delbrueckii*), Y904, Red Fruit, Elegance, AWRI-350, and CY3079. Regarding wine tint, significant differences were observed between grape varieties, but no significant differences were detected between yeast strains. (Caridi, 2013) reported significant interaction between yeast adsorption and must origin (variety). The disagreement between these results can be attributed to differences on varietal anthocyanins composition between the varieties used in each evaluation (Pomar *et al.*, 2005), yeast strains analyzed that varied on their pigments versus cell wall mannoproteins interactions capacities (Caridi, 2006). Independent of this fact, the present method allows the evaluation of yeast adsorption, and its effect on wines obtained

from musts from different origins and varieties, allowing the best experimental configuration for the intended purpose.

**Table 1** - Color intensity and relative pigments adsorption (means and standard deviations) of twenty commercial wine yeast strains on musts from three red grape varieties.

	Ives		Merlot		Cabernet Sauvignon	
	Intensity	Adsorption	Intensity	Adsorption	Intensity	Adsorption
Red Fruit	6.11 ± 0.04 <sup>c</sup>	102.8 ± 0.57 <sup>dc</sup>	5.25 ± 0.16 <sup>d</sup>	100.9 ± 1.5 <sup>a</sup>	3.46 ± 0.04 <sup>ab</sup>	90.7 ± 0.9 <sup>bc</sup>
Rouge	8.13 ± 0.04 <sup>a</sup>	28.2 ± 3.1 <sup>i</sup>	6.86 ± 0.03 <sup>a</sup>	51.7 ± 5.9 <sup>e</sup>	3.71 ± 0.09 <sup>a</sup>	30.4 ± 2.3 <sup>e</sup>
Maurivin B	6.16 ± 0.03 <sup>e</sup>	97.6 ± 2.7 <sup>ef</sup>	5.08 ± 0.28 <sup>de</sup>	105.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	3.19 ± 0.23 <sup>b</sup>	110.2 ± 1.5 <sup>a</sup>
QA23	7.12 ± 0.12 <sup>b</sup>	87.0 ± 2.6 <sup>g</sup>	5.75 ± 0.04 <sup>c</sup>	92.0 ± 1.0 <sup>b</sup>	3.37 ± 0.06 <sup>ab</sup>	85.1 ± 2.8 <sup>bc</sup>
EC1118	7.09 ± 0.22 <sup>bc</sup>	93.9 ± 1.9 <sup>f</sup>	6.06 ± 0.09 <sup>bc</sup>	88.5 ± 1.9 <sup>bc</sup>	3.41 ± 0.12 <sup>ab</sup>	95.7 ± 0.7 <sup>b</sup>
UCD522	6.79 ± 0.12 <sup>cd</sup>	98.3 ± 0.9 <sup>ef</sup>	6.22 ± 0.05 <sup>b</sup>	82.7 ± 2.5 <sup>cd</sup>	3.60 ± 0.07 <sup>a</sup>	71.8 ± 3.6 <sup>d</sup>
AWRI-350	6.01 ± 0.12 <sup>e</sup>	112.9 ± 1.8 <sup>b</sup>	5.28 ± 0.14 <sup>d</sup>	103.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.40 ± 0.10 <sup>ab</sup>	80.1 ± 1.6 <sup>cd</sup>
Y904	5.69 ± 0.09 <sup>f</sup>	109.8 ± 0.5 <sup>bc</sup>	4.98 ± 0.15 <sup>de</sup>	106.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.13 ± 0.04 <sup>b</sup>	88.5 ± 2.6 <sup>bc</sup>
BP725	6.92 ± 0.02 <sup>bcd</sup>	94.6 ± 2.0 <sup>f</sup>	6.04 ± 0.11 <sup>bc</sup>	85.8 ± 0.6 <sup>bc</sup>	3.41 ± 0.26 <sup>ab</sup>	95.9 ± 1.6 <sup>b</sup>
Elegance	6.74 ± 0.10 <sup>d</sup>	106.3 ± 0.9 <sup>cd</sup>	6.23 ± 0.08 <sup>b</sup>	76.1 ± 1.1 <sup>d</sup>	3.64 ± 0.16 <sup>a</sup>	71.2 ± 8.8 <sup>d</sup>
TPI4	5.85 ± 0.12 <sup>ef</sup>	118.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	4.85 ± 0.07 <sup>e</sup>	105.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	3.08 ± 0.13 <sup>b</sup>	110.1 ± 4.6 <sup>a</sup>
VL-5	8.04 ± 0.04 <sup>a</sup>	31.4 ± 2.1 <sup>i</sup>	6.72 ± 0.03 <sup>a</sup>	54.6 ± 4.2 <sup>e</sup>	3.68 ± 0.12 <sup>a</sup>	32.2 ± 1.9 <sup>e</sup>
VL-1	7.89 ± 0.11 <sup>a</sup>	45.7 ± 4.3 <sup>h</sup>	6.44 ± 0.09 <sup>a</sup>	65.2 ± 3.8 <sup>e</sup>	3.49 ± 0.10 <sup>a</sup>	39.6 ± 2.2 <sup>e</sup>
VL-2	8.12 ± 0.05 <sup>a</sup>	30.5 ± 2.5 <sup>i</sup>	6.97 ± 0.08 <sup>a</sup>	52.2 ± 3.6 <sup>e</sup>	3.84 ± 0.09 <sup>a</sup>	29.7 ± 1.5 <sup>e</sup>
F15	6.97 ± 0.13 <sup>b</sup>	87.4 ± 2.2 <sup>g</sup>	5.62 ± 0.07 <sup>c</sup>	95.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	3.26 ± 0.06 <sup>ab</sup>	88.2 ± 2.5 <sup>bc</sup>
F33	7.77 ± 0.09 <sup>a</sup>	49.4 ± 1.7 <sup>hi</sup>	6.36 ± 0.03 <sup>ab</sup>	58.6 ± 2.4 <sup>e</sup>	3.54 ± 0.12 <sup>ab</sup>	39.9 ± 2.0 <sup>e</sup>
AWRI-R2	7.83 ± 0.12 <sup>a</sup>	38.0 ± 1.1 <sup>i</sup>	6.55 ± 0.06 <sup>ab</sup>	56.2 ± 3.2 <sup>e</sup>	3.58 ± 0.10 <sup>ab</sup>	34.4 ± 1.8 <sup>e</sup>
AWRI-796	6.81 ± 0.07 <sup>cd</sup>	99.2 ± 2.7 <sup>f</sup>	6.15 ± 0.22 <sup>de</sup>	102.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	3.19 ± 0.11 <sup>b</sup>	113.2 ± 1.7 <sup>a</sup>
Spark	7.27 ± 0.21 <sup>bc</sup>	97.2 ± 0.9 <sup>ef</sup>	6.30 ± 0.13 <sup>bc</sup>	89.5 ± 1.9 <sup>bc</sup>	3.52 ± 0.12 <sup>ab</sup>	98.3 ± 0.8 <sup>b</sup>
CY3079	6.94 ± 0.14 <sup>bcd</sup>	103.3 ± 0.9 <sup>cd</sup>	6.33 ± 0.10 <sup>b</sup>	97.3 ± 1.1 <sup>ab</sup>	3.66 ± 0.16 <sup>a</sup>	101.2 ± 5.6 <sup>ab</sup>

# Different letters within a column indicate significant differences at 95% of confidence level by the Tukey's HSD test.

#### 4. Conclusion

This work described a simple and optimized method for the monitoring of yeast pigments adsorption and wine color changes using microvinification, spectrophotometric determination of wine color intensity, and digital determination of yeast relative pigments adsorption in a single experiments. The method can be used for the evaluation of high number of yeast strains and species, and designed for any intended purpose (must origin, yeast strain, breeding). The method confirmed the variation on yeast adsorption capacity, and its interaction with grape varieties anthocyanin composition. Moreover, data showed a particular

behavior on yeast adsorption, with high pigments retention through the final stages of fermentation.

### **Acknowledgements**

The authors thank the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Brazilian Research Council (CNPq) for their fellowship and financial support, respectively.

### **References**

- Aguilar-Uscanga, B., François, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 266–274.
- Bisson, L., Karpel, J.E., 2010. Genetics of yeast impacting wine quality. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* 1, 139–162.
- Caridi, A., 2006. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Anton. Van Leeuwenhoek* 89, 417–422.
- Caridi, A., 2013. Improved screening method for the selection of wine yeasts based on their pigment adsorption activity. *Food Technol. Biotechnol.* 51, 137–144.
- Caridi, A., Sidari, R., Solieri, L., Cufari, A., Giudici, P., 2007. Wine colour adsorption phenotype: an inheritable quantitative trait loci of yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 103, 735–742.
- Caridi, A., Sidari, R., Krakova, L., Kuchta, T., Pangallo, D., 2015. Assessment of color adsorption by yeasts using grape skin agar and impact on red wine color. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 49, 195–203.
- Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995.
- He, F., Liang, N.N., Mu, L., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.Q., 2012a. Anthocyanins and their variation in red wines. I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* 17, 1571–1601.
- He, F., Liang, N.N., Mu, L., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.Q., 2012b. Anthocyanins and their variation in red wines. II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* 17, 1483–1519.
- Jackson, R.S., 2014. Sensory perception and wine assessment. Chapter 11 In: *Wine Science: Principles and Applications*, 4th Edition. Academic Press, Elsevier (933 p).

- Lipke, P.N., Ovalle, R., 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bact.* 180, 3735–3740.
- Manzanares, P., Rojas, V., Genovés, S., Vallés, S., 2000. A preliminar search for anthocyanin-  $\beta$ -D-glucosidase activity in non-Saccharomyces wine yeasts. *Int. J. Food Sci. Techn.* 35, 95–103.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2005. Yeast interactions with anthocyanins during red wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 104–109.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2018. Effects of non-Saccharomyces yeasts on color, anthocyanin and anthocyanin-derived pigments of Tannat grapes during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 69, 148–156.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colombo, B., Suárez, J.A., 2003. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4084–4088.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Colombo, B., Suárez, J.A., 2005. Cell wall anthocyanin adsorption by different Saccharomyces strains during the fermentation of Vitis vinifera L. cv. Graciano grapes. *Eur. Food Res. Technol.* 220, 341–346.
- Morata, A., Iris, L., Suárez, J.A., 2016. Influence of yeasts in wine colour. Chapter 13 In: Morata, A., Loira, I. (Eds.), *Grape and Wine Biotechnology*. IntechOpen, pp. 285–305.
- OIV (2012) Guidelines for the characterization of wine yeasts of the genus Saccharomyces isolated from vitivinicultural environments: low cell wall anthocyanin adsorption. Resolution OIV-Oeno 370–2012.
- Pérez-Caballero, V., Ayala, F., Echávarri, J.R., Negueruela, A.I., 2003. Proposal for a new standard OIV method for determination of chromatic characteristics of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 59–62.
- Pomar, F., Novo, M., Masa, A., 2005. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *J. Chromat. A* 1094, 34–41.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology*. Vol. 1. The microbiology of wine and vinifications, 2nd. John Wiley & Sons, England, pp. 497.

## 4.2 CAPÍTULO 2

Neste capítulo está descrito o artigo intitulado - *Anthocyanin adsorption by Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation is associated to the loss of yeast cell wall/membrane integrity* – que foi publicado na revista *International Journal of Food Microbiology*, o qual consiste no estudo da adsorção de antocianinas por *Saccharomyces cerevisiae* associada à perda de integridade da parede celular/ membrana da levedura durante a fermentação do vinho.

### **ANTHOCYANIN ADSORPTION BY SACCHAROMYCES CEREVISIAE DURING WINE FERMENTATION IS ASSOCIATED TO THE LOSS OF YEAST CELL WALL/MEMBRANE INTEGRITY**

Sergio Echeverrigaray<sup>1</sup>, Fernando Joel Scariot<sup>1</sup>, Morgana Menegotto<sup>1</sup>, Ana Paula Longaray Delamare<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Enologia e Microbiologia Aplicada da Universidade de Caxias do Sul

#### **Abstract**

Yeasts contribute to anthocyanin extraction during red wine fermentation, but they also reduce wine color by adsorption of pigments on their cell walls. *Saccharomyces cerevisiae* strains vary on their pigment adsorptive properties, but the mechanisms involved in this phenomenon remain unclear. In this work, we evaluated high, medium and low pigment-adsorbing *S. cerevisiae* winemaking strains during red wine fermentation. Flow cytometry protocols were devised to measure different populations of yeast and their pigment adsorption in association with other variables such as fermentation rate, cell viability, and cell wall/membrane integrity. The results showed that the high pigment adsorbing strain accumulated anthocyanin towards the end of alcoholic fermentation observed as an increase in the population of fluorescent cells. By contrast, low adsorbing strain displayed a single low adsorbing cell population. Pigment adsorption was negatively correlated with cell viability and cell wall/membrane integrity. Independent of their adsorptive potential during wine fermentation, viable cells displayed a low capacity to adsorb anthocyanins, while permeabilized yeast cells exhibited high pigment adsorption capacity. Our findings suggest that yeast pigment adsorption requires a breach to the inner part of the cell wall, for pigments

to access constitutively expressed pigment-binding factors, and that the phenotypic differences among strains are determined by their fermentative live-span and cell wall/membrane integrity. These findings will help to rationalize and optimize the match of winemaking strains and vines.

Keywords: Anthocyanins; Wine color; Yeast pigment adsorption; Cell viability.

## 1. Introduction

The color intensity and tonality are important quality features of red wines and a matter of concern to winemakers (Jackson, 2008; Morata *et al.*, 2016). The color of wines is determined by the concentration of pigments, primarily anthocyanins and related compounds, which are extracted from grape skins during the maceration process (Balík, 2006; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Anthocyanins in must and wine are present as monomeric, polymerized, and co-polymerized forms (He *et al.*, 2012a). Monomeric anthocyanins are soluble glycosides of anthocyanidins, such as malvidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, petunidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside, and delphinidin-3-O-glucoside, and their acetyl, coumaroyl, and other esters. These anthocyanins interact with other compounds during fermentation, maturation, and aging, and yield the more complex polymerized and copolymerized pigments (He *et al.*, 2012a, 2012b).

Wine color intensity and tonality depends on the grapevine variety, agricultural practices, and fruit maturation, as well as enological protocols, such as extraction procedures, maceration conditions, malolactic fermentation, winemaking yeast strains, and wine aging, among others (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006; Morata *et al.*, 2016). During fermentation and aging, anthocyanins are chemically modified by their interaction with pyruvic acid, coumaric acid, ethanal, flavan-3-ols, condensed tannins, and other reactive molecules yielding pyroanthocyanins and polymerized pigments (He *et al.*, 2012a, 2012b; Morata *et al.*, 2016).

Yeasts can reduce color intensity and modify wine tonality by deglycosylation of anthocyanins catalyzed by  $\beta$ -glycosidase or anthocyanidase enzymes (Manzanares *et al.*, 2000), and through the direct adsorption of pigments on yeasts cell wall (Medina *et al.*, 2005; Caridi *et al.*, 2007; Morata *et al.*, 2003, 2005, 2016). Data reported by Morata *et al.* (2016) showed that adsorption mechanisms can be responsible for up to 6% reduction of

anthocyanins that contribute to wine color intensity, significantly impacting the quality of the final product. Yeast adsorption and its impact on wine color has been corroborated by multiple studies (Medina *et al.*, 2005; Caridi *et al.*, 2007; Morata *et al.*, 2003, 2005, 2016), and this trait has been identified as a target for yeast strain selection towards the improvement for wine production (Pretorius, 2000; Fleet, 2008).

Experimental data indicated that anthocyanin adsorption by yeast depends on cell wall constitution and the proportion of the anthocyanins in grape must and wine (Vasserot *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 2005; Caridi *et al.*, 2007; Morata *et al.*, 2003, 2005, 2016). The cell wall of yeast is primarily composed of mannoproteins,  $\beta$ -1,3-glucans,  $\beta$ -1,6-glucans, and chitin (Lipke and Ovalle, 1998), and its thickness and composition can vary in response to growth conditions (Aguilar-Uscanga and François, 2003). Moreover, yeast pigments adsorption is variable among yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains (Morata *et al.*, 2005; Caridi *et al.*, 2007; Echeverrigaray *et al.*, 2019), and this trait displays polygenic inheritance (Caridi *et al.*, 2007).

Yeast pigment adsorption has been evaluated by: i) anthocyanin extraction and analysis by HPLC-DAD-MS (Morata *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005), ii) growth of yeast on solid media supplemented with red grape skins (Caridi *et al.*, 2015), or iii) with red wine fermentation (Echeverrigaray *et al.*, 2019) followed by relative yeast pigment adsorption determination by computing-assisted image analysis.

Monitoring of anthocyanin adsorption during the course of alcoholic fermentation using a high-adsorption *S. cerevisiae* strain showed that yeast cells primarily adsorb grape pigments towards the end of fermentation (Echeverrigaray *et al.*, 2019). This behavior can be explained by: (1) chemical modifications to anthocyanins during fermentation that determines an increase in their adsorbability by yeast cells, (2) structural or metabolic modifications that increase yeast capacity to adsorb anthocyanins, or (3) a combined effect of both factors. The first hypothesis is supported by Morata *et al.* (2003) and Medina *et al.* (2005) who showed that acylated anthocyanins, primarily cinnamoyl derivatives, are preferentially accumulated during fermentation (He *et al.*, 2012a, 2012b). On the other hand, several studies report structural and compositional changes in yeast cell walls and membranes that correlate with the stages of fermentation (Mizoguchi, 1998; Klis *et al.*, 2002; Pratt *et al.*, 2003; Aguilar-Uscanga and François, 2003; Duc *et al.*, 2017), which may contribute to the overall amount of anthocyanin adsorption. Such changes occur during alcoholic fermentation because



yeast cells must withstand several stressors (osmotic stress, low pH, high acidity, nitrogen depletion, elevated ethanol), and respond accordingly to maintain metabolic activity and cell viability (Bauer and Pretorius, 2000; Stanley *et al.*, 2010).

To address these open questions, we embarked on the present study to determine the main factors responsible for anthocyanin adsorption during wine fermentation using a complementary method of flow cytometry analysis. This method enables the evaluation of individual yeast cell pigments adsorption and other cellular parameters.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Yeast strains and growth conditions**

Five commercial wine yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae*) were used in the experiments. These strains were selected based on their high (“Red Fruit”, Enartis, Italy), medium (“Cross Evolution”, Lallemand, Canada, “Maurivin B”, Maurivin, Australia, and “Y904”, COATEC, Brazil), and low (“Rouge”, Fermol, Italy) relative yeast pigment adsorption phenotypes (RYPA) with average values of >75, 30 to 55, and <15, respectively.

### **2.2. Starting cultures**

YEPD broth (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), or YEPD solidified with 2% agar, was used for yeast maintenance and multiplication.

### **2.3. Microfermentations**

Small scale fermentations were undertaken using must from *Vitis vinifera* cv. Merlot/Tannat (50:50), a combination that yields the desired intense color, obtained by a laboratory-scale thermovinification process. Briefly, grape berries were homogenized in a blender (3 pulses of 30 s), heated at 70 °C for 30 min, and filtered through cheesecloth. The resulting must was autoclaved at 121 °C for 30 min, and conserved under refrigeration (4 °C) in the dark. Previous to the experiments the must were centrifuged (6000 rcf, 10 min) and

filtered (45  $\mu\text{m}$ ) to remove particles. Yeasts were inoculated ( $1\text{--}2\times 10^7$  cells/mL) from a starting culture of 48 h at 25 °C in YEPD.

Fermentations (400 mL) were conducted in 500 mL Duran flasks closed with Muller valves. Fermentations were maintained stationary at 25 °C, and agitated manually once a day.

#### 2.4. Relative yeast pigments adsorption

Yeast anthocyanins adsorption was determined by the method proposed by Echeverrigaray *et al.* (2019). Briefly, yeast cells from a 1 mL sample were collected by centrifugation (3600 rpm, 10 °C, 5 min), washed twice with 10% ethanol (pH 3.6), resuspended in 200  $\mu\text{L}$  ( $1\text{--}2\times 10^8$  cells/200 mL), deposited in 96 well plates (TPP, Switzerland) and centrifuged at 3600 rpm, 10 °C, for 5 min. The plates were imaged using a HP ScanJet G3110 Photo Scanner and analyzed by computing the red-green-blue (RGB) values of each sample with Adobe Photoshop CS2 Version 9.0. Relative Yeast Pigments Adsorption was calculated as described by Echeverrigaray *et al.* (2019). All samples were imaged in technical triplicate plates.

#### 2.5. Anthocyanins adsorption of individual cells

Pigments adsorption by individual cells was determined by flow cytometry and fluorescence microscopy. Flow cytometry (FC) determination of anthocyanin adsorbing cells was carried out using a FACSCalibur (BD) analyzer equipped with an argon-ion laser of wavelength 488 nm, and a long pass filter of 670 nm (FL3). Data are expressed as percentage of cells with above-threshold fluorescence, and each population defined by its average relative fluorescence unit (RFU). Samples were analyzed in triplicate FC measurements.

In an initial experiment, an excitation wavelength of 488 nm, and filters 533/30 (FL1), 585/42 (FL2) and long pass 670 nm (FL3) were used to define the optimal emission spectrum.

Pigment adsorbing yeast cells were also counted using a fluorescence microscope, Olympus IX71 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan), using a filter for excitation wavelengths between 480 and 543 nm and an emission filter for 580–700 nm. Microscopic images were

captured using a digital camera, and each sample was visually counted in triplicate with at least 200 cells per evaluation.

## 2.6. Yeast viability and membrane integrity

Yeast cell viability was determined by methylene blue staining, according to the method proposed by Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza (2014). Cell membrane integrity was determined by the Trypan Blue exclusion assay (McGahon *et al.*, 1995) using a 0.4% Trypan Blue solution (ThermoFisher, 15250061), and following the manufacturer instructions. Cells were evaluated on an Olympus IX71 microscope, counting blue cells as membrane damaged cells. Each sample was evaluated in triplicate with at least 200 cells per evaluation.

## 2.7. Grape skin anthocyanins extraction

Grape anthocyanins were extracted from Tannat grapes collected at Caxias do Sul, RS, Brazil, using the methanol/formic acid procedure (Li *et al.*, 2010), followed by suspension in 10% ethanol solution (pH 3.6). The anthocyanin concentration of the extract was determined by spectrophotometry (Lee *et al.*, 2005) and expressed as mg/L of malvidin-3-O-glucoside. Extract was adjusted to 120 mg/L and maintained in the dark under refrigeration (4 °C).

## 2.8. Anthocyanins adsorbed by yeast cells

Anthocyanins were recovered by the method reported by Morata *et al.* (2003), and quantified by spectrophotometry (Lee *et al.*, 2005).

## 2.9. Yeast cell killing/permeabilization

Yeast cells were collected by centrifugation on day 3 of fermentation of Chardonnay white must (2 L), and re-suspended in phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4,  $1 \times 10^9$  cells/mL). Cells suspensions were treated with three methods: i) for 10 min at 70 °C (adapted from Guyot *et al.*, 2015), ii) 50% (v/v) ethanol (pH 3.6) for 30 min (Panesar *et al.*, 2007), or iii) sodium lauryl sarcosinate (0.2%) for 30 min (Kippert, 1995). Yeast viability and cell wall

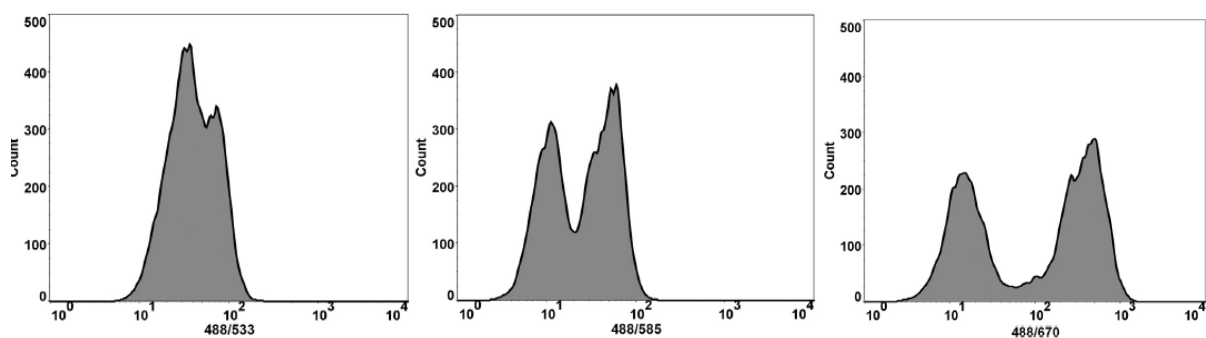
integrity of untreated and treated cells was determined as described by Methylene Blue, and Trypan Blue staining, respectively.

## 2.10. Statistical analysis

Descriptive parameters (mean and standard deviation), ANOVA, means comparison (Tukey's test), and Pearson correlations were performed using the IBM SPSS 20.0 Statistics program for Windows.

## 3. Results

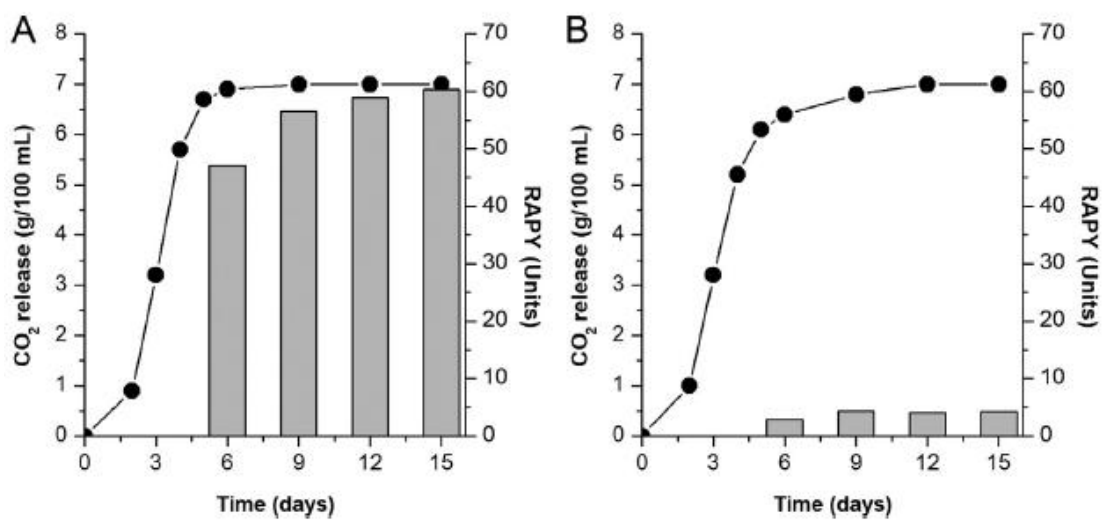
We first determined optimal conditions for the flow cytometric (FC) evaluation of single-cell pigment adsorption, by comparing Red Fruit as a representative high pigment-adsorption *S. cerevisiae* strain collected after 20 days of fermenting red and white wine (Tannat-Merlot, and Chardonnay must, respectively). The excitation laser wavelength was fixed at 488 nm, and three bandpass filters were evaluated. The profiles of 1:1 mixture (colorless/colored cells) using the 533, 558 and 670 nm filters are shown in Fig. 1. We determined the strongest difference between colorless Chardonnay fermenting cells (accounting for yeast autofluorescence) and red (Tannat-Merlot) wine fermenting cells was observed with the long-pass filter (670 nm). Based on these results, the 488/670 nm setup was used to evaluate yeast anthocyanin adsorption in subsequent experiments.



**Fig. 1.** Flow cytometry of anthocyanin adsorbing (high fluorescent) and nonadsorbing (low fluorescent) yeast cells (50:50 mixture) with an excitation wavelength of 488 nm, and filters 533/30 (FL1), 585/42 (FL2), and long pass 670 nm (FL3).

Next, we measured pigment adsorption during the course of red wine fermentation (Tannat-Merlot must) with two *S. cerevisiae* strains that represent high and low anthocyanin

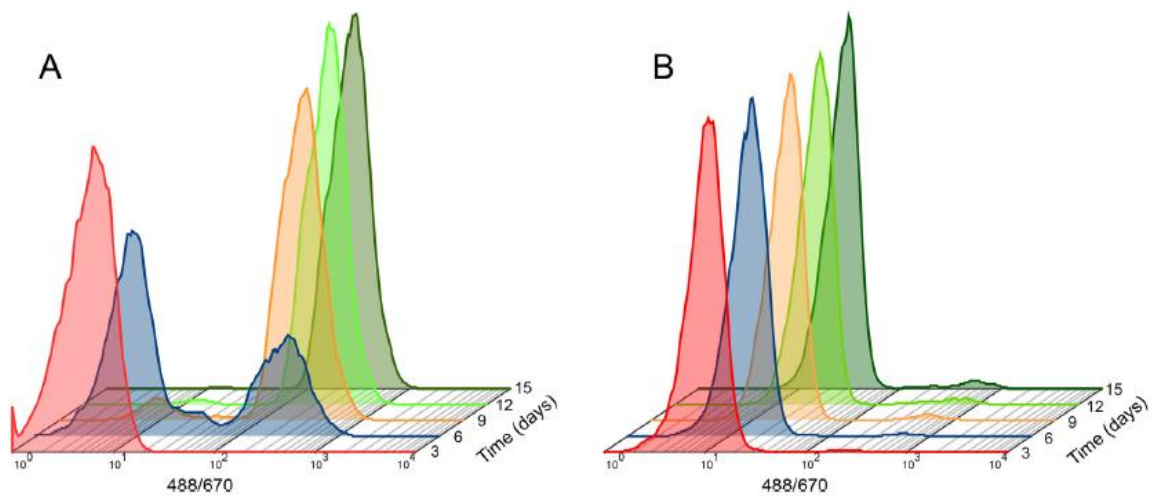
adsorbing strains, Red Fruit, and Rouge, respectively (Echeverrigaray *et al.*, 2019). Fermentations were monitored by the evolution of CO<sub>2</sub>, and samples were collected at 3 days intervals for the analysis of relative yeast pigment adsorption (RYPA), and FC evaluation of cellular anthocyanin adsorption. The Red Fruit strain displayed a faster fermentation profile releasing approximately 7 g CO<sub>2</sub>/100 mL by the 6th day, while Rouge reached the stationary phase between 9 and 12 days (Fig. 2A and B, respectively). The maximum ethanol concentration (9.2% v/v) and total residual sugars (1.3 mg/L) at the end of fermentation (15 days) were similar for both strains, indicating that alcoholic fermentation had ceased.



**Fig. 2.** Wine fermentation profile (lines) and relative pigment adsorption (bars) of a high (A- Red Fruit) and a low (B- Rouge) anthocyanin adsorbing strains. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

As expected, despite their similar fermentation profiles, the strains differed in their anthocyanin adsorption (RYPA) phenotypes (Fig. 2A and B). Red Fruit yeast began to adsorb anthocyanins towards the end of alcoholic fermentation (6 days), displaying a RYPA of  $45 \pm 2$  units, and reached a plateau of pigment adsorption after 12 days (RYPA of  $59.3 \pm 3.9$  units, Fig. 2A). On the other hand, Rouge yeast displayed basal pigment adsorption throughout the fermentation process (Fig. 2B) reaching only  $5.1 \pm 2.2$  RYPA units at the end of fermentation. An analysis of the pigment absorption of the Red Fruit strain (Fig. 3A) demonstrated that at the beginning of fermentation (3 days) > 90% of the cells were associated with negligible levels of anthocyanin fluorescence, measured under  $15.3 \pm 0.8$  Relative Fluorescence Units (RFU, Fig. 3A). However, after 6 days, when ethanol concentration reached 8.5% (v/v) and sugar fell to 3.4 g/L, two cell populations were evident: low fluorescence (65.1%) displaying approximately the same fluorescence level observed at day 3, and a high fluorescence

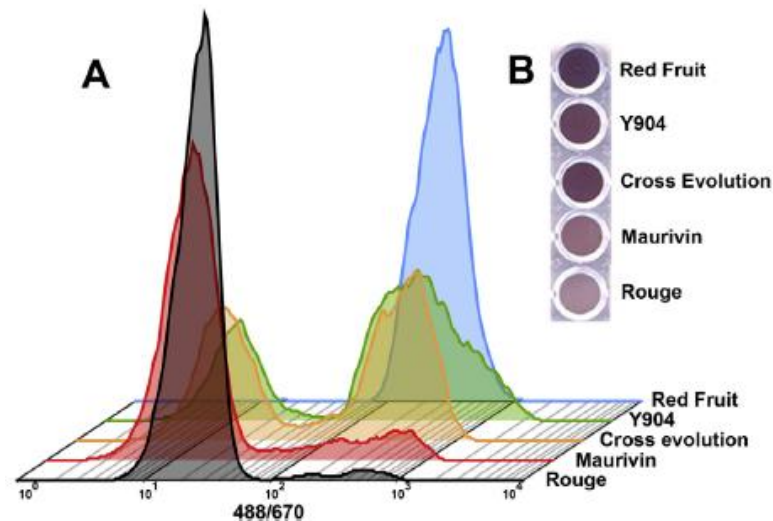
population (34.9%) displaying  $336.5 \pm 26.7$  RFU. Sampling the fermentation subsequently at 9 and 15 days, we observed the high fluorescence population continued to increase to 93.5% and 99.5% respectively, concomitantly with the disappearance of the low fluorescence population. Importantly, whereas the population distribution changed, the level of fluorescence of either population did not change significantly with time. The high fluorescence population displayed almost the same RFU average values (336 to 348 RFU) along alcoholic fermentation.



**Fig. 3.** Fluorescence (anthocyanin adsorption) of yeast cells throughout the fermentation of red wine (Tannat Merlot): A- Red Fruit, and B- Rouge. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

To corroborate the non-continuous relationship of anthocyanin adsorption phenotypes, we evaluated additional yeast strains considered intermediate adsorbing strains, sampled in parallel with the previously evaluated strains as controls after 16 days of Tannat-Merlot fermentation. As can be observed in Fig. 4A and B, Red Fruit and Rouge replicated the previously observed phenotypes of RYPA and FC populations (Fig. 4A and B). Among the intermediate strains, Maurivin B was visually the lowest pigment adsorbing yeast with RYPA of 31.7 units, followed by Cross Evolution at 49.7 units, and finally Y904 with 55.4 units. Remarkably, the FC analysis of these strains (Fig. 4A) again demonstrated the presence of two distinct populations of low and high anthocyanin adsorbing cells (fluorescence cells) in ratios that correlated with the bulk coloration of the yeast mass. Maurivin B low fluorescence cells represented 88.2% and the high fluorescence population 11.8%; Cross Evolution low and high fluorescence populations were 43.2 and 56.8%, respectively; and finally, Y904 low and high fluorescence was 28% and 72%, respectively. Importantly, there was no

“intermediate fluorescence” population identified in the analysis of any intermediate absorbing strains.

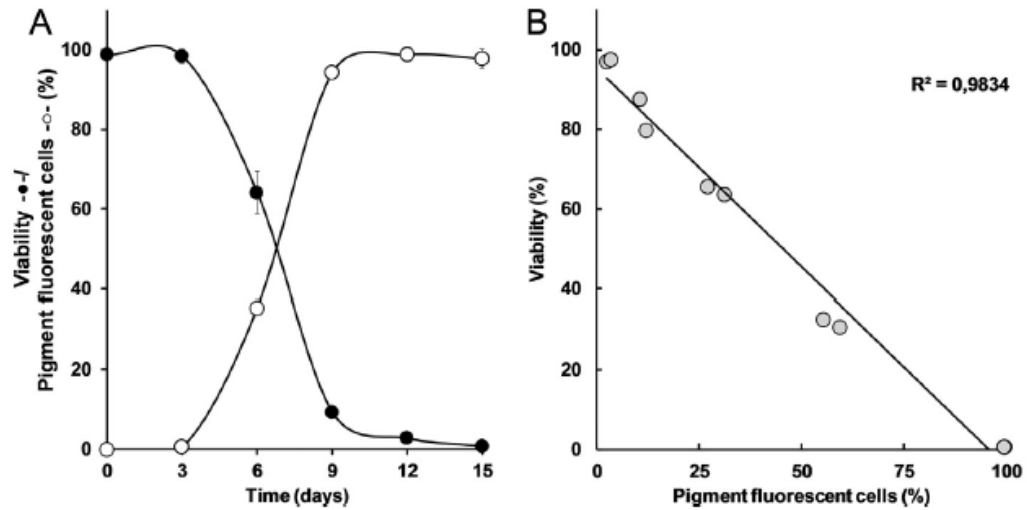


**Fig. 4.** Anthocyanin adsorption of yeast cells (A) and yeast color (B) of five wine yeast strains after 16 days fermentation of a Tannat-Merlot must.

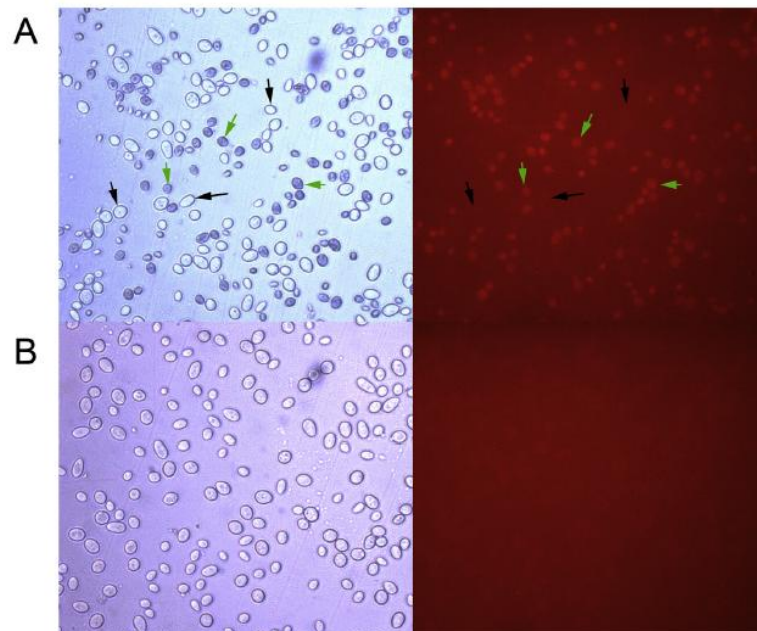
In addition to anthocyanin adsorption (RYPA), and CF analysis, we also monitored cell viability through methylene blue staining. Data obtained throughout the red wine fermentation by the Red Fruit strain showed a strong negative correlation ( $R=-0.998$ ) between the ratio of viable cells and the ratio of highly fluorescent cells (Fig. 5A). Moreover, the analysis of five yeast strains with different adsorption capacity (Fig. 5B) confirmed a high negative correlation between the percentage of high fluorescence cells and cell viability ( $R=-0.987$ ). Rouge cells exhibited high cell viability, low RYPA, and a small population of low fluorescent cells, while Red Fruit showed low viability, high RYPA and a large percentage of high fluorescent cells. The intermediary adsorbing strains exhibited intermediary adsorption behaviors, fluorescent population, and cell viability.

To confirm that anthocyanin adsorption occurred with concomitant loss of cell viability, Red Fruit and Rouge cells were collected after 7 days of fermentation (Tannat-Merlot red must), stained with Trypan Blue and evaluated by fluorescent microscopy. As can be observed in Fig. 6, Red Fruit samples comprised both fluorescent and non-fluorescent cells (Fig. 6A) and the fluorescent cells correspond to those stained by Trypan Blue. Consistent with the FC results, Rouge cells did not stain with Trypan Blue and did not fluoresce (Fig. 6B), indicating that anthocyanin adsorption is associated with modifications on cell

wall/membrane integrity. In additional control experiments, sampling a white wine fermentation by the Red Fruit strain, the Trypan Blue stained cells did not display the fluorescence associated with anthocyanins (data not shown).



**Fig. 5.** Relation between the percentage of pigment adsorbing cells (high fluorescent cells) and cell viability (Trypan Blue staining) along Red Fruit red wine fermentation (A), and high/medium/low yeast adsorbing strains at the end of alcoholic fermentation (B). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 6.** Yeast cell fluorescence and Trypan Blue staining of Red Fruit (A) and Rouge (B) cells at the middle of a Tannat-Merlot must fermentation (7 days). Green arrows- fluorescent/Trypan Blue colored cells; black arrows- non-fluorescent/Trypan blue uncolored cells. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Next, we evaluated if we could observe any difference in anthocyanin adsorption between high (Red Fruit), intermediate (Y904) and low (Rouge) adsorbing strains that were determined by each strain's cell constitution or anthocyanin-binding factors independently of cellular viability. The three yeast strains were grown by fermenting white wine must, and collected at the end of the exponential phase. At this stage yeast strains exhibited  $97.9 \pm 0.5\%$  viability and had not been exposed to anthocyanins (Table 1). Aliquots of each yeast strain were separated in four treatments: controls (untreated viable cells), heat, ethanol, and SLS (sodium lauryl sarcosinate). Heat, ethanol and SLS treated cells stained with Trypan Blue and Methylene Blue ( $> 95\%$ ), indicating that the treatments led to the loss of membrane integrity and loss of cell viability (Table 1). To evaluate anthocyanin adsorption, treated and untreated cells were incubated in a 10% ethanol (pH 3.6) solution containing grape anthocyanins (120 mg/L) extracted from grape skins. We observed that the control viable cells from either strain, Rouge, Y904, or Red Fruit were not able to adsorb anthocyanins, while killed or permeabilized cells of the three strains showed essentially identical and robust pigment adsorption (Table 1). Taken together these data indicate that anthocyanin absorption is not determined by differentially expressed cellular factors among winemaking yeast strains. Instead, a discrete population of breached cells is the primary driver of the differences in anthocyanin adsorption among winemaking yeast strains, which is determined by each strain's characteristic ability to maintain cell viability or cell/wall integrity though the stress of wine fermentation.

**Table 1** - Cell viability, relative pigment adsorption, and adsorbed anthocyanins by control and death/permeabilized yeast cells.\*

Parameter	Treatment	Strains		
		Red Fruit	Rouge	Y904
Viability (%)	Control cells	97.5 ± 1.3 <sup>Aa</sup>	98.4 ± 2.2 <sup>Aa</sup>	97.7 ± 1.9 <sup>Aa</sup>
	Heat treated cells	1.5 ± 1.3 <sup>Ba</sup>	0.8 ± 1.3 <sup>Ba</sup>	1.1 ± 1.3 <sup>Ba</sup>
	Ethanol treated cells	1.6 ± 1.3 <sup>Ba</sup>	2.2 ± 1.3 <sup>Ba</sup>	1.8 ± 1.3 <sup>Ba</sup>
	LSS treated cells	1.8 ± 0.8 <sup>Ba</sup>	1.3 ± 1.4 <sup>Ba</sup>	2.2 ± 1.8 <sup>Ba</sup>
RYPA (Units)	Control cells	0.3 ± 0.6 <sup>Ba</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>Ba</sup>	0.3 ± 0.3 <sup>Ba</sup>
	Heat treated cells	56.4 ± 3.3 <sup>Aa</sup>	57.6 ± 4.1 <sup>Aa</sup>	55.4 ± 2.8 <sup>Aa</sup>
	Ethanol treated cells	54.5 ± 2.3 <sup>Aa</sup>	53.6 ± 1.6 <sup>Aa</sup>	54.6 ± 2.0 <sup>Aa</sup>
	LSS treated cells	48.3 ± 8.0 <sup>Aa</sup>	56.4 ± 3.6 <sup>Aa</sup>	53.2 ± 4.3 <sup>Aa</sup>
Adsorbed Anthocyanins (mg/g)	Control cells	0.14 ± 0.02 <sup>Ba</sup>	0.18 ± 0.06 <sup>Ba</sup>	0.16 ± 0.02 <sup>Ba</sup>
	Heat treated cells	5.56 ± 0.23 <sup>Aa</sup>	5.67 ± 0.08 <sup>Aa</sup>	5.72 ± 0.32 <sup>Aa</sup>
	Ethanol treated cells	5.43 ± 0.26 <sup>Aa</sup>	5.17 ± 0.9 <sup>Aa</sup>	5.26 ± 0.41 <sup>Aa</sup>
	LSS treated cells	5.83 ± 0.34 <sup>Aa</sup>	6.0.3 ± 1.6 <sup>Aa</sup>	5.36 ± 0.82 <sup>Aa</sup>

\*Means followed by the same capital letters in a column and lower case letters on the lines do not differ significantly by the Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Red wine color, mainly determined by the concentration of anthocyanins and their derivatives, represents one of the most desirable sensory attributes of red wines (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006; Jackson, 2008; Morata *et al.*, 2016). Due to the fused aromatic rings of anthocyanins, these molecules have fluorescent properties that have been explored to observe anthocyanin intracellular vesicle-mediated trafficking in grapevine cells (Gomez *et al.*, 2011), and to study anthocyanin evolution during wine aging (Agati *et al.*, 2013). This manuscript showed that FC can be used to evaluate the relative anthocyanin adsorption of individual yeast cells, using an excitation light source of 488 nm, and the 670 nm long-pass filter. These results are consistent with those reported by Agati *et al.* (2013) showing that under excitation at 500 nm, malvidin-3-O-glucoside and vitisin A, the most prevalent anthocyanins of grapes and wines, display maximum emission in the red spectrum between 615 and 720 nm.

We used FC to evaluate red wine samples with fermenting yeast strains of contrastingly high- and low-pigment adsorption capacities showed that yeast begins to adsorb pigments only towards the end of alcoholic fermentation when a distinct population of highly fluorescent yeast cells is developed. By contrast, the low pigment-adsorbing yeast strain

developed only a small population of fluorescent (anthocyanin adsorbing) cells at the end of the fermentation process. These data are consistent with the anthocyanin adsorption observations previously reported by Echeverrigaray *et al.* (2019), corroborated by the RYPA data obtained in the present work. Importantly, the FC analysis shows that fermenting yeast populations are not homogeneous, and that the cells do not exhibit an expected progressive adsorption of anthocyanins. We observed a bimodal distribution of cells displaying low and high anthocyanin fluorescence, and we observed variable ratios of these populations. However, the mean fluorescence levels of these populations appeared constant among samples collected along red wine fermentation. These results suggested the presence of two cell populations with distinct properties emerge from high adsorbing strains, but a uniform population with low pigment adsorption comprises low adsorbing strains.

Similarly, the FC results for other *S. cerevisiae* strains previously recognized to have intermediate pigment adsorption capacities (Echeverrigaray *et al.*, 2019) showed bimodal distributions of low and high fluorescence cell populations, and these strains displayed population ratios that correlated with the bulk yeast mass pigment adsorption. This data suggest that a ratio of strongly fluorescent anthocyanin adsorbing cells determines the phenotypic pigment adsorption capacity by *Saccharomyces* strains. This finding is consistent with reports of polygenic genetic variations among yeast strains determining pigment adsorption traits (Morata *et al.*, 2003; Caridi *et al.*, 2007).

Other factors may also contribute to the extent of anthocyanin adsorption during alcoholic fermentation and aging, such as the production of acylated anthocyanins (Morata *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2005), and the reduction of medium polarity at high ethanol concentrations. However, this sequence of events cannot explain the existence of two populations with differential pigment adsorption during red wine fermentations.

The negative correlation observed between cell viability and anthocyanin- absorbing population ratios at various points of red wine fermentation or using various strains, indicate that pigment adsorbing cells have breached cell walls and that viable cells are not primarily responsible for pigment adsorption. These results supported those of Vasserot *et al.* (1997) and Petruzzi *et al.* (2015) demonstrating that commercially prepared yeast cell walls were more effective for anthocyanin adsorption than yeast cells preparations, and concluded that while both sides are accessible to adsorption in isolated yeast walls, only the external side of the yeasts walls can fix anthocyanins in integral cells.

End-stage fermentation imposes several stressing conditions on the fermenting yeast, such as low pH, high osmotic pressure, increasing ethanol concentration, and progressively limited nutrients that can trigger yeast cell changes in wall and membrane composition, metabolic adaptation, and ultimately cell death (Mizoguchi, 1998; Klis *et al.*, 2002; Pratt *et al.*, 2003; Aguilar-Uscanga and François, 2003; Duc *et al.*, 2017). Yeast stress response and survival capacity depend on a large number of genes and their expression, and it is known to vary among yeast strains and winemaking conditions (Bauer and Pretorius, 2000; Stanley *et al.*, 2010; Duc *et al.*, 2017).

In this study, the comparison and time-course evaluation of anthocyanin adsorption by viable cells and death or permeabilized cells by high, intermediate and low adsorbing strains demonstrated that a population of yeast with breached cell wall and membrane destabilization, or ultimately the proportion of dead versus live-cell mass, is the primary driver pigment adsorption. Independent of their adsorption behavior during red wine fermentation, damaged yeast cells showed the same anthocyanin adsorption capacity, indicating that any major differences in anthocyanin adsorption between yeast strains are determined by their ability to maintain cell viability, as well as the cell wall and membrane integrity throughout wine fermentation. Moreover, these results suggest that anthocyanin adsorption binding molecules, probably mannoproteins, did not vary significantly among strains, and that such factors are localized in the inner part of yeast cell walls, as previously suggested by observations by Vasserot *et al.* (1997), Petrucci *et al.* (2015), and Gonçalves *et al.* (2018).

## 5. Conclusions

This study showed that anthocyanin adsorption by *S. cerevisiae*, an important contributor to wine color and quality occurs at the end of alcoholic fermentation, and that this process is associated with the development of a bimodal population of highly adsorbing cells over time. The ratio of low and high adsorbing cell populations varied among wine yeast strains, and is related to yeast fermentative life-span or cell viability. Moreover, flow cytometry data in combination with the evaluation of live/permeabilized cells, allowed to conclude that yeast anthocyanin adsorption occurs by pigment-binding molecules constitutively expressed in the inner part of the cell walls of all *Saccharomyces* strains, regardless of their assigned adsorption behavior in red wine fermentation (high, medium and

low pigment adsorption yeast strains). More broadly, the findings in this work offer the opportunity to rationalize the selection of oenological yeasts towards engineering and controlling color adsorption in red wines.

### Acknowledgments

This work was financially supported by the The National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (Universal- 431538/ 2016-6), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) finance code 001, and the University of Caxias do Sul, Brazil. The authors would like to thank Cytogene Molecular Diagnostics for flow cytometry analyses, and Dr. P. Maianti (Harvard University) for constructive criticism of the manuscript.

### References

- Agati, G., Matteini, P., Oliveira, J., de Freitas, V., Mateus, N., 2013. Fluorescence approach for measuring anthocyanins and derived pigments in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10156–10162.
- Aguilar-Uscanga, B., François, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 266–274.
- Balík, J., 2006. Dynamics of changes in total anthocyanins during the fermentative maceration of grapes. *Hort. Sci.* 33, 103–107. Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive making of wine – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 27–51.
- Caridi, A., Sidari, R., Solieri, L., Cufari, A., Giudici, P., 2007. Wine colour adsorption phenotype: an inheritable quantitative trait loci of yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 103, 735–742.
- Caridi, A., Sidari, R., Krakova, L., Kuchta, T., Pangallo, D., 2015. Assessment of color adsorption by yeasts using grape skin agar and impact on red wine color. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 49, 195–203.
- Duc, C., Pradal, M., Sanchez, I., Noble, J., Tesnière, C., Blondin, B., 2017. A set of nutrient limitations trigger yeast cell death in a nitrogen-dependent manner during wine alcoholic fermentation. *PlosOne* 12, e0184838.
- Echeverrigaray, S., Menegotto, M., Delamare, A.P.L., 2019. A simple and reliable method for the quantitative evaluation of anthocyanin adsorption by wine yeasts. *J. Microbiol. Methods* 157, 88–92.
- Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8, 979–995.

- Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N., Ageorges, A., 2011. In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *Plant J.* 67, 960–970.
- Gonçales, F.J., Fernandes, P.A.R., Wessel, D.F., Cardoso, S.M., Rocha, S.M., Coimbra, M., 2018. Interaction of wine mannoproteins and arabinogalactans with anthocyanins. *Food Chem.* 243, 1–10.
- Guyot, S., Gervais, P., Young, M., Winckler, P., Dumnont, J., Davey, H.M., 2015. Surviving the heat: heterogeneity of response in *Saccharomyces cerevisiae* provides insight into thermal damage to the membrane. *Environ. Microbiol.* 17, 2982–2992.
- He, F., Liang, N.N., Mu, L., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.Q., 2012a. Anthocyanins and their variation in red wines. I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* 17, 1571–1601.
- He, F., Liang, N.N., Mu, L., Pan, Q.H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.Q., 2012b. Anthocyanins and their variation in red wines. II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* 17, 1483–1519.
- Jackson, R.S., 2008. *Wine Science: Principles, Practice and Perception*, 3rd ed. Elsevier Inc, San Diego, CA, USA.
- Kippert, F., 1995. A rapid permeabilization procedure for accurate quantitative determination of  $\beta$ -galactosidase activity in yeast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 201–206.
- Klis, F.M., Mol, P., Helligwerf, K., Brul, S., 2002. Dynamics of cell wall structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microb. Rev.* 26, 239–256.
- Kwolek-Mirek, M., Zadrag-Tecza, R., 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res.* 14, 1068–1079.
- Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E., 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J. AOAC Int.* 88, 1269–1278.
- Li, Z., Pan, Q., Cui, X., Duan, C., 2010. Optimization on anthocyanins extraction from wine grape skins using orthogonal test design. *Food Sci. Biotechnol.* 19, 1047–1053.
- Lipke, P.N., O valle, R., 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bact.* 180, 3735–3740.
- Manzanares, P., Rojas, V., Genovés, S., Vallés, S., 2000. A preliminar search for anthocyanin-  $\beta$ -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Sci. Techn.* 35, 95–103.
- McGahon, A.J., Martin, S.J., Bissonnette, R.P., Mahboudi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K., Green, D.R., 1995. The end of the (cell) line – methods for the study of apoptosis in vitro. *Meth. Cell Biol.* 46, 153–185.

- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2005. Yeast interactions with anthocyanins during red wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 104–109.
- Mizoguchi, H., 1998. Permeability barrier of the yeast plasma membrane induced by ethanol. *J. Ferment. Bioeng.* 85, 25–29.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., Suárez, J.A., 2003. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4084–4088.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Colomo, B., Suárez, J.A., 2005. Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes. *Eur. Food Res. Technol.* 220, 341–346.
- Morata, A., Iris, L., Suárez, J.A., 2016. Influence of yeasts in wine colour. In: Morata, A., Loira, I. (Eds.), *Grape and Wine Biotechnology*. IntechOpen, pp. 285–305.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Bera, M.B., 2007. Permeabilization of yeast cells with organic solvents for  $\beta$ -galactosidase activity. *Res. J. Microbiol.* 2, 34–41.
- Petruzzi, L., Baiano, A., De Gianni, A., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., 2015. Differential adsorption of Ochratoxin A and anthocyanins by inactivated yeasts and yeast cell walls during simulation of wine aging. *Toxins* 7, 4350–4365.
- Pratt, P.L., Bryce, J.H., Stewart, G.G., 2003. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J. Inst. Brew.* 109, 218–228.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeasts for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., 2006. Handbook of enology. In: *The Microbiology of Wine and Vinifications*, 2nd ed. 1 John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Cambers, P.J., Stanley, G.A., 2010. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 109, 13–24.
- Vasserot, Y., Caillet, S., Maujean, A., 1997. Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 433–437.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

---

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- foi possível desenvolver uma metodologia rápida e eficiente para determinar a capacidade de adsorção de pigmentos durante a fermentação vínica, utilizando microvinificações, determinação espectrofotométrica e determinação digital da adsorção relativa de pigmentos por leveduras;
- as leveduras apresentam maior capacidade de adsorver pigmentos após a metade da fermentação;
- as diferentes linhagens de leveduras apresentam ampla diversidade na capacidade de adsorção de pigmentos, podendo ser divididas em grupos de baixa, média e alta adsorção;
- a capacidade de adsorção de antocianinas de uma levedura é inversamente proporcional à integridade parede/membrana.

Por fim, como considerações finais deste trabalho, o presente estudo contribui para melhorar a seleção de linhagens de leveduras enológicas no controle de adsorção de antocianinas em processos fermentativos de vinhos tintos, além do método proposto para avaliação de diferentes linhagens de leveduras poder ser aplicado em protocolos de seleção de leveduras para vinificação e também para programas de melhoramento genético.



## 6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

---

ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n2, p. 394-400, 2007.

ABYARI, M.; HEIDARI, R.; JAMEI, R. The effects of heating, UV irradiation and pH on stability of Siahe Sardasht grape anthocyanin-copigment complex. **International Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 638–645, 2006.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**. v.40, p.997-1026, 2005.

ALEXOPOULOS, C.J.; MINS, C.W.; BLACKWELL, M. **Phylum Oomycota. In: Introductory mycology**. New York, 4 ed.: John Wiley & Sons. Cap. 23, 1996. p. 683-737.

ANDRÉ, P.; BÉNARD, P.; CHAMBROY, Y.; FLANZY, C.; JOURET, C. Méthode de vinification par macération carbonique. II. La production d'alcool en vinification par macération carbonique. **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v.16, n.2, p.117-123, 1967.

ARFELLI, G. La tecnica di vinificazione per macerazione carbonica. **Vignevini**, Bologna, v.17, n.1/2, p.33-38, 1990.

BAKKER, J., TIMBERLAKE, C.F. Isolation, identification and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.35–43, 1997.

BALIK, J. Dynamics of changes in total anthocyanins during the fermentative maceration of grapes. **Horticultural Science**, v. 33, n. 3, p. 103–107, 2006.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; SALMON, J.M. **La levadura de fermentación alcohólica**. In: FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos e tecnológicos**. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, 2000, p. 274-315.

BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; MARTINEZ-CUTILLAS, A.; ROS-GARCÍA, J. M.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. Improving colour extraction and stability in red wines: The use of maceration enzymes and enological tannins. **International Journal of Food Sciences and Technology**, v. 40, p. 867–878, 2005.

BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J. I.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 546–552, 2007.

BERTHELIS, N.J.; OTERO, R.R.C.; BAUER, F.F; THEVELEIN, J.M.; PRETORIUS, I.S. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Sacharomyces cerevisiae* wine yeast strain. **FEMS Yeast Research**, v. 4, 2004. p. 683- 689.

BOULTON, R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 2, p. 67-86, 2001.

BRÉCHOT, P.; CHAUVET, J.; DEPUY, P.; CROSSON, M.; RABATU, A. Acide oléanolique, facteur de croissance anaérobie de la levure de vin. **Ann. Technol. Agric.**, 20, p. 103-110, 1971.

BROUILLARD, R.; CHASSAING, S.; FOUGEROUSSE, A. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? **Phytochemistry Letters**, v. 64, p. 1179–1186, 2003.

BURNS, J.; MULLEN, W.; LANDRAULT, N.; TEISSEDRE, P. L.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from *Cabernet sauvignon* and hybrid grapes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 4096–4102, 2002.

BUSSE-VALVERDE, N.; GÓMEZ-PLAZA, E.; LÓPEZ-ROC, J. M.; GIL-MUNOZ, R.; BAUTISTA-ORTIN, A. B. The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 5450–5455, 2011.

CAMARGO, U. A. Variedades de uva. **In: Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Documentos n° 48 Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, RS, 2009.

CARIDI, A.; CUFARI, A.; LOVINO, R.; POLUMBO, R.; TEDESCO, I. Influence of Yeast on Polyphenol Composition of Wine. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 37–40, 2004.

CARIDI, A.; SIDARI, R.; SOLIERI, L.; CUFARI, A.; GIUDICI, P. Wine colour adsorption phenotype: na inheritable quantitative trait loci of yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 735-742, 2007.

CÀSTINO, M. Riv. Viticolt. Enol, v. 34, p. 333–348, 1982.

CÀSTINO, M. Macerazione carbonica: ricerca, risultati, tecnologia. **L'Enotecnico**, Milano, v.20, n.10, p.865-868, 1984.

CHAVAN, P., MANE, S., KULKARNI, G., SHAIKH, S., GHORMADE, V., NERKAR, D.P., SHOUCHE, Y., DESHPANDE, M.V. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. **Food Microbiology**, v.26, p.801–808, 2009.

COMBINA, M., MERCADO, L., BORGIO, P., ELIA, A., JOFRÉ, V., GANGA, A., MARTINEZ, C., CATANIS, C. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p.1055–1061, 2005.

DAUDT, C.E.; SIMON, J.A. Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 2001. p. 697-701.

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. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, p. 291-296, 1994.

DE PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: From plant to health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 281–299, 2008.

DUFOUR, C.; SAUVAITRE, I. Interactions between anthocyanins and aroma substances in a model system. Effect on the flavor of grape-derived beverages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 1784–1788, 2000.

FAOSTAT., 2013. Database of Food and Agricultural Organization. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em Janeiro de 2015.

FEUILLAT, M. Yeast macromolecules: origin, composition and enological interest. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 54, p. 211-213, 2003.

FLANZY, C.; BÉNARD, P.; AUBERT, S. Méthode de vinification par macération carbonique. IV. Influence de la température et de la durée de macération carbonique sur la qualité des vins secs élaborés à partir de "Grenache Noir". **Annales de Technologie Agricole**, Paris, v.19, n.1, p.29-40, 1970.

FLEET, G. H.; PRAKITCHAIWATTANA, C.; BEH, A.L.; HEARD, G. The yeast ecology of wine grapes. **Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts**, p.1-17. 2002.

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

FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.979–995, 2008.

FREITAS, VICTOR DE; MATEUS, NUNO. Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.401, p.1463-1473, 2011.

FULCRAND, H., BENABDELJALIL, C., RIGAUD, J., CHEYNIER, V., MOUTOUNET, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. **Phytochemistry**, v.47, p.1401–1407, 1998.

GÓMEZ-MÍGUEZ, M.; HEREDIA, F. J. Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 5117–5123, 2004.

GONZÁLEZ, S.S., BARRIO, E., QUEROL, A. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife. **Journal of applied microbiology**, v.102, p.1018–1025, 2007.

GONZÁLEZ-MANZANO, S.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V.; SANTOS-BUELGA, C. Influence of the degree of polymerisation in the ability of catechins to act as anthocyanin copigments. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 83–92, 2008.

GUTIÉRREZ, I. H. Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4079–4083, 2003.

HAYASAKA, Y., ASENSTORFER, R.E. Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.756–761, 2002.

HE, F.; LIANG, N. N.; MU, L.; PAN, Q. H.; WANG, J.; REEVERS, M. J.; DUAN, C. Q. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. **Molecules**, v. 17, p. 1571-1601, 2012.

HE, F.; LIANG, N. N.; MU, L.; PAN, Q. H.; WANG, J.; REEVERS, M. J.; DUAN, C. Q. Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. **Molecules**, v. 17, p. 1483-1519, 2012(b).

HE, J., SANTOS-BUELGA, C., SILVA, A.M.S., MATEUS, N., DE FREITAS, V. Isolation and structural characterization of new anthocyanin-derived yellow pigments in aged red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.9598–9603, 2006.

JACKSON, R. S. **Wine Science: Principle and Applications**, 3rd ed.; Elsevier-Academic Press: Oxford, UK, 2008.

JILANI, HANENE, CILLA, A., BARBERÁ, R., HAMDI, M. Biosorption of green and black tea polyphenols into *Saccharomyces cerevisiae* improves their bioaccessibility. **Journal of Functional Foods**, v.17, p.11-21, 2015.

JOLLY, N.P., AUGUSTYN, O.P.H., PRETORIUS, I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. **Journal for Enology and Viticulture**, v.27, p.15–39, 2006.

KAMMERER, D., CLAUS, A., CARLE, R., SCHIEBER, A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/ MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4360-4367, 2004.

LEE, JUNGMIN; DURST, ROBERT W.; WROLSTAD RONALD E. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**. v.88, n.5, p.1269-1278, 2005.

LIMA, Urgel de Almeida, et. al. **Biotechnologia Industrial, processos fermentativos e enzimático**. São Paulo, 1º ed., v. 3. Editoria Edgard Blücher, 2001.

LIU, S. Q.; PILONE, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in wine making with emphasis on microbiological implications. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, p. 49-61, 2000.

LONA, A. A. **VINHOS: degustação, elaboração e serviço**. Porto Alegre, 9ª ed., Ed. AGE., 2006, p. 64-71.

LOPEZ-TOLEDANO, A.; VILLANO-VALENCIA, D.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Interaction of yeasts with the products resulting from the condensation reaction between (+)- catechin and acetaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2376-2381, 2004.

MANZANARES, P.; ROJAS, V.; GENOVES, S.; VALLES, S. A preliminary search for anthocyanin- $\beta$ -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, p. 95–103, 2000.

MARAIS, J. Effect of different wine-making techniques on the composition and quality of Pinotage wine. I. Low-temperature skin contact prior to fermentation. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, p. 70–75, 2003.

MATTANOVICH, D., SAUER, M., GASSER, B. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. **Microbial Cell Factories**, v.13, p.34, 2014.

MAZAURIC, J. P.; SALMON, J. M. Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5647-5653, 2005.

MAZZA, G.; FRANCIS, F. J. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341–371, 2005.

MEDINA, K.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E.; CARRAU, F. Yeast Interactions with Anthocyanins during Red Wine Fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56 n. 2, p. 104-109, 2005.

MELLO, L.M.R.; MACHADO, C.A.E. Vitivinicultura brasileira: panorama 2019. Comunicado técnico 214. **EMBRAPA**. Bento Gonçalves, RS, Julho de 2020. ISSN 1808-6802. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215377/1/COMUNICADO-TECNICO-214-Publica-602-versao-2020-08-14.pdf>>. Acesso em 05 de julho de 2021.

MERIDA, J.; LOPEZ-TOLEDANO, A., MARQUEZ, T., MILLAN, C.; ORTEGA, J. M.; MEDINA, M. Retention of browning compounds by yeasts involved in the winemaking of sherry type wines. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1565-1570, 2005.

MESAS, J. M.; ALEGRE, M. T. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. **Ciencia y Tecnología de los Alimentos**, v. 2, p. 174–183, 1999.

MORATA, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, M. C.; SUBERVIOLA, J.; BARTOLOMÉ, B.; COLOMO, B.; SUÁREZ, J. A. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 14, p. 4084-4088, 2003.

MORATA, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, M. C.; COLOMO, B.; SUÁREZ, J. A. Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. **European Food Research and Technology**, v. 220, p. 341-346, 2005.

NISIOTOU, A.A., NYCHAS, G.J.E. Yeast populations residing on healthy or Botrytis infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, p.2765–2768, 2007.

PARISA, S.; REZA, H.; ELHAM, G.; RASHID, J. Effect of heating, UV irradiation and pH on the stability of the anthocyanin compigment complex. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 267–272, 2007.

PÉREZ-LAMELA, C.; GARCIA-FALCÓN, M. S.; SIMAL-GÁNDARA, J.; ORRIOLS-FERNÁNDEZ, I. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. **Food Chemistry**, v. 101, p. 601–606, 2007.

PRAKITCHAIWATTANA, C.J., FLEET, G.H., HEARD, G.H. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, v.4, p.865–877, 2004.

PRETORIUS, I.S., VAN DER WESTHUIZEN, T.J., AUGUSTYN, O.P.H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. **Journal of Enology and Viticulture**, v.20, p.61–74, 1999.

PUÉRTOLAS, E.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. Changes in phenolic compounds of Aragón red wines during alcoholic fermentation. **Food Science and Technology International**, v. 17, p. 77–86, 2011.

RADLER, F. The main constituents of the surface waxes of varieties and species of the genus *Vitis*. *American Journal of Viticulture and Enology*, 16, p. 159-167, 1965.

RASPOR, P., MILEK, D.M., POLANC, J., MOZINA, S.S., CADEZ, N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, p.97–102, 2006.

REALE, A.; DI RENZO, T.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E. Microbiological and Fermentative Properties of Baker's Yeast Starter Used in Breadmaking. **Journal of Food Science**, v.78, p.1224-1231, 2013.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBÉREAU-GAYON, P.; SUDRAUD, P. **Sciences et techniques du vin**. Paris: Dunod, v.3, 719p, 1976.

RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D., DONÈCHE, B., LONVAUD, A. Cytology, Taxonomy and Ecology of Grape and Wine Yeast. **Handbook of Enology**, vol. 1. John Wiley and Sons, West Sussex (England), pp. 1–49. 2000.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONECHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology**, Vol I: The microbiology of wine and vinifications. John Wiley and Sons, Chichester, UK, 2006.

RIO GRANDE DO SUL. Atlas Socioeconômico do Rio Grande do Sul. **Uva e maçã**. Disponível em: <<http://www.atlassocioeconomico.rs.gov.br/uva-e-maca>>. Acesso em: 20 de maio de 2018.

RIZZON, LUIZ ANTENOR; MIELE, ALBERTO; MENEGUZZO, JÚLIO; ZANUZ, MAURO CELSO. Efeito de três processos de vinificação sobre a composição química e a qualidade do vinho Cabernet Franc. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.7, p.1285-1293, 1999.

ROMERO-CASCALES, I.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J. I.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 163–167, 2005.

SABATÉ, 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.

SACCHI, K. L.; BISSON, L. F.; ADAMS, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, p. 197-206, 2005.

SILVA, Roberto da (Org.); LAGO-VANZELA, Ellen (Org.); BAFFI, Milla (Org.). **Uvas e vinhos: química, bioquímica e microbiologia**. 1.ed. São Paulo: Unesp; Senac, 196p., 2015.

SILVA, G. A.; MURATORE, L. Influência da Fermentação Maloláctica Espontânea sobre a Evolução da Acidez Volátil em Vinhos Cabernet Sauvignon.. **In: XIV-Sinaferm, 2003**, Florianópolis. Anais do SINAFERM 2003 - XIV Simpósio Nacional de Fermentações, p.1-7, 2003.

SOMERS, T.C. Polymeric nature of wine pigments. **Phytochemistry**, v.10, p.2175-2186, 1971.

SPAGNOLLI, F. Vini novelli da macerazione carbonica. **Vini d'Italia**, Brescia, v.29, n.6, p.27-32, 1987.

UBIGLI, M. **Tecniche di vinificazione in rosso**. Vini d'Italia, Brescia, v.30, 1988.

UBIGLI, M. Considerazioni su alcune particolarità dei vini novelli. **Vini d'Italia**, Brescia, v.28, n.5, p.9-18, 1986.

UMMARINO, L.; GARCIA MORUNO, E.; DI STEFANO, R. Interazione polifenoli – scorze di lievito. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, v. 54, p. 37-46, 2001.

USSEGLIO-TOMASSET, L. Interventi e trattamenti nella produzione dei vini rosati per mezzo della macerazione carbonica. **Vini d'Italia**, Brescia, v.28, n.3, p.65-70, 1986.

VASSEROT, Y.; CAILLET, S.; MAUJEAN, A. Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, p. 433–437, 1997.

VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blücher, XXVII, 461 p. (Bebidas 1), 2010.

VERSINI, G.; DALLA SERRA, A.; PELLEGRINI, R. Contributo alla conoscenza dell'aroma dei vini da macerazione carbonica. **L. Enotecnico**, Milano, v.20, n.10, p.871-878, 1984.

VILLA, D. Influenza della macerazione carbonica in fase gassosa. **Vini d'Italia**, Brescia, v.30, n.3, p.23-34, 1988.

ZIMMAN, A.; JOSLIN, W. S.; LYON, M. L.; MEIER, J.; WATERHOUSE, A. L. Maceration variables affecting phenolic composition in commercial-scale *Cabernet Sauvignon* winemaking trials. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 93–98, 2002.

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F.S. **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 2001.

ZOECKLEIN, B. W.; HAZKNEY, C. H.; DUNCAN, S. E.; MARCY, J. E. Effect of fermentation, aging and thermal storage on total glycosides, phenol-free glycosides and volatile compounds of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 100-107, 1999.

ZUZUARREGUI, A.; OLMO, M. Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behavior. **FEMS Yeast Research**, v. 4, 2004. p. 699-710.