

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

Yohana Porto Calegari Alves

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO  
MOSTO DE UVAS CABERNET FRANC DA REGIÃO DE  
BENTO GONÇALVES-RS**

Santa Maria, RS

2020

**Yohana Porto Calegari Alves**

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO MOSTO DE UVAS  
CABERNET FRANC DA REGIÃO DE BENTO GONÇALVES-RS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Química  
Bacharelado, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**BACHAREL EM QUÍMICA.**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Neidi Garcia Penna

Orientador: Dr Gildo Almeida da Silva

Santa Maria, RS.

2020

**Yohana Porto Calegari Alves**

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO MOSTO DE UVAS  
CABERNET FRANC DA REGIÃO DE BENTO GONÇALVES-RS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Química  
Bacharelado, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**BACHAREL EM QUÍMICA.**

Aprovada em 21 de Agosto de 2020:

---

Neidi Garcia Penna, Dr<sup>a</sup> (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)

---

Gildo Almeida da Silva, Dr., Pesquisador (EMBRAPA)  
(Co-orientador)

---

Ana Betine Beutinger Bender, Dr<sup>a</sup>

Santa Maria, RS

2020

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram nesta trajetória e que, sem seu apoio e ajuda, não estaria finalizando esta etapa tão significativa da minha vida. Em especial aos meus pais, minha dinda e meu namorado.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente e profundamente aos meus pais Carla e Francisco que juntamente com minha dinda Cariana me proporcionaram e me apoiaram para chegar até este incrível momento.

Aos meus irmãos José Carlos e Yasmim, que me aguentaram ao longo destes anos, sempre me mantendo para cima e me incentivando.

Ao meu namorado Anthony, que sempre me manteve firme e me incentivou a ser cada dia melhor ao longo desses 3 anos.

As minhas amigas Karine, Daniella, Cândida, Tatiane e Daíse que escutaram minhas reclamações, puxaram minha orelha e nunca mediram esforços para me auxiliar.

As minhas amigas Elisa, Mariana e Camila, que mesmo de longe me auxiliaram, me apoiaram e me fizeram manter o foco.

A minha enteada Maria Helena e todos meus familiares que entenderam minha ausência e me deram forças para continuar.

Ao pesquisador Dr Gildo Almeida da Silva, pela acolhida em seu laboratório e por confiar em mim para desempenhar este trabalho.

À Embrapa por ter me autorizado a executar este trabalho em suas dependências e disponibilizar a equipe da microbiologia para a execução deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada e a Embrapa Uva e Vinho pela oportunidade de aprendizado e experiência, além de todo carinho e apoio que recebi durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria pela base forte de ensino que me proporcionou.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Neidi Penna por toda dedicação para com este trabalho e comigo.

Grata!

## **RESUMO**

## CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO MOSTO DE UVAS CABERNET FRANC DA REGIÃO DE BENTO GONÇALVES-RS

A elaboração de um bom vinho vai muito além do *terroir*. Depende fundamentalmente da matéria prima e do processo de vinificação. Por isso a importância do emprego de uma linhagem adequada. As leveduras autóctones, que são leveduras pertencentes a microflora local desempenham um papel importante nesse processo visto que, estão mais adaptadas ao substrato, conferem uma particularidade ao vinho seja pelo aroma e “buquê” ou teor alcoólico. Este trabalho teve por objetivo caracterizar as leveduras da série T84 obtidas a partir do mosto de uvas Cabernet Franc da região de Bento Gonçalves, RS. Todas as linhagens foram avaliadas quanto à velocidade de fermentação, à produção de H<sub>2</sub>S, à capacidade de expressar a característica killer e de exibir sensibilidade ao fator killer. Os resultados mostraram que, das 49 leveduras da série T84, 45 linhagens apresentaram fermentação semelhante às linhagens K1 e 1VVT e além disso, 20 leveduras das 49 não apresentaram a formação de H<sub>2</sub>S. As linhagens 117T84 e 154T84 expressaram características killer em relação à linhagem 26B84 e, no teste de sensibilidade, 29 das linhagens foram sensíveis às duas linhagens Killer, e apenas três leveduras não apresentaram sensibilidade a nenhuma linhagem padrão killer. A linhagem 144T84 apresentou-se neutra pois não inibiu o crescimento de nenhuma linhagem padrão e não teve seu crescimento inibido por nenhuma linhagem killer, mas formou H<sub>2</sub>S e mostrou uma evolução de CO<sub>2</sub> abaixo de 5,2mg de CO<sub>2</sub> /h. A linhagem 117T84, por ter apresentado um comportamento distinto das demais, foi submetida à identificação por PCR-RFLP. Foi identificada como *Saccharomyces cerevisiae*, confirmando os resultados anteriores obtidos. A partir dos resultados apresentados, observa-se que as linhagens 117T84 e 154T84 são killer apenas para linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, possuindo a linhagem 117T84 uma atividade killer mais agressiva. A linhagem 144T84 identificada como *Meyerozyma guilliermondii*, possui característica neutra. As linhagens 117T84 e 154T84 apresentam potencial enológico adequado, podendo ser utilizadas em indústrias vinícolas.

**Palavras-chave:** Leveduras, H<sub>2</sub>S, Fermentação, Killer sensibilidade, Fator Killer, PCR/RFLP

**Abstract**

## CHARACTERIZATION OF YEASTS ISOLATED FROM THE CABERNET FRANC GRAPE MUST OF THE REGION OF BENTO GONÇALVES-RS

The elaboration of a good wine goes far beyond of *terroir*. It strongly depends upon the grape quality used and on the vinification process. Therefore, it is important to use a proper yeast for vinification. The autochthonous yeasts belonging a local microflora play an important role in this process, since they are more adapted to to the local substrate, and can enhance the aroma, the complexity and the typicity of the wine. This work aimed to characterize the yeasts of T84 series, which were collected from of grapes must of Cabernet Franc of Bento Goncalves region during the tumultuous phase of vinification. All strains have been assessed for fermentation performance, H<sub>2</sub>S production, killer skill and sensibility to the have presented similar fermentation skill compared to K1 and 1VVT standard strains and 20 out of the 49 strains did not produce H<sub>2</sub>S. The strains 117T84 and 154T84 have presented Killer factor with respect to *Saccharomyces cerevisiae* 26B84 strains and according to the sensibility test, 29 were sensitive to two Killer strain and just three yeasts did not show any sensibility to the Killer standard strain. The strain 144T84 presented neutral phenotype, because the cells neither kill the sensitive strains nor are killed by the killer yeasts. The 117T84 strain was identified by PCR/RFLP since it had shown atypical behavior. The identification was confirmed as *Saccharomyces cerevisiae*, as previously identified. The results show that the strains of *Saccharomyces cerevisiae* 117T84 and 154T84 are killer, do not form H<sub>2</sub>S and the strain 117T84 presents a mor expressive killer activity. The strain 144T84 was identified as *Meyerozyma guilliermondii* and has neutral phenotype. The strains 117T84 and 154T84 present an adequate enological potential to be used for wine production.

**Keywords:** Yeasts, H<sub>2</sub>S, Fermentation, Killer Sensitivity, Killer Factor, PCR/RFLP

## Lista de Figuras

Figura 1 - Cacho da uva Cabernet Franc .....	14
Figura 2 - Preparação dos tubos de ensaio para a replicação e manutenção de leveduras com mosto ágar inclinado.....	24
Figura 3 - Preparação das placas de Petri para teste Killer e sensibilidade com mosto 80:20.....	26
Figura 4 - Preparação dos tubos de ensaio para o teste de velocidade de fermentação e produção de H <sub>2</sub> S. ....	27
Figura 5 - Verificação da concentração da suspensão e células seguindo o método de Der Walt e Yarrow (1984). ....	28
Figura 6 - Placa de Petri marcada para a realização dos testes de sensibilidade e Killer .....	30
Figura 7 – Espalhamento da suspensão de células com alça de Drigalski na placa de Petri.....	31
Figura 8 - Replicação das leveduras de interesse .....	32
Figura 9 - Condições programadas no termociclador para a realização da PCR. ....	35
Figura 10 - Gel de agarose 1,5% sendo submetido a eletroforese. ....	35
Figura 11 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 104T84 a 114T84 e as linhagens padrão <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1VVT97 e K1. ....	37
Figura 12 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 115T84 a 124T84 e as linhagens padrão <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1VVT97 e K1. ....	37
Figura 13 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 125T84 a 134T84 e as linhagens padrão <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1VVT97 e K1. ....	38
Figura 14 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 135T84 a 144T84 e as linhagens padrão <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1VVT97 e K1. ....	38
Figura 15 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 145T84 a 154T84 e as linhagens padrão <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1VVT97 e K1. ....	39
Figura 16 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 117T84 e 154T84 e as leveduras padrões K1 e 1VVT97. ....	40
Figura 17 - Porcentagem de linhagens da série T84 comparado ao nível de produção de H <sub>2</sub> S .....	41
Figura 18- Placas com o tapete formado pela linhagem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 26B84 e os halos de inibição provocados pelas linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 117T84 e 154T84.....	45



Figura 19 – Número de linhagens sensíveis às linhagens killer padrão. 1- Saccharomyces cerevisiae 1B84; 2- 91B84; 3- K1; 8- Hanseniaspora uvarum 33MCF14; 11- Candida diversa 30MPB12. ....	46
Figura 20 - Teste Killer utilizando as linhagens 117T84 e 154T84 como tapete. ....	47
Figura 21 – Perfil eletroforético da região ITS1-5.8-ITS2  crds-ITS2 amplificado pelos iniciadores ITS1 e ITS4. ....	48
Figura 22 – Dendrograma das linhagens da série T84 <sub>104-154</sub> com relação à evolução de CO <sub>2</sub> , níveis de H <sub>2</sub> S, capacidade killer e sensibilidade ao fator killer de linhagens padrão. ...	49

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Linhagens sensíveis utilizadas como “tapete” no teste Killer da série T84 .....	30
Tabela 2 - Linhagens killer para teste de sensibilidade .....	33
Tabela 3 - Componentes do meio reacional da PCR .....	34
Tabela 4 - Evolução de CO <sub>2</sub> e produção de H <sub>2</sub> S das linhagens da Série T84. ....	42

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVOS .....	12
2.1. OBJETIVO GERAL.....	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
3.1 VINHO .....	13
3.2. UVA CABERNET FRANC.....	13
3.3 “TERROIR” .....	15
3.4 LEVEDURAS.....	15
3.4 FERMENTAÇÃO.....	17
3.5 SULFETO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> S).....	17
3.6 FATOR KILLER E SENSIBILIDADE.....	18
3.7 IDENTIFICAÇÃO POR PCR-RFLP.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO .....	21
4.1.1 Embrapa Uva E Vinho .....	22
4.1.2 Laboratório De Microbiologia .....	22
4.2 COLETA E ISOLAMENTO DE LEVEDURAS .....	23
4.3 PRESERVAÇÃO NO ULTRA FREEZER.....	23
4.4 MEIOS DE CULTURA.....	23
4.4.1 Meio Mosto Ágar.....	24
4.4.2 Meio Mosto 80:20 .....	25
4.4.3 Meio Mosto Sulfito.....	26
4.5 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE CÉLULAS.....	27
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO .....	28
4.6.1 Preparo Das Fitas Impregnadas Com Acetato De Chumbo 3% .....	29
4.7 TESTE DE VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO .....	29

4.8 DETECÇÃO DA CAPACIDADE KILLER .....	29
4.9 TESTE DE SENSIBILIDADE .....	32
4.10 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS .....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1 VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO.....	36
5.2 PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> S .....	40
5.3 LINHAGENS KILLER E SENSÍVEIS AO FATOR KILLER.....	44
5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS .....	47
5.5 DENDROGRAMA .....	48
6. CONCLUSÃO .....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

O vinho é uma bebida que transcende séculos, por ser sua criação antes mesmo que a escrita (Alves et al., 2020). Além da uva e o *terroir*, para a elaboração de um excelente vinho é necessário que o processo fermentativo seja adequado, sendo a levedura protagonista deste processo. As leveduras autóctones são linhagens adaptadas ao substrato local pois residem nos vinhedos, são elas que trazem a particularidade do vinho de cada local. Apesar de terem disponíveis no mercado leveduras de alto padrão, ou seja, com alta taxa de conversão de açúcar em etanol, utilizar leveduras próprias do vinhedo traz inúmeros benefícios ao vinho produzido. Como relata Silva et al. (2008) em seu trabalho, por serem adaptadas à matéria-prima local e as condições climáticas as linhagens nativas agregam ao vinho características organolépticas únicas.

Antes de utilizar leveduras autóctones, é preciso caracterizar as mesmas, visto que existem linhagens que formam compostos indesejáveis que conferem características desagradáveis ao vinho. O  $H_2S$  é um desses compostos e que apresenta um odor característico de ovos podres. Outra característica importante a ser analisada no processo de seleção de leveduras está relacionada com a atividade killer das linhagens. Há no ambiente linhagens killer, sensíveis e neutras. Muitos estudos mostram que linhagens killer promovem inibição de leveduras que causam problemas na vinificação. Mas também é verdade que da mesma forma que inibem os microrganismos indesejáveis, afetam as linhagens desejáveis no processo de elaboração de vinho, diminuindo-lhe a complexidade e reduzindo-lhe a tipicidade regional. Por isso, o Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da Embrapa Uva e Vinho defende o ponto de vista no qual o uso de linhagens killer assim como sensíveis deve ser evitado no processo de vinificação. Procura-se por linhagens neutras. Na sua falta, aconselha-se usar linhagens que sejam neutras para leveduras não-

*Saccharomyces*. Há inúmeros estudos que relatam a ação de linhagens killer sobre a contaminação.

Nem sempre linhagens autóctones possuem aptidão para elaborar um vinho de qualidade. Desejando empregar tais linhagens se faz necessário isolar e realizar o processo de caracterização. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização de leveduras autóctones obtidas de mosto de uva Cabernet Franc da região de Bento Gonçalves, durante a fase tumultuosa da vinificação, em processo livre de contaminação.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar leveduras autóctones obtidas a partir do mosto de uva da cultivar Cabernet Franc da região do Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves (RS) em 1984, durante a fase tumultuosa da vinificação, em processo livre de contaminação.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar da capacidade fermentativa das leveduras e velocidade de fermentação;
- Avaliar da produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) pelas linhagens;
- Avaliar da capacidade killer pelas linhagens da série T84 com relação às linhagens *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces*.
- Avaliar da sensibilidade das linhagens de leveduras da série T84 com relação às linhagens *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces*.
- Identificar das linhagens por biologia molecular das representantes de grupos estabelecidos por meio de extração de DNA de leveduras, PCR/RFLP da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 VINHO

De acordo com a portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988 da União Brasileira de Viticultura, por definição vinho é: “Bebida resultante da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto simples ou virgem, com um conteúdo de álcool mínimo de 7% (V/V a 20°C)” (Ministério da Agricultura, 1988).

Após a colheita das uvas nos vinhedos, as mesmas são levadas para o processo conhecido como desengace cuja função é retirar qualquer material vegetal, sejam folhas, ramos ou pedúnculos, dos cachos de uva. Esta técnica tem por finalidade limitar a adstringência, o amargor e o gosto desagradável de herbáceo e de secura no vinho (Guerra et al., 2005). Em seguida, esses cachos são prensados, de forma que a semente não seja triturada, dando origem ao mosto. O mosto, palavra que vem do latim *mustum* que significa “novo” ou “jovem” é o líquido turvo que contém suco, casca e sementes da uva. É este mosto que irá sofrer transformação comandada pelas leveduras. A fermentação alcoólica se dá a partir da ação das leveduras sobre os açúcares e a atividade desses agentes transformadores depende também de outros componentes presentes no mosto. Ao produto dessa pronta transformação dá-se o nome vinho.

#### 3.2. UVA CABERNET FRANC

A cultivar Cabernet Franc (figura 1) é uma *Vitis vinífera* tinta oriunda da França da região de Bordeaux. Foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul pela Estação Agrônômica de Porto Alegre em meados de 1900 e, em 1920 já estava sendo produzida e comercializada em Garibaldi pelos Irmãos Maristas. Nas décadas de 70 a 80 ocorreu a maior produção da mesma, se tornando a base do vinho tinto brasileiro por ser consumido jovem e produzir vinhos com grande aromaticidade e pouca acidez quando comparado com vinhos de Cabernet Sauvignon. Além disso, o vinho de



Cabernet Franc apresenta coloração vermelho-rubi, com aroma de vegetais e fruta e ainda possui boa estrutura e equilíbrio no paladar (Rizzon & Miele, 2001).

Figura 1 - Cacho da uva Cabernet Franc



Fonte: (WINER, 2020)

A partir deste período grandioso, sua produção passou por um declínio e não se sabe até hoje o real motivo que levou a este fato. Sendo de difícil adaptação, possuindo clones de baixas qualidades e tendo sido dado grande incentivo aos vinhos brancos, não se torna difícil deduzir que estes fatores são as possíveis respostas para esta questão. Hoje em dia, sua produção ainda ocorre, mas em pequenas quantidades visto que os produtores encontraram cultivares mais adaptáveis no terreno acidentado da Serra Gaúcha. A área plantada com Cabernet Franc no Estado do Rio Grande do Sul em 1995 era de 296,27 ha, atingindo uma área máxima de 413,37 ha em 2004 e em 2015, a área era de 164,36 ha. Comparando os dados da Cabernet Franc com os de Cabernet Sauvignon no mesmo período, no Estado do Rio Grande do Sul em 1995

era de 423,64ha, atingindo uma área máxima de 1.868,48 ha em 2007 e em 2015, a área de 1.028,68 ha (de Mello et al., 2017).

### 3.3 “TERROIR”

Convém conceitualizar, neste momento, o "terroir". Segundo (Tonietto, 2007), a palavra terroir é antiga. Data de 1.229 e é resultante de modificações linguísticas (tieroir, tioroer), de origem latina "*territorium*". É definido de acordo com alguns dicionários, como uma extensão limitada de terra com aptidões agrícolas. No conceito referente ao vinho, há significados do tipo: "Solo apto à produção de um vinho", "Terroir produzindo um grand cru", "Vinho que possui um gosto de terroir", "Um gosto particular que resulta da natureza do solo onde a videira é cultivada". Possui, portanto uma conotação positiva em relação ao vinho. Mas, na França do século XIX, o termo era pejorativo. Estava associado a um vinho que não tinha o caráter nobre (cru) suficiente para ser consumido pelas pessoas da cidade. Vinho com "gosto de terroir" era para ser consumido por gente do interior. A palavra "cru", criadas por monges franceses, embora se origine de crescer (croître), está relacionada ao que hoje se chama agricultura de precisão. O termo "cru" está relacionado com tipificação, ou seja, um vinho elaborado de uvas de uma determinada parte homogênea de um vinhedo, com características específicas independente de safras (Grizzo, 1997).

### 3.4 LEVEDURAS

Leveduras são microrganismos unicelulares pertencentes ao filo *Ascomycota* do reino Fungi. A classificação dentro do reino é baseada em suas características de colonização e a fisiologia de suas células. O filo *Ascomycota*, ou mais conhecidos como ascomicetos, é o que possui maior número de representantes e, em sua grande maioria, produzem enzimas e diferentes metabólitos que são utilizados em setores industriais, no caso do presente trabalho, na indústria vinícola, elaborando vinho e outros derivados fermentados de uva.

Há muito tempo as leveduras são utilizadas para a realização da fermentação alcoólica com o intuito de produzir bebidas. A indústria vinícola brasileira tem por rotina empregar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* importadas. Esse comportamento tende a equalizar a produção o que é um grave equívoco. Deseja-se estimular a diferenciação geográfica dos vinhos. Este procedimento de uso de leveduras não ajuda no processo de discriminação (Silva & Silva, 1983).

As pesquisas que envolvem coleta, isolamento, caracterização e identificação possuem o claro intuito de selecionar leveduras a partir da microflora das regiões com potencial vitivinícola. Hoje, é possível a utilização de leveduras autóctones, ou seja, leveduras originárias da microflora de cada região brasileira que vai do Vale do São Francisco ao Pampa Gaúcho que possuam algum tipo de Indicação Geográfica ou em vias de obtenção da referida deferência. Estas leveduras atribuem ao vinho produzido uma maior qualidade além de uma uniformidade dentro da mesma região seja por conferir aromas específicos ou pelo teor alcoólico ou ainda reduzindo os riscos da presença de compostos indesejáveis (Silva & Silva, 1983). Além do mais, o uso de linhagens com características conhecidas traz vantagens por permitir fermentações completas e uniformes, promover clarificação mais rápida e melhora a estabilidade biológica do vinho (da Silva & Dalarmi, 2003).

A baga da uva pode abrigar leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas. A quantidade relativa desses indivíduos depende do estágio de maturação da uva e da disponibilidade de componentes nutricionais (Barata et al., 2012b; Bokulich et al., 2016). Num processo de vinificação, não apenas as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* desempenham papel importante e relevante. Há outros gêneros e espécies que participam da vinificação, há aqueles que por um lado dão maior complexidade, aroma e tipicidade ao vinho (Agustini et al., 2018) e por outro pode comprometer a qualidade, formando substâncias indesejáveis. As práticas enológicas afetam sobremaneira a flora (Albertin et al., 2014) e o estado sanitário da uva pode apresentar uma flora diferenciada daquela flora de uma uva sadia (Barata et al., 2008, 2012a). O emprego continuado de linhagens importadas reduz sobremaneira a diversidade e a

importância das linhagens autóctones (Beltran et al., 2002) assim como o uso de fungicidas à base de cobre afetam a densidade populacional (Martins et al., 2014)

### 3.4 FERMENTAÇÃO

A fermentação, em linhas gerais, é um processo bioquímico no qual um composto orgânico transfere seus elétrons para um receptor final que também é um composto orgânico. A glicose transfere quatro elétrons para duas moléculas de acetaldeído para formar duas moléculas de uma outra substância denominada etanol. A conversão de açúcar em álcool etílico ocorre no citoplasma da célula e, de uma forma geral, na ausência de oxigênio. É, sem dúvida, o mais conhecido e o mais popular dos processos fermentativos, mas é apenas um dos muitos que a célula executa na sua rotina metabólica. É um processo complexo que depende de vários fatores internos e externos além das inúmeras enzimas e cofatores envolvidos.

### 3.5 SULFETO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>S)

O sulfeto de hidrogênio, ou também conhecido como gás sulfídrico, é um composto sulfurado que possui um odor muito característico, semelhante a ovo podre com um limiar de percepção muito baixo em torno de 0,9 a 1,5 ppb (Laboratories, 2011), e portanto, um dos maiores problemas na elaboração de vinhos (Linderholm & Bisson, 2005; Kinzurik et al., 2015). Rankine (1963) afirma que o aroma de H<sub>2</sub>S é formado de bissulfito e enxofre elementar mas não de aminoácidos e que a quantidade formada pela levedura é inversamente proporcional ao tamanho da partícula de enxofre. Spiropoulos e Bisson (2000) verificaram que uma superexpressão da sulfidrilase OAS/OAH (O-acetilserina/O-acetilhomoserina sulfidrilase) resultou em um nível ligeiramente maior de cisteína numa determinada linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* comercial, especialmente em condições de altas concentrações de nitrogênio. Neste caso, houve o maior decréscimo na formação de H<sub>2</sub>S. Mostraram também que há uma relação entre os níveis elevados de cisteína e o baixo nível de

liberação de H<sub>2</sub>S. Isso indica que altos níveis de cisteína podem exercer uma maior eficiência na incorporação de H<sub>2</sub>S. Por outro lado, tem sido observado que a cisteína e a O-acetilserina estão envolvidas com a regulação da assimilação do sulfato (Ono et al., 1999) e assim, indiretamente, influenciam a formação de H<sub>2</sub>S.

A produção de H<sub>2</sub>S depende da linhagem de levedura, do tipo de enxofre inorgânico presente no meio e do tipo de fungicida usado no vinhedo (Acree et al., 1972). O número de linhagens de leveduras produtoras de H<sub>2</sub>S é variado (da Silva, 1999; da Silva et al., 2011a, 2012b) e representa um sério problema durante a elaboração de vinhos, pois está relacionada a graves defeitos de elaboração. Sendo assim, é de fundamental importância selecionar leveduras autóctones para o processo de vinificação. Pois, além de serem utilizadas apenas aquelas que não formam H<sub>2</sub>S e descartadas as demais formadoras e estarem adaptadas ao substrato podem produzir aromas únicos o que farão com que o vinho daquela região seja singular.

### 3.6 FATOR KILLER E SENSIBILIDADE

O fator Killer é uma toxina descoberta por Bevan e Makower em 1963 (Bevan & Makower, 1963) em *Saccharomyces cerevisiae*, mas não sendo uma característica exclusiva da mesma. Esta toxina é produzida por determinadas linhagens de leveduras que, em contato com uma linhagem sensível, ocasiona sua morte. A identificação do indivíduo como killer, sensível e neutra depende de alguns fatores como, as linhagens utilizadas, condições de cultivo (Woods & Bevan, 1968; Tipper & Bostian, 1984; Wilson & Whittaker, 1989; da Silva, 1996; da Silva et al., 2011c) e fase de crescimento (Tipper & Bostian, 1984; Maldotti et al., 2015). *Saccharomyces cerevisiae* possui quatro tipos diferentes de fator killer. São eles, K1, K2, K28 e Klus (Maqueda et al., 2012; Rodríguez-Cousino et al., 2013; Giesselmann et al., 2017; Becker & Schmitt, 2017; Rodríguez-Cousiño & Esteban, 2017). O fator killer deste gênero, independentemente do tipo de toxina killer é determinado por moléculas de RNA encapsuladas localizadas no citoplasma celular e denominadas L-dsRNA e M-dsRNA (Bostian et al., 1980; da Silva, 1994; Becker & Schmitt, 2017). Os plasmídeos

de L-dsRNA e M-dsRNA são genomas contendo dupla fita de RNA (dsRNA) de tamanhos diferentes L (large) e M (medium). O L-dsRNA é quem codifica a formação do capsídeo polipeptídico que envolve os dois genomas, ou seja, o L-dsRNA e o M-dsRNA (Bostian et al., 1980, 1983). A função do M-dsRNA é sintetizar a proteína killer e portanto, apresenta um único ORF (open reading frame). O L-dsRNA, no entanto, possui dois ORFs, o GAG e POL. O ORF1 codifica a capa proteica (gag) e o ORF2 codifica o RNA (pol) (Icho & Wickner, 1989; Dinman et al., 1991). Além disso, o M-dsRNA confere à levedura a característica de imunidade (Schmitt, 1995; Schmitt & Breinig, 2006).

Embora haja no mercado linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* killer para elaboração de vinhos e tenham sido propagadas vantagens de utilizar tais linhagens no processo fermentativo, da Silva (1996), chama atenção para o fato de que uma levedura deve ser selecionada para elaboração de vinhos pela sua aptidão enológica e não por ser killer. Esta afirmação tem sua base no fato de as linhagens killer, segundo Tipper & Bostian (1984) serem entidades ineficientes de controle. O uso de tais linhagens em processos fermentativos não estéreis, como é o caso do vinho, dá ao vinicultor a impressão de uma segurança de controle que não existe (da Silva, 1996). O simples fato de haver linhagens neutras já nos dá uma boa ideia da fragilidade do sistema killer. Uma das vantagens citadas está vinculada ao controle de linhagens que são indesejáveis para a elaboração de vinho. Da mesma forma que as linhagens killer podem inibir linhagens indesejáveis, podem também inibir linhagens altamente desejáveis. Além do mais, linhagens killer, mesmo ineficientes, podem alterar a microflora natural da uva, podendo diminuir as características locais de tipicidade do vinho. É aconselhável, portanto, empregar sempre linhagens neutras para a elaboração de vinhos. Já em casos onde se deseje usar linhagens killer no processo de vinificação, que sejam utilizadas aquelas que não apresentam capacidade killer para linhagens não-Saccharomyces.

### 3.7 IDENTIFICAÇÃO POR PCR-RFLP

A biologia molecular é o ramo da biologia que se dedica ao estudo da estrutura e função do material genético (RNA e DNA) assim como seus produtos de expressão, as proteínas. Suas técnicas foram sendo aperfeiçoadas desde o início de 1970, sendo em sua grande maioria técnicas que funcionam de acordo com a variação de temperatura. A elevação da temperatura, faz com que o DNA seja desnaturado, ou seja, as pontes de hidrogênio são quebradas, resultando na separação das fitas.

Uma das técnicas mais utilizadas na identificação de organismos é a PCR (Polymerase Chain Reaction) – Reação em Cadeira da Polimerase criada oficialmente em 1985 por Kary Mullis (Pérez, 2013). Tem como base, uma série de reações envolvendo alternâncias de temperatura, uso de iniciadores (primers), emprego de bases nitrogenadas, utilização de uma enzima termoestável obtida da bactéria *Thermus aquaticus*, denominada de Taq Polimerase e o DNA alvo. É interessante observar que esta técnica já tinha sido descrita por Molineux 14 anos antes. Mas foi tida como inoperante. Mesmo depois que Mullis oficialmente determinou os procedimentos para a PCR, a Taq polimerase empregada era o fragmento de Klenow de *Escherichia coli*, uma enzima termolábil, o que necessitava adicionar a enzima depois de cada ciclo, devido à temperatura de desnaturação ser elevada (96°C). Somente em 1988, foi introduzida a enzima termoestável obtida da bactéria *Thermus aquaticus* (Peake, 1989; Pérez, 2013).

O objetivo da técnica é aumentar milhares de vezes o número de um segmento específico de DNA. Consiste em adicionar em um tubo de ensaio o DNA, os primers, que são DNAs iniciadores, as bases nitrogenadas e uma enzima DNA polimerase termoestável. Os primers são fitas de DNA que possuem em torno de 20 bases complementares (A, T, C, G) e que se ligam por complementaridade ao início da sequência que deve ser multiplicada. No equipamento onde ocorre a PCR, a amostra de DNA é desnaturada, ou seja, sua dupla fita separada, e esse processo é feito em uma alta temperatura (94°C). Com as fitas já separadas, a temperatura é resfriada e os primers conseguem formar as pontes de hidrogênio com a sequência alvo e para finalizar o primeiro ciclo de reações a DNA polimerase adiciona nucleotídeos que, por

complementaridade, faz o alongamento da fita filha. Este mesmo ciclo é feito diversas vezes, até que a quantidade de replicações seja satisfatória. O número satisfatório de ciclos que se atinge fica entre 25 a 40 ciclos.

Para que ocorra a caracterização efetiva do DNA amostral, é quase sempre necessário que se aplique a técnica de análise do Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism ou RFLP). Neste procedimento, usam-se enzimas que possuem a capacidade de reconhecer uma sequência específica de bases de DNA (4 a 8 nucleotídeos) e sequências palindrômicas, que são sequências que possuem a mesma sequência, mas em direções opostas. Nas sequências palindrômicas a enzima faz cortes formando diversos fragmentos de DNA (Botstein et al., 1980). É um método rápido no processo de discriminação de gêneros e de espécies de leveduras (Cadez et al., 2002; Caruso et al., 2002; Bedriñana et al., 2010), assim como também usado para identificar fungos filamentosos (Martorell et al., 2005; Diguta et al., 2011; Gkatzionis et al., 2014).

A técnica é uma simples reação enzimática. O produto da reação é aplicado em gel de agarose e submetido à eletroforese, para separação de fragmentos de amplicon. A eletroforese provoca a migração dos fragmentos para o polo positivo devido à carga negativa do DNA e à diferença de potencial aplicada. Os fragmentos são, dessa forma, separados por tamanho. Depois de separados, os fragmentos são submetidos ao brometo de etídio, visualizados e documentados sob luz ultravioleta (Andrade et al., 2006; Agustini et al., 2014).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Aplicada pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho (CNPUV) - Embrapa, sob supervisão do pesquisador Dr. Gildo Almeida da Silva.



#### **4.1.1 Embrapa Uva E Vinho**

A Embrapa Uva e Vinho é uma unidade descentralizada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) que é vinculada ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A unidade situa-se em Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul que é conhecida como a Capital Brasileira do Vinho.

O início de suas atividades foi em 1942 quando houve a criação da Estação de Enologia de Bento Gonçalves, que era uma das três estações experimentais do Laboratório Central de Enologia criado em 1937 com sede no Rio de Janeiro. Em 1969 integrou-se à rede IPEAS (Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuária do Sul) e mudou seu nome para Estação Experimental de Bento Gonçalves. Após a criação da Embrapa em 1972, durante uma reunião da Diretoria Executiva da Embrapa em 1975 criou-se a Unidade de Execução de Pesquisas de âmbito Estadual (UEPAE) de Bento Gonçalves. Então em 1985 recebeu uma nova missão, passando para Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (CNPUV) que se mantém até hoje. Em 1992 a Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado (EFCT), criada em 1981 e até então vinculada a Embrapa de Clima Temperado, vinculou-se a Embrapa Uva e Vinho e no ano de 1993 ocorreu a criação da Estação Experimental de Viticultura Tropical (EVT) em Jales, São Paulo (Embrapa, 2020).

#### **4.1.2 Laboratório De Microbiologia**

O laboratório realiza atividade com microrganismos de interesse agroindustrial (Embrapa, 2020a). Os estudos desenvolvidos com leveduras autóctones, que são aquelas encontradas naturalmente no ambiente, ocorrem para que sejam selecionadas para os mais diferentes usos no setor agroindustrial. Entre estes usos está a seleção de leveduras que juntamente com a cultivar e o *terroir* tipificam o vinho de uma determinada região.

Todos os microrganismos isolados, e todo o pessoal envolvido nas pesquisas com esses microrganismos, são cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). O SisGen

gerencia o patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado e está vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (Ministério do Meio Ambiente, 2020).

#### 4.2 COLETA E ISOLAMENTO DE LEVEDURAS

As leveduras da série T84 foram isoladas da cultivar Cabernet Franc em 1984 na região do Vale dos Vinhedos no município de Bento Gonçalves. Os procedimentos de colheita das bagas e isolamento de leveduras foram realizados pela equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho. O isolamento das leveduras foi realizado em mosto durante o estágio da fermentação tumultuosa da vinificação. A metodologia de isolamento é descrita por da Silva & Silva (1987).

#### 4.3 PRESERVAÇÃO NO ULTRA FREEZER

A preservação das leveduras após isolamento ocorre em ultra freezer a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . As leveduras foram retiradas do ultra freezer, descongeladas e reativadas. A reativação ocorreu em ambiente estéril, utilizando câmara de fluxo laminar, Trox (Brasil), onde pipetaram-se  $35\ \mu\text{L}$  de solução para tubo de ensaio com meio mosto ágar inclinado e levou-se para a estufa de crescimento ( $24^{\circ}\text{C}$ ) (Labline Imperial II, USA) por 48 horas.

Durante todas as análises, conforme a levedura estava sendo utilizada, era realizado o processo de repicagem ou espalhamento das mesmas. O procedimento de repicagem consiste na transferência do tubo de ensaio contendo a levedura para o outro apenas com o mosto ágar inclinado. Todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril.

#### 4.4 MEIOS DE CULTURA

Para a realização das atividades foram utilizados três tipos de meio de cultura: 1) Meio mosto ágar segundo da Silva (1996), utilizado para a manutenção das culturas

de leveduras; 2) Meio mosto 80:20, segundo da Silva et al. (2011c) e 3) Meio mosto sulfito segundo da Silva & da Silva (1984).

#### **4.4.1 Meio Mosto Ágar**

O meio mosto ágar foi utilizado para a replicação de leveduras e a conservação das mesmas. Para o preparo de um litro de meio de cultura foram separados dois frascos de Erlenmeyer, um de 1000 mL para a preparação da solução A e outro de 500 mL para a preparação da solução B. As soluções devem ser preparadas em separado para que ocorra o endurecimento adequado do meio de cultura contendo ágar. Para a solução A pesaram-se 10g de extrato de levedura Difco, USA, 250 mL de mosto de uva Lorena, 250 mL de água destilada e algumas gotas de Luftal (Simeticona, 75 mg/mL) para que não houvesse a formação de bolhas. Para a solução B pesaram-se 20g de ágar e 500 mL de água destilada.

As soluções foram levadas para a esterilização na autoclave horizontal FABBE, (modelo 104, Brasil) a 121°C por 30 min e, posteriormente, os dois frascos foram misturados em ambiente estéril. Por fim, verteu-se nos tubos de ensaio (17cm x 1,5cm) e estes foram inclinados conforme representado na figura 2.

Figura 2 - Preparação dos tubos de ensaio para a replicação e manutenção de leveduras com mosto ágar inclinado.



Fonte: Autora, 2020

#### **4.4.2 Meio Mosto 80:20**

O meio mosto 80:20 é utilizado para os testes Killer e de sensibilidade (da Silva et al., 2011c). É composto por 80% de mosto de uva Lorena e 20% de ELNC (extrato de levedura não comercial) que é preparado segundo da Silva & de Almeida (2006). O meio foi preparado separadamente em dois Erlenmeyer, para a produção de dois litros de meio de cultura são necessários para a solução A um frasco de Erlenmeyer de 2000 mL e para a solução B um frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Para o preparo da solução A, foram medidos em proveta 1600 mL de mosto de uva Lorena com pH ajustado em 4,5 e pipetados 24 mL de azul de metileno 0,5%. Para a solução B foram medidos 376 mL de ELNC e adicionados 10 g de ágar. As soluções foram levadas para a esterilização na autoclave horizontal a 121°C por 30 min e, posteriormente, os dois frascos foram misturados em ambiente estéril. Por fim, verteu-se nas placas de Petri conforme demonstrado na figura 3.

Figura 3 - Preparação das placas de Petri para teste Killer e sensibilidade com mosto 80:20



Fonte: Autora, 2020.

#### **4.4.3 Meio Mosto Sulfito**

O mosto sulfito é utilizado para o teste de velocidade de fermentação e produção de  $H_2S$  (da Silva & da Silva, 1984). Para a preparação de dois litros de meio de cultura foram pesados e adicionados em um frasco de Erlenmeyer de 2000 mL, 2g de sulfito de sódio, 20g de triptona e adicionado 2000 mL de mosto de uva Lorena. Após a esterilização do meio em autoclave horizontal a  $121^{\circ}C$  por 30 min e, em ambiente estéril, pipetaram-se 9 mL do meio em tubos de ensaio com tampa de acordo com a figura 4.

Figura 4 - Preparação dos tubos de ensaio para o teste de velocidade de fermentação e produção de H<sub>2</sub>S.

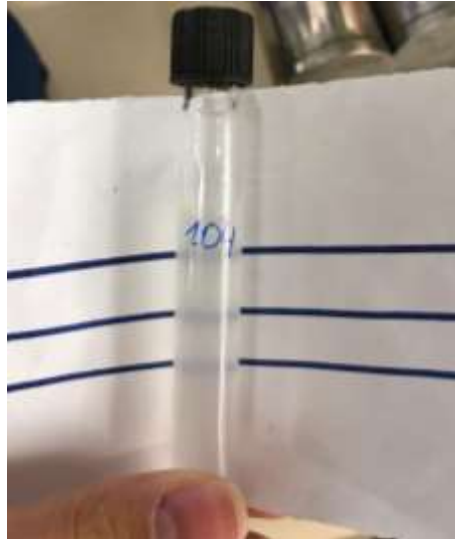


Fonte: Autora, 2020.

#### 4.5 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE CÉLULAS

As suspensões de células, ou também chamados de inóculos, foram utilizadas para o teste de fermentação e como tapete no teste de sensibilidade. O procedimento consiste em dissolver uma alçada recém-crescida de leveduras em tubo de ensaio com tampa rosqueável contendo água destilada esterilizada de modo a fornecer uma concentração aproximada de  $10^7$  células/ mL. A verificação da concentração foi realizada pelo método descrito por Walt & Yarrow (1984), conforme figura 5.

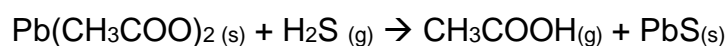
Figura 5 - Verificação da concentração da suspensão e células seguindo o método de Der Walt e Yarrow (1984).



Fonte: Autora, 2020.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO

A avaliação ocorreu em tubo de ensaio de rosca contendo 9 mL de mosto sulfito e sobre ele foi pipetado 1 mL da suspensão de leveduras (inóculos) de interesse na concentração de  $10^7$  céls/mL. Para a detecção da formação de  $H_2S$  foi fixado na tampa do tubo uma fita de papel de filtro previamente impregnada com solução de acetato de chumbo 3%. A avaliação ocorre juntamente com o teste de velocidade de fermentação e os resultados aparecem após 48h em estufa de crescimento a temperatura de  $24^\circ C$ . Em caso de resposta positiva para a produção do  $H_2S$ , a fita muda de coloração (branca para marrom/preto), sinalizando a formação de sulfeto de chumbo ( $PbS$ ) conforme reação descrita abaixo.



As leveduras foram classificadas em três níveis, de acordo com a intensidade da coloração da fita. As linhagens não produtoras foram classificadas com (-), e para aquelas que produziram  $H_2S$  foram dadas as notações de (+) para baixa, de (++) para média e de (+++) para alta produção.

#### **4.6.1 Preparo Das Fitas Impregnadas Com Acetato De Chumbo 3%**

As fitas foram preparadas com papel filtro de tamanho 0,5 x 7,5 cm e foram mergulhadas em solução saturada de acetato de chumbo 3%. Para o preparo da solução foram pesados 4,5g de acetato de chumbo e diluídos em 150 mL de água. O recipiente contendo as fitas e a solução foram levadas a estufa (24°C) para a secagem completa do líquido (da Silva & da Silva, 1984).

#### **4.7 TESTE DE VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO**

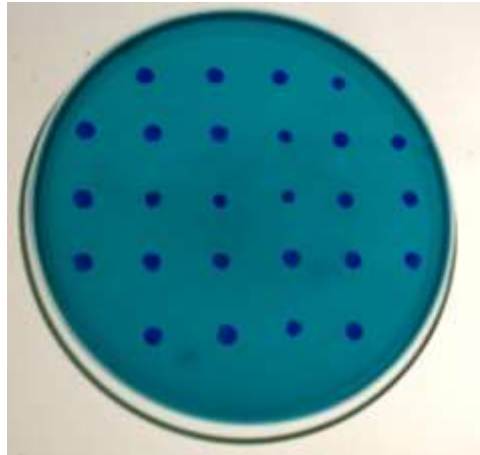
O teste foi realizado para avaliar a capacidade fermentativa de cada linhagem de levedura. A avaliação da velocidade de fermentação foi realizada em triplicata, em tubos de ensaio com rosca previamente esterilizados em autoclave por 30 min em temperatura de 121°C. Nos mesmos foram colocados 9 mL de mosto sulfito e 1 mL de suspensão de levedura. O processo de fermentação foi conduzido em estufa a 24°C, sem agitação e nos mesmos tubos foi efetuada a avaliação de formação de H<sub>2</sub>S. Esta avaliação durou 96 horas e, com leituras feitas em intervalos de 6 e 18 horas. A avaliação foi efetuada por gravimetria (Giudici & Kunkee, 1994; Vaughan-Martini & Martini, 1998; Pellegrini et al., 1999; Jolly et al., 2003; Ciani et al., 2006; Butzke & Park, 2011; da Silva et al., 2011b). Os valores obtidos são correspondentes ao desprendimento de CO<sub>2</sub> e os resultados foram digitados em planilha do Excel, para calcular a média aritmética das repetições e os valores de  $\Delta$  dos pesos das amostras.

#### **4.8 DETECÇÃO DA CAPACIDADE KILLER**

O teste foi realizado em placas de Petri contendo meio mosto 80:20 e previamente marcadas conforme figura 6. As placas foram semeadas pipetando 100  $\mu$ L de uma suspensão de células contendo 10<sup>7</sup> céls/mL de cada linhagem padrão (Tabela 1). As células foram espalhadas com alça de Drigalski flambada em bico de Bulsen (figura 7).



Figura 6 - Placa de Petri marcada para a realização dos testes de sensibilidade e Killer



Fonte: Autora, 2020.

Tabela 1 - Linhagens de leveduras sensíveis utilizadas como “tapete” no teste Killer da série T84

LINHAGENS	GÊNERO E ESPÉCIE
26B84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
40MCF14	<i>Candida californica</i>
21MCF14	<i>Issatchenkia terrícola</i>
50MCF14	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
46TASL15	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
1GTRU15	<i>Pichia fermentans</i>
3GPEpUf17	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
7MCBS17	<i>Candida californica</i>

Fonte: Autora, 2020.

Figura 7 – Espalhamento da suspensão de células com alça de Drigalski na placa de Petri



Fonte: Autora, 2020.

As leveduras de interesse foram, em duplicata, colocadas sob forma de massa pontual sobre um tapete de células sensíveis padrão (Tabela 1), previamente plaqueadas. Cada dupla de pontos corresponde a uma levedura da série T84 em teste (Figura 8). Foram também empregadas as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* padrão K1, 1B e 91B como massa pontual para servir de padrão killer e assim avaliar a adequação do meio de cultura.

Ao fim da repicagem de todas as leveduras, as placas foram transferidas para a estufa por 48h em temperatura de 24°C. O resultado será considerado positivo para capacidade killer quando a colônia killer estiver rodeada por um halo de inibição formado pela ausência de crescimento da linhagem sensível padrão utilizada como “tapete” (da Silva, 1996).

Figura 8 - Replicação das leveduras de interesse



Fonte: Autora, 2020.

#### 4.9 TESTE DE SENSIBILIDADE

O teste foi realizado em placas de Petri contendo meio mosto 80:20, previamente marcadas conforme mostra a figura 6. As placas foram semeadas, pipetando 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de células de leveduras da série T84 (ANEXO A), contendo  $10^7$  céls/mL. Estas foram uniformemente espalhadas sobre a superfície do meio sólido de modo a formar um tapete de células. Sobre estas leveduras foram colocadas, sob forma de massa pontual e em duplicata, as 25 linhagens de leveduras killer apresentadas na Tabela 2. Ao fim da repicagem de todas as leveduras, as placas foram levadas à estufa por 48h em temperatura de 24°C. O resultado será considerado positivo quando a colônia killer estiver rodeada por um halo de inibição formado pela ausência de crescimento da linhagem da série T84 utilizada como tapete (da Silva, 1996).

Tabela 2 - Linhagens killer para teste de sensibilidade

Identificação	Linhagens	Gênero Espécie
1	1B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	91B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	K1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	10MBR2F14	<i>Candida diversa</i>
5	27MBR2F14	<i>Candida diversa</i>
6	28MCF14	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
7	29MCF14	<i>Candida diversa</i>
8	33MCF14	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
9	51MCF14	<i>Candida diversa</i>
10	52MCF14	<i>Candida diversa</i>
11	30MPB12	<i>Candida diversa</i>
12	12MPB12	<i>Candida diversa</i>
13	13GTRU15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
14	7GTGU15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
15	44TASL15	<i>Candida diversa</i>
16	37GPEpU15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
17	34GPEpU15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
18	2GCEpU16	<i>Candida diversa</i>
19	8GCEpU16	<i>Candida diversa</i>
20	36GCEpU16	<i>Candida diversa</i>
21	40GCEpU16	<i>Candida diversa</i>
22	41GCEpU16	<i>Candida diversa</i>
23	19GCEpU16	<i>Candida diversa</i>
24	28GCEpU16	<i>Candida diversa</i>
25	32GCEpU16	<i>Candida diversa</i>

#### 4.10 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS LINHAGENS

A extração de DNA da linhagem selecionada para a PCR consistiu em congelar e descongelar a suspensão de células, seguindo o procedimento descrito por da Silva et al. (2012a). Foi amplificada a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, (Agustini et al., 2014) com os primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT CCT GCG G'3) e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et al., 1990). A PCR foi realizada com os componentes e nas concentrações referidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Componentes do meio reacional da PCR

Componentes	Concentração
Água ultra pura	13,95 µL
Tampão <i>Taq</i> DNA polimerase 10x	2,5 µL
Cloreto de Magnésio (Mg <sub>2</sub> Cl) 50mM	0,75 µL
Nucleotídeos trifosfatados 1mM	4,5 µL
Oligonucleotídeos iniciadores F 20pmol/µL	1,0 µL
Oligonucleotídeos iniciadores R 2pmol/µL	1,0 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase 5U/µL	0,3 µL

Fonte: Autora, 2020.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (M. J. Research, California, USA), iniciada por uma fase de desnaturação a 95°C por 5 min seguido por 39 ciclos com as condições descritas na figura 9.

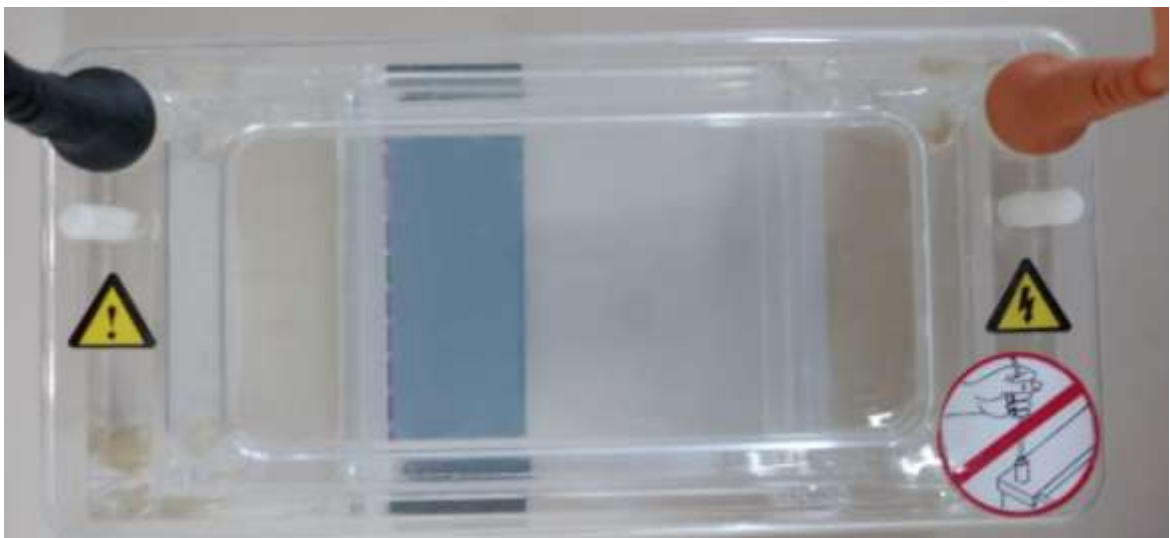
Figura 9 - Condições programadas no termociclador para a realização da PCR.

95°C por 30 seg: ➤ 60°C por 1 min: ➤ 72°C por 1 seg:  
Desnaturação ➤ Pareamento ➤ Extensão da cadeia

Fonte: Autora, 2020.

Depois desses 39 ciclos, a reação entra na sua última fase que compreende uma extensão a 72°C por 10 minutos. Após este processo o produto da ampliação, ou amplicon, foi misturado ao corante (Purple (6X) B7024S, New England, BioLabs) e aplicado ao gel de agarose 1,5%. O gel foi submetido a eletroforese horizontal na corrente elétrica de 120/110V por aproximadamente 1,5 horas, como mostra a figura 10. O gel foi corado em solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µL/mL por 30 minutos. As bandas foram visualizadas e fotografadas para documentação, utilizando o fotodocumentador Biorad MolecularImager Gek DCOTM, equipado com o software Image Lab™ Software (USA) (Biorad-USA).

Figura 10 - Gel de agarose 1,5% sendo submetido a eletroforese.



Fonte: Autora, 2020.

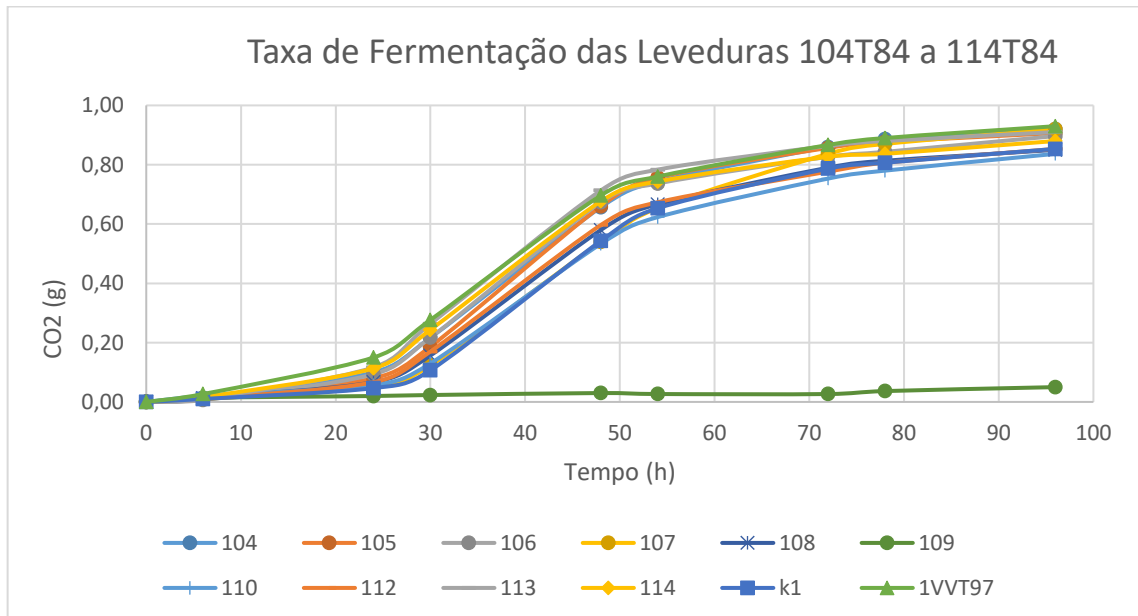
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO

Os resultados de velocidade de evolução de CO<sub>2</sub> referentes às 49 linhagens da série T84 e comparação com a velocidade das linhagens padrão *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 e K1 podem ser visualizados nas figuras 11, 12, 13, 14 e 15.

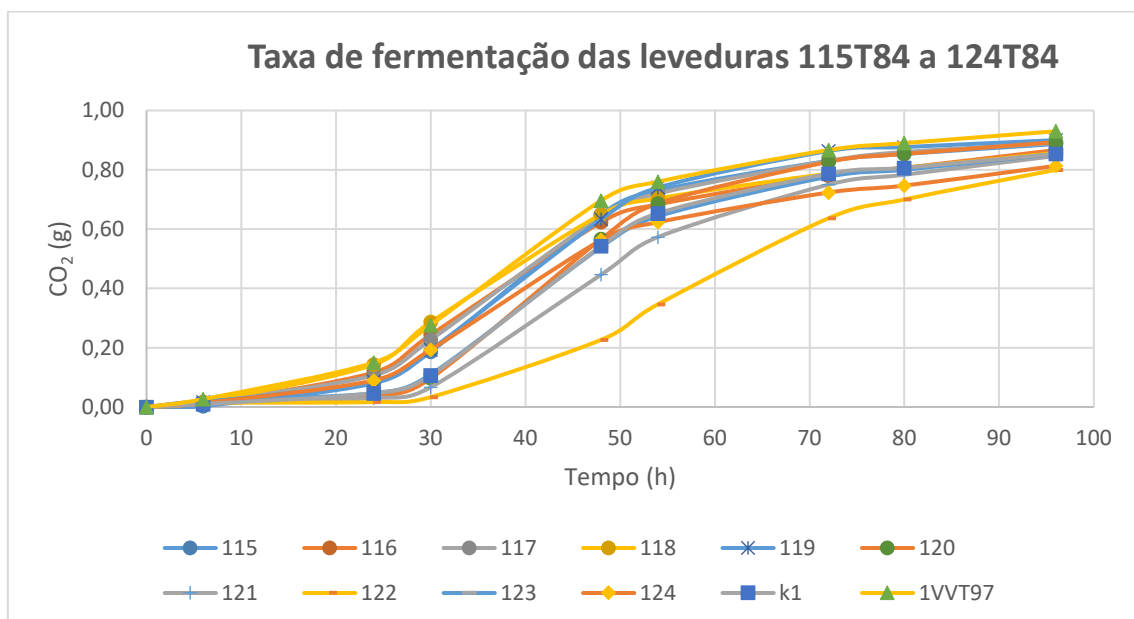
Conforme pôde ser observado em todas as figuras, a fermentação teve seu início nas primeiras 24 horas. Aparentemente, o início da fermentação parece ser muito demorado, mas na realidade não, se levarmos em consideração vários fatores, como a elevada concentração de açúcares, a presença de O<sub>2</sub> dissolvido na massa líquida no início do processo devido à agitação do tubo para a homogeneização, a adaptação das linhagens ao processo fermentativo, pois estavam todas em condições aeróbicas, a dissolução do CO<sub>2</sub> na massa líquida e o próprio método de avaliação, que foi por gravimetria. Comportamento semelhante é observado na prática enológica. Dentre as 49 linhagens, 45 (98,8%) apresentaram valores de desprendimento de CO<sub>2</sub> semelhantes aos das linhagens padrão 1VVT97 e K1. Apenas cinco (10,2%) linhagens da série apresentaram desprendimento de CO<sub>2</sub> menor que o equivalente a 8,3 mg/h.

Figura 11 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 104T84 a 114T84 e as linhagens padrão *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 e K1.



Fonte: Autora, 2020.

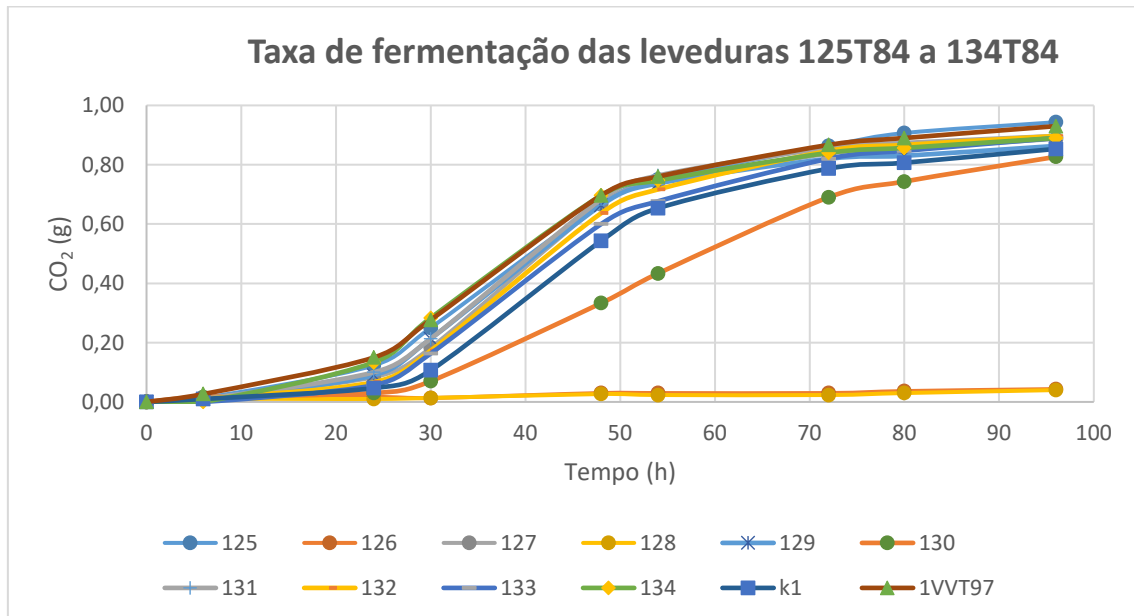
Figura 12 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 115T84 a 124T84 e as linhagens padrão *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 e K1.



Fonte: Autora, 2020.

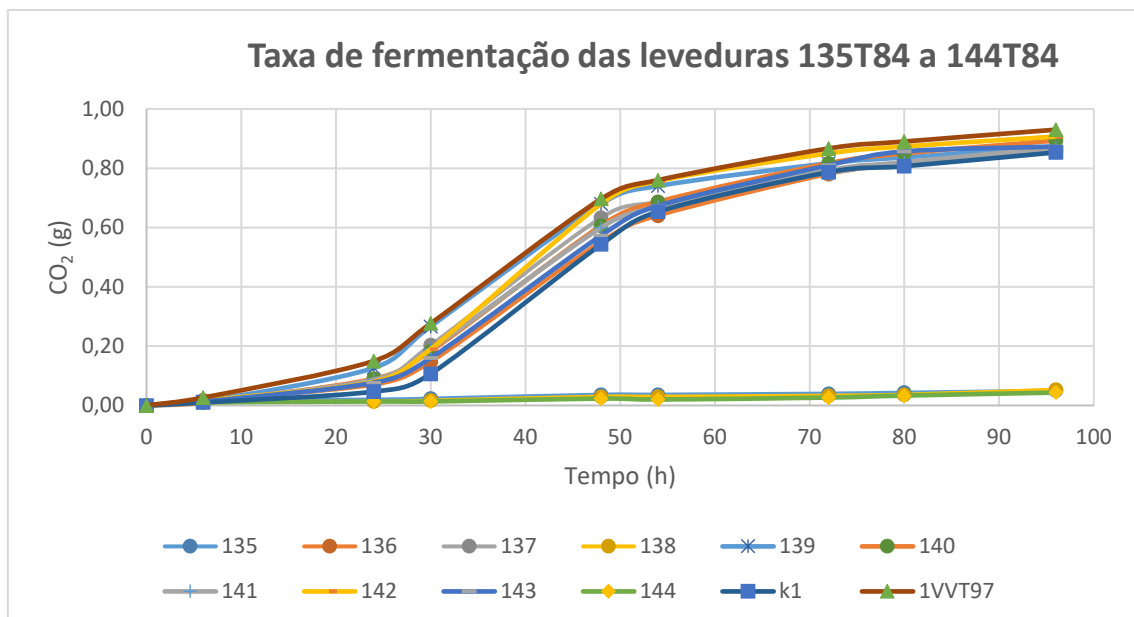


Figura 13 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 125T84 a 134T84 e as linhagens padrão *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 e K1.



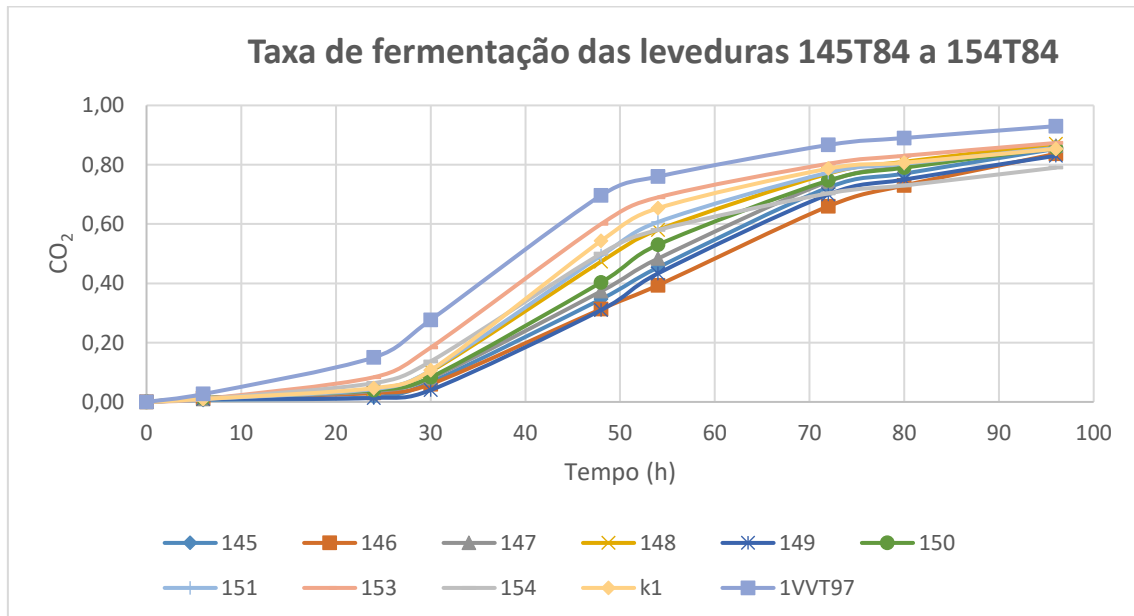
Fonte: Autora, 2020.

Figura 14 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 135T84 a 144T84 e as linhagens padrão *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 e K1.



Fonte: Autora, 2020.

Figura 15 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 145T84 a 154T84 e as linhagens padrão *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 e K1.



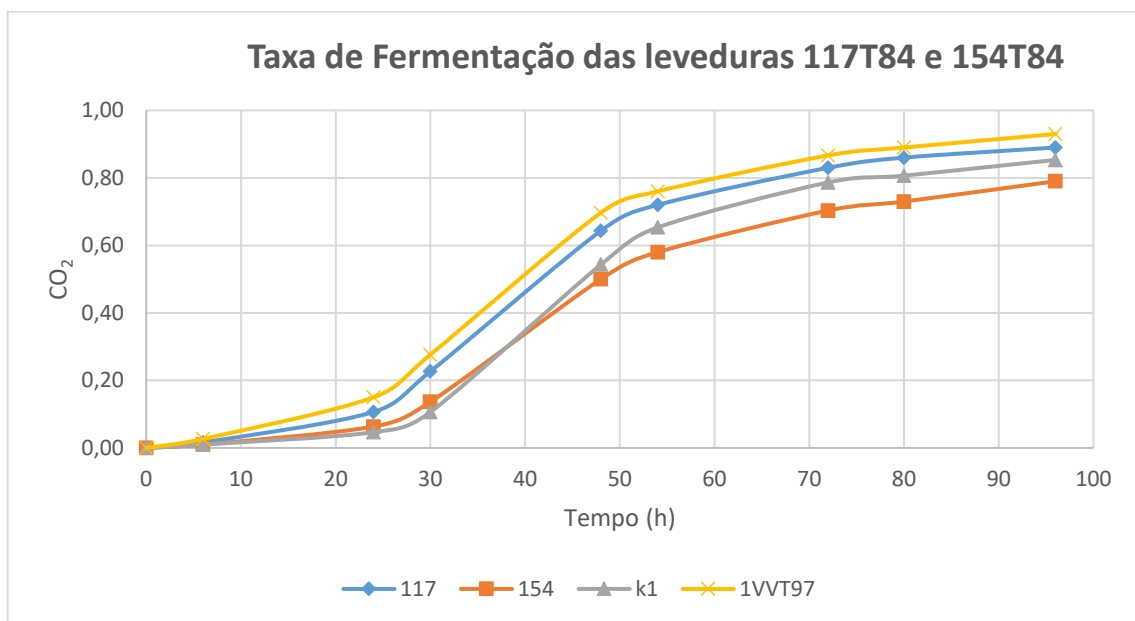
Fonte: Autora, 2020.

Entre as linhagens que apresentarem altos valores de desprendimento de  $\text{CO}_2$  e conseqüentemente, em condições anaeróbicas, alta produção de etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), apenas duas mostraram comportamento Killer com relação à linhagem *Saccharomyces cerevisiae* 26B84, que foram as leveduras 117T84 e 154T84. Se não for possível encontrar linhagens neutras com o perfil fermentativo semelhante a estas duas linhagens, estas podem ser empregadas para a elaboração de vinho. No entanto, ainda é necessário e importante verificar o comportamento destas duas linhagens com relação à produção de  $\text{H}_2\text{S}$ .

Com relação ao potencial fermentativo, como visto na figura 16, estas se equivalem às linhagens padrão 1VVT97 e K1. Há séries de linhagens isoladas de uva de diferentes cultivares e de locais distintos com baixa ou nula incidência da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, o que leva a séries de linhagens com baixa atividade na evolução de  $\text{CO}_2$  (Canossa et al., 2012, 2014, 2015; Bruneli et al., 2017). As interações entre os microrganismos do vinho se dão entre levedura-levedura, levedura-fungo filamentoso e levedura- bactérias (Fleet, 2003), mas deve se considerar também outras interações, como fungo filamentoso entre si, bactérias entre si, bactérias-

fungos filamentosos. Há ainda outros fatores que interferem na incidência de espécies, como a maturação da uva (Fleet, 2003) e os tratamentos fitossanitários (Martins et al., 2014).

Figura 16 - Comparação da taxa de fermentação entre as leveduras 117T84 e 154T84 e as leveduras padrões K1 e 1VVT97.



Fonte: Autora, 2020.

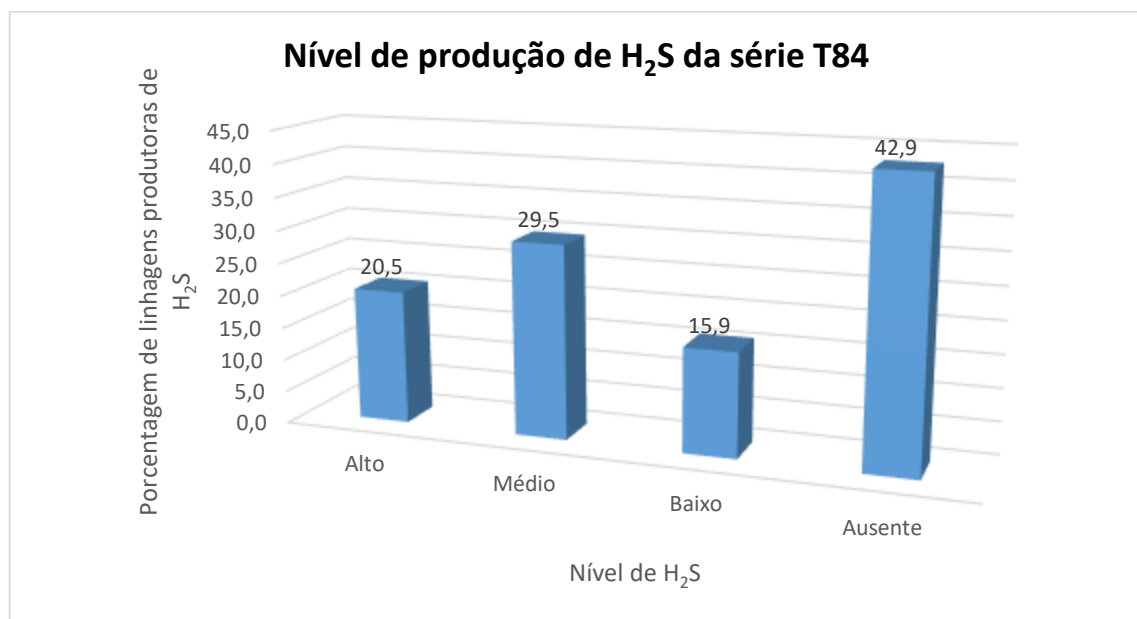
Para as leveduras 109T84, 135T84, 138T84 e 144T84 que apresentaram baixo desprendimento de CO<sub>2</sub>, o resultado já era esperado pois se tratavam de linhagens não-*Saccharomyces*. Leveduras do gênero *Meyerozyma guilliermondii* não apresentam altas taxas de conversão de glicose a etanol embora fermentem açúcares e assimile muitas hexoses, dissacarídeos, poliis e ácidos orgânicos (Kurtzman & Suzuki, 2010). A linhagem 126T84 apesar de pertencer a espécie *Saccharomyces cerevisiae* apresentou desprendimento de CO<sub>2</sub> de 0,04 g.

## 5.2 PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>S

A produção de H<sub>2</sub>S das 49 leveduras selecionadas da série T84 está demonstrada na figura 17. Destas, 20 linhagens não apresentaram a formação de H<sub>2</sub>S

o que corresponde a 42,8%. Isso significa que mais da metade das leveduras isoladas produzem  $H_2S$ . Observou-se que 22 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são produtoras de  $H_2S$  e com taxas de evolução de  $CO_2$  elevadas. Esse quadro é preocupante e reforça a necessidade do uso imediato de elevadas concentrações de linhagens selecionadas logo após o esmagamento da uva no processo de vinificação. Os valores percentuais de 120 linhagens com potencial de formação de  $H_2S$  encontrada por Wlodarczyk et al. (2012); Wlodarczyk (2013) foi de 35,8% e aumentando o número de linhagens para 175, o percentual de linhagens produtoras aumentou para 48%. Isso mostra que a incidência de linhagens com potencial para formar  $H_2S$  é um fenômeno frequente mesmo levando em conta diferentes regiões e safras distintas. Valores bem mais elevados no número de linhagens produtoras de  $H_2S$  podem ser encontrados. Nas safras de 2003, em vinhedos de Cabernet Sauvignon no Vale dos Vinhedos, observou-se que 79% das linhagens apresentavam potencial de formação de sulfeto de hidrogênio (da Silva & Dalarmi 2003) e no Vale do Rio São Francisco foram isoladas 218 linhagens onde 70% das linhagens foram produtoras de  $H_2S$  (da Silva et al., 2011a).

Figura 17 - Porcentagem de linhagens da série T84 comparado ao nível de produção de  $H_2S$



Fonte: Autora, 2020.

As linhagens *Saccharomyces cerevisiae* 117T84 e 154T84 exibiram aptidão enológica, podendo, portanto, participar de processos fermentativos na elaboração de vinhos. Estas duas linhagens não apresentaram formação de H<sub>2</sub>S e mostraram boa evolução de CO<sub>2</sub>, como visto na Tabela 4.

Tabela 4 - Evolução de CO<sub>2</sub> e produção de H<sub>2</sub>S das linhagens da Série T84.

(continua)

<b>Linhagens</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>Espécie</b>
104	-	0,920	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
105	-	0,907	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
106	++	0,897	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
107	++	0,920	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
108	++	0,850	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
109	+++	0,050	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
110	-	0,837	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
112	-	0,853	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
113	+	0,910	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
114	+	0,880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
115	++	0,887	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
116	-	0,867	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
117	-	0,89	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
118	+	0,857	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
119	-	0,900	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
120	+	0,893	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
121	-	0,847	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
122	++	0,800	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
123	++	0,853	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
124	-	0,813	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
125	-	0,943	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

126	++	0,04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
127	+++	0,887	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
128	+++	0,040	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
129	+	0,863	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
130	+	0,827	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
131	++	0,897	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
132	-	0,897	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
133	-	0,890	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
134	-	0,890	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
135	+++	0,05	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
136	-	0,87	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
137	+++	0,86	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
138	+++	0,05	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
139	+	0,87	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
140	-	0,89	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
141	++	0,87	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
142	+++	0,91	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
143	-	0,87	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
144	+++	0,04	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
145	++	0,853	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
146	++	0,837	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
147	-	0,863	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
148	++	0,870	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
149	-	0,830	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
150	+++	0,857	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
151	++	0,857	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
153	-	0,87	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
154	-	0,79	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

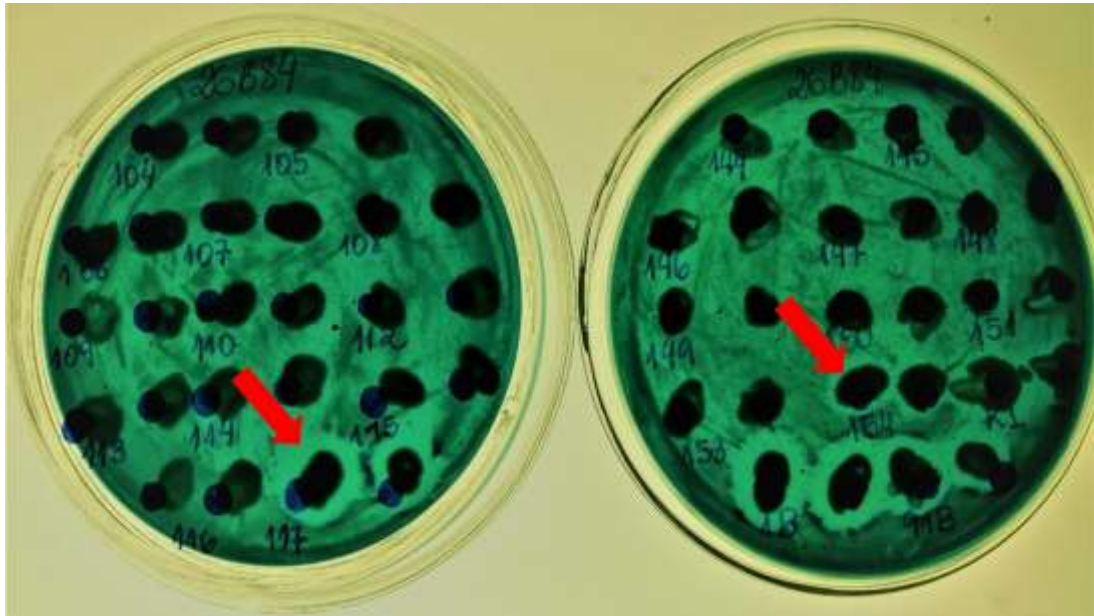
Fonte: Autora, 2020.

Onde (-) significa nulo, (+) baixa, (++) média e (+++) alta produção de H<sub>2</sub>S.

### 5.3 LINHAGENS KILLER E SENSÍVEIS AO FATOR KILLER

No teste de detecção da presença de linhagens Killer foi observado que apenas duas linhagens das 49 apresentaram halo de inibição de crescimento com relação à linhagem padrão *Saccharomyces cerevisiae* 26B84, ou seja, a *Saccharomyces cerevisiae* 117T84 e a 154T84, o que pode ser confirmado na Figura 18, onde estas linhagens estão indicadas com uma seta. A presença de espécies de leveduras killer nos mais diferentes habitats é um fenômeno frequente. Podem ser encontradas no ambiente (Abranches et al., 1997; Criseo et al., 1999; Buzzini & Martini, 2000; Agnolucci et al., 2007), em águas marinhas (Chi et al., 2010), vinícolas (Villalba et al., 2016) e na superfície de uvas (da Silva, 1996; Agnolucci et al., 2007; Csoma et al., 2010; Comitini & Ciani, 2011; Wlodarczyk et al., 2015; de Almeida et al., 2016). Mas pode também haver casos onde não se observa linhagens killer numa determinada comunidade de leveduras (da Silva et al., 2011a; Bonet et al., 2015; Sperotto et al., 2016). Cuinier & Gros (1983) também mostraram que na França a frequência de linhagens killer varia de 80 a 100% na Borgogne e Beaujolais, de 0% em Touraine e, nas demais regiões, a frequência é intermediária. Como a detecção de linhagens killer depende de uma série de fatores, incluindo a linhagem sensível que se utiliza e as condições de avaliação (Tipper & Bostian, 1984), é plenamente justificável a variação no número de indivíduos, assim como a ausência ou presença de linhagens killer num determinado grupo de leveduras.

Figura 18- Placas com o tapete formado pela linhagem *Saccharomyces cerevisiae* 26B84 e os halos de inibição provocados pelas linhagens *Saccharomyces cerevisiae* 117T84 e 154T84.



Fonte: Autora, 2020.

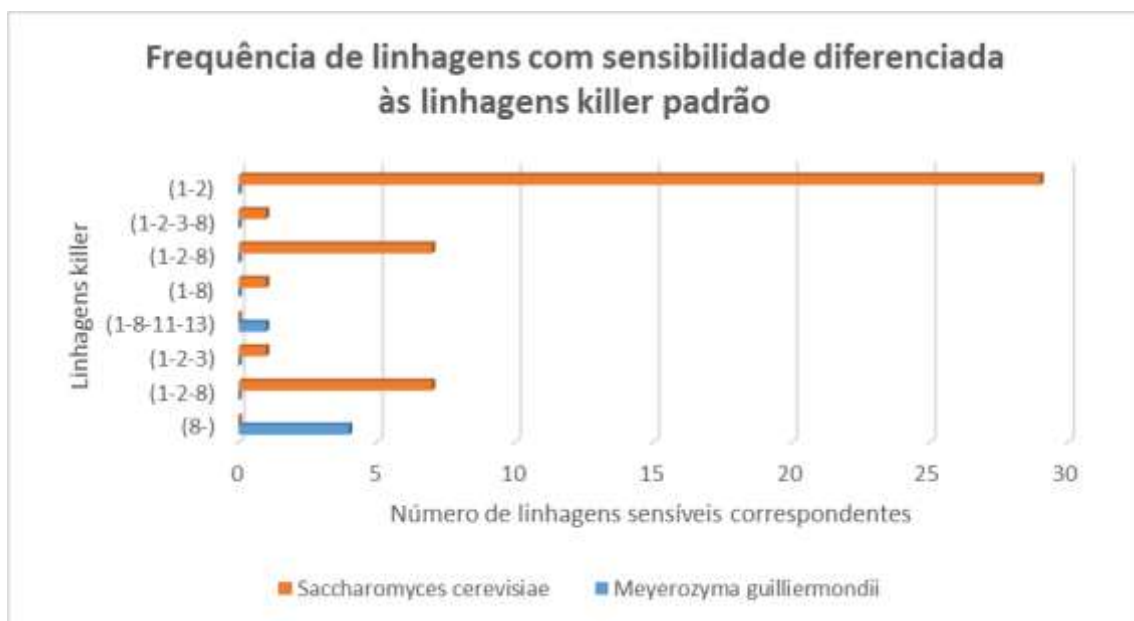
Com relação à sensibilidade das linhagens sensíveis da série T84, observou-se que apenas as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* 117T84, 144T84 e 154T84 foram resistentes à ação das 25 linhagens killer padrão exibidas na Tabela 2. Todas as outras apresentaram sensibilidade a pelo menos uma das linhagens killer padrão. Isto nos mostra que 93,9% das linhagens exibem sensibilidade a alguma linhagem killer. Estes resultados indicam que mesmo sendo da mesma espécie, muitas linhagens apresentam um certo grau de diferenciação entre elas, quando se consideram a velocidade de evolução de CO<sub>2</sub> e produção de H<sub>2</sub>S.

A Figura 19 mostra, quais as linhagens padrão killer foram capazes de matar e quantas linhagens da série T84 foram mortas por estas linhagens. Pode-se observar que a maioria (29) apresentou sensibilidade a duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* killer padrão. Duas linhagens (105T84 e 109T84) apresentaram sensibilidade a 4 linhagens padrão, mas de forma diferenciada (Figura 19). O cenário



com relação à frequência de linhagens sensíveis não parece ser diferente daquele observado para linhagens killer. Mostra também importantes variações. Podem ser encontradas linhagens sensíveis numa proporção entre 0 e 10% (Bruneli et al., 2017), entre 10 e 20% (Sperotto et al., 2016), entre 21 e 30% (de Souza Tavares et al., 2014) e acima de 30% (Sangorrín et al., 2007). Há relatos onde não se encontraram linhagens sensíveis (Wlodarczyk et al., 2015).

Figura 19 – Número de linhagens sensíveis às linhagens killer padrão. 1- *Saccharomyces cerevisiae* 1B84; 2- 91B84; 3- K1; 8- *Hanseniaspora uvarum* 33MCF14; 11- *Candida diversa* 30MPB12.

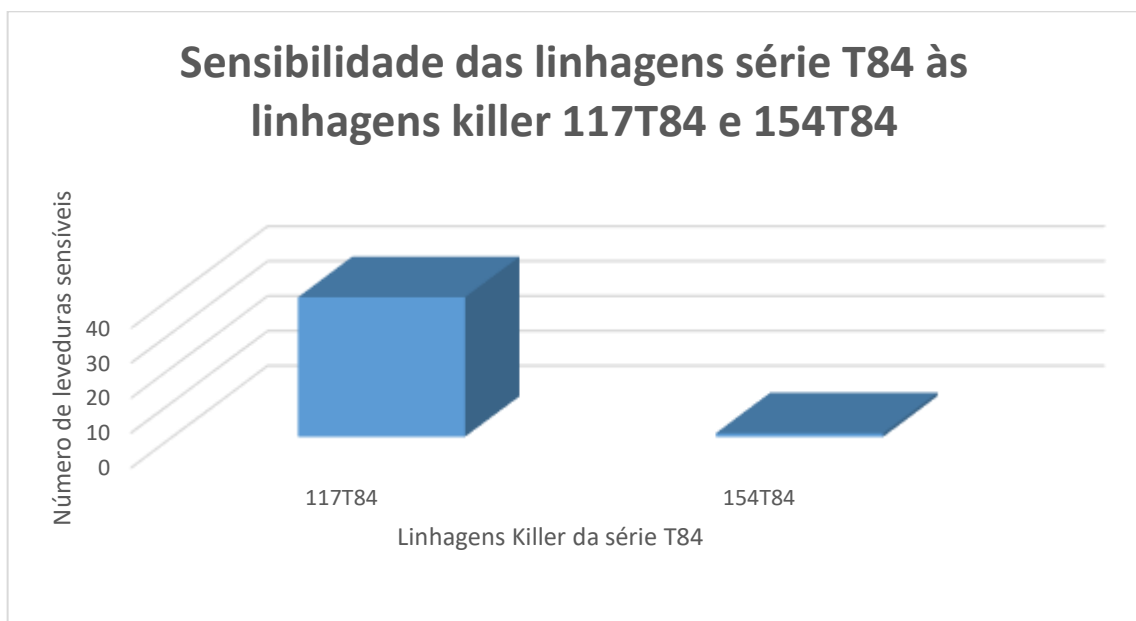


Fonte: Autora, 2020.

As linhagens 117T84 e 154T84 são linhagens killer, como pode ser comprovado claramente na Figura 18. A partir disso, uma nova avaliação de sensibilidade foi realizada, utilizando como tapete as leveduras isoladas da série T84 e colocadas em cima as leveduras 117T84 e 154T84 que apresentaram fator killer. A levedura 117T84 apresentou uma atividade killer mais forte, como pode ser visto na Figura 20, inibindo o crescimento de 40 das 48 linhagens, sendo, portanto, uma candidata a integrar as leveduras killer padrão do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa. As leveduras são consideradas neutras quando apresentam

resultado negativo para ambos os testes (killer e sensibilidade), ou seja, não apresenta capacidade killer e nem sensibilidade ao fator killer. A linhagem 144T84, que no teste killer o resultado foi negativo e no de sensibilidade também foi negativo, foi a única linhagem neutra deste grupo de 49 linhagens da série T84.

Figura 20 - Teste Killer utilizando as linhagens 117T84 e 154T84 como tapete.

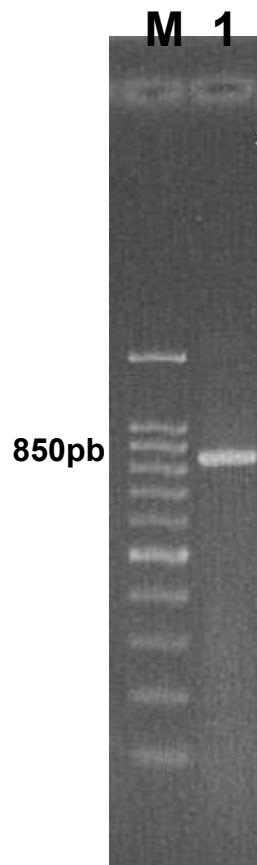


Fonte: Autora, 2020.

#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS

Os critérios para a escolha da identificação da levedura da série T84 foi baseado no comportamento que a mesma expressou durante os testes de sensibilidade e fator Killer. A confirmação da identidade da linhagem 117T84 como sendo *Saccharomyces cerevisiae* foi efetuada por PCR/RFLP. A PCR mostrou que a 117T84 apresentou banda de aproximadamente 850 pb, o que corresponde a *Saccharomyces cerevisiae* (Granchi et al., 1999; Fernández-Espinar et al., 2000; Agnolucci et al., 2007), podendo também atingir 880 pb (Guillamón et al., 1998; Esteve-Zarzoso et al., 1999; Heras-Vazquez et al., 2003; Korabecná et al., 2003; Stringini et al., 2008; Lv et al., 2013; Agustini et al., 2014).

Figura 21 – Perfil eletroforético da região ITS1-5.8-ITS2| crds-ITS2 amplificado pelos iniciadores ITS1 e ITS4.



Fonte: Autora, 2020.

M (marcador molecular) e 1 (linhagem 117T84).

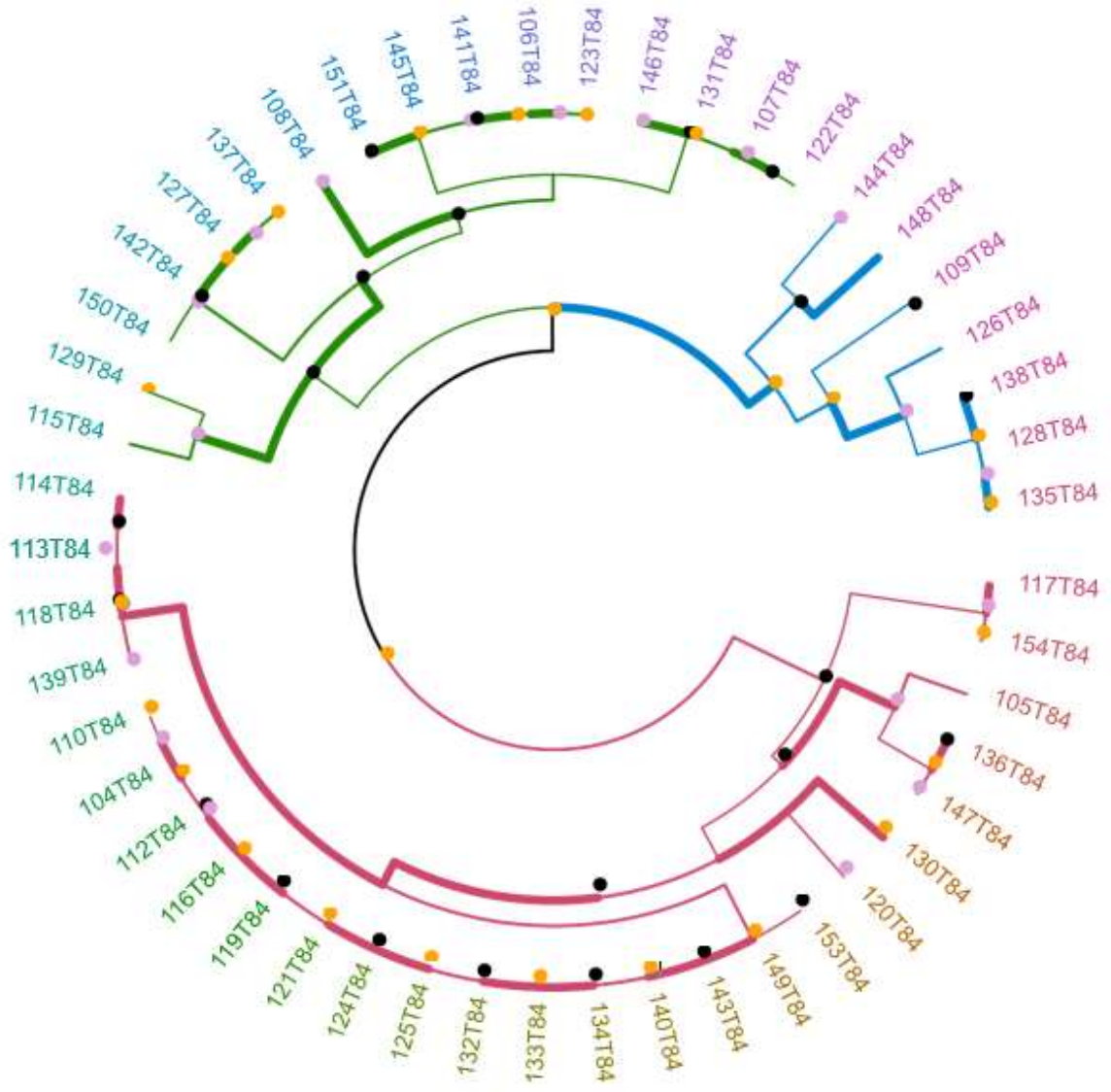
## 5.5 DENDROGRAMA

Após ter sido efetuada todas as avaliações propostas, as linhagens foram agrupadas de modo a identificar as similaridades e as diferenças entre elas, considerando todos os resultados obtidos. Para esta análise, foi feito um dendrograma com todas as 49 linhagens da série T84. Dendrograma, que vem do grego que significa “árvore”, tem por objetivo hierarquizar itens. O HCA (Hierarchical Cluster Analysis) é um método estatístico para classificar uma série de itens e agrupar indivíduos de

acordo com suas similaridades. O dendrograma da Figura 22 foi criado com R program (R Core Team, 2020), utilizando o pacote do dendextend (Galili, 2015; da Silva, 2020) do Laboratório de Microbiologia Aplicada especificamente para observar a formação dos grupos metabolicamente relacionados, independentemente do grupo taxonômico das linhagens.

O dendrograma é dividido em dois grandes grupos. No primeiro grupo estão todas as linhagens que produziram pelo menos nível um de H<sub>2</sub>S. Este grupo situa-se na parte superior do dendrograma que vai da linhagem 115T84 até à linhagem 135T84, no sentido horário. As linhagens 115T84 e 129T94 formam um grupo intermediário porque só diferem entre si no quesito formação de H<sub>2</sub>S. A linhagem 115T84 produz nível dois e a 129T84 forma nível um. O segundo grupo é formado por aquelas que tiveram produção com um nível máximo de um, que vai, no sentido horário, da linhagem 117T84 à linhagem 114T84. Pela distância euclidiana empregando a média, obteve-se uma correlação cofenética de 0,84 e, por Bray-Curtis, 0,89. As linhagens que não mostram ramificação entre si se comportam exatamente da mesma forma. Há vários casos no dendrograma. Observando apenas as linhagens 117T84 e 154T84, estas estão no mesmo nível porque só foi incluído na análise de cluster o comportamento dessas linhagens em relação às linhagens padrão. Se fosse considerada a capacidade killer das duas linhagens com relação às linhagens da série T84, seguramente estariam separadas por uma boa distância.

Figura 22 – Dendrograma das linhagens da série T84<sub>104-154</sub> com relação à evolução de CO<sub>2</sub>, níveis de H<sub>2</sub>S, capacidade killer e sensibilidade ao fator killer de linhagens padrão.



Fonte: Autora, 2020.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam que, das 49 linhagens, 5 não apresentaram alta taxa de fermentação, 20 não apresentaram produção de H<sub>2</sub>S, 2 linhagens apresentaram fator Killer e 1 apresentou caráter neutro. Além disso, nem todas as linhagens de leveduras presentes na baga da uva são adequadas à elaboração de vinhos. Por isso que, se for necessário empregar linhagens autóctones para conferir aos vinhos regionais características singulares, é necessário, antes de mais nada, isolar, caracterizar, selecionar linhagens e usar apenas aquelas que apresentem aptidão enológica adequada. De preferência, que sejam neutras com relação, especialmente, às linhagens não-Saccharomyces. Neste caso, só duas linhagens apresentaram tal característica, a 117T84 e a 154T84, com preferência para a linhagem 154T84.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches, J.; Morais, P. B.; Rosa, C. A.; Mendonça-Hagler, L. C.; Hagler, A. N. (1997). The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. **Canadian Journal of Microbiology**, 43(4):328– 336.

Acree, T. E.; Sonoff, E. P.; Splittstoesser, D. F. (1972). Effect of yeast strain and type of sulfur compound on hydrogen sulfide production. **American Journal of Enology and Viticulture**, 23(1):6–9.

Agnolucci, M.; Scarano, S.; Santoro, S.; Sassano, C.; Toffanin, A.; Nuti, M. (2007). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous *Saccharomyces* spp. strains associated to natural fermentation of 'Malvasia delle Lipari'. **Letters in Applied Microbiology**, 45(6):657–662.

Agustini, B. C.; da Silva, G. A.; Bonfim, T. M. B. (2018). MALDI-TOF MS Supplementary database for species identification employing the yeast diversity encountered on southern Brazil grapes. **Folia Microbiologica**, on line:1–9. ISSN-1874- 9356.

Agustini, B. C.; Silva, L. P.; Bloch, C.; Bonfim, T. M. B.; da Silva, G. A. (2014). Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98(12):5645– 5654.

Albertin, W.; Miot-Sertier, C.; Bely, M., Marullo; P., Coulon, J.; Moine, V.; Colonna Ceccaldi, B.; Masneuf-Pomarède, I. (2014). Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. **International Journal of Food Microbiology**, 178:87–97.

Alves, Y. P. C.; Facco, M.; de Azevedo de Campos, M. A.; dos Santos Vargas, D.; Bisognin, C. (2020). Análise das características físico químicas do vinho verde: uma aplicação do modelo de regressão beta 101. In Dullius, A. I.; Fabris, J. P., editors, **Aplicações Em Ciências Exatas e Engenharias**, pages 101–10. Backup Books.

- Andrade, M. J.; Rodríguez, M.; Sánchez, B.; Aranda, E.; Córdoba, J. J. (2006). DNA typing methods for differentiation of yeasts related to drycured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, 107(1):48–58.
- Barata, A.; González, S.; Malfeito-Ferreira, M.; Querol, A., Loureiro, V. (2008). Sour rotdamaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. **FEMS Yeast Research**, 8(7):1008– 1017.
- Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2012a). Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 154(3):152–161.
- Barata, A.; Malfeito Ferreira, M.; Loureiro, V. (2012b). The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, 153(3):243–259.
- Becker, B.; Schmitt, M. J. (2017). Yeast killer toxin k28: biology and unique strategy of host cell intoxication and killing. **Toxins**, 9.
- Bedriñana, R. P.; Simón, A. Q.; Valles, B. S. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from asturias. **Food Microbiology**, 27(4):503–508.
- Beltran, G.; Torija, M. J.; Novo, M.; Ferrer, N.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Rozès, N.; Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. **Systematic and Applied Microbiology**, 25(2):287–293.
- Bevan, E. A.; Makower, M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. In Geerts, S., editor, Proc. 11th Int. Congr. Genet. (Abstract), volume 1, pages 202–203. Pergamon Press, **Oxford**, N°203.
- Bokulich, N. A.; Collins, T. S.; Masarweh, C.; Allen, G., Heymann, H.; Ebeler, S. E.; Mills, D. A. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. **American Society of Microbiology**, 7(3):1–12.



- Bonet, J.; Agustini, B. C.; Morini, M. A. L.; da Silva, G. A. (2015). Caracterização de leveduras isoladas de bagas de uva Goethe da região de Urussanga (SC) para a elaboração de vinhos. In **XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia e XIII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**.
- Bostian, K. A.; Burn, V. E.; Jayachandran, S.; Tipper, D. J. (1983). Yeast killer dsrna plasmids are transcribed in vivo to produce full and partial-length plusstranded rnas. **Nucleic Acids Research**, 11(4):1077–1097.
- Bostian, K. A.; Sturgeon, J. A.; Tipper, D. J. (1980). Encapsidation of yeast killer doublestranded ribonucleic acids: dependence of m on l. **Journal of Bacteriology**, 143(1):463–470.
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, 32:314–331.
- Bruneli, R. E.; da Silva, G. A.; Agustini, B. C.; Morini, M. A. L. (2017). Caracterização da diversidade de linhagens de levedura (gtruf17) isoladas de uvas 'goethe tradicional' da região dos vales da uva goethe, urussanga-sc. **XV Encontro de Iniciação Científica e XI Encontro de Pós-Graduandos da Embrapa Uva e Vinho**.
- Butzke, C. E.; Park, S. K. (2011). Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine. **Journal of Microbiology Biotechnology**, 21(5):519–524.
- Buzzini, P.; Martini, A. (2000). Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the brazilian rain forest. **Canadian Journal of Microbiology**, 46(7):607–611.
- Cadez, N.; Raspor, P.; de Cock, A. W. A. M.; Boekhout, T.; Smith, M. T. (2002). Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* ; *Kloeckera*. **FEMS Yeast Research**, 1(4):279–289.
- Canossa, S.; Agustini, B. C.; Manfroi, V.; da Silva, G. A. (2014). Caracterização das leveduras isoladas de uvas das cultivares Malvasia Bianca e Moscato Alexandria da

região de Farroupilha-RS. In **XII Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho - VIII Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho** - Bento Gonçalves, 24 a 25 de Julho.

Canossa, S.; Agustini, B. C.; Manfroi, V.; da Silva, G. A. (2015). Características das linhagens isoladas de bagas de uva da cultivar Moscato Tradicional da região de Farroupilha-RS. In e Vinho, E. U., editor, **XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia e XIII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**, BRASIL / Rio Grande do Sul / Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho.

Canossa, S.; Włodarczyk, S. R.; da Silva, G. A. (2012). Características de leveduras isoladas das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot de Pinto Bandeira- Bento Gonçalves. In Girardi, C. L.; Machado, C. A. E.; dos Santos, H. P.; Antonioli, L. R.; Revers, L. F.; Botton, M.; editors, **X Encontro de Iniciação Científica e VI Encontro de Pós-Graduandos**, page 48, Rua Livramento, 515, Bento Gonçalves, RS. Embrapa, Embrapa.

Caruso, M.; Capece, A.; Salzano, G.; Romano, P. (2002). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. **Letters in Applied Microbiology**, 34(5):323–328.

Chi, Z.-M.; Liu, G.; Zhao, S.; Li, J.; Peng, Y. (2010). Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 86(5):1227–1241.

Ciani, M.; Beco, L.; Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, 108(2):239–245.

Comitini, F.; Ciani, M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. **FEMS Microbiology Letters**, 316(1):77–82.

Criseo, G.; Gallo, M.; Pernice, A. (1999). Killer activity at different phs against cryptococcus neoformans var. neoformans serotype a by environmental yeast isolates. **Mycoses**, 42(11-12):601–608.

Csoma, H.; Zakany, N.; Capece, A.; Romano, P.; Sipiczki, M. (2010). Biological diversity of Saccharomyces yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, 140(2- 3):239–248.

Cuinier, M. C.; Gros, M. C. (1983). Enquete sur la repartition des levures killer en France. **Vignes et Vins**, 318:25–27.

da Silva, G. A. (1994). Levedura killer - solução ou problema na vinificação? II **Jornada Brasileira de Vitivinicultura**, pages 1–32.

da Silva, G. A. (1996). The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 46(2):112–121.

da Silva, G. A. (1999). Comportamento de leveduras isoladas no Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves, RS, com relação à atividade killer. In Tonietto, J.; Guerra, C. C., editors, **Anais do IX Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**, page 170, **Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho**, Embrapa Uva e Vinho.

da Silva, G. A. (2020). Hierarchical cluster analysis on a set of dissimilarities among environmental yeast strains. **Laboratory of Applied Microbiology - Embrapa Grape and Wine**.

da Silva, G. A.; Bernardi, T. L.; Schaker, P. D. C.; Menegotto, M.; Valente, P. (2012a). Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents ; DNA purification. **Brazilian Archives of Biology Technology**, 55(2):319–327.

da Silva, G. A.; Dalarmi, L. (2003). Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra de 2003. In Zanús, M. C., Laureano, O.; de Melo, G. W. B.; de Souza Seben, S., editors, **Anais do X**

**Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**, page 214, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.

da Silva, G. A.; de Almeida, E. A. (2006). Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. **Brazilian Archives Biology and Technology**, 49(3):411–419.

da Silva, G. A.; Menegotto, M.; Schaker, P.D. C.; Bernardi, T. L.; de Mello, L. M. R.; Pereira, G. E. (2011a). São Francisco Valley Region ; the autochthonous yeast of the Brazilian Northeast. In **34th World Congress of Vine and Wine. 9th General Assembly of the OIV**, Lisboa (Portugal). OIV.

da Silva, G. A.; Poletto, C. M.; Poli, J. S.; Valente, P. (2011b). Influence of *Brettanomyces custersianus* upon the activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the tumultuous phase of vinification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 54(2):347–356.

da Silva, G. A.; Poli, J. S.; Poletto, C. M.; Balbinotte, J.; Valente., P. (2008). Composição do meio e sua relação com a expressão killer. In Ritschel, P.; de Souza Sebben, S.; editors, **Anais do XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves**, page 158, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.

da Silva, G. A.; Poli, J. S.; Poletto, C. M.; Schaker, P. D. C. ; Silva, P. V. (2011c). Production of functional killer protein in batch cultures upon a shift from aerobic to anaerobic conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 54(3):601–612.

da Silva, G. A.; Wlodarczyk, S. R.; de Souza, R. C. (2012b). Avaliação de leveduras isoladas na região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) com relação o à produção de H<sub>2</sub>S e velocidade de fermentação. In **II SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA SIMBBTEC**, Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário Caixa Postal

6001 CEP – 86.051– 990 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

da Silva, M. A. A. A.; da Silva, G. A. (1984). Determinação qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio por leveduras vínicas. In **Síntese: Tecnologias Geradas pelo sistema EMBRAPA**, page 243. EMBRAPA- DDT, Brasília.

da Silva, M. A. A. A.; da Silva, G. A. (1987). Leveduras nacionais selecionadas para a elaboração de vinho. **Technical report**, Embrapa, CNPUV. p. 5-9, Circular Técnica Bento Gonçalves.

de Almeida, M. B.; de Medeiros, A. H.; da Silva, G. A.; Agustini, B. C. (2016). Caracterização e identificação de leveduras isoladas de uvas Sauvignon Blanc de parreirais de Campo Belo do Sul (SC), safra de 2016. **Relatório de estágio, Laboratório de Microbiologia Aplicada - Embrapa** – Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho/UF- SCAR. Orientadores: Ane H. de Medeiros; Gildo Almeida da Silva.

de Mello, L. M. R.; Machado, C. A. E.; da Silva, S. M. R.; Zanesco, R. (2017). Dados cadastrais da viticultura do rio grande do- sul: 2013 a 2015. In de Mello, L. M. R.; Machado, C. A. E., editors, **Cadastro vitícola do Rio Grande do Sul: 2013 a 2015**, chapter 1, pages 9–30. Loiva Maria Ribeiro de Mello; Carlos Alberto Ely Machado ; Flávio Bello Fialho ; Luiz Carlos Guzzo ; Rosemary Hoff ; Rudimar Zanesco ; Sonia Marliza Rodrigues da Silva, primeira edition.

de Souza Tavares, B.; Bernd, L. P.; Agustini, B. C.; da Silva, G. A. (2014). Caracterização e identificação de leveduras autóctones isoladas de uvas da cultivar Moscato Branco, na região de Farroupilha - RS. **Estágio - Trabalho de Conclusão de Curso, TCC- Embrapa Uva e Vinho** - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Bento Gonçalves.

Diguta, C. F.; Vincent, B.; Guilloux-Benatier, M.; Alexandre, H.; Rousseaux, S. (2011). PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiology**, 28(6):1145–1154.

Dinman, J. D.; Icho, T.; Wickner, R. B. (1991). A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded rna virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America**, 88(1):174–178.

Embrapa; Sede da Embrapa Uva e Vinho: Laboratório de Microbiologia. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/sede/laboratorio-de-microbiologia>> Acesso em: 17 de jan. de 2020

Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 49 Pt 1:329–337.

Fernández-Espinar, M. T.; Esteve-Zarzoso, B.; Querol, A.; Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 78(1):87–97.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, 86(1- 2):11–22.

Galili, T. (2015). Dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering. **Bioinformatics Advance Access**.

Giesselmann, E.; Becker, B.; Schmitt, M. J. (2017). Production of fluorescent and cytotoxic k28 killer toxin variants through high cell density fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, 16(1):1.

Giudici, P.; Kunkee, R. E. (1994). The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture** 45(1):107–112.

Gkatzionis, K.; Yunita, D.; Linforth, R. S. T.; Dickinson, M.; Dodd, C. E. R. (2014). Diversity and activities of yeasts from different parts of a stilton cheese. **International Journal of Food Microbiology**, 177:109–116.

Granchi; Bosco; Messini; Vincenzini (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by pcr-rflp analysis of the rdna its region. **Journal of Applied Microbiology**, 87(6):949– 956.

Grizzo, A. (1997). O que significa o famoso termo francês “cru”? Disponível em: [https://revistaadega.uol.com.br/artigo/como-surgiu-e-o-que-significa-o-famoso-termo-frances-cru\\_10955.html](https://revistaadega.uol.com.br/artigo/como-surgiu-e-o-que-significa-o-famoso-termo-frances-cru_10955.html) Acesso em: 29 de jul. de 2020.

Guerra, C. C.; Madelli, F.; Tonietto, J.; Zanus, M. C.; Camargo, U. A. (2005). Conhecendo o essencial do vinho. **Série Documentos**, 48:9–68.

Guillamón, J. M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J.; Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, 169(5):387–392.

Heras-Vazquez, F. J. L.; Mingorance Cazorla, L.; Clemente Jimenez, J. M.; Rodriguez-Vico, F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by rflp and sequence analysis of the 5.8s rna gene and the two internal transcribed spacers. **FEMS Yeast Research**, 3(1):3–9.

Icho, T.; Wickner, R. B. (1989). The doublestranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. **The Journal of Biological Chemistry**, 264(12):6716–6723.

Jolly, N. P.; Augustyn, O. P. H.; Pretorius, I. S. (2003). The effect of non-Saccharomyces yeasts on fermentation and wine quality. **South African Journal for Enology and Viticulture**. 24(2):55–62.

Kinzurik, M. I.; Herbst-Johnstone, M.; Gardner, R. C.; Fedrizzi, B. (2015). Evolution of volatile sulfur compounds during wine fermentation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 63(36):8017–8024.

Korabecná, M.; Liska, V.; Fajfrlík, K. (2003). Primers its1, its2 and its4 detect the intraspecies variability in the internal transcribed spacers and 5.8s rna gene region in clinical isolates of fungi. **Folia Microbiology (Praha)**, 48(2):233–238.

Kurtzman, C. P.; Suzuki, M. (2010). Phylogenetic analysis of Ascomycete yeasts that form coenzymeQ-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleroyzyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, 51:2–14.

Laboratories, E. (2011). ETS volatile sulfide analysis. **Technical report**, <http://www.etslabs.com/display.aspx?catid=48,50,66&pageid=94> p. 1-4.

Linderholm, A. L.; Bisson, L. F. (2005). Elimination formation of hydrogen sulfide by *Saccharomyces*. **Practical Winery and Vineyard Magazine**.

Lv, X.-C.; Huang, X.-L.; Zhang, W.; Rao, P.-F.; Ni, L. (2013). Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for hong qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Control**, 34:183–190.

Maldotti, V.; Agustini, B. C.; Morini, M. A. L.; da Silva, G. A. (2015). Avaliação de sensibilidade de leveduras neutras a linhagens killer não-*Saccharomyces*. In **XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia e XIII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**.

Maqueda, M.; Zamora, E.; Álvarez, M. L.; Ramírez, M. (2012). Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces sensu stricto* killer yeasts in the spontaneous grape must fermentations of Southwestern Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(3):735–743.

Martins, G.; Vallance, J.; Mercier, A.; Albertin, W.; Stamatopoulos, P.; Rey, P.; Lonvaud, A.; Masneuf-Pomarède, I. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 177:21–28.

Martorell, P.; Fernández-Espinar, M. T.; Querol, A. (2005). Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. **International Journal of Food Microbiology**, 101(3):293–302.



Ministério da Agricultura, M. A. (1988). Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988: Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho. Acesso em: 2 de jul. de 2020. **UVIBRA - União Brasileira de Vitivinicultura**. Disponível em: <[http://www.uvibra.com.br/legislacao\\_portaria229.htm](http://www.uvibra.com.br/legislacao_portaria229.htm)>.

Ministério do Meio Ambiente, M. M. A. (2015). Patrimônio genético e conhecimentos tradicionais associados. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/patrimonio-genetico/conselho-de-gestao-dopatrimoniogenetico/sis-gen> Acesso em: 16 de jan. de 2020.

Ono, B. I.; Hazu, T.; Yoshida, S.; Kawato, T.; Shinoda, S.; Brzwczy, J.; Paszewski, A. (1999). Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation. **Yeast**, 15(13):1365– 1375.

Peake, I. (1989). The polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, 42:673–676.

Pellegrini, L.; Cardinali, G.; Martini, A. (1999). Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains able to ferment at supraoptimal temperatures. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, pages 55–65.

Pérez, G. D. (2013). Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

R Core Team (2020). R: A Language ; Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria.

Rankine, B. C. (1963). Nature, origin and prevention of hydrogen sulphide aroma in wines. **Journal of the Science of Food Agriculture**, 14:79–91.

RIZZON, Luiz Antenor; MIELE, Alberto. AVALIAÇÃO DA CV. CABERNET FRANC PARA ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 249-255, ago. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612001000200022>.

Rodríguez-Cousino, N.; Gómez, P.; Esteban, R. (2013). L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus double-stranded RNA: possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, 79(15):4661–4674.

Rodríguez-Cousiño, N.; Esteban, R. (2017). Relationships and evolution of double-stranded rna totiviruses of yeasts inferred from analysis of l-a-2 and l-bc variants in wine yeast strain populations. **Applied and Environmental Microbiology**, 83:1–18.

Sangorrín, M. P.; Lopes, C. A.; Giraudó, M. R.; Caballero, A. C. (2007). Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. **International Journal of Food Microbiology**, 119(3):351–357.

Schmitt, M. J. (1995). Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. **Molecular Genetics and Genomics**, 246(2):236–246.

Schmitt, M. J.; Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, 4(3):212–221.

SILVA, Maria Angela Amazonas Almeida da; SILVA, Gildo Almeida da. LEVEDURAS NACIONAIS SELECIONADAS PARA A ELABORAÇÃO DE VINHO. 14. ed. Bento Gonçalves: **Embrapa**, 1983.

Sperotto, J.; da Silva, G. A.; Agustini, B. C.; Morini, M. A. L. (2016). Caracterização de leveduras isoladas de uvas da cultivar Malbec de Campo Belo do Sul/SC da Safra de 2016 – Série MCBS16. In **14º Encontro de Iniciação Científica e 10º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho - Resumo**.

Spiropoulos, A.; Bisson, L. F. (2000). MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(10):4421–4426.

Stringini, M.; Comitini, F.; Taccari, M.; Ciani, M. (2008). Yeast diversity in cropgrowing environments in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, 127(1-2):184–189.

Tipper, D. J.; Bostian, K. A. (1984). Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. **Microbiology Reviews**, 48(2):125–156.

Tonietto, J. (2007). Afinal, o que é terroir? Disponível em:

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/h;le/doc/542312> Acesso em: 29 de jul. de 2020.

Vaughan-Martini, A.; Martini, A. (1998). Determination of ethanol production. In Kurtzman, C.; Fell, J.; Boekhout, T.; editors, *The Yeasts: A Taxonomic Study*, volume 3 of *The Yeasts: A Taxonomic Study*, chapter 14, pages 1–1055. **Elsevier**, Amsterdam, 4th edition.

Villalba, M. L.; Lutz, M. C.; Lopez, S.; Pildain, M. B.; Sangorrín, M. P. (2016).

Patagonian antagonist yeasts for food biopreservation. In **Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms**. Springer.

Walt, V. d.; Yarrow, D. (1984). Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In van Rij, N. K., editor, **The yeasts a taxonomic study**, chapter II, pages 45–104. Elsevier, P.O. Box 211, Amsterdam, The Netherlands, third edition.

White, T.; Bruns, T.; Lee, E.; Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, MA; Gelfand, DH; Sninsky, JJ; White, TJ: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, chapter 38, page 315–322. Academic Press, San Diego.

Wilson, C.; Whittaker, P. A. (1989). Factors affecting activity and stability of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, 55(3):695–699.

WINER; Cabernet Franc saiba mais sobre a mae da Cabernet Sauvignon. Disponível em: <<http://www.winer.com.br/cabernet-franc-saiba-mais-sobre-a-mae-da-cabernet-sauvignon/>> Acesso em: 15 de jun. de 2020

Włodarczyk, S. R. (2013). Caracterização de leveduras vínicas provenientes do município de Pinto Bandeira (RS) e da Região Metropolitana de Curitiba (PR).

**Master's thesis**, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

Włodarczyk, S. R.; de Souza, R. C.; Bonfim, T. M.; Brand, D.; da Silva, G. A. (2012). Evaluation of isolated yeasts from grapes of Pinto Bandeira region, Bento Gonçalves (RS) in relation to production of H<sub>2</sub>S and fermentation rate. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, 11(2):24–27.

Włodarczyk, S. R.; Gaensly, F.; Calegari- Santos, R.; Deffert, F.; da Silva, G. A.; Bonfim, T. M. B. (2015). Characterization of autochthonous wine yeasts isolated in vine-yards of the State of Paraná, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, 37(3):361– 365.

Woods, D. R.; Bevan, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of General Microbiology**, 51(1):115–126.

## ANEXO A:

(continua)

Linhagens isoladas do mosto	
LINHAGENS	GÊNERO E ESPÉCIE
104T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
105T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
106T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
107T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
108T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
109T84	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
110T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
112T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
113T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
114T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
115T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
116T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
117T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
118T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
119T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
120T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
121T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
122T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
123T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
124T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
125T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
126T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
127T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
128T84	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
129T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
130T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

---

131T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
132T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
133T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
134T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
135T84	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
136T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
137T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
138T84	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
139T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
140T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
141T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
142T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
143T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
144T84	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
145T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
146T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
147T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
148T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
149T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
150T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
151T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
152T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
153T84	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>
154T84	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

---