

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO MIRTILO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Bortoluzzi Lucion

Santa Maria, RS, Brasil

2015

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO MIRTILO

Fernanda Bortoluzzi Lucion

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Área de concentração Análise e Controle de Qualidade de Uva, Mostos e Vinhos, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Neidi Garcia Penna

Co-orientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós Graduação em Tecnologia e Ciência dos
Alimentos**

**A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova e Dissertação de Mestrado**

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO MIRTILO

Elaborada por
Fernanda Bortoluzzi Lucion

COMISSÃO EXAMINADORA:

Neidi Garcia Penna, Dr^a
(Presidente/Orientadora)

Marina Venturini Copetti, Dr^a (UFSM)

Taís Letícia Bernardi, Dr^a (IFRS)

Santa Maria, 13 de março de 2015.

À minha mãe Janes Lucion,
que com sua extrema força e garra me motiva e
inspira a continuar a trilhar o meu caminho;
Ao meu pai, Irineu Lucion,
pelo carinho e amor incondicional
sempre transmitidos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus. Muitas foram as lutas, maiores foram as vitórias, transformando-se as fraquezas em força e as derrotas em vitórias.

A meus pais Janes e Irineu Lucion e ao meu irmão Diego, pelo amor incondicional, pelo convívio nesta família maravilhosa, pelo apoio, pela minha formação de boa índole e caráter e por sempre acreditarem em mim, amo vocês!

Ao meu noivo, Walter Anderson Pillon, pelo amor, carinho e alegria transmitida. Pelo incentivo em meus projetos, por me inspirar como exemplo de força, caráter e responsabilidade laboral! Por me acompanhar sempre em todos os momentos, pela compreensão de minha ausência, por tornar esta caminhada menos árdua! Te amo!

À minha orientadora, Dra Neidi Garcia Penna, pelo apoio, compreensão, pelo auxílio necessário, pela amizade, ideias, tranquilidade, conhecimentos transmitidos e pela confiança em meu trabalho. Obrigada!

Ao meu co-orientador e Pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Dr. Gildo Almeida da Silva, fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa, por me acolher em seu laboratório, pela confiança, pela ajuda e paciência constantes, pela amizade e risadas, pelos conhecimentos transmitidos e por compreender meu modo de trabalho.

À Bruna Carla Agustini, pela ajuda na realização das análises, pelos conhecimentos transmitidos e por não medir esforços em inúmeros auxílios e “quebra-galhos”, pelo apoio e força a mim transmitidos, por me acolher em sua residência com muito carinho em Bento Gonçalves. Sem você a realização deste trabalho seria muito difícil, muito obrigada!

À funcionária do Laboratório de Microbiologia das Fermentações da Embrapa Uva e Vinho, Maria Antonieta Luvison Morini (Chica), por toda a ajuda prestada, sempre

auxiliando para o progresso de minhas pesquisas! Obrigada pelas conversas divertidas, pelos mates, pelo apoio, pela generosidade, pela palavra amiga!

Aos queridos colegas de laboratório, Sheila Canossa, Jéssica Tomasi, Marlova Serafin, Daiana Stein e Vagner Maldotti, pelos momentos de descontração e pelos auxílios recebidos.

Às minhas amigas do coração: Priscila Vidor, Jenifer Godoy, Anelise Rosa, Joice Dalenogare, Mariana Grundling e Gabriela Rigo, por me proporcionarem bons momentos compartilhados, longas rodas de conversas-cabeça e pelo apoio e compreensão de sempre!

Aos meus colegas de pós-graduação Évelin Wigmann, Andriéli Borges, Jossiê Donadel e Greice Dotto pelo companheirismo, amizade e mates compartilhados ao longo das aulas da pós.

À família Pillon: dona Eliane, seu Walter, João Vitor, Germano e Wilian. Minha segunda família, obrigada pelo carinho!

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da UFSM.

À Universidade Federal de Santa Maria e à Embrapa Uva e Vinho pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo, que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos que, de alguma maneira, pessoal, moral ou profissional, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas,
mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de
espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito,
porque vivem numa penumbra cinzenta,
onde não conhecem nem vitória, nem derrota.

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DO MIRTILO

AUTORA: FERNANDA BORTOLUZZI LUCION

ORIENTADORA: NEIDI GARCIA PENNA

CO-ORIENTADOR: GILDO ALMEIDA DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de março de 2015.

O perfil químico de um produto fermentado depende da matéria prima de base e da microbiota que participam do processo fermentativo. No presente estudo, leveduras pertencentes à microbiota do mirtilo foram investigadas, isolando-se estes micro-organismos da superfície de duas diferentes cultivares de mirtilo, Florida M e Climax. Foram avaliadas a capacidade fermentativa, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), formação de filme, característica killer, sensibilidade e neutralidade a este fator. Três metodologias para identificação foram empregadas: espectrometria de massas MALDI-TOF, análise da região ITS do gene rRNA por PCR-RFLP e, quando necessário, sequenciamento genético da região D1/D2 do 26S do gene rRNA. A cultivar Florida M apresentou em sua superfície as espécies *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida sorboxylosa*, *Metschnikovia kunwiensis*, *Candida bentonensis*, *Candida oleophila/Candida railenensis* e *Candida quercitrusa*. Na cultivar Climax, foram encontradas as espécies *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola*, *Candida sorboxylosa*, *Candida asiatica*, *Candida oleophila/Candida railenensis*, *Issatchenkia hanoiensis* e *Kazachstania intestinalis*. Apenas três espécies foram comuns as duas cultivares, sendo elas *H. uvarum*, *C. sorboxylosa*, *Candida oleophila/Candida railenensis*. *H. uvarum* foi a espécie predominante em ambas cultivares, representando 70,4% e 78% do total de leveduras isoladas da cv. Florida M e Climax, respectivamente. A característica killer não foi detectada em nenhuma linhagem isolada da cv. Florida M. Na cv. Climax, apenas a linhagem *C. asiatica* 133 MCMCF/14 se comportou como killer. A linhagem *K. intestinalis* 91 MCMCF/14 foi a única que demonstrou sensibilidade em relação a todas as linhagens killer padrão K1 (Lallemand), EMBRAPA 1B, EMBRAPA 91B. Esta mesma linhagem se mostrou sensível também à linhagem isolada da cultivar Climax *C. asiatica* 133 MCMCF/14. Todas as linhagens isoladas de ambas cultivares apresentaram baixa capacidade fermentativa e todas elas foram identificadas como sendo não-*Saccharomyces*. Houve de moderada a alta produção de H₂S em 21 e 34% nas linhagens isoladas das cultivares Florida M e Climax, respectivamente. A produção máxima de H₂S se destacou principalmente em linhagens das espécies *I. terricola* e *C. sorboxylosa*. A maioria das linhagens de leveduras da espécie *C. oleophila/C. railenensis* apresentaram baixa produção deste gás. O processo de produção de fermentados de mirtilo tanto da cultivar Florida M como da cultivar Climax pode ser severamente afetado por este tipo de leveduras autóctones.

Palavras-chave: *Vaccinium mytillus*; Leveduras Não-*Saccharomyces*; Microbiota do mirtilo; Região do ITS; Identificação de leveduras.

ABSTRACT

Master's dissertation
Post-Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BLUEBERRY'S YEASTS

AUTHOR: FERNANDA BORTOLUZZI LUCION

ADVISOR: NEIDI GARCIA PENNA

CO-ADVISOR: GILDO ALMEIDA DA SILVA

Date and Place of Defense: Santa Maria, March 13th 2015

The chemical profile of a fermented product depends upon the raw basic material and the fermentative microbiota. The yeast microbiota is responsible for fermentation and contributes to fermented product aroma by several mechanisms. The study of this microbiota is relevant because the microorganisms utilize the constituents of the raw basic material and transform them into aroma or flavour impacting components. Autochthonous yeasts belonging to the blueberry microbiota of two different cultivars, Florida M and Climax, were investigated by analyzing the fermentative capacity, the hydrogen sulfide (H₂S) production, the film-forming ability, killer feature, sensitivity and neutrality to killer factor. Three methods employed to distinguish autochthonous yeast species were used: MALDI-TOF MS, PCR and PCR-RFLP of ITS region of rRNA gene and, if necessary, genetic sequencing of the D1/D2 26S rRNA region. The species *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida sorboxylosa*, *Metschnikovia kunwiensis*, *Candida bentonensis*, *Candida oleophila/Candida railenensis* and *Candida quercitrusa* were found on the surface of Florida M. *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola*, *Candida sorboxylosa*, *Candida asiatica*, *Candida oleophila/railenensis*, *Issatchenkia hanoiensis* and *Kazachstania intestinalis* were of berries of Climax variety. Only three species were found in both varieties: *H. uvarum*, *C. sorboxylosa* and *C. oleophila/railenensis*. The species *H. uvarum* was the predominant in both cultivars, representing 70.4% and 78% of yeasts isolated from the surface of the Florida M and Climax, respectively. The killer feature was not detected in any strain isolated from Florida M. From strains isolated from Climax, only one strain *C. asiatica* 133 MCMCF/14 was killer against the 26B. Moreover, the *K. intestinalis* 91 MCMCF/14 was the only sensitive when tested against both the patterns killer *S. cerevisiae* K1 (Lallemand), EMBRAPA 1B, EMBRAPA 91B and the killer yeast *C. asiatica* 133 MCMCF/14. All strains showed low fermentative capacity and all of them were non-*Saccharomyces* yeasts. All yeasts isolated from Florida M produced H₂S. Only four strains from Climax did not produce H₂S. The highest evolution of H₂S was observed with the genus *Issatchenkia* and with the majority strains of *C. sorboxylosa*. The species *C. oleophila/C. railenensis* showed low production of this parameter. The fermentation process of fermented products from blueberries of both Florida and Climax can be severely affected by this kind of autochthonous yeasts.

Keywords: *Vaccinium mytillus*; Non-*Saccharomyces* yeasts; Blueberry microbiota; ITS region; Yeast identification.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Demonstração da via de redução do sulfato em *Saccharomyces cerevisiae*.....24

Figura 2 - Resultado positivo para sensibilidade à toxina killer. A levedura testada sofreu inibição e morte, devido à presença da levedura killer ao centro.....27

Figura 3 - Representação esquemática da unidade de repetição do rDNA, onde se encontram as regiões ITS (espaçador transcrito interno) e 26S do rDNA de leveduras.....31

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 - Number of strains and its H₂S production and film-forming intensity from Florida M (A) and Climax blueberry variety (B).....61

Figure 2 - Yeast species diversity isolated from Florida M (A) and Climax (B) varieties from blueberry.....62

Figure 3 - Representative mass spectra (A) and representation in form of gel separation (B) of the comparison profile between *Issatchenkia terricola*, *Issatchenkia hanoiensis* and *Hanseniaspora uvarum* and *C. asiatica* yeast species.....63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 – Number of strains identified by mass spectrometry MALDI-TOF from yeast strains from Florida M and Climax varieties.....58

Table 2 – Sizes in bp of the PCR amplified products of the ITS region and restriction fragments (bp) from the yeasts not identified by MALDI-TOF MS with endonucleases *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MbolI* and *DdeI*.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: Microlitro

ATP: Adenosina trifosfato

ADS: 5-adenilil-sulfato

bp: Pares de bases, (do inglês, *pairs base*)

CO₂: Dióxido de carbono

cv: Cultivar

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dsRNA: Dupla fita de RNA (do inglês, *double strand of RNA*)

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

H₂S: Sulfeto de hidrogênio

ITS: Espaçador interno transcrito (do inglês, *internal transcribed spacer*)

MALDI-TOF MS: Espectrometria de massa com analisador de tempo de voo e ionização/dessorção a laser assistida por matriz (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*)

mL: Mililitro

PCR: Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)

pH: Potencial hidrogeniônico

RFLP: Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*)

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA gene (S): DNA ribossomal

SRS: Sequência de redução do sulfato

TBE: Solução tamponante Tris-borato-EDTA

TPP: Tiamina pirofosfato

VLPs: Partículas semelhantes a vírus (do inglês, *Virus like-particles*)

YEPD: do inglês: *Yeast Extract Peptone Dextrose*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 A IMPORTÂNCIA DAS LEVEDURAS COMO AGENTES DE TRANSFORMAÇÃO.....	16
3.2 FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA	19
3.3 A UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS SELECIONADAS	21
3.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	23
3.5 FORMAÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO (H ₂ S).....	24
3.6 CARACTERÍSTICA KILLER	26
3.7 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS	30
3.8 BEBIDA FERMENTADA DE MIRTILO	32
4 ARTIGO CIENTÍFICO	34
1 INTRODUCTION	36
2 MATERIAL AND METHODS.....	38
3 RESULTS.....	41
4 DISCUSSION	45
5 CONCLUSIONS	51
6 REFERENCES	51
5 DISCUSSÃO GERAL	64
6 CONCLUSÕES	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

Muitos estudos foram realizados sobre as leveduras desde que Pasteur, em 1866, demonstrou que elas eram responsáveis pela transformação dos açúcares em etanol. A partir de então, ficou claro que as fermentações alcoólicas realizadas espontaneamente não eram devidas à ação de uma única levedura, mas da ação combinada de diversas espécies de leveduras que agem ao longo de um processo fermentativo (BARATA et al., 2012). Pasteur, à luz do conhecimento da época, desconhecia a proveniência desses micro-organismos. Posteriormente, descobriu-se que flores e frutos eram importantes *habitats* para o seu desenvolvimento, pois são fontes complexas de alimento como açúcares, vitaminas, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, além de apresentarem baixo pH (STRINGINI et al., 2008).

Uma prática que cada dia ganha mais destaque está relacionada com o emprego de linhagens presentes no próprio fruto a ser fermentado (SCACCO et al., 2012). Isto confere à bebida sabor singular, características peculiares e regionais. A presença de diferentes leveduras no mosto depende de vários fatores, como a cultivar e maturidade do fruto, tratamentos fitossanitários, desbalanceamento microbiológico e condições climáticas (BARATA et al., 2012; CHAVAN et al., 2009). A ideia de utilizar frutos como matéria prima para a elaboração de produtos fermentados não é nova, pois, entre os alimentos, os frutos são as *commodities* mais facilmente perecíveis devido à elevada atividade de água e ao próprio valor nutritivo que estes alimentos possuem. Este conjunto de fatores favorece a proliferação de micro-organismos deterioradores especialmente em países tropicais e subtropicais (SWAIN et al., 2014).

O mirtilo, pequeno fruto rico em antioxidantes (YOU et al., 2011), é um substrato promissor para elaboração de bebida fermentada, pois possui um teor considerável de açúcares, antocianinas e ácidos, bem como apresenta sabor agradável. Como a matéria prima para a fermentação desse tipo de produto agrícola, a exemplo do mosto de uva, não pode ser esterilizada, a influência de micro-organismos autóctones presentes nas bagas deve fazer a diferença entre um produto de alta e de baixa qualidade. Estes micro-organismos vão participar, em

algum momento, do processo fermentativo e conferir suas características específicas no produto final. Assim se explica o poder desses agentes autóctones, presentes no fruto durante o esmagamento, no processo fermentativo. Sabe-se que leveduras selecionadas a partir da microbiota do local onde vão ser utilizadas têm maior probabilidade de conferir características sensoriais positivas e produzir uma bebida de qualidade, por estarem adaptadas às condições climáticas, específicas da região.

Convém salientar que, numa determinada safra, nem sempre é possível obter linhagens autóctones aptas a elaborar um fermentado de qualidade. Assim, o isolamento, caracterização, identificação e seleção de leveduras autóctones do mirtilo de uma região específica é um fator determinante para a obtenção de um produto fermentado com características peculiares. Por outro lado, conhecer as características fisiológicas das linhagens autóctones mesmo sem aptidão fermentativa presentes na superfície do mirtilo se faz necessário para prevenir a obtenção de produto fermentado de baixa qualidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e identificar taxonomicamente leveduras autóctones presentes no mirtilo com ou sem aptidão fermentativa adequada

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar, identificar e caracterizar a diversidade de leveduras presentes na superfície do mirtilo.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar leveduras autóctones da superfície do mirtilo;
- Caracterizar as leveduras quanto à capacidade fermentativa, produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) e formação de filme;
- Avaliar a produção de fator killer por linhagens autóctones;
- Determinar a sensibilidade e a neutralidade ao fator killer produzido por linhagens padrão;

- Investigar a sensibilidade e a neutralidade ao fator killer produzido por linhagens isoladas do mirtilo;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A importância das leveduras como agentes de transformação

As leveduras são micro-organismos unicelulares e pertencem ao reino Fungi, apresentando parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear, nutrição heterotrófica e ausência de motilidade. São capazes de fermentar ou assimilar, dependendo do gênero e da espécie, diferentes fontes de carbono e de energia, como glicose, galactose, xilose, glicerol, entre outros. A seleção por determinado nutriente poderá determinar a diversidade de espécies em diferentes ambientes, pois esses micro-organismos podem ser altamente especializados de acordo com o *habitat* (PHAFF, 1978).

A superfície de flores e frutos são as fontes primárias desses micro-organismos, pois as populações mais densas de leveduras em ambientes naturais estão normalmente associadas a substratos que contêm açúcares e outras fontes de carbono prontamente assimiláveis. As espécies *Hanseniaspora uvarum*, tendo como seu estado anamórfico *Kloeckera apiculata* e *Metshnikowia spp.*, entre outras, são frequentemente isoladas a partir desses substratos. Conhecer sobre a comunidade de leveduras presentes num determinado ambiente é importante para que seja obtida uma bebida fermentada de qualidade e para que se tenham atributos regionais e representativos (COMBINA et al., 2005; GONZALEZ et al., 2007; SABATE et al., 2002; TRISTEZZA et al., 2013)

A densidade populacional e diversidade de leveduras selvagens na superfície de frutos estão intrinsecamente relacionadas a inúmeros fatores, como maturidade, variedade do fruto, localização geográfica, condições climáticas, aplicação de fungicidas, idade e técnica de manejo (CHAVAN et al., 2009; COMBINA et al., 2005; GONZALEZ et al., 2007). O tipo de substrato utilizado pelas leveduras reflete as exigências que permitem o seu crescimento, sobrevivência, a

síntese de substâncias importantes e outras condições ambientais, como o pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio e atividade de água (FERNANDES, 2008).

No mundo inteiro, bebidas e alimentos fermentados possuem grande importância econômica e cultural. Arqueólogos descobriram evidências na produção de bebidas fermentadas na China em 7000 DC (MCGOVERN et al., 2004), e de vinho no Irã e no Egito, em 6000 AC e 3000 AC, respectivamente (CAVALIERI et al., 2003). Para a utilização de leveduras em processos fermentativos, é necessário determinar seu desempenho e selecionar uma linhagem que possua alguns atributos importantes, como capacidade efetiva de fermentação, baixa ou ausência de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), ausência de formação de toxina killer, resistência ao fator killer, entre outros. A necessidade de determinação desse desempenho se justifica pela ocorrência de linhagens que apresentam diferenças significativas de processo fermentativo, mesmo pertencendo à mesma espécie (STROPPA, 2003). Pode-se afirmar que diferenças entre vinhos obtidos a partir de um mesmo mosto fermentado por distintas leveduras, em condições idênticas, devem ser atribuídas aos produtos secundários formados durante a fermentação (SILVA & SILVA, 1987).

Leveduras desempenham um papel fundamental no processo de deterioração de produtos fermentados e em fermentação. Estes micro-organismos suportam condições de estresse onde outros não conseguem sobreviver. Leveduras oxidativas, são consideradas sem interesse enológico, como os gêneros *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Filobasidium* e *Aureobasidium pullulans*. Estes micro-organismos são, na sua maioria, predominantes nos vinhedos tanto no solo, como nas folhas e nas uvas (RENOUF et al., 2005; SABATE et al., 2002). Entre os ascomicetos, as leveduras apiculadas fracamente fermentativas, como *Hanseniaspora* e *Kloeckera* e as oxidativas, como os gêneros *Candida*, *Pichia*, e *Metschnikowia*, são predominantes em uvas maduras (RENOUF et al., 2005; SABATE et al., 2002). O último grupo inclui espécies fermentativas, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspota* (ARROYO-LOPEZ et al., 2010).

A investigação da presença de leveduras no fruto a ser fermentado é muito importante, uma vez que os micro-organismos podem trazer tanto benefícios quanto acarretar problemas durante a fermentação. Tomando como exemplo a elaboração de vinhos, na maioria dos países a microbiota é ignorada, sendo a produção toda baseada em linhagens comerciais, com consequente redução da biodiversidade

autóctone. Isso leva a uma uniformização por não considerar a importante fonte de linhagens nativas de interesse enológico que o vinhedo pode oferecer (CORDERO-BUESO et al., 2011). Como efeitos prejudiciais, podemos citar a atuação de leveduras que podem ser responsáveis por uma série de problemas durante o processo fermentativo. Cabrini & Gallo (1999) considerem que uma levedura contaminante pode ser descrita como qualquer levedura presente no processo fermentativo que não seja a levedura selecionada para a condução da produção de álcool. Diversos tipos de deterioração podem ser causados por leveduras quando estas possuem este potencial. Na fermentação da cerveja, por exemplo, podem produzir um composto conhecido como diacetil que, quando formado em excesso, confere à bebida um sabor desagradável à manteiga rançosa (YADAV & GUPTA, 1975). O diacetil também é formado no vinho por ação de bactérias lácticas, especialmente *Oenococcus oeni*, não sendo, dependendo do estilo do vinho e da concentração, um problema a ser considerado (BARTOWSKY & HENSCHKE, 2004). O diacetil poderá ser metabolizado a 2,3 butanodiol (MALHERBE, 2011).

As leveduras dos gêneros *Debaryomyces* e *Pichia* e algumas espécies de *Candida*, por exemplo, são responsáveis pelo aumento da turbidez, produção de odores estranhos descritos como ésteres e formação de uma película na superfície do vinho, denominado véu. Essas leveduras, chamadas de leveduras formadoras de flor, “film-forming strains” ou “yeast-flor”, produzem alterações indesejáveis, devido ao seu metabolismo oxidativo. A atuação dessas linhagens resulta em produtos de qualidade inferior e pode causar perdas durante o armazenamento (BARATA et al., 2012). Por outro lado, *S. cerevisiae* pode formar filmes desejáveis sobre a superfície do vinho, pois ela é responsável pela produção de vinhos do tipo Xerez, vinhos tradicionalmente elaborados na região sul da Espanha, o qual possui características sensoriais peculiares. Após a fermentação alcoólica, essas leveduras ocupam a parte superior do barril, onde formam uma película protetora. Visto que após a fermentação os níveis de açúcar são baixos e o de etanol elevados, essas leveduras produzem quantidades consideráveis de acetaldeído, como resultado da oxidação do etanol por meio da álcool desidrogenase (GUIJO et al., 1997). Em geral, o processo de formação de flor pode ser entendido como um mecanismo de adaptação que mantém o acesso desses micro-organismos ao oxigênio e, assim, permite o crescimento da levedura por meio de uma fonte não fermentescível de carbono em um ambiente aeróbico (NAKAGAWA et al., 2011).

No início do processo de envelhecimento, as células de leveduras em suspensão no vinho aumentam a hidrofobicidade das suas membranas celulares, devido à síntese de proteínas da parede celular. Este aumento favorece a formação de agregados de células, que retêm as bolhas de CO₂ formadas pelo metabolismo microbiano. Os agregados têm uma densidade relativa menor do que o vinho, e assim eles se deslocam para a superfície. Finalmente, a superfície do vinho é colonizada pela levedura "flor", que forma uma extensa camada de filme na superfície (GUTIERREZ et al., 2010). Estudos apontam que essa formação ocorre devido à presença do gene FLO11 (ISHIGAMI et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2011). Outros genes também estão envolvidos na formação do véu, como o HSP12, o qual codifica a proteína "heat-shock", conhecida por ser essencial na formação de película (ZARA et al., 2002).

As leveduras selvagens dos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces*, encontradas na elaboração de cervejas especiais (HAYASHI et al., 2007) e de vinhos (DA SILVA et al., 2011) também são considerados micro-organismos deteriorantes. Essas leveduras não competem com a levedura selecionada durante a fermentação, mas conseguem crescer e sobreviver em níveis elevados de etanol e baixa oferta de açúcar, causando diminuição na qualidade da bebida devido à produção de *off-flavours* característicos de espécies desse gênero (SILVA et al., 2011).

3.2 Fermentação espontânea

As fermentações espontâneas são aquelas efetuadas por leveduras provenientes do ambiente, sem nenhum tipo de inoculação. Isto faz com que as fermentações espontâneas resultem em produtos elaborados não por ação de uma única espécie de levedura, e sim uma interação entre espécies de leveduras diferentes (TORIJA, 2002), assim como de outros micro-organismos. Embora muitos gêneros e espécies de leveduras estejam presentes no mosto, a espécie *S. cerevisiae* é a principal responsável pela fermentação alcoólica (CADIÈRE et al., 2012; QUEROL et al., 2003).

Em relatos fornecidos por Tristezza et al. (2013), tem-se a informação de que nos estádios iniciais da fermentação do mosto de uva, as espécies predominantes são *H. uvarum* e *Metschnikowia pulcherrima*, embora tenham sido encontradas

outros micro-organismos como *Aureobasidium pullulans*, *Candida stellata*, *Starmerella bacilaris* (*Candida zemplinina*), *Issatchenkia terricola*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Cryptococcus*, *Z. hellenicus* e *Kluyveromyces thermotolerans*. O declínio progressivo da população de linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* é observado à medida que avança o processo fermentativo. Este fenômeno é atribuído à baixa capacidade adaptativa do metabolismo dessas leveduras devido ao aumento gradual da concentração de álcool, uma vez que estas linhagens toleram concentrações de até 3-5% de etanol. O aumento da concentração de álcool favorece o crescimento de linhagens de *S. cerevisiae*, pois são álcool-tolerantes, osmotolerantes e resistem à baixa disponibilidade de oxigênio, conseqüentemente mantêm sua atividade metabólica até o estágio final da fermentação (RENOUF et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2010).

Jolly (2003), em experimentos realizados utilizando a inoculação de leveduras, afirmam que a utilização de linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* autóctones e de *Saccharomyces* (linhagem industrial) assegura a qualidade do vinho elaborado. Cappello et al. (2004) consideram que a qualidade do vinho está relacionada com a microbiota natural presente nas uvas, o que confere ao vinho características típicas e representativas de cada região vinífera e, portanto, adaptadas ao seu *habitat*. Leveduras selecionadas de uma área vitícola determinada demonstraram ser mais adaptadas às condições ambientais e substratos específicos (ESTEVE-ZARZOSO et al., 2000).

Vian (2011) elaborou bebida fermentada de mirtilo e relatou que a velocidade do processo fermentativo encontrou-se, desde o início, muito lenta. Apesar de uma nova adição de levedura ao fermentado, visando à refermentação, essa medida não se mostrou eficaz e a autora pressupôs que a dificuldade de fermentação deveu-se, possivelmente, ao fato de que a levedura utilizada não era específica para o mirtilo, e sim para uva. Deve haver outras razões mais relevantes para o insucesso do processo fermentativo do mirtilo, além daquelas apresentadas pela referida autora.

Estudos demonstram que diferentes linhagens de *S. cerevisiae* estão envolvidas simultânea ou sucessivamente na fermentação do vinho, e ainda, que as linhagens variam com a região geográfica, condições climáticas, época do ano e substratos. A ampla distribuição de algumas linhagens em determinadas regiões vinícolas e a permanência destas ao longo de dois anos, sugere a ocorrência de linhagens autóctones específicas, representantes de uma região, e que há relação

entre origem geográfica e linhagens (ESTEVE-ZARZOSO et al., 2000; SABATE et al., 1998; VEZINHET et al., 1992). A existência de linhagens específicas de *S. cerevisiae* em diferentes regiões vinícolas representa uma adaptação das mesmas a microambientes específicos. Alguns enólogos admitem que bons resultados possam ser obtidos usando linhagens originadas destes microambientes como iniciadoras em processos fermentativos (COMBINA et al., 2005; ESTEVE-ZARZOSO et al., 2000). Porém, nas fermentações espontâneas, o crescimento populacional não é estável (DUARTE et al., 2009). A instabilidade não diz respeito apenas ao crescimento mas também a outros fatores de origem metabólica, como produção de H₂S.

3.3 A utilização de leveduras selecionadas

Pode-se definir como “levedura selecionada”, aquela levedura autóctone que passou por um processo de seleção na busca por aptidão fermentativa desejável. Mediante o emprego de leveduras selecionadas, é possível evitar alguns transtornos como fermentação lenta, escassa presença de leveduras na fermentação, formação excessiva de ácidos voláteis e desenvolvimento de micro-organismos não desejáveis, que influenciam diretamente na qualidade do vinho (ZAMBONELLI, 2003).

A melhoria da qualidade de bebidas e o aumento na eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas ao processo. A qualidade da bebida está fortemente relacionada com os tipos de micro-organismos presentes e suas populações durante os processos de fermentação e maturação do produto final, sendo determinantes tanto com relação ao fator de conversão de etanol, como na formação de compostos secundários (RAMOS, 2009).

Como anteriormente definido, a levedura selecionada é obtida de leveduras autóctones que foram isoladas e selecionadas por suas aptidões fermentativas, entre as quais estão a tolerância à elevada concentração inicial de açúcares, ao elevado teor final de etanol, a não formação de produtos indesejáveis do metabolismo, ao elevado fator de conversão, à eficiência fermentativa, estabilidade genética e poder de adaptação a novas condições ambientais. Essas características conduzem fermentações uniformes, rápidas, de maior fator de conversão, com

produto final de maior qualidade e baixos teores de açúcares residuais (MILLAN et al., 1991; SANNI & LONNER, 1993). As culturas iniciadoras conseguem dominar o processo, pois são adicionadas em altas concentrações, prevalecendo sobre a microbiota autóctone, mas isto não diminui significativamente a ação de leveduras naturais durante os primeiros estádios da fermentação, as quais têm um importante efeito no aroma do vinho (PEREZGONZALEZ et al., 1993).

Durante a fermentação alcoólica as células de leveduras são submetidas a diversas condições de estresse e, desta maneira, têm que desenvolver mecanismos moleculares para que resistam a estas situações adversas. Qualquer fator do meio que possa vir a produzir um efeito adverso sobre o crescimento celular é considerado uma condição de estresse e a sobrevivência celular depende da sua habilidade em se adaptar rapidamente essas alterações ambientais (IVORRA et al., 1999).

As leveduras possuem sistemas para responder às condições de estresse. O dano provocado pelo estresse e a resposta da levedura ao mesmo, dependem do tipo e grau do estresse e do estado de desenvolvimento em que se encontra a levedura no momento do estímulo. Em geral, as condições adversas que as leveduras enfrentam afetam principalmente as estruturas celulares, como as membranas e as diferentes macromoléculas, especialmente os lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, os quais sofrem modificações estruturais que afetam seu funcionamento (FOLCH-MALLOL, 2004).

Estes sistemas de resposta envolvem a rápida síntese de moléculas de proteção e a ativação de sinais que induzem eventos secundários como a ativação de atividades enzimáticas pré-existentes e a transcrição de genes que codificam fatores de proteção. O diferente comportamento frente às condições de estresse apresentados pelas leveduras podem determinar suas propriedades fermentativas e assim estabelecer critérios importantes para a utilização daquela levedura em vinhos e em outras bebidas fermentadas (CARRASCO, 2001).

É prática comum a fermentação utilizando leveduras autóctones sem seleção prévia, entretanto, descobriu-se que o estudo, seleção e utilização de leveduras isoladas da microbiota natural das próprias regiões viníferas asseguraria a tipicidade e a regionalidade do vinho produzido. Muitos estudos vêm produzindo evidências que estimulam o emprego desta prática enológica para produzir vinhos com

propriedades sensoriais típicas da região (SATORA & TUSZYNSKI, 2010; SCACCO et al., 2012).

3.4 Fermentação Alcoólica

O processo de fermentação é tradicionalmente utilizado pela população humana para estender a vida de prateleira de produtos agrícolas perecíveis (HUGENHOLTZ, 2013). As leveduras são os micro-organismos mais importantes na produção de vinho e outras bebidas fermentadas, pois influenciam na velocidade de fermentação, sabor e outras qualidades (FLEET, 2003; LOUREIRO & MALFEITO-FERREIRA, 2003)

A levedura possui duas formas de obtenção de energia: uma pela rota respiratória outra pela rota fermentativa. A rota respiratória acontece quando em presença de oxigênio no meio. Esta rota é predominante em relação à rota fermentativa. O processo de obtenção de energia pela respiração celular é a via preferencial pois a quantidade de energia metabólica acumulada em forma de ATP por molécula de glicose consumida é maior. A fase respiratória ocorre nas primeiras horas de fermentação, sendo caracterizada pela intensa multiplicação celular, formação de membrana, pouca formação de espuma e reduzida queda de substrato. A rota fermentativa inicia-se à medida que o oxigênio é consumido na respiração. A levedura busca uma rota alternativa para obter energia e a rota fermentativa ou fase anaeróbia de fermentação é caracterizada pela intensa queda de substrato, liberação de calor e formação de etanol (NELSON, 2011).

A formação de espuma está relacionada com a composição química do mosto e com determinadas proteínas liberadas pelas leveduras (BLASCO, VINAS, et al., 2011). Quanto mais aminoácidos hidrofóbicos o mosto possuir, maior será a possibilidade de haver grandes formações de espuma. As manoproteínas liberadas pelas leveduras exercem importante papel na estabilidade das bolhas em espumantes (BLASCO, VEIGA-CRESPO, et al., 2011; BLASCO, VINAS, et al., 2011)

A transformação dos açúcares gera produtos majoritários, como etanol e o dióxido de carbono, porém esses compostos não são os únicos formados. Durante a fermentação, o açúcar é degradado a álcool e dióxido de carbono e transformado em uma ampla variedade de produtos secundários, também utilizados pela levedura

para o seu crescimento. A glicose é convertida em piruvato pela glicólise, e o piruvato é convertido em etanol e CO_2 por um processo de dois passos. No primeiro passo, o piruvato sofre descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela piruvato descarboxilase, formando o acetaldeído. Essa reação é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A piruvato descarboxilase requer Mg_2^+ e tem uma coenzima firmemente ligada, a tiamina pirofosfato (TPP). No segundo passo, por ação da álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, com o NADH derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fornecendo esse agente redutor (NELSON, 2011).

Atualmente, tem-se utilizado culturas mistas (também chamadas de cruzadas) em fermentações, onde atuam mais de uma espécie de microrganismo, com o intuito de se obter um produto complexo e diferenciado. Isso vem ocorrendo em diversos substratos, como mostos botritizados (BELY et al., 2008), cacau (CRAFACK et al., 2013) e mosto num processo sequencial (LOIRA et al., 2014).

3.5 Formação de sulfeto de hidrogênio (H_2S)

A formação de *off-flavours* durante processo fermentativo reduz a qualidade do produto final e é, portanto, uma preocupação que deve ser levada em conta no sistema de seleção de micro-organismos. O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é um produto formado por micro-organismos que confere aromas indesejáveis ao vinho. Devido a seu baixo limiar de percepção, esse composto exerce uma forte influência no aroma do vinho (WINTER et al., 2011) e possui odor semelhante a ovos podres (PARK, 2008). Numerosos fatores podem ser responsáveis pela produção de H_2S durante o processo fermentativo, como a concentração de compostos nitrogenados, o teor de compostos sulfurados, o estado de maturação da uva, as práticas enológicas, a atividade da enzima sulfito redutase, a taxa e a temperatura de fermentação e, especialmente, a linhagem de levedura utilizada (NOWAK et al., 2004). Sem dúvida, um dos fatores que se destaca pela sua importância, é a capacidade intrínseca da levedura para produzir H_2S .

Spiropoulos et al (2000) demonstraram a via enzimática de produção de H_2S , através da redução do sulfato pela enzima sulfito redutase (Figura 1). Além disso, mostraram os genes envolvidos na síntese desse gás em leveduras. A

produção do H_2S ocorre por via enzimática e está relacionada com a redução de sulfato exógeno durante a biossíntese de aminoácidos contendo enxofre, como cisteína e metionina (JIRANEK et al., 1995). Isso ocorre durante a sequência de redução do sulfato (SRS). Estes aminoácidos são essenciais para o crescimento de leveduras e se estiverem esgotados, ocorrerá a assimilação de outros compostos de enxofre. A fonte mais comum é o enxofre extracelular. No mosto, este composto está presente em grande quantidade na forma de sulfato. Na primeira fase da SRS, o sulfato (SO_4^{2-}) é transportado para dentro da célula por duas permeases específicas (sulfatopermease I e sulfatopermease II). A enzima ATP sulfúrilase catalisa a transferência de uma unidade adenosil-fosforil do ATP para o sulfato, formando 5-adenilil-sulfato (APS). Este é fosforilado pela enzima APS quinase, resultando em 3-fosfo-5-adenilil-sulfato (PAPS). Este é reduzido a SO_3^{2-} que pode ser convertido a SO_2 ou ser novamente reduzido a S^{2-} . Neste ponto, poderá haver formação de H_2S ou reagir com um precursor nitrogenado, como O-acetilserina ou O-acetil homoserina, podendo originar cisteína ou metionina (CORDENTE et al., 2009).

A remoção do H_2S do vinho é complexa e problemática, por isso, é fundamental que, durante sua elaboração sejam empregadas linhagens que apresentem deficiência ou baixa atividade da enzima sulfito redutase. O uso de tais leveduras, apresentando elevada capacidade fermentativa, tem se mostrado uma solução eficaz (SILVA & SILVA, 1987).

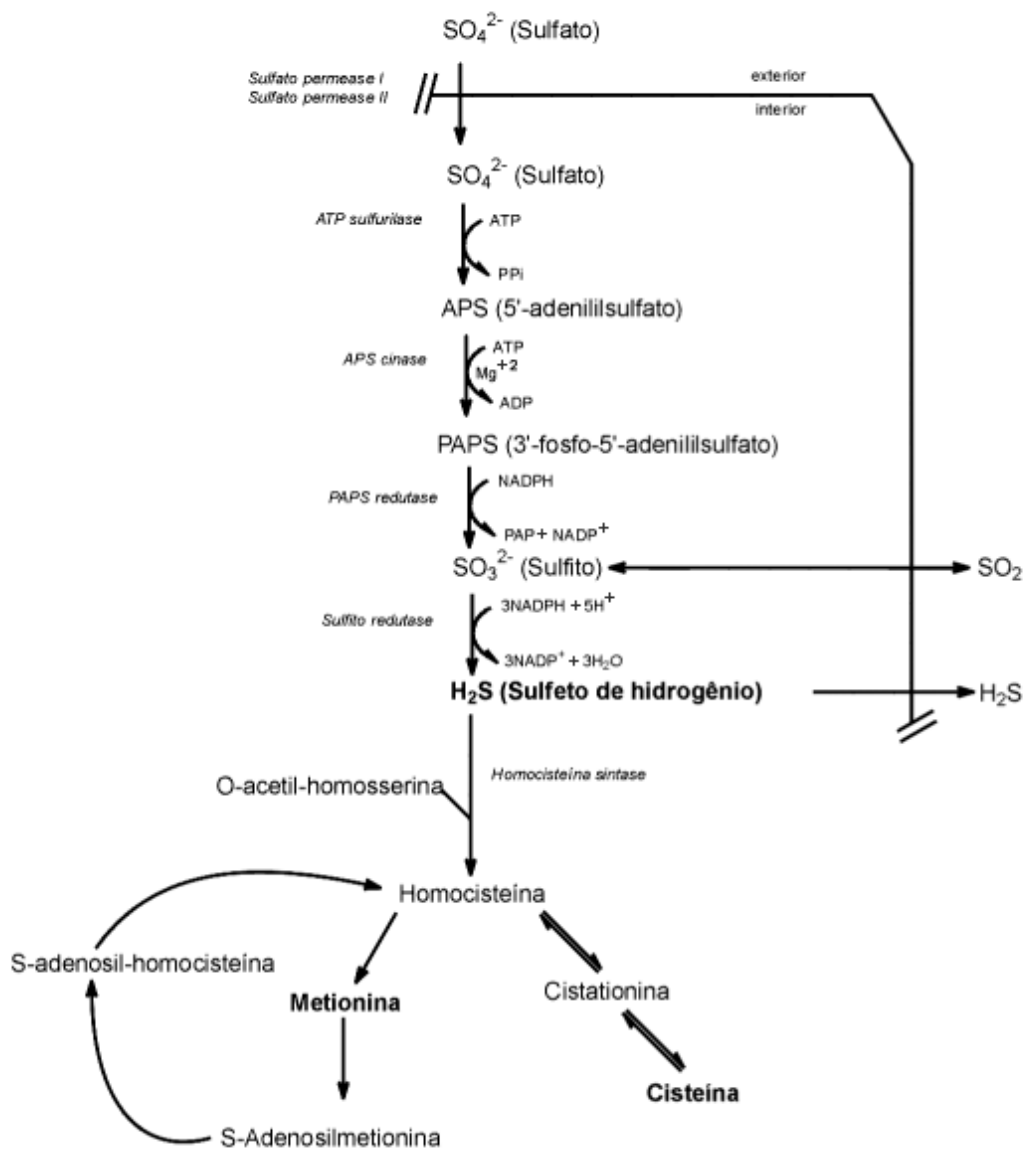


Figura 1. Demonstração da via de redução do sulfato em *Saccharomyces cerevisiae*.
Fonte: Neto & Mendes-Ferreira (2005).

3.6 Característica Killer

Leveduras killer produzem toxinas extracelulares com atividade antifúngica, de natureza proteica, que inibem linhagens sensíveis de leveduras da mesma espécie e gênero e de outros gêneros (CECCATO-ANTONINI et al., 1999). Esta substância é comumente denominada como fator killer, toxina killer ou proteína killer (Figura 2). Esta característica foi descrita pela primeira vez por Bevan & Makover (1963) em linhagens de *S. cerevisiae*. Esses pesquisadores propuseram que certas

linhagens de *S. cerevisiae* podiam ser classificadas em três fenótipos: killer, sensível e neutra. As leveduras killer são imunes às suas próprias toxinas e matam leveduras sensíveis presentes no meio. As neutras não matam e nem são mortas pelas leveduras killer (SILVA, 2011). Após a descoberta do fenômeno killer em *S. cerevisiae*, logo ficou evidente que linhagens que produzem esta toxina não estão restritas somente a este gênero, mas também pode estar presente em muitos outros gêneros, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis* e *Zygosaccharomyces*, evidenciando que este fenômeno é ocorrência comum entre diferentes gêneros de leveduras (EL-BANNA, 2011).

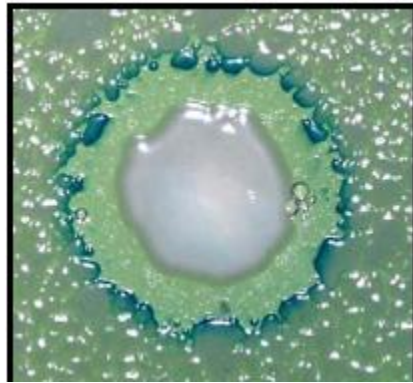


Figura 2. Resultado positivo para sensibilidade à toxina killer. A levedura testada sofreu inibição (presença de halo) e morte (círculo azul), devido à presença da levedura killer ao centro.

Fonte: Tosta (2004).

A expressão da atividade killer pode ocorrer por meio de duas possibilidades: uma delas está relacionada exclusivamente a genes cromossomais e a outra, mais frequente, envolve tanto a combinação de genes cromossomais como a de plasmídeos citoplasmáticos, formados por fitas duplas de RNA ou dsRNA (*double strand* RNA), também denominados VLPs (*Virus like-particles* – VLPs - que são partículas citoplasmáticas semelhantes a vírus). As linhagens killer de *S. cerevisiae* possuem dois tipos de VLPs, ou seja, L-dsRNA (*larger* - grande) e M-dsRNA (*Medium*), assim denominados devido à diferença entre seus tamanhos. Segundo Bostian et al (1980) , para que uma linhagem de *S. cerevisiae* se comporte como killer é necessário que esta possua o plasmídeo M-dsRNA. Este plasmídeo é responsável pela formação da proteína killer e pela resistência da levedura ao fator killer do mesmo tipo. Há diferentes M-dsRNA (M1, M2, M3, M28), cada um

codificando uma proteína distinta e conferindo uma imunidade específica à toxina killer (WICKNER, 1979) K1, K2, K3 e K28, respectivamente. Logo, para que a levedura seja portadora da característica killer, deve conter tanto o plasmídeo M-dsRNA quanto o L-dsRNA. Linhagens sensíveis não possuem M-dsRNA, mas podem conter a forma L-dsRNA (SILVA, 2003). O L-dsRNA possui dois quadros abertos de leitura (ORF). O ORF 1 codifica a proteína da capa viral "gag" e o ORF2 codifica uma RNA polimerase RNA-dependente "Pol". A fusão dos dois ORFs forma a proteína de fusão gag-pol (DINMAN et al., 1991; ICHO & WICKNER, 1989; SCHMITT & BREINIG, 2006; TERCERO et al., 1992; WICKNER et al., 1991)

O gênero *S. cerevisiae* produz quatro tipos de toxinas: K1, K2, K3 e K28 (YOUNG & YAGIU, 1978). Os tipos K1, K2 e K3 são específicos do gênero *Saccharomyces* enquanto a K28 é encontrada em outros gêneros, segundo Young (1987). Há trabalhos que agrupam as toxinas killer de *Saccharomyces cerevisiae* em K1, K2 e K28 (RODRIGUEZ-COUSINO et al., 2011; SCHMITT & BREINIG, 2006; SCHMITT & TIPPER, 1990). A toxina K1 atua em uma estreita faixa de pH, 4,6-4,8, e pode ser inativada por agitação. A faixa de pH ótimo para a toxina K2 varia de 2,9 a 4,9 (MARQUINA et al., 2002). Embora já tenham sido isoladas várias toxinas killer, a estrutura e função de apenas poucas delas foram estudadas a nível molecular, sendo a toxina K1 de *S. cerevisiae* a melhor caracterizada. A sequência do K2 de *S. cerevisiae* foi estudada por Tommasino et al (1988) e Dignard et al (1991), do K28 por Schmitt & Tipper (1995) e do M1-dsRNA por Bostian et al (1984). Em relação à toxina K3, nada se sabe sobre o mecanismo de ação da mesma (NOVOTNÁ et al., 2004).

Apesar das toxinas killer possuírem modos diferentes de ação, elas possuem algo em comum: todas matam uma célula de levedura sensível em um receptor mediado por duas fases: o primeiro passo envolve uma ligação rápida e independente de energia a um receptor de toxina dentro da parede celular de uma célula alvo sensível. No caso das toxinas K1 e K2, este receptor principal tem sido identificado como β -1,6-D-glucano, enquanto que o receptor de parede celular para a toxina K28 é conhecido como α -1,3-manoproteína (KAPSOPOULOU et al., 2008).

A toxina K1 secretada é composta de duas subunidades distintas α e β , ligadas por pontes de enxofre. Ambas as subunidades participam da ligação do receptor da parede celular. A subunidade β da toxina é necessária para a ligação do receptor glicano da parede celular, enquanto a subunidade α , também envolvida na

ligação da glicana, penetra nos sítios da membrana plasmática onde o efeito tóxico é manifestado pela liberação de íons K^+ , ocasionando morte celular (BUSSEY & SHERMAN, 1973; DELAPENA et al., 1980). A toxina K2 tem sido caracterizada de forma menos expressiva que K1, mas sabe-se que o mecanismo da sua ação é similar (MAGLIANI et al., 1997). A toxina K28 inibe tanto a síntese do DNA nuclear quanto o ciclo de reprodução por brotamento, causando a perda da viabilidade celular (SCHMITT et al., 1996).

A capacidade de produção de toxina killer possibilita uma vantagem seletiva entre espécies competidoras em um mesmo *habitat* e a produção dessas proteínas pode exercer uma importante influência na biodiversidade de leveduras, uma vez que a liberação dessa toxina pode causar modificações na composição de espécies do substrato a favor das produtoras e permitindo que elas se estabeleçam com mais sucesso em detrimento das outras leveduras sensíveis (SATO et al., 1993). Alguns autores relatam as vantagens de se utilizar leveduras selecionadas com característica killer durante o processo fermentativo, pois a presença dessas leveduras torna-se importante em fermentações conduzidas por inoculação com cepas selecionadas de *Saccharomyces sp.*, uma vez que podem eliminar cepas sensíveis e até mesmo contaminantes (MAQUEDA et al., 2012; PHILLISKIRK & YOUNG, 1975). Entretanto, apesar disso, leveduras killer também podem eliminar leveduras selvagens sensíveis benéficas ao processo fermentativo, como as leveduras apiculadas, responsáveis pela formação de aromas secundários importantes (FLEET, 2003). Devido a isto, Silva (1996) sugere a utilização de leveduras neutras, uma vez que linhagens com esta característica possibilita a atuação de outras leveduras presentes naturalmente no mosto, as quais contribuem expressivamente em atributos representativos, promovendo, assim, a elaboração de uma bebida fermentada de qualidade superior.

O efeito killer depende, para sua atuação, de uma variedade de fatores ambientais e genéticos, como a proporção inicial de linhagens sensíveis (HEARD & FLEET, 1987), as condições ambientais e a fase de crescimento das células sensíveis (WOODS & BEVAN, 1968), a presença de leveduras neutras de proteção (SILVA, 1996), a composição do meio em que atua (SILVA, 1996), a presença de componentes do meio que servem como proteção (SILVA, 1996), do tamanho do inóculo e da disponibilidade de nitrogênio (MEDINA et al., 1997). Com tantas

interferências e dependências, se torna difícil estabelecer a ocorrência de linhagens killer numa população heterogênea de levedura.

3.7 Identificação de leveduras

Atualmente existe uma ampla gama de métodos que podem ser utilizados para identificação de leveduras. O maior desafio ao se identificar esses micro-organismos recai na necessidade de diferenciar gêneros e espécies que taxonomicamente estão muito próximos, mas que possuem perfis muito diferentes no que se refere às suas características fermentativas e sensoriais. A identificação e a classificação de leveduras ocorrem, principalmente, pelo emprego de métodos fenotípicos convencionais, baseados nas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das células (CHAVAN et al., 2009). A correta identificação é muitas vezes difícil quando baseada exclusivamente em características fisiológicas, podendo ser até mesmo inconclusiva, uma vez que podem ser instáveis, variáveis e subjetivas (LATOUCHE et al., 1997). Chavan et al. (2009) utilizaram o método de identificação convencional e encontraram dificuldades em diferenciar os gêneros *Issatchenkia* e *Hanseniaspora* devido à alta similaridade de suas características bioquímicas.

Essa dificuldade e dispendioso tempo empregado na identificação de leveduras pela utilização de técnicas microbiológicas tradicionais tem induzido o desenvolvimento de um grande número de diferentes métodos para identificação. A biologia molecular tem providenciado técnicas para a determinação taxonômica de leveduras. Estas técnicas incluem análise de restrição do DNA genômico e mitocondrial e a reação em cadeia da Polimerase (PCR), entre outras. A caracterização de gêneros de leveduras a partir de PCR utilizando iniciadores específicos, seguida de análise complementar para identificação de espécies, como o RFLP, são usualmente empregadas (JOSEPA et al., 2000). Embora os procedimentos de identificação que envolvam ferramentas moleculares sejam menos morosos do que os métodos clássicos, todo o processo de análise molecular de genes-alvo ainda permanece, segundo Chalupova et al (2014), dispendioso.

A técnica de PCR-RFLP, amplamente utilizada na biologia molecular para identificação de leveduras, baseia-se na diferenciação entre os micro-organismos pela comparação dos padrões de fragmentação obtidos por digestão com enzimas de restrição de DNA de um produto específico amplificado pela PCR. No caso de fungos, o alvo mais estudado é a região ITS (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999). As regiões ITS estão localizadas entre os genes 18S, 5.8S e 26S do rRNA e podem ser amplificadas por iniciadores específicos, sendo divididas em ITS1, localizada entre os genes 18S e o 5.8S, e ITS2, que separa os genes 5.8S e 26S (Figura 3).

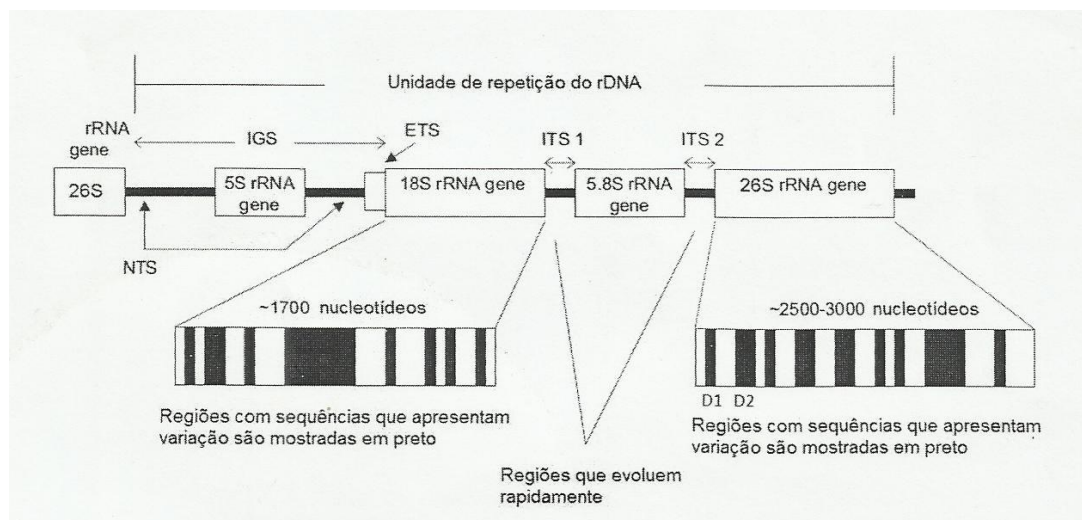


Figura 3 Representação esquemática da unidade de repetição do rDNA, onde se encontram as regiões ITS (espaçador transcrito interno) e 26S do rDNA de leveduras.

Fonte: Agustini (2014)

As sequências de DNA dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro das espécies e as regiões dos espaçadores ITS podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento, sendo frequentemente usadas para taxonomia de espécies e gêneros de fungos. Adicionalmente, a análise das sequências da região D1/D2, localizada no gene 26S, também é efetiva na identificação de leveduras por apresentar baixa variabilidade entre membros da mesma espécie e alta variabilidade entre os indivíduos de espécies diferentes (COUTO et al., 2005).

A partir da década de 80, uma técnica de identificação se consagrou como um método rápido e de alto rendimento para identificação microbiana. A análise por espectrometria de massas MALDI-TOF possui a capacidade de avaliar misturas complexas de proteínas e peptídeos, revelando um padrão de picos característicos

para cada espécie, gerando o que se pode chamar de “fingerprinting” ou “impressão digital” microbiana. Os métodos convencionais resultam em identificações mais incorretas em nível de gênero (1,6%) quando comparados com MALDI-TOF MS (0,1%) (CHALUPOVA et al., 2014). Em 2009, Seng et al (2009) relataram que os resultados de MALDI-TOF MS podiam ser obtidos a partir de um dado isolado dentro de 6 a 8,5 minutos, em comparação com 5 a 48 horas para métodos de identificação tradicionais. Esses fatos demonstram que a utilização de métodos alternativos, como espectrometria de massas MALDI-TOF e PCR-RFLP podem servir como uma metodologia segura, Além disso, podem ser considerados métodos mais precisos e menos dispendiosos quando comparados aos tradicionais.

3.8 Bebida fermentada de Mirtilo

O mirtilo (*Vaccinium* sp.) é uma espécie frutífera pertencente à família *Ericaceae*. É originário de algumas regiões da Europa e América do Norte e sua riqueza em polifenóis, substâncias de alto poder antioxidante e preventivas de doenças degenerativas, seu sabor único e sua cor inconfundível são fatores que atraem diretamente o consumidor (ANTUNES & MADAIL, 2007; CHU et al., 2011; MARTZ et al., 2010). Faz parte do grupo das pequenas frutas, junto com a amora, morango, framboesa e fisalis, tornando-se a segunda mais importante espécie de pequenas frutas depois de morango (FACCHINELLO, 2008; JOSEPH et al., 2003). O mirtilo é uma fruta ainda pouco conhecida no Brasil, porém com grande potencial produtivo, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul, devido ao clima temperado (RASEIRA & ANTUNES, 2004).

Bebidas fermentadas de frutas constituem produtos promissores devido a tendência de aceitação em pesquisas de consumo, além de contribuírem para a redução de perdas pós-colheita de frutos perecíveis (SANDHU & JOSHI, 1995). Além disso, apresentam-se como alternativa no desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de produtos derivados com maior período de vida útil e maior valor agregado. A indústria de alimentos e bebidas vem redescobrando a fermentação como um passo crucial na inovação e elaboração de produtos. A fermentação pode trazer diversas vantagens, entre elas a obtenção de produtos de sabor singular,

manutenção do valor nutricional, textura diferenciada e segurança do produto, uma vez que em função do conteúdo de álcool, sua vida de prateleira é ampliada (HUGENHOLTZ, 2013). Além disso, o processo de fermentação pode diminuir as perdas pós-colheita, uma vez que este fruto é bastante perecível. Tendo em vista que muitas dessas bebidas são naturalmente fermentadas, e, portanto, sujeitas a influências ambientais, sua microbiota pode diferir significativamente, mas a aplicação de tecnologia de confiança pode ajudar definitivamente a identificar um núcleo populacional, responsável por traços característicos da bebida em questão.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

DIVERSITY AND CHARACTERIZATION OF YEASTS ISOLATED FROM BLUEBERRY

Fernanda Bortoluzzi Lucion^a, Bruna Carla Agustini^b, Neidi Garcia Penna^a, Gildo
Almeida da Silva^b

^a Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^b Laboratório de Microbiologia Aplicada, EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brazil

Artigo a ser enviado para a revista *International Journal of Food Microbiology*

*Corresponding author: gildo.almeida@embrapa.br; telephone +55 54 3455-8046; fax number +55 54 3455-8000

Abstract

The chemical profile of a fermented product depends upon the raw basic material and the fermentative microbiota. The yeast microbiota is responsible for fermentation and contributes to fermented product aroma by several mechanisms. The study of this microbiota is relevant because the microorganisms utilize the constituents of the raw basic material and transform them into aroma or flavour impacting components. Autochthonous yeasts belonging to the blueberry microbiota of two different cultivars, Florida M and Climax, were investigated by analyzing the fermentative capacity, the hydrogen sulfide (H₂S) production, the film-forming strains, killer feature, sensitivity and neutrality to killer factor. Three methods employed to distinguish autochthonous yeast species were used: MALDI-TOF MS, PCR and PCR-RFLP of ITS region of rRNA gene and, if necessary, genetic sequencing of the D1/D2 26S rRNA region. The species *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida sorboxylosa*, *Metschnikovia kunwiensis*, *Candida bentonensis*, *Candida oleophila/Candida railenensis* and *Candida quercitrusa* were found on the surface of Florida M. *Hanseniaspora uvarum*, *Issatchenkia terricola*, *Candida sorboxylosa*, *Candida asiatica*, *Candida oleophila/railenensis*, *Issatchenkia hanoiensis* and *Kazachstania intestinalis* were of berries of Climax variety. Only three species were found in both varieties: *H. uvarum*, *C. sorboxylosa* and *C. oleophila/railenensis*. The species *H. uvarum* was the predominant in both cultivars, representing 70.4% and 78% of yeasts isolated from the surface of the Florida M and Climax, respectively. The killer feature was not detected in any strain isolated from Florida M. From strains isolated from Climax, only one strain *C. asiatica* 133 MCMCF/14 was killer against the 26B. Moreover, the *K. intestinalis* 91 MCMCF/14 was the only sensitive when tested against both the patterns killer *S. cerevisiae* K1 (Lallemand), EMBRAPA 1B, EMBRAPA 91B and the killer yeast *C. asiatica* 133 MCMCF/14. All strains showed low fermentative capacity and all of them were non-*Saccharomyces* yeasts. All yeasts isolated from Florida M produced H₂S. Only four strains from Climax did not produce H₂S. The highest evolution of H₂S was observed with the genus *Issatchenkia* and with the majority strains of *C. sorboxylosa*. The specie *C. oleophila/C. railenensis* showed low production of this parameter. The fermentation process of fermented products from blueberries of both Florida and Climax can be severely affected by this kind of autochthonous yeasts.

Keywords: *Vaccinium mytilus*; Non-*Saccharomyces* yeasts; Blueberry microbiota; ITS region; Yeast identification;

1 Introduction

The ecological distribution of microorganisms on different substrates has been studied in several scientific fields (Binetti et al., 2013; Combina et al., 2005; Davis, 2014; de Melo Pereira et al., 2014; de Ponzzes-Gomes et al., 2014; Diosma et al., 2014, Mestre et al., 2014). Alcoholic fermentation is a complex microbiological process characterized by the presence of a large number of different microorganisms. Among these microorganisms, yeasts are the ones responsible for alcoholic fermentation. The transformation of sugars into ethanol by spontaneous fermentation is the result of the sequential development and metabolic activity of various species and strains of yeasts originated from berries surfaces (Barata et al., 2012).

Fermented beverages fruit products are promising because consumer research has shown a good acceptance. Moreover, it contributes to the reduction of post-harvest perishable fruits losses (Sandhu and Joshi, 1995). It represents an alternative technology for obtaining derivatives with a higher shelf life and higher added value. Much of the domestic production of fruits is not geared to the fresh market, but to processing. The largest portion is directed to the preparation of juices, pulps and alcoholic beverages as well as the preparation of pastries, jams and ice creams.

Several fruits can be used as raw material for preparation of fermented alcoholic beverage (Venturini, 2010), but only the fermentation of grapes can be nominated as wine. Blueberries, for example, are native from parts of Europe and North America, belonging to the genus *Vaccinium* and family *Ericaceae*. Their wealth in polyphenols, its taste and unmistakable colour due to the anthocyanins content are factors that directly appeal to the consumer (Norberto et al., 2013; You et al., 2011; Zafra-Stone et al., 2007). In the group of small fruits that also covers strawberry, raspberry and blackberry, blueberry is known as the most antioxidant-rich fresh fruit already studied, having a high content of polyphenols in both peel and pulp (Payne, 2005). Despite their importance, no reports investigating the yeasts species associated with them were found in literature. Tournas & Katsoudas (2005) showed that 95% of the blueberry samples supported the growth of filamentous fungi and the

levels found were between 10% and 100%. No comments were made by these authors about the presence of yeasts on the blueberries surface.

It is well known that fermented beverages quality is strongly influenced by the yeasts involved in the fermentative process, like the body, viscosity, colour, flavour and aroma are strongly determined by yeast metabolism (Rainieri and Pretorius, 2000). Autochthonous yeasts are able to enhance aromatic traits contributing with geographical indications of vitiviculture areas. Zagorc et al. (2001) verified that a local strain presented the best wine fermentation profiles with specific valuable characteristics. Many intrinsic and extrinsic factors could affect the occurrence and growth of microorganisms on the surfaces of fruits. The climate, soil, berries maturity, damage due to birds, insects and mould attack, mechanical damage, fungicides, insecticides and geographic location affect the yeast flora (Combina et al., 2005). Recently, several investigations have been carried out in different environments both to obtain better knowledge of yeast biodiversity and to define the impact of these microorganisms on the food products (Stringini et al., 2008; Masoud et al., 2004; Tournas and Katsoudas, 2005; Agustini et al., 2014; Chavan et al., 2009; Combina et al., 2005, Silva, 1996).

Yeast selection encompasses the evaluation of some parameters that contribute to the final product, as killer capacity and the formation of H₂S testing. Killer yeasts can produce toxic proteins or glycoproteins (so-called killer toxins) that can cause death in other sensitive (killer-sensitive) yeast strains and do not kill neutral-killer strains (Silva, 1996). According to Silva (1996), neutral yeast is of great importance in non-sterile industrial fermentation processes for obtaining fermented beverages because yeasts with killer activity can reduce or eliminate sensitive yeast during the fermentation process, causing impairment in the formation of flavours. The production of unpleasant volatile sulfur compounds by yeasts, such as hydrogen sulfide (H₂S) is a chronic problem in the global fermented beverages industry, because it imparts an undesirable sulfurous, like a rotten egg-like off-flavour (Fedrizzi et al., 2007).

Brazil is an important fruit-producing country and since 1983 has begun to produce blueberries. Rio Grande do Sul state is the major blueberry grower in the country. This paper describes the characterization and identification of autochthonous yeasts isolated from blueberries surfaces.

2 Material and methods

2.1 Blueberry samples

Healthy blueberries from the varieties Florida M and Climax were randomly and aseptically collected from a blueberry bush, on January 2014. The blueberries did not receive any application of pesticide or fungicide. The collect were carried out in Farroupilha commune (RS, Brazil), situated at 29°12'50"S51°15'33"E, assuring the berries were in its maximum degree of maturation.

2.2 Yeasts growth and isolation

The blueberries were crushed in sterile bags for juice extraction and were submitted to serial dilution. After dilutions, aliquots of 100 µl were spread on must agar (Silva, 1996) and incubated at 28°C for 48-72h for growth. Seventy five yeasts were isolated from each variety and each one received an arabic number (from 1 to 75 and 76 to 150) followed by the acronym MFMF/14 or MCMCF/14 for the ones isolated from Florida M and Climax varieties, respectively.

2.3 Yeasts preservation

For yeast cryopreservation, each strain was grown on G7 medium (Silva & Almeida, 2006). After 24h of growth, 650 µl of that medium were added to an aliquot of equal volume of glycerol solution (24.65 g/L magnesium sulphate 10 mL/L - phosphate buffer pH 4.0, 100 g/L sucrose, 650 mL/L - glycerol). The strains were stored at -80 °C (Sanyo MDF-U33V, Japan).

2.4 Characterization of yeast strains

2.4.1 Killer, sensitivity and neutral behavior

The killer, sensitivity and neutral phenotype assay was performed in the liquid medium must Lorena [80 mL Lorena grape must, 20 mL ELNC medium (Silva &

Almeida, 2006), 0,003 g methylene blue and 1g Bacto agar, pH 4,5]. To avoid hydrolysis, the agar was sterilized separately. The neutral and sensitivity assay consisted on plating suspended cells as a lawn (approximately 10^7 cells/ml) onto the medium. Punctual mass of the standard killer strains 1B, 91B and K1 were streaked over the lawn in triplicate. In the killer assay the sensitive strain 26B was plated as a lawn and each of the strains were inoculate in duplicate. Inoculated plates were incubated at 24°C for 48-72h. If the punctual masses were surrounded by a clear zone inhibition, the yeast plated as a lawn was designated as sensitive and the yeast streaked over it was designated as killer (Silva, 1996).

2.4.2 Fermentative performance

The fermentative performance was evaluated by weight loss and was controlled each 6 and 18 hours intervals, during a total of 96 hours (Giudici and Zambonelli, 1992).

2.4.3 Hydrogen sulfide (H₂S) production

The H₂S formation was evaluated by employing a narrow strip of Whatman #1 filter paper impregnated with a solution of 3% lead acetate. These papers were fixed in the top of the fermentation tubes, which contained 1 ml of suspension containing 10^7 cells/ml of the testing yeast and 9 ml of must sulfite (0.1% anhydrous sodium sulfite, 1% tryptone, 5 ml of must grape) (Silva and Silva, 1987) . After inoculation and before incubation, the lead acetate strip was suspended in the borosilicate glass test tubes with black caps so that the end of the strip was approximately 1.3 cm above the level of the must sulfite medium. The top of the strip was held by the black cap. The following standard strains were used: *S. cerevisiae* EMBRAPA 1VVT/97 as negative control and a commercial *S. cerevisiae* K1 (Lallemand) as positive control. The tubes were incubated at 24 °C and the H₂S formation was evaluated after 96 hours of fermentation (Silva and Silva, 1984) . The production level of H₂S is indicated by blackning of the lower portion of the strip inside the tube test. The H₂S-positive yeast strains change the white colour of the strip to brown or black, while H₂S-negative strains do not change the colour of the strip. The following code was used: Negative = white (-); Low or Very low = light brown (+); Moderate = brown (++); High = dark-brown (+++).

2.4.4 Film forming strains

The presence of the film produced by yeast was made by visual observation of the film formed on the surface of liquid medium (Van Rij, 1984; Volleková et al., 1996). The tubes were examined for film growth in the liquid must sulfite medium.

2.5 Yeast identification

2.5.1 Yeasts identification by MALDI-TOF mass spectrometry

MALDI-TOF MS analysis was performed according to the methodology and the *in-house* library implemented described by Agustini et al. (2014). The results of the pattern-matching process were expressed as log score values, which ranged from 0 to 3.000. Score values of >1.800 indicated identification beyond to the species level, and score values between of 1.700 and 1.800 indicated identification to the genus level. Scores of <1.700 was interpreted as no identification.

2.5.2 PCR-RFLP analysis

Strains unsuccessfully identified by MALDI-TOF MS analysis and with log score <1.800 had their identifications confirmed by PCR-RFLP using the amplicons of ITS region. The DNA extraction was performed by freeze-thawing process described by Silva et al. (2012). PCR was carried out using the primers ITS1 and ITS4 (White et al., 1990). PCR was performed in 25 µL reaction volume containing 100 µM of each dNTP, PCR buffer, 2.5 µM MgCl₂, 0.8 µL of each primer, 1.5 U Taq polymerase and 1µL DNA template. Amplifications were carried out using the following PCR program: 95 °C for 5 min followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a final step at 72 °C for 10 min (ProFlex thermocycler, Applied Biosystems, California, USA).

For restriction analysis, three endonucleases were employed: *CfoI*, *HinfI* and *HaeIII*. Yeasts with 750 bp were differenced employing two other restriction enzymes, *DdeI* and *MboI*. The enzymatic reactions were conducted following the

manufacturer recommendations. PCR products were resolved in 1.5% agarose gel electrophoresis while restriction fragments were resolved in 3% agarose gel electrophoresis. The gels were stained with ethidium bromide and the stained DNA was visualized under UV light on the Eagle Eye Image II (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The fragments sizes were estimated by comparisons with a 100-bp (pairs base) DNA ladder (Invitrogen, Brasil).

2.5.3 Sequencing procedure

Isolates not identified by PCR-RFLP were submitted to sequencing. The sequencing primers were NL-1 and NL-4 (Kurtzman and Robnett, 2003) used to amplify the D1/D2 region of the 26S RNA gene. Sequences were analyzed using BlastN search at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3 Results

3.1 Yeasts growth and isolation

At first, seventy five yeasts were isolated from each surface blueberry variety, but 14 and 20 strains did not grow under laboratorial conditions for the cultivars Florida M and Climax, respectively.

3.2 Yeast identification

3.2.1 MALDI-TOF mass spectrometry

The remaining 116 yeast strains were all submitted to identification by MALDI-TOF MS and the results are summarized in **Table 1**. From the 61 yeast strains isolated from Florida M variety, 46 strains (75%) were successfully identified by MALDI-TOF MS and all of them had log score >1.800. Fifteen strains had yielded log scores of <1.700. All 46 yeasts isolated from this variety that was identified by MALDI-TOF MS were from *Hanseniaspora* genus. Three of *H. opuntiae* and 43 strains of *H. uvarum* were correctly identified to the species level.

From the 55 yeast strains isolated from Climax variety, 47 strains (85%) were successfully identified by MALDI-TOF MS (log score > 1.800), wherein 39 (83%) yeasts belonged to the species *H. uvarum*. The species *Issatchenkia terricola* and *Issatchenkia hanoiensis* were also found. The species *Hanseniaspora opuntiae* was not encountered in this variety. Eight strains were not identified by this technique and just one (*I. terricola* 141 MCMCF/14) had yielded log score between 1.700 and 1.800. These results require confirmation by PCR-RFLP. It was not possible to identify yeasts from the species *Candida sorboxylosa*, *Metshnikowia kunwiensis*, *Kazachstania intestinalis*, *Candida asiatica*, *Candida bentonensis*, *Candida quercitrusa*, *Candida oleophila/Candida railenensis* and three strains of *H. uvarum* using MALDI-TOF MS.

Table 1

3.2.2 PCR-RFLP analysis

The strains unsuccessfully identified by spectrometry analysis were gathered together according to the ITS-RFLP patterns, resulting in 10 groups (G1-G10, **Table 2**). The **Table 2** shows the restriction patterns of the species of each group, using five restriction enzymes, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MboII* and *DdeI*. The identity of the species was determined by comparing the restriction profile obtained with literature (Agustini, 2014; Esteve-Zarzoso et al., 1999). From 24 analyzed strains, only five of them presented a comparable profile with the literature (*I. terricola* 141 MCMCF/14, *H. uvarum* 79 MCMCF/14, 82 MCMCF/14, 83 MCMCF/14 and 105 MCMCF/14). The remaining strains were submitted to sequencing of the 26S D1/D2 domain.

The 141 MCMCF/14 strain, isolated from Climax variety, presented a restriction profile in agreement with the data reported in literature, being identified as *I. terricola* (Granchi et al., 1999; Agustini et al., 2014). Yeasts of G8 group (79 MCMCF/14, 82 MCMCF/14, 83 MCMCF/14 and 105 MCMCF/14) were identified as *H. uvarum* in agreement with results in literature (Agustini, 2014). Strains of the groups G1, G2, G3, G5, G6, G7, G9 and G10 could not be identified by PCR-RFLP, being unraveled only by sequencing of the 26S D1/D2 domain. Hence this is the first report demonstrating the ITS-RFLP profile of the species belonging to these groups.

Table 2

3.2.3 Genetic sequencing D1/D2 domain of 26s rRNA gene

When the differentiation was not possible by PCR-RFLP technique or to confirm a restriction profile, the identification is then carried out by comparative sequence analysis. At least one strain of each group formed by the previous the ITS-RFLP analysis (**Table 2**) had their identification determined by genetic sequencing of the D1/D2 26S rRNA region. For the identification to be successful, Hughes et al. (2009) suggest that the sequence analyzed should be considered to match a sequence in GenBank if more than 80% coverage gave a percentage identity (homology) of 98% or greater.

The BlastN analysis of the sequence obtained from 20 MFMF/14 resulted in 71% of coverage and 90% of identity for the species *M. kunwiensis* which did not confirm with reliability the identity of the strain. The sequencing of other regions on the genome could contribute with the resolution of this case. The sequence obtained from the 118 MCMCF/14 resulted in 99% of coverage and identity for both *C. oleophila* and *C. railensis*. The strain 91 MCMCF/14 was identified as *K. intestinalis*, which showed 97% of query coverage and 99% of identity.

The species *C. asiatica* 133 MCMCF/14, *C. bentonensis* 22 MFMF/14 and *C. quercitrusa* 54 MFMF/14 showed coverage between 99% and 100% with 99% of identity, confirming a correct identification. The species identified as *C. sorboxylosa* 55 MFMF/14 presented showed 85% of query coverage with 80% of identity. This species could not reliably be identified.

3.3 Characterization of yeast strains

3.3.1 Fermentation ratio

In micro-fermentation assays the yeast strains displayed different fermenting behaviors (expressed as CO₂ loss (g) in 10 mL) and were compared to the patterns *S. cerevisiae* K1 (Lallemand) and EMBRAPA 1VVT/97. All strains revealed a low fermentation activity when compared to patterns as *S. cerevisiae* EMBRAPA 1VVT/97 and commercial *S. cerevisiae* K1 (Lallemand).

3.3.2 Killer behavior, neutrality and sensitive

Regarding the strains isolated from Florida M variety, all of them were considered to have a neutral character. These strains neither kill sensitive cells (*S. cerevisiae* 26B) nor are killed by killer strains (*S. cerevisiae* K1, EMBRAPA 1B and EMBRAPA 91B). However, it was observed that the strain *C. asiatica* 133 MCMCF/14 isolated from Climax variety kill the strain EMBRAPA 26B and the strain *K. intestinalis* 91 MCMCF/14 obtained from the same variety presented sensibility toward the action of the killer toxins produced by strains K1, EMBRAPA 1B and EMBRAPA 91B. Depending on the media, the yeast *S. cerevisiae* behaves as sensitive and as neutral strain.

The killer potential of the strain *C. asiatica* 133 MCMCF/14 was also tested toward all neutral and sensitivity strains of the series MCMCF/14 (yeasts isolated from Climax). With the exception of the strains 83 MCMCF/14, 85 MCMCF/14, 86 MCMCF/14, 92 MCMCF/14, 96 MCMCF/14, 99 MCMCF/14, 104 MCMCF/14, 118 MCMCF/14, 131 MCMCF/14 and 146 MCMCF/14, all the remaining neutral strains have presented sensitivity to the killer toxin produced by the strain 133 MCMCF/14. The sensitive strain 91 MCMCF/14 was also killed by 133 MCMCF/14. Killer and sensitive character were not influenced by different incubation temperatures (18 and 24°C).

3.3.3 Hydrogen sulfide (H₂S) production and film-forming

Considering the H₂S production of strains isolated from Florida M, 77.0%, 6.5%, and 14.7% of them presented, respectively, low, moderate and high levels of production (**Figure 1**). Only 1.8% of the strains did not produce the aforementioned gas. From 43 strains from *H. uvarum*, 86% have showed low H₂S production and, 89% have also presented low level of film production, while the others 7% have demonstrated moderate level. Just 4,6% presented high production and 2.4% no produced this gas. *H. uvarum* 18 MFMF/14 was the only strain for this specie that stood out both H₂S and film-forming production. Regarding the species *C. sorboxylosa*, from the 8 strains isolated, only 42 MFMF/14 and 57 MFMF/14 have showed low levels of H₂S production. The strains *H. uvarum* 18 MFMF/14, *C.*

bentonensis 22 MFMF/14 and *C. sorboxylosa* 55 MFMF/14 produced high concentration of H₂S and also exhibited high film formation (**Figure 1**).

Considering the H₂S production of strains isolated from Climax variety, only 7.3% of the them did not produce this gas, while 34.5% and 58.2% have showed, respectively, moderate to high and low levels of production (**Figure 1**). Regarding the strain of *I. terricola* and *I. hanoiensis*, all of them presented high levels of H₂S production. Beyond that, the strains of *I. hanoiensis* 92 and 96 MCMCF/14 have also showed high levels of film-forming. The killer strain *C. asiatica* 133 MCMCF/14 was considered a high H₂S producer. The sensitive strain *K. intestinalis* 91 MCMCF/14 and the strain *H. uvarum* 146 MCMCF/14 were the only strain that did not showed H₂S production or film formation.

4 Discussion

4.1 Yeast diversity from blueberry

The use of autochthonous yeasts, can offer many advantages for the preparation of fermented beverages because they are more adapted to the environment in which they operate. The achievement of a product with typical and unique features, low or no production of H₂S and absence of killer toxin production are some of these advantages. In this work, the occurrence of *S. cerevisiae* was not observed in both blueberry cultivars (**Figure 2**). However, a great population diversity of non-*Saccharomyces* yeast species was observed. Studies performed to other substrates, such as grape, also had a high occurrence of these species (Barata et al., 2012; Capece et al., 2013; Combina et al., 2005; Esteve-Zarzoso et al, 1998; Tristezza et al., 2013).

In blueberries surface, the *Hanseniaspora* genus represented 75% and 78% of the isolates in Florida M and Climax, respectively. The non-*Saccharomyces* population is expected to be dominant in the early stages of must processing. The oxidative, weakly fermentative or fermentative ascomycetous species (*Candida* spp., *Kloeckera apiculata*/*Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp.) are present in pre-fermentation steps or at the beginning of fermentation (Barata et al., 2012)

Researchers has demonstrated that *S. cerevisiae* positive berries are extremely rare (Mortimer and Polsinelli, 1999). Combina et al. (2005) isolated 150 yeasts from Malbec variety in Mendoza, Argentina, and not found this fermentative yeast. Authors reported that fermentative strains, as *S. cerevisiae* species, were found in very low quantities on grape berry surfaces, difficulting its isolation (Cordero-Bueso et al., 2014; Fleet, 2003). *S. cerevisiae* involved in spontaneous fermentations has been demonstrated to originate from both vineyard and cellar environments (Le Jeune et al., 2006). One of the reasons for the absence of *S. cerevisiae* was possibly due to blueberry not given addition of sulfur dioxide. It has been reported that this compound can selectively inhibit indigenous non-*Saccharomyces* in grape juice, reducing its presence in 10- to 100-fold and encouraging the selective growth of *S. cerevisiae* (Egli et al., 1998). Furthermore, an important point for the maintenance of biodiversity in the fruits is not using fungicides in blueberry bush. The blueberries used in this study there was no fungicides application. Cordero-Bueso et al. (2014) concluded that the presence of fungicides clearly exerted negative effects on the abundance and diversity of the majority of species over a three years' study.

The yeast diversity identified in this work was showed in **Figure 2**. The interest in the industrial application of non-*Saccharomyces* yeasts has emerged dramatically once it enhances wine aroma by producing important metabolites, such as glycerol, acids and esters. Studies have assured its positive contribution on wine flavour (Esteve-Zarzoso et al.; Fleet, 2003) and in biotechnological fields due to the production of interesting enzymes (Maturano et al., 2012; Rai et al., 2010).

Both blueberries varieties analyzed in the present study had the same number of different species of yeasts in its surface. However, only three species are common between them: *C. sorboxylosa*, *C. oleophila/railenensis* and *H. uvarum*. This could be attributed to differences in the physicochemical properties of the blueberries varieties that affect the adaptation of wild yeasts (Hong and Park, 2013).

4.2 Yeast identification by MALDI-TOF MS

Concerning to MALDI-TOF MS identification method, only *I. terricola* 141 MCMCF/14 strain presented a log score between 1.700 and 1.800 and it was necessary confirm its identification by molecular biology. Agustini et al. (2014) analyzed 845 yeasts by MALDI-TOF MS isolated from grape surface and have

suggested that despite the manufacturer company postulate log scores ≥ 2.000 to guarantee species-level identification using the MALDI Biotyper library, the designations were accurate until the log score boundary of ≥ 1.800 . Moreover, The species *C. sorboxylosa*, *M. kunwiensis*, *K. intestinalis*, *C. asiatica*, *C. bentonensis*, *C. quercitrusa*, *C. oleophila/C. railenensis* and three strains of *H. uvarum* could not be identified by MALDI-TOF MS due to the absence of a standard spectrum of these species in both the manufacturer and in the in-house libraries constructed (Agustini, 2014). Hence, these species were firstly grouped by PCR-RFLP profiles and then at least one strain of each group was submitted to sequencing to confirm the species identity. Like the present study, Xiao et al. (2014) tried to identify the *C. quercitrusa* species by MALDI-TOF MS and, likewise, did not obtain identification, presenting values of log score < 1.500 .

4.3 Yeast identification by PCR-RFLP

For the PCR-RFLP identification, three main restriction enzymes were used for the RFLP analysis: *CfoI*, *HaeIII* and *HinI*. For yeasts that had 750 bp, two other restriction enzymes, *DdeI* and *MboI*, were necessary to discriminate species with 750 bp. In the **Table 2**, for example, the strains *H. uvarum* 79 MCMCF/14, 82 MCMCF/14, 83 MCMCF/14, 105 MCMCF/14, *C. asiatica* 133 MCMCF/14 and *K. intestinalis* 91 MCMCF/14 showed both *amplicon* sizes with 750 bp. When compared to the *K. intestinalis* 91 MCMCF/14 strain (G10 group), despite to have identical *amplicon* sizes, the profile of fragmentation of enzymes was completely different to the G8 and G9 groups.

Only 2 of 10 groups of different yeasts profiles were in agreement with the literature, where the species identified were *H. uvarum* and *I. terricola* (G4 and G8 groups). This affirmation highlights the intraspecific variation encountered in some species, where the same species could present different restriction profiles depending to the analyzed strain. Moreover, strains with the same restriction profile may belong to different species, as occurred with the strain *C. asiatica* 133 MCMCF/14 and other strains of group 8 (G8). The restriction profile for the species *C. sorboxylosa*, *M. kunwiensis*, *C. bentonensis*, *C. oleophila/C. railenensis*, *C. asiatica* and *K. intestinalis*, for example, were not found in the literature for comparison

purposes. The restriction profiles of these species were firstly described in the present study.

The species *C. oleophila* was encountered in both blueberry varieties analyzed, however regarding the variety from which it was isolated, a different restriction profile was visualized when using *Hinf*I as endonuclease. This difference can be seen comparing the profile from strain 118 MCMCF, isolated from Climax variety, with the profile of *C. oleophila/C. railenensis* strains originated from Florida M (**Table 2**). This intraspecific variation can be observed also in spectral profiles, generated by MALDI-TO MS analysis (**Figure 3**), where two different strains from the same species share common peaks but also present many mass signals that are unique for that strain. It has been already suggested that MALDI-TOF MS has the potential for differentiate not just species but also strains (Moothoo-Padayachie et al., 2013).

Figure 3

4.4 Yeast identification by genetic sequencing

As afore mentioned, when using the BlastN tool, the sequence analyzed should be considered to match a sequence in GenBank if more than 80% coverage gave a percentage homology of 98% or greater. The obtained sequence for the strain 20 MFMF/14 presented 90 and 70% of identity and 71 and 88% of coverage for the species *M. kunwiensis* and *Metschnikowia corniflorae*, respectively, results that do not reach the reliability level expected. Hence, the sequencing of another genetic region should be conducted in order to resolve this question. Another case that requires the sequencing of another genetic region for a reliable identification was for the strain 118 MCMCF/14. The BlastN analysis suggests 99% identity for both the species *C. railenensis* and *C. oleophila*. Isaeva et al. (2009) have also showed the great similarity between the sequence of D1/D2 region of these species. These authors have also pointed out that the only phenotypic difference between than was the ability to ferment trehalose. Regarding the ITS-RFLP patterns for this strain, the amplicon size in 610 bp and the fragmentation profile are in agreement with the study of Glushakova (2007) with the species *C. oleophila*. In contrast, Wang (2011) describes the ITS amplicon size as 510 bp and restriction patterns for the specie *C.*

railenensis quite different for that encountered in the present study. Based on these literature comments, the strain 118 MCMCF/14 was considered as belonging to the *C. oleophila* species.

The sequence analysis of the strain 91 MCMCF/14 presented a 99% and 96% of identity with *K. intestinalis* and *Kluyveromyces lodderae*, respectively, and for both the species coverage of 97% has been achieved. The strains *C. asiatica* 133 MCMCF/14, *C. bentonensis* 22 MFMF/14 e *C. quercitrusa* 54 MFMF/14 presented a coverage of 99 to 100% and all of them presented 99% of identity, resulting in a reliable identification. In the other hand, the strain 55 MFMF/14 has showed only 85% of identity and 80% of coverage, for the species *C. sorboxylosa* as the best match, achieving a poor percentage for a reliable identification. In this case, another genetic region should be sequenced in order to confirm this species.

4.5 Killer behavior, neutrality and sensitive

The killer and sensitive character was not encountered in the strains isolated from Florida M cultivar. In the study of Cuiner (1983), large differences concerning the killer character were observed between different regions in France. In Gard and Beajoulais region the frequency of killer strains were established between 80 a 100%, while in Touraine region no killer strains were present. These divergences were also visualized in different wineries from Argentina, once only in Salta province, killer strains were no detected (Vazquez and Toro, 1994).

Regarding the strains from Climax cultivar, just the strain 133 MCMCF/14 was considered killer and just 91 MCMCF/14 was sensitive. Another yeasts isolated were considered neutral against the standard killer strains used. But when they were tested against the killer strain 133 MCMCF/14, isolated from the same cultivar, 82 % of them were considered sensitive. The use of neutral strains as the starter in fermented beverages is desirable, once it will not impair other strains development, in particular, strains that could enhance aromatic complexity in final product (Silva, 1996). Furthermore, the results suggested that the functional killer protein expression depended upon the stress imposed to cells by the culture medium composition or by culture conditions, according to Silva et al. (2011). However, the

temperatures (18 and 24° C) had no influence for toxin killer production. Marquina et al. (2002) affirm that the activity of K1 killer is unstable at temperatures above 25°C.

4.6 H₂S production

The species *C. sorboxylosa*, *I. terricola* and *I. hanoiensis* have presented a high H₂S production, which can implicate in a low quality product or even in a total loss of the production. Wlodarczyk et al. (2012) have demonstrated that the grape cultivar could have influence in the frequency of isolated strains that produce H₂S, once Cabernet Franc variety presented 65%, Ancellota showed 32,5% and Tannat have 10,0% of the strains isolated presenting H₂S production. In blueberries cultivars studied, 21% of the strains from Florida M have produced high to moderate levels of H₂S, against 34% of the strains from Climax.

Neto and Mendes-Ferreira (2005) have showed that non-*Saccharomyces* strains, in BiGGY agar, presented light brown to black colonies, produced statistically more H₂S levels (2,73±0,09) when compared to *Saccharomyces* strains (2,22±0,06). The amount of H₂S produced are dependent on the yeast strain, the presence of the sulfur precursor compound, the culture growth rate and the activity of the sulfite reductase enzyme (Cordente et al., 2012).

4.7 Film-forming yeasts

I. terricola (synonymous: *Pichia terricola*) typically form films on liquid media and are known to grow during fermentation or in wine improperly handled, in particular, on the surface of wine exposed to oxygen (Barata et al., 2012). This species often acts as a spoilage yeast in fruit juices. The most commonly recognized symptoms of yeast spoilage are film formation in bulk wines, cloudiness, sediment formation and gas production in bottled wines, and also off-flavour production during all processing and storing stages (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003).

Film-forming yeasts (e. g. *Pichia* and *Candida*) owe their denomination to the ability of forming pellicles on the surface of bulk wines, being common contaminants of musts and being regarded the indicators of hygiene, with the ability to produce off-flavours. They may affect wine and favor growth of acetic bacteria leading to serious

consequences (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003). The ability to form films by *Pichia* and *Candida* is probably explained by their aerobic nature and fast growth, and so other species are usually only minor constituents of film microbiota (Malfeito-Ferreira, 2011).

4.8 Fermentative performance

Regarding the fermentative profile of the strains analyzed, all of them presented a poor ability to ferment when compared to the high fermentative strains *S. cerevisiae* EMBRAPA 1VVT/97 and K1 (Lallemand). It was already expected considering all of the strains belong to non-*Saccharomyces* species.

5 Conclusions

The yeasts diversity is not only related to the location, but also to different substrates (blueberry varieties) and just the specie *H. uvarum*, *C. sorboxylosa* and *C. oleophila* were found both Florida M and Climax varieties. Neutral strains for a given strain can be sensitive to one another and the species found can compromise the quality of fermented blueberry product.

Acknowledgments

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

6 References

Agustini, B.C., 2014. Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados suplementar fundamentado em espectrometria de massa MALDI-TOF, Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Paraná, Brasil, p. 115.

- 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, 5645-5654.
- Amaral, C., Lucas, M.S., Sampaio, A., Peres, J.A., Dias, A.A., Peixoto, F., Anjos, M.d.R., Pais, C., 2012. Biodegradation of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 68, 45-50.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153, 243-259.
- Bezerra-Bussoli, C., Baffi, M.A., Gomes, E., Da-Silva, R., 2013. Yeast diversity isolated from grape musts during spontaneous fermentation from a Brazilian winery. *Current Microbiology* 67, 356-361.
- Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., Suarez, V., 2013. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology* 115, 434-444.
- Capece, A., Siesto, G., Poeta, C., Pietrafesa, R., Romano, P., 2013. Indigenous yeast population from Georgian aged wines produced by traditional "Kakhetian" method. *Food Microbiology* 36, 447-455.
- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D.P., Shouche, Y., Deshpande, M.V., 2009. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology* 26, 801-808.
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofre, V., Ganga, A., Martinez, C., Catania, C., 2005. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1055-1061.
- Cordente, A.G., Curtin, C.D., Varela, C., Pretorius, I.S., 2012. Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96, 601-618.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Valero, E., 2014a. A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *International Journal of Food Microbiology* 189, 189-194.
- Cuiner, M.C.G., C., 1983. Enquete sur la repartition des levures "killer" en France. *Vignes vins* 318, 27.
- Davis, T.S., 2014. *The Ecology of Yeasts in the Bark Beetle Holobiont: A Century of Research Revisited*. *Microbiology Ecology*
- de Melo Pereira, G.V., Soccol, V.T., Pandey, A., Medeiros, A.B., Andrade Lara, J.M., Gollo, A.L., Soccol, C.R., 2014. Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology* 188, 60-66.
- de Ponzzes-Gomes, C.M., de Melo, D.L., Santana, C.A., Pereira, G.E., Mendonca, M.O., Gomes, F.C., Oliveira, E.S., Barbosa, A.M., Jr., Trindade, R.C., Rosa, C.A., 2014. *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in grape varieties of the Sao Francisco Valley. *Brazilian Journal Microbiology* 45, 411-416.

- Diosma, G., Romanin, D.E., Rey-Burusco, M.F., Londero, A., Garrote, G.L., 2014. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 30, 43-53.
- Egli, C.M., Edinger, W.D., Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology* 85, 779-789.
- 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. *Int Journal System Bacteriology* 49 Pt 1, 329-337.
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A., 1998. The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology* 1, 143-148.
- Fedrizzi, B., Magno, F., Badocco, D., Nicolini, G., Versini, G., 2007. Aging effects and grape variety dependence on the content of sulfur volatiles in wine. *Journal Agricultural Food Chemistry* 55, 10880-10887.
- Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11-22.
- Glushakova, A. M.; Yurkov, A. M.; Chernov, Y. I. Massive Isolation of Anamorphous Ascomycete Yeasts *Candida oleophila* from Plant Phyllosphere. **Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 803, 2007.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: a strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiology* 33, 271-281.
- Giudici, P.; Zambonelli, C., 1992. Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 370-374.
- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vincenzini, M., 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, 949-956.
- Hong, Y.A., Park, H.D., 2013. Role of non-Saccharomyces yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. *Food Microbiology* 34, 207-214.
- Hughes, K.W., Petersen, R.H., Lickey, E.B., 2009. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist* 182, 795-798.
- Isaeva, O.V., Glushakova, A.M., Yurkov, A.M., Chernov, I.Y., 2009. The yeast *Candida railenensis* in the fruits of English oak (*Quercus robur* L.). *Microbiology* 78, 355-359.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *Fems Yeast Research* 3, 417-432.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86, 23-50.

- Malfeito-Ferreira, M., 2011. Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology* 61, 95-102.
- Masoud, W., Cesar, L.B., Jespersen, L., Jakobsen, M., 2004. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* 21, 549-556.
- Maturano, Y.P., Rodriguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Nally, M.C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L.I., Combina, M., Vazquez, F., 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 155, 43-50.
- Mestre, M.C., Fontenla, S., Rosa, C.A., 2014. Ecology of cultivable yeasts in pristine forests in northern Patagonia (Argentina) influenced by different environmental factors. *Can J Microbiol* 60, 371-382.
- Moothoo-Padayachie, A., Kandappa, H.R., Krishna, S.B.N., Maier, T., Govender, P., 2013. Biotyping *Saccharomyces cerevisiae* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Food Research and Technology* 236, 351-364.
- Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. *Research Microbiology* 150, 199-204.
- Neto, L.M., Mendes-Ferreira, A.A., 2005. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. *Food Science and Technology* 25, 278.
- Norberto, S., Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M., Calhau, C., 2013. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *Journal of Functional Foods* 5, 1518-1528.
- Payne, T.J., 2005. Formulating with blueberries for health. *Cereal Foods World* 50, 262-264.
- Rai, A.K., Prakash, M., Appaiah, K.A.A., 2010. Production of *Garcinia* wine: changes in biochemical parameters, organic acids and free sugars during fermentation of *Garcinia* must. *International Journal of Food Science and Technology* 45, 1330-1336.
- Rainieri, S., Pretorius, I.S., 2000. Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology* 50, 15-31.
- Sandhu, D.K.J., Joshi, V.K., 1995. Technology, quality and scope of fruit wines especially apple beverages. *Indian Food Industry* 14, 34.
- Silva, G.A., 1996. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Itálico grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46, 121.
- Silva, G.A., Poli, J. S., Poletto, C. M., Schaker, P.D.C, Valente, P., 2011. Production of functional killer protein in batch cultures upon a shift from aerobic to anaerobic conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54, 612.
- Silva, G.A., Bernardi, T.L.; Schaker, P.D.C.; Menegotto, M.; Valente, P., 2012. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze–thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55, 327.

- Silva, G.A.S., Silva, M.A.A.A., 1984. Determinação Qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio, Tecnologias geradas pelo sistema EMBRAPA. UEPAE de Bento Gonçalves Bento Gonçalves, RS.
- Silva, G.A.S., Silva, M.A.A.A., 1987. Leveduras nacionais selecionadas para elaboração de vinho, Circular Técnica 14. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, p. 19.
- Silva, G.A.d., Almeida, E.A.d., 2006. Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49, 411-419
- Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., Ciani, M., 2008. Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology* 127, 184-189.
- Tournas, V.H., Katsoudas, E., 2005. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology* 105, 11-17.
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., Mita, G., Grieco, F., 2013. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food Microbiology* 36, 335-342.
- Van Rij, N.J.N.K., 1984. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam - Netherlands.
- Vazquez, F., Toro, M.E., 1994. Occurrence of Killer Yeasts in Argentine Wineries. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 10, 358-359.
- Venturini, W.G.F., 2010. *Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia*. first ed. Blucher, São Paulo.
- Vollekova, A., Malik, F., Vollek, V., Linczenyiova, K., 1996. Characterization of yeasts isolated from red wine surface film. *Folia Microbiol (Praha)* 41, 347-352.
- Wang, Y., Kang, W., Xu, Y., Li, J., 2011. Effect of Different Indigenous Yeast β -Glucosidases on the Liberation of Bound Aroma Compounds. *Journal of the Institute of Brewing* 117, 230-237.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, pp. 315-322.
- Wlodarczyk, S.R.S., R. C.; Bonfim. T. M. B; 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 H₂S and Fermentation Rate. *Biochemistry and Biotechnology Report* 1, 27.
- Xiao, M., Wang, H., Lu, J., Chen, S.C., Kong, F., Ma, X.J., Xu, Y.C., 2014. Three clustered cases of candidemia caused by *Candida quercitrusa* and mycological characteristics of this novel species. *J Clin Microbiol* 52, 3044-3048.
- You, Q., Wang, B.W., Chen, F., Huang, Z.L., Wang, X., Luo, P.G., 2011. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chem* 125, 201-208.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., Bagchi, D., 2007. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition Food Research* 51, 675-683.

Zagorc, T., Maraz, A., Cadez, N., Jemec, K.P., Peter, G., Resnik, M., Nemanic, J., Raspor, P., 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology* 18, 441-451.

Table 1 Identified amount of yeast strains by mass spectrometry MALDI-TOF from different blueberry varieties isolated on January 2014 from Farroupilha commune, RS, Brazil.

Species identified	Florida M	Climax
	Number of identified yeasts	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	43	39
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	3	0
<i>Issatchenkia terricola</i>	0	5
<i>Issatchenkia hanoiensis</i>	0	3
<i>Candida oleophila</i>	NIP	NIP
<i>Candida asiática</i>	NIA	NIP
<i>Metschnikowia kunwiensis</i>	NIP	NIA
<i>Candida bentonensis</i>	NIP	NIA
<i>Candida quercitrusa</i>	NIP	NIA
<i>Candida sorboxylosa</i>	NIP	NIP
<i>Kazachstania intestinalis</i>	NIA	NIP

*NIP – No-identified by MALDI-TOF MS, but present in this blueberry variety.

*NIA – No-identified by MALDI-TOF MS and absent in this blueberry variety.

0 – Identified by MALDI-TOF MS and absent in this blueberry variety.

Table 2 Sizes in bp of the PCR amplified products of the ITS region and restriction fragments (bp) from the yeasts not identified by MALDI-TOF MS with endonucleases *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MboI* and *DdeI*.

Group	Yeast Strain*	Ap** (bp)	Restriction fragments					Identification
			<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>MboI</i>	<i>DdeI</i>	
G1	19 MFMF/14	350/380	140+130+80+60	220+75+50	190+100+80	-	-	<i>Candida soboxylosa</i> ¹
	39 MFMF/14							
	41 MFMF/14							
	42 MFMF/14							
	49 MFMF/14							
	55 MFMF/14							
	57 MFMF/14							
	75 MFMF/14							
99 MCMCF/14								
G2	20 MFMF/14	400	210+180	400	190+175	-	-	<i>Metschnikovia kunwiensis</i> ¹
G3	22 MFMF/14	400	300+70	180+130+110	250+175	-	-	<i>Candida bentonesis</i> ¹
G4	141 MCMCF/14	420	120+80+75+60+50	290+120	240+110+100	-	-	<i>Issatchenkia terricola</i> ²
G5	118 MCMCF/14	620	285+285	450+140+80	320	-	-	<i>Candida oleophila/C. railenensis</i> ¹
G6	36 MFMF/14	620	285+285	450+140+80	320+280	-	-	<i>Candida oleophila/C. railenensis</i> ¹
	56 MFMF/14							
	59 MFMF/14							
	63 MFMF/14							
G7	54 MFMF/14	620	290+200	450+140+80	310+310	-	-	<i>Candida quercitrusa</i> ¹
G8	79 MCMCF/14	750	-	-	-	400+350	300+180+80+50	<i>Hanseniaspora uvarum</i> ²
	82 MCMCF/14							
	83 MCMCF/14							
	105 MCMCF/14							
G9	133 MCMCF/14	750	-	-	-	400+350	300+180+80+50	<i>Candida asiatica</i> ¹
G10	91 MCMCF/14	750	210+150+130+90	670+80	390+350	400+230	750	<i>Kazachstania intestinalis</i> ¹

*MFMF/14 serie – Yeast strains isolated from Florida M variety.
MCMCF/14 serie – Yeast strains isolated from Climax variety.

**PCR amplified product

¹ Identified by genetic sequencing.

² Identified by PCR-RFLP.

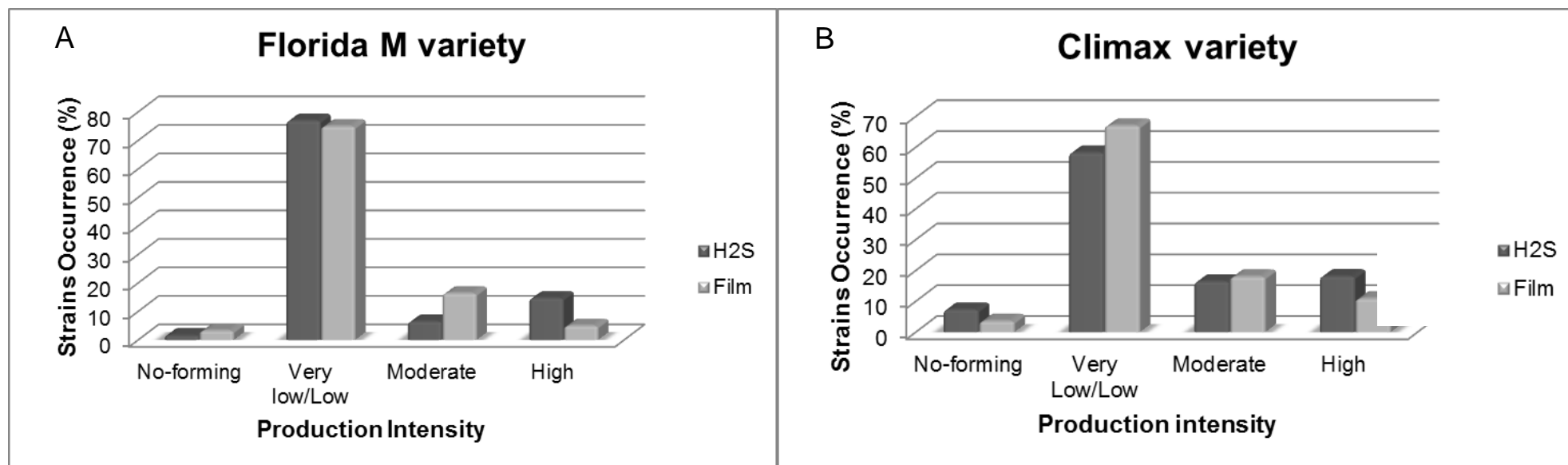


Fig. 1. Number of strains and H₂S production and film-forming intensity from Florida M (A) and Climax (B).

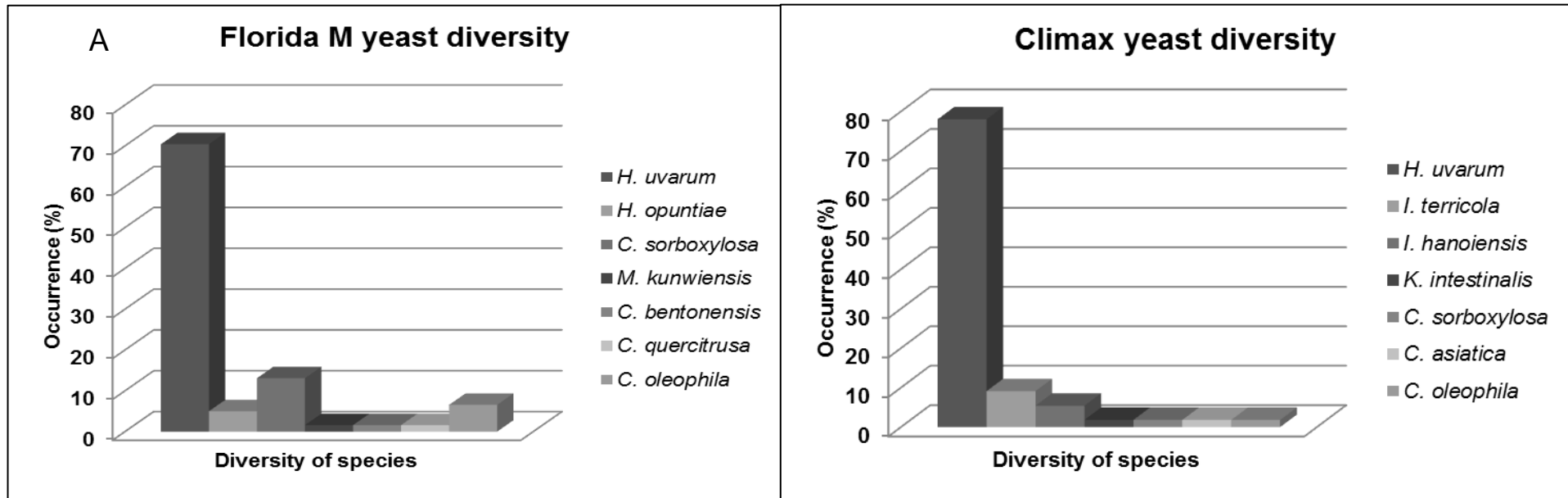


Fig. 2. Yeast species diversity isolated from Florida M (A) and Climax (B) varieties from Blueberry.

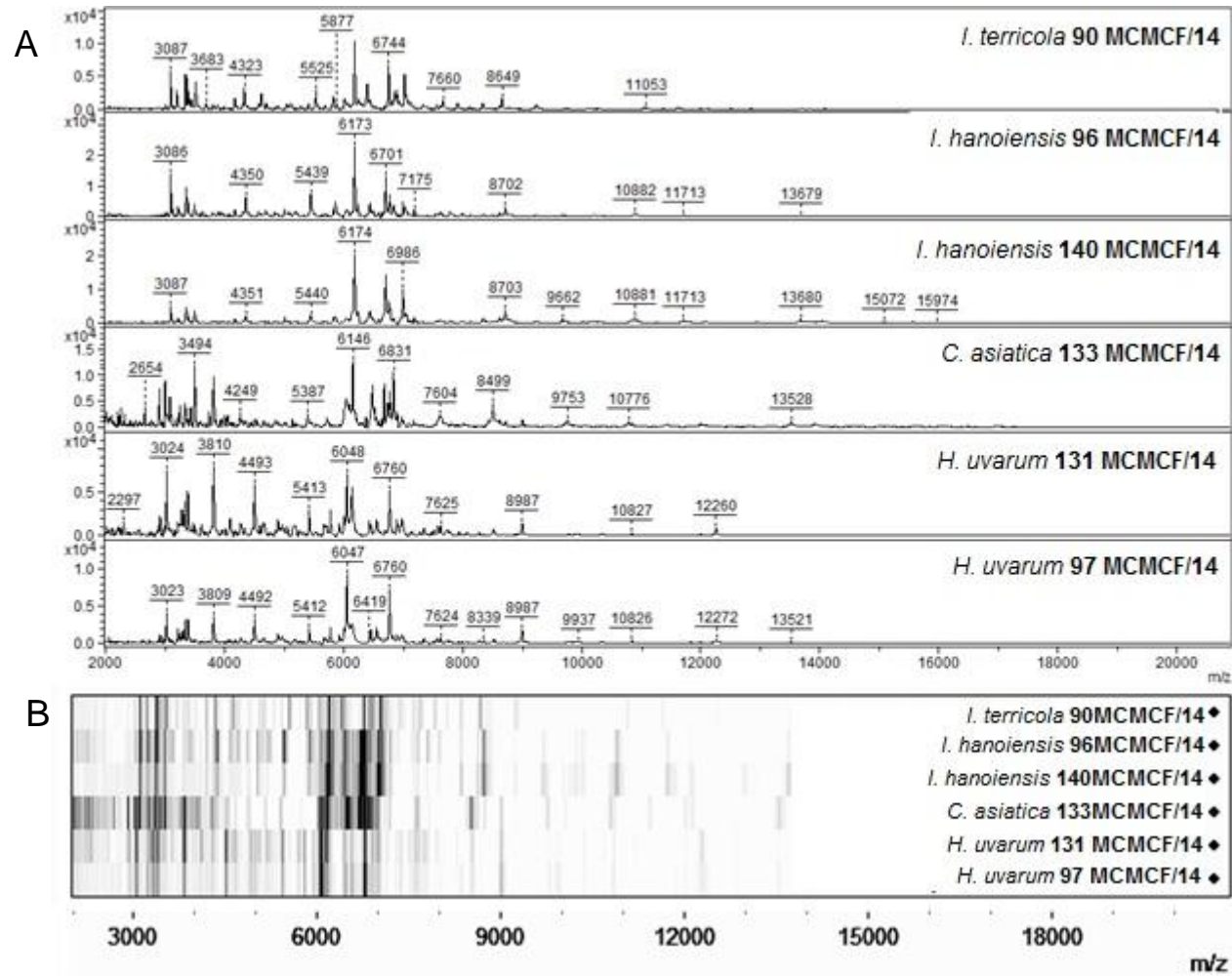


Fig. 3 Representative mass spectra (A) and representation in form of gel separation (B) of the comparison profile between *Issatchenkia terricola*, *Issatchenkia hanoiensis*, *Hanseniaspora uvarum* and *Candida asiatica* yeast species.

5 DISCUSSÃO GERAL

Do total de leveduras isoladas da cv. Florida M (61 leveduras), 46 pertencem ao gênero *Hanseniaspora* (43 – *H. uvarum* e três – *H. opuntiae*), 14 foram do gênero *Candida* (oito – *C. sorboxylosa*, quatro – *C. oleophila/C. railenensis*, uma – *C. bentonensis*, e uma – *C. quercitrusa*) e apenas uma do gênero *Metshnikowia* (*M. kunwiensis*). Esta última e as espécies *H. opuntiae*, *C. bentonensis* e *C. quercitrusa* foram encontradas exclusivamente nesta cultivar.

Na cultivar Climax, a espécie *Hanseniaspora uvarum* (43 linhagens) também foi predominante, representando cerca de 78% do total de 55 linhagens isoladas da superfície dessa cultivar. Foram encontradas cinco linhagens de *Issatchenkia terricola* e três linhagens de *Issatchenkia hanoiensis*. *Kazachstania intestinalis* ou *Kluyveromyces lodderae* (uma linhagem), *C. sorboxylosa* (uma linhagem), *C. oleophila* ou *C. railenensis* (uma linhagem) e *C. asiatica* (cinco linhagens). As duas variedades de mirtilo apresentaram a ocorrência da espécie *C. oleophila/railenensis*.

As linhagens desta espécie isoladas de diferentes cultivares, no entanto, mostraram variação com relação ao perfil de fragmentação. Houve diferença neste perfil quando utilizada a enzima *HinfI*, efetuado por PCR-RFLP, entre as linhagens *C. oleophila/railenensis* 118 MCMCF, isolada da variedade Climax e das linhagens *C. oleophila/railenensis* 36 MFMF/14, 56 MFMF/14, 59 MFMF/14 e 63 MFMF/14, isoladas da variedade Florida M, constatando-se, assim, uma variação de linhagens conforme a cultivar isolada.

Leveduras da espécie *S. cerevisiae* não foram encontradas em nenhuma das cultivares do mirtilo, no entanto, observou-se uma grande diversidade de espécies não-*Saccharomyces*. É esperado que leveduras não-*Saccharomyces* atuem nas fases iniciais da fermentação, pois os processos fermentativos realizados pela ação destas leveduras têm produzido bebidas alcoólicas de um teor máximo de álcool de 5%, visto que as mesmas apresentaram baixa tolerância ao etanol. Foi observado que leveduras fermentativas, como *S. cerevisiae*, habitam a superfície das uvas em pequenas quantidades, dificultando o processo de isolamento (CORDERO-BUESO et al., 2014a; FLEET, 2003). Le Jeune et al. (2006) observaram que *S. cerevisiae* envolvidas em fermentações espontâneas podem ser provenientes tanto dos

vinhedos quanto de utensílios e equipamentos utilizados na adega. Recentemente, há um crescente interesse na aplicação industrial de leveduras não-*Saccharomyces*. Acredita-se que a ação destas leveduras seja benéfica para as características sensoriais, devido à produção de metabólitos importantes, como glicerol, ácidos e ésteres que são importantes para o desenvolvimento de aromas (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1998; FLEET, 2003).

Observou-se que a diversidade de leveduras não está relacionada apenas com os diferentes locais onde se encontram, mas também com as diferentes cultivares de um mesmo local. Ao comparar as duas cultivares de mirtilo, observou-se que as espécies podem ser encontradas numa cultivar e não na outra. Apenas três espécies foram comuns as duas cultivares: *C. sorboxylosa*, *C. oleophila* e *H. uvarum*. Este fato pode estar relacionado às diferenças nas propriedades físico-químicas dessas cultivares, afetando a adaptação dessas leveduras selvagens (HONG & PARK, 2013). Além disso, foi constada uma variação intraespecífica na espécie *C. oleophila/railenensis* entre as duas cultivares do mirtilo. A mesma espécie apresentou diferentes linhagens, dependendo da cultivar de que foi isolada. Fato que pode ser observado pelos diferentes perfis de fragmentação obtidos. A variação na concentração e na diversidade de espécies presentes durante a fermentação pode ocorrer devido à diversos fatores, como localização geográfica, condições climáticas, tratamentos fitossanitários, técnicas durante a vinificação, entre outros (BARATA et al., 2012; CHAVAN et al., 2009).

Entre as linhagens isoladas da cultivar Florida M, não foram encontradas linhagens killer com relação à linhagem sensível *S. cerevisiae* EMBRAPA 26B e nem linhagens sensíveis ao fator killer em relação aos padrões *S. cerevisiae* K1 (Lallemand), *S. cerevisiae* EMBRAPA 1B e *S. cerevisiae* EMBRAPA 91B. Com relação às linhagens isoladas da cultivar Climax, a linhagem *C. asiatica* 133 MCMCF/14 foi a única linhagem que apresentou característica killer. Quando, no entanto, as leveduras, antes consideradas neutras, provenientes da cultivar Climax, foram testadas quanto à sensibilidade em relação à esta linhagem, o comportamento de quase todas as linhagens se modificou, tornando-se sensível perante ela. Isso pode ter ocorrido devido ao meio utilizado, o qual foi diferente do meio utilizado quando testadas as linhagens killer padrão K1 (Lallemand), EMBRAPA 1B e 91B.

Silva et al. (2011a) observaram comportamentos distintos em relação à sensibilidade ao utilizar meios diferentes para o teste de sensibilidade, o que corrobora com o que foi constatado neste estudo. Quando se trata da qualidade de

vinhos, é desejável que a levedura selecionada utilizada apresente fenótipo neutro. Assim, ela não eliminará leveduras que irão conferir aspectos importantes para a bebida fermentada, especialmente no que se refere à complexidade aromática (SILVA, 1996).

Todas as linhagens identificadas como sendo *I. terricola* (90 MCMCF/14, 95 MCMCF/14, 104 MCMCF/14, 134 MCMCF/14 e 141 MCMCF/14) isoladas da cultivar Climax, demonstraram alta produção de H₂S. Leveduras que formam esta película sobre a superfície dos vinhos são contaminantes comuns, podendo ser indicadores de higiene, as quais possuem a capacidade de produzir *off-flavours*. Elas podem afetar a qualidade das bebidas fermentadas e favorecer o crescimento de bactérias acéticas (LOUREIRO & MALFEITO-FERREIRA, 2003). Leveduras do gênero *Candida* são relatadas na literatura pela sua alta capacidade de formar filme, entretanto, esta característica parece não estar estritamente relacionada ao gênero, pois todas as linhagens pertencentes à espécie *C. oleophila* isoladas do mirtilo apresentaram baixa formação de filme e H₂S. Ainda, a linhagem 63 MFMF/14, pertencente a esta mesma espécie, não apresentou formação de filme.

Houve uma graduação de moderada a alta na produção de H₂S, representando 21 e 34% das linhagens isoladas das cultivares Florida M e Climax, respectivamente. A produção máxima de H₂S foi observada com as linhagens da espécie *I. terricola* e *C. sorboxylosa*. Nesta, 75% das linhagens tiveram nível máximo de produção deste composto. O processo de elaboração de fermentados de mirtilo, tanto da cultivar Florida M como da cultivar Climax, pode ser severamente afetado por este tipo de leveduras autóctones, devido a isso, leveduras que produzem este gás não devem ser utilizadas em processos fermentativos.

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) é um grande problema na produção de bebidas fermentadas, pois se pode obter um vinho com aromas indesejáveis, semelhante a ovos podres. A quantidade de H₂S produzido é dependente da linhagem de levedura, de precursores de enxofre, da taxa de crescimento da cultura e da atividade da enzima sulfito redutase (CORDENTE et al., 2012). Em relação ao perfil fermentativo encontrado nas leveduras, a liberação de CO₂ de todas as espécies encontrou-se bem inferior quando comparadas às leveduras de referência *S. cerevisiae* EMBRAPA 1VVT/97 e *S. cerevisiae* K1 (Lallemand), por se tratarem de leveduras não-*Saccharomyces*.

6 CONCLUSÕES

O estudo sobre a diversidade e caracterização de leveduras isoladas do mirtilo permitiu as seguintes conclusões:

- Sete espécies diferentes de levedura foram identificadas em cada cultivar de mirtilo analisada, sendo que três espécies foram comuns as duas cultivares, o que significa que a diversidade de leveduras não está somente relacionada ao local, mas também a diferentes substratos;
- As espécies *I. terricola*, *I. hanoiensis* e *C. sorboxylosa* podem conferir ao fermentado de mirtilo um produto de qualidade inferior, devido à alta produção de H₂S;
- A espécie *C. oleophila*/*C. railenensis* apresentou variação intraespecífica e espécies nas diferentes cultivares de mirtilo estudadas;
- A linhagem killer 133 MCMCF/14 não possui características adequadas para utilização em processo fermentativo, uma vez que apresenta alta produção de H₂S, moderada produção de filme e, ainda, por ser killer, poderá eliminar outras leveduras sensíveis desejáveis;
- As linhagens caracterizadas como neutras isoladas da cultivar Climax podem responder de maneira distinta quanto à sensibilidade a produção de fator killer e sensibilidade a este fator;
- Embora o processo fermentativo seja indesejavelmente afetado pela microbiota presente, há a possibilidade de utilização do mirtilo para a obtenção de outros produtos importantes, como sucos e geleias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUSTINI, B.C. **Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados suplementar fundamentado em espectrometria de massa MALDI-TOF.** 2014. 115 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2014.
- AGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH, C.; BONFIM, T. M. B.; DA SILVA, G. A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5645-5654, 2014.
- ANTUNES, L. E. C.; MADAIL, J. C. M. Mirtilo: uma oportunidade de negócios. 2007. Acesso em: 26 de agosto.
- ARROYO-LOPEZ, F. N.; SALVADO, Z.; TRONCHONI, J.; GUILLAMON, J. M.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. **Yeast**, v. 27, n. 12, p. 1005-15, 2010.
- BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 243-259, 2012.
- BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 235-252, 2004.
- BELY, M.; STOECKLE, P.; MASNEUF-POMAREDE, I.; DUBOURDIEU, D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 312-320, 2008.
- BEVAN, E. A.; MAKOVER, M. **The physiological basis of the killer character in yeast.** XIth International Congress of Genetics. Pergamon, Oxford, 1963. 202-203 p.
- BLASCO, L.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. FPGI, a gene involved in foam formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 28, n. 6, p. 437-451, 2011.
- BLASCO, L.; VINAS, M.; VILLA, T. G. Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast. **International Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 61-71, 2011.
- BOSTIAN, K. A.; ELLIOTT, Q.; BUSSEY, H.; BURN, V.; SMITH, A.; TIPPER, D. J. Sequence of the Preprotoxin Dsrna Gene of Type-I Killer Yeast - Multiple Processing Events Produce a 2-Component Toxin. **Cell**, v. 36, n. 3, p. 741-751, 1984.
- BOSTIAN, K. A.; HOPPER, J. E.; ROGERS, D. T.; TIPPER, D. J. Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. **Cell**, v. 19, n. 2, p. 403-414, 1980.
- BUSSEY, H.; SHERMAN, D. Yeast Killer Factor - Atp Leakage and Coordinate Inhibition of Macromolecular Synthesis in Sensitive Cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 298, n. 4, p. 868-875, 1973.
- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação e leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, v. 56, p. 207-216, 1999.

CADIERE, A.; AGUERA, E.; CAILLE, S.; ORTIZ-JULIEN, A.; DEQUIN, S. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution. **Food Microbiol**, v. 32, n. 2, p. 332-7, 2012.

CAPPELLO, M. S.; BLEVE, G.; GRIECO, F.; DELLAGLIO, F.; ZACHEO, G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. **Journal Applied Microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1274-80, 2004.

CARRASCO, P.; QUEROL, A.; DEL OLMO, M. L. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. **Archives of Microbiology**, v. 175, n. 6, p. 450-457, 2001.

CAVALIERI, D.; MCGOVERN, P. E.; HARTL, D. L.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. **Journal of Molecular Evolution**, v. 57, p. S226-S232, 2003.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; CREMONINI, L. C. M.; REGENFUSS, C. 'Killer' character of yeasts isolated from ethanolic fermentations. **Scientia Agricola**, v. 56, p. 631-635, 1999.

CHALUPOVA, J.; RAUS, M.; SEDLAROVA, M.; SEBELA, M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 230-41, 2014.

CHAVAN, P.; MANE, S.; KULKARNI, G.; SHAIKH, S.; GHORMADE, V.; NERKAR, D. P.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 801-8, 2009.

CHU, W.; CHEUNG, S. C. M.; LAU, R. A. W.; BENZIE, I. F. F. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). In: BENZIE, I. F. F. & WACHTEL-GALOR, S. (Ed.). **Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects**. 2nd. Boca Raton (FL), 2011. ISBN 9781439807132.

COMBINA, M.; MERCADO, L.; BORGIO, P.; ELIA, A.; JOFRE, V.; GANGA, A.; MARTINEZ, C.; CATANIA, C. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 5, p. 1055-61, 2005.

CORDENTE, A. G.; CURTIN, C. D.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S. Flavour-active wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 601-618, 2012.

CORDENTE, A. G.; HEINRICH, A.; PRETORIUS, I. S.; SWIEGERS, J. H. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. **Fems Yeast Research**, v. 9, n. 3, p. 446-59, 2009.

CORDERO-BUESO, G.; ARROYO, T.; SERRANO, A.; TELLO, J.; APORTA, I.; VELEZ, M. D.; VALERO, E. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 132-139, 2011.

CORDERO-BUESO, G.; ARROYO, T.; VALERO, E. A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 189-194, 2014a.

COUTO, M. M. B.; REIZINHO, R. G.; DUARTE, F. L. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 49-56, 2005.

CRAFACK, M.; MIKKELSEN, M. B.; SAERENS, S.; KNUDSEN, M.; BLENNOW, A.; LOWOR, S.; TAKRAMA, J.; SWIEGERS, J. H.; PETERSEN, G. B.; HEIMDAL, H.; NIELSEN, D. S. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a

defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 103-116, 2013.

CUINER, M. C. G., C.; Enquete sur la repartition des levures "killer" en France. **Vignes vins**, v. 318, p. 27, 1983.

DA SILVA, G. A.; POLETTO, C. M.; POLI, J. S.; VALENTE, P. Influence of *Brettanomyces custersianus* Upon the Activity of *Saccharomyces cerevisiae* Strains During the Tumultuous Phase of Vinification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 2, p. 347-356, 2011.

DELAPENA, P.; BARROS, F.; GASCON, S.; RAMOS, S.; LAZO, P. S. Primary Effects of Yeast Killer Toxin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 96, n. 2, p. 544-550, 1980.

DIGNARD, D.; WHITEWAY, M.; GERMAIN, D.; TESSIER, D.; THOMAS, D. Y. Expression in Yeast of a Cdna Copy of the K2 Killer Toxin Gene. **Molecular & General Genetics**, v. 227, n. 1, p. 127-136, 1991.

DINMAN, J. D.; ICHO, T.; WICKNER, R. B. 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 U S A**, v. 88, n. 1, p. 174-178, 1991.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; DE MELO PEREIRA, G. V.; GERVASIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 557-69, 2009.

EGLI, C. M.; EDINGER, W. D.; MITRAKUL, C. M.; HENICK-KLING, T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 5, p. 779-89, 1998.

EL-BANNA, A. A. M., A.; SHEHATA, M.G. Yeasts Producing Killer Toxins: An Overview. **Alex. J. Fd. Sci. & Technol.**, v. 8, n. 1, p. 53, 2011.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49 Pt 1, p. 329-37, 1999.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; GOSTINCAR, A.; BOBET, R.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedes' area (Spain). **Food Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 553-562, 2000.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; MANZANARES, P.; RAMON, D.; QUEROL, A. The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. **International Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 143-8, 1998.

FACCHINELLO, J. C. **Mirtilo**. Revista Brasileira de Fruticultura. v. 30: 285-576 p. 2008.

FEDRIZZI, B.; MAGNO, F.; BADOCCO, D.; NICOLINI, G.; VERSINI, G. Aging effects and grape variety dependence on the content of sulfur volatiles in wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10880-10887, 2007.

FERNANDES, A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺ ATPase da membrana plasmática**. 2008. Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

- FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 11-22, 2003.
- FOLCH-MALLOL, J. L. G.-A., A.; LLEDIAS, F. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v. 46, n. 1-2, p. 46, 2004.
- GONZALEZ, S. S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 1018-25, 2007.
- GUIJO, S.; MAURICIO, J. C.; SALMON, J. M.; ORTEGA, J. M. Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and 'flor' film ageing of dry sherry-type wines. **Yeast**, v. 13, n. 2, p. 101-117, 1997.
- GUTIERREZ, P.; ROLDAN, A.; CARO, I.; PEREZ, L. Kinetic study of the velum formation by *Saccharomyces cerevisiae* (beticus ssp.) during the biological aging of wines. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 493-499, 2010.
- HAYASHI, N.; ARAI, R.; TADA, S.; TAGUCHI, H.; OGAWA, Y. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. **Food Microbiology**, v. 24, n. 7-8, p. 778-85, 2007.
- HEARD, G. M.; FLEET, G. H. Occurrence and Growth of Killer Yeasts during Wine Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 2171-2174, 1987.
- HONG, Y. A.; PARK, H. D. Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 207-214, 2013.
- HUGENHOLTZ, J. Traditional biotechnology for new foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 155-9, 2013.
- HUGHES, K. W.; PETERSEN, R. H.; LICKEY, E. B. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. **New Phytologist**, v. 182, n. 4, p. 795-798, 2009.
- ICHO, T.; WICKNER, R. B. The Double-Stranded-Rna Genome of Yeast Virus L-a Encodes Its Own Putative Rna-Polymerase by Fusing 2 Open Reading Frames. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 12, p. 6716-6723, 1989.
- ISAEVA, O. V.; GLUSHAKOVA, A. M.; YURKOV, A. M.; CHERNOV, I. Y. The yeast *Candida railenensis* in the fruits of English oak (*Quercus robur* L.). **Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 355-359, 2009.
- ISHIGAMI, M.; NAKAGAWA, Y.; HAYAKAWA, M.; IIMURA, Y. FLO11 is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of NRG1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Lett**, v. 237, n. 2, p. 425-430, 2004.
- IVORRA, C.; PEREZ-ORTIN, J. E.; DEL OLMO, M. L. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnology Bioeng**, v. 64, n. 6, p. 698-708, 1999.
- JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Regulation of Hydrogen-Sulfide Liberation in Wine-Producing *Saccharomyces-Cerevisiae* Strains by Assimilable Nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 461-467, 1995.

JOLLY, N. P. The Effect of Non-Saccharomyces Yeasts on Fermentation and Wine Quality. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, n. 2, p. 62, 2003.

JOLLY, N. P.; O.P.H.; A.; I.S, P. The Effect of Non-Saccharomyces Yeasts on Fermentation and Wine Quality. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. v. 24, n. n. 2, p. p. 55-62, 2003.

JOSEPA, S.; GUILLAMON, J. M.; CANO, J. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus* *Saccharomyces pastorianus* using specific primers. **FEMS Microbiol Lett**, v. 193, n. 2, p. 255-259, 2000.

JOSEPH, J. A.; DENISOVA, N. A.; ARENDASH, G.; GORDON, M.; DIAMOND, D.; SHUKITT-HALE, B.; MORGAN, D. Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. **Nutr Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 153-62, 2003.

KAPSOPOULOU, K.; BAROUTI, E.; MAKRIONITI, A.; KOSTAKI, K. Occurrence of *Saccharomyces cerevisiae* killer yeasts in wine-producing areas of Greece. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1967-1971, 2008.

LATOUCHE, G. N.; DANIEL, H. M.; LEE, O. C.; MITCHELL, T. G.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. **Journal Clinical Microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3171-3180, 1997.

LE JEUNE, C.; ERNY, C.; DEMUYTER, C.; LOLLIER, M. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. **Food Microbiology**, v. 23, n. 8, p. 709-16, 2006.

LOIRA, I.; VEJARANO, R.; BAÑUELOS, M. A.; MORATA, A.; TESFAYE, W.; UTHURRY, C.; VILLA, A.; CINTORA, I.; SUÁREZ-LEPE, J. A. Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, Part 1, p. 915-922, 2014.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 23-50, 2003.

MAGLIANI, W.; CONTI, S.; GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 369-8, 1997.

MALHERBE, S. **Investigation of the impact of commercial malolactic fermentation starter cultures on red wine aroma compounds, sensory properties and consumer preference**. 2011. 121 PhD (PhD). Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch University, Stellenbosch, África do Sul.

MAQUEDA, M.; ZAMORA, E.; ALVAREZ, M. L.; RAMIREZ, M. 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**, v. 78, n. 3, p. 735-743, 2012.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M. Biology of killer yeasts. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 65-71, 2002.

MARTZ, F.; JAAKOLA, L.; JULKUNEN-TIITTO, R.; STARK, S. Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in Northern Europe following

foliar development and along environmental gradients. **Journal of Chemistry Ecology**, v. 36, n. 9, p. 1017-28, 2010.

MCGOVERN, P. E.; ZHANG, J.; TANG, J.; ZHANG, Z.; HALL, G. R.; MOREAU, R. A.; NUNEZ, A.; BUTRYM, E. D.; RICHARDS, M. P.; WANG, C. S.; CHENG, G.; ZHAO, Z.; WANG, C. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 51, p. 17593-8, 2004.

MEDINA, K.; CARRAU, F. M.; GIOIA, O.; BRACESCO, N. Nitrogen availability of grape juice limits killer yeast growth and fermentation activity during mixed-culture fermentation with sensitive commercial yeast strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2821-2825, 1997.

MILLAN, M. C.; MORENO, J.; MEDINA, M.; ORTEGA, J. M. Influence of the physiological state of the inoculum on fermentation of musts from Pedro Ximenez grapes by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbios**, v. 65, n. 263, p. 87-95, 1991.

MOOTHOO-PADAYACHIE, A.; KANDAPPA, H. R.; KRISHNA, S. B. N.; MAIER, T.; GOVENDER, P. Biotyping *Saccharomyces cerevisiae* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 2, p. 351-364, 2013.

MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. On the origins of wine yeast. **Research Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 199-204, 1999.

NAKAGAWA, Y.; TODA, Y.; YAMAMURA, H.; HAYAKAWA, M.; IIMURA, Y. FLO11 is essential for pellicle formation by wild pellicle-forming yeasts isolated from contaminated wines. **Journal of Bioscience Bioeng**, v. 111, n. 1, p. 7-9, 2011.

NELSON, D. L. C., M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. p.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 2, p. 278, 2005.

NOVOTNÁ, D.; FLEGELOVÁ, H.; JANDEROVÁ, B. Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Yeast Research**, v. 4, n. 8, p. 803-813, 2004.

NOWAK, A.; KUSEWICZ, D.; KALINOWSKA, H.; TURKIEWICZ, M.; PATELSKI, P. Production of H₂S and properties of sulfite reductase from selected strains of wine-producing yeasts. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 1, p. 84-89, 2004.

PARK, S. K. Development of a method to measure hydrogen sulfide in wine fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 1550-1554, 2008.

PEREZGONZALEZ, J. A.; GONZALEZ, R.; QUEROL, A.; SENDRA, J.; RAMON, D. Construction of a Recombinant Wine Yeast-Strain Expressing Beta-(1,4)-Endoglucanase and Its Use in Microvinification Processes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2801-2806, 1993.

PHAFF, H. J. M., M.W.; MRAK, E.M. **The life of yeasts**. Cambridge and London: Harvard University Press, 1978. p.

PHILLISKIRK, G.; YOUNG, T. W. Occurrence of Killer Character in Yeasts of Various Genera. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 147-151, 1975.

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

RAMOS, J. A. **Identificação molecular de populações de *Saccharomyces cerevisiae* em destilarias de cachaça no Estado de Pernambuco**. 2009. Monografia (Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C. **A cultura do mirtilo**. Embrapa Clima Temperado. Pelotas: 67 p. p. 2004.

RENOUF, V.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 3, p. 316-327, 2005.

RENOUF, V.; STREHAIANO, P.; LONVAUD-FUNEL, A. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. **Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin**, v. 41, n. 1, p. 51-61, 2007.

RODRIGUEZ-COUSINO, N.; MAQUEDA, M.; AMBRONA, J.; ZAMORA, E.; ESTEBAN, R.; RAMIREZ, M. A New Wine *Saccharomyces cerevisiae* Killer Toxin (Klus), Encoded by a Double-Stranded RNA Virus, with Broad Antifungal Activity Is Evolutionarily Related to a Chromosomal Host Gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1822-1832, 2011.

RODRIGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; BARBAGELATA, R. J.; BARDA, N. B.; CABALLERO, A. C. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 19-25, 2010.

SABATE, J.; CANO, J.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; GUILLAMON, J. M. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. **Microbiological Research**, v. 157, n. 4, p. 267-274, 2002.

SABATE, J.; CANO, J.; QUEROL, A.; GUILLAMON, J. M. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 452-5, 1998.

SAIGUSA, N.; KAWASHIMA, N.; OHBA, R. Maintaining the anthocyanin content and improvement of the aroma of an alcoholic fermented beverage produced from raw purple-fleshed sweet potato. **Food Science and Technology Research**, v. 13, n. 1, p. 23-27, 2007.

SANDHU, D. K. J., V. K. **Technology, quality and scope of fruit wines especially Apple beverages**. New Delhi: Indian Food Industry, 1995. p.

SANNI, A. I.; LONNER, C. Identification of Yeasts Isolated from Nigerian Traditional Alcoholic Beverages. **Food Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 517-523, 1993.

SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Study of Some Characteristics of Newly Isolated Killer Yeast. **Revista De Microbiologia**, v. 24, n. 1, p. 71-72, 1993.

SATORA, P.; TUSZYNSKI, T. Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 418-424, 2010.

SCACCO, A.; OLIVA, D.; DI MAIO, S.; POLIZZOTTO, G.; GENNA, G.; TRIPODI, G.; LANZA, C. M.; VERZERA, A. Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains and their influence on the quality of Cataratto, Inzolia and Grillo white wines. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 2012.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 212-221, 2006.

SCHMITT, M. J.; KLAVEHN, P.; WANG, J.; SCHONIG, I.; TIPPER, D. J. Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. **Microbiology**, v. 142 (Pt 9), p. 2655-62, 1996.

SCHMITT, M. J.; TIPPER, D. J. K28, a Unique Double-Stranded-Rna Killer Virus of *Saccharomyces-Cerevisiae*. **Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 9, p. 4807-4815, 1990.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P. E.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 4, p. 543-51, 2009.

SILVA, G. A. **Elaboração de Vinhos: Aspectos Microbiológicos**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2003.

SILVA, G. A. 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**, v. 46, p. 121, 1996.

SILVA, G. A., POLI, J. S., POLETTO, C. M., SCHAKER, P.D.C, VALENTE, P. Production of functional killer protein in batch cultures upon a shift from aerobic to anaerobic conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 612, 2011.

SILVA, G. A.; SILVA, M. A. A. Determinação Qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio. In: (Ed.). **Tecnologias geradas pelo sistema EMBRAPA**. Bento Gonçalves, RS: UEPAE de Bento Gonçalves 1984.

SILVA, G. A. D.; POLETTO, C. M.; POLI, J. S.; VALENTE, P. Influence of *Brettanomyces custersianus* upon the activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the tumultuous phase of vinification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 347-356, 2011.

STRINGINI, M.; COMITINI, F.; TACCARI, M.; CIANI, M. Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 184-9, 2008.

STROPPIA, C. T. A., S.R.; ANDRIETTA, M.G.R. **Caracterização de leveduras floculantes selecionadas em reator tipo torre em uma unidade de fermentação alcoólica**. SINFERM. Florianópolis. 2003, 2003. p.

SWAIN, M. R.; ANANDHARAJ, M.; RAY, R. C.; PARVEEN RANI, R. Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. **Biotechnology Research International**, v. 2014, p. 250424, 2014.

TERCERO, J. C.; RILES, L. E.; WICKNER, R. B. Localized Mutagenesis and Evidence for Posttranscriptional Regulation of Mak3 - a Putative N-Acetyltransferase Required for Double-Stranded-Rna Virus Propagation in *Saccharomyces-Cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 28, p. 20270-20276, 1992.

TOMMASINO, M.; RICCI, S.;GALEOTTI, C. L. Genome Organization of the Killer Plasmid P_{gk12} from *Kluyveromyces-Lactis*. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 13, p. 5863-5878, 1988.

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

TOSTA, C. D. **Biotipagem de leveduras industriais através do sistema killer**. 2004. 78 Dissertação de Mestrado (Maister). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba, SP.

TOURNAS, V. H.;KATSLOUDAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 11-7, 2005.

TRISTEZZA, M.; VETRANO, C.; BLEVE, G.; SPANO, G.; CAPOZZI, V.; LOGRIECO, A.; MITA, G.;GRIECO, F. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 335-42, 2013.

VEZINHET, F.; HALLET, J. N.; VALADE, M.;POULARD, A. Ecological Survey of Wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, n. 1, p. 83-86, 1992.

VIAN, M. L. **Análise físico-química, sensorial e capacidade antioxidante de fermentado de mirtilo**. 2011. 40 p. Monografia (Graduação). Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.;TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.;GELFAND, D., *et al* (Ed.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**: Academic Press, 1990. p.315-322.

WICKNER, R. B. The killer double-stranded RNA plasmids of yeast. **Plasmid**, v. 2, n. 3, p. 303-322, 1979.

WICKNER, R. B.; ICHO, T.; FUJIMURA, T.;WIDNER, W. R. Expression of Yeast L-a Double-Stranded-Rna Virus Proteins Produces Derepressed Replication - a Ski- Phenocopy. **Journal of Virology**, v. 65, n. 1, p. 155-161, 1991.

WINTER, G.; HENSCHKE, P. A.; HIGGINS, V. J.; UGLIANO, M.;CURTIN, C. D. Effects of rehydration nutrients on H₂S metabolism and formation of volatile sulfur compounds by the wine yeast VL3. **AMB Express**, v. 1, p. 36, 2011.

WOODS, D. R.;BEVAN, E. A. Studies on Nature of Killer Factor Produced by *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 51, p. 115-&, 1968.

XIAO, M.; WANG, H.; LU, J.; CHEN, S. C.; KONG, F.; MA, X. J.;XU, Y. C. Three clustered cases of candidemia caused by *Candida quercitrusa* and mycological characteristics of this novel species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 3044-8, 2014.

YADAV, N. K.;GUPTA, K. G. Acetoin & diacetyl production by yeasts. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 13, n. 6, p. 586-8, 1975.

YOU, Q.; WANG, B. W.; CHEN, F.; HUANG, Z. L.; WANG, X.;LUO, P. G. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 201-208, 2011.

YOUNG, T. W. **The yeasts**. New York: Academic Press, 1987. p.

YOUNG, T. W.; YAGIU, M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 44, n. 1, p. 59-77, 1978.

ZAGORC, T.; MARAZ, A.; CADEZ, N.; JEMEC, K. P.; PETER, G.; RESNIK, M.; NEMANIC, J.; RASPOR, P. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 441-451, 2001.

ZAMBONELLI, C. **Microbiologia e biotecnologia dei vini**. Bologna: Edagricole, 2003. p.

ZARA, S.; FARRIS, G. A.; BUDRONI, M.; BAKALINSKY, A. T. HSP12 is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S-cerevisiae*. **Yeast**, v. 19, n. 3, p. 269-276, 2002.