

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Variabilidade genética de *Saccharomyces cerevisiae* detectada
por RAPD e caracterização de leveduras isoladas de cultivares
de uvas brancas da região de Farroupilha - RS**

SHEILA CANOSSA

Porto Alegre

2015

SHEILA CANOSSA

Variabilidade genética de *Saccharomyces cerevisiae* detectada por RAPD e caracterização de leveduras isoladas de cultivares de uvas brancas da região de Farroupilha - RS

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Tecnologia e Ciência dos Alimentos.

Orientador: Dr. Vitor Manfroi

Co-orientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Canossa, Sheila

Variabilidade genética de *Saccharomyces cerevisiae* detectada por RAPD e caracterização de leveduras isoladas de cultivares de uvas brancas da região de Farroupilha-RS / Sheila Canossa. -- 2015. 79 f.

Orientador: Vitor Manfroi.

Coorientador: Gildo Almeida da Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. PCR-RAPD. 2. Isolamento. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Manfroi, Vitor, orient. II. Almeida da Silva, Gildo, coorient. III. Título.

SHEILA CANOSSA

Variabilidade genética de *Saccharomyces cerevisiae* detectada por RAPD e caracterização de leveduras isoladas de cultivares de uvas brancas da região de Farroupilha - RS

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Tecnologia e Ciência dos Alimentos.

Aprovado em __/__/__

Orientador: Dr. Vitor Manfroi

Co-orientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Universidade Federal do Rio grande do Sul-UFRGS

Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Universidade Federal do Rio grande do Sul-UFRGS

Prof. Dr^a. Tais Letícia Bernardi

Instituto Federal do Rio Grande do Sul- IFRS- Campus Sertão

Porto Alegre

2015

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

A transformação do mosto de uva em vinho envolve uma série de ações combinadas de diferentes gêneros e espécies de microrganismos. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* domina a fase intermediária e a fase final da fermentação alcoólica. De modo geral, as leveduras enológicas podem ser caracterizadas pela capacidade fermentativa, produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio) e seu comportamento killer. A Embrapa uva e vinho possui em sua Coleção, diversas leveduras autóctones isoladas de bagas de uvas oriundas de diversas regiões do Brasil. Entretanto, a diversidade genética destes isolados não é conhecida. Neste estudo foram avaliados a capacidade fermentativa, formação de H₂S, fator killer e sensibilidade ao fator killer de 150 leveduras provenientes das cultivares Malvasia Bianca (FMB14), Moscato Alexandria (FMA14) e Moscato Tradicional (MBTF14) todas oriundas da região de Farroupilha- RS. A capacidade fermentativa foi avaliada juntamente com a formação de H₂S, inoculando as leveduras em meio mosto sulfito. Os testes ao fator killer e sensibilidade ao fator killer foram avaliados através do meio Lorena/ELNC (80:20). As linhagens com perfil para elaboração de vinhos e produtoras da toxina killer foram identificadas por amplificação da região ITS1- 5.S- ITS2 por PCR e por PCR-RFLP. Foi avaliada também a diversidade genética de 23 linhagens da espécie de *Saccharomyces cerevisiae* da Coleção da Embrapa Uva e Vinho, usando a técnica de PCR-RAPD. Foram empregados para detectar a variabilidade genética das leveduras os oligonucleotídeos iniciadores: (GTG)₅, (GAC)₅, (GACA)₄ e M13. Os resultados mostraram que a maioria das linhagens apresentaram baixa velocidade fermentativa aliada à diferentes níveis de produção de H₂S. Somente 3 linhagens apresentaram capacidade fermentativa adequada quando comparadas com as linhagens de referência 1vvt/97 e K1, quais sejam, 29MBF14, 39MBTF14 e 50MBF14. Apenas a linhagem 29MBTF4 formou pequenas quantidades de H₂S. Verificou-se que 64% das linhagens isoladas mostraram-se metabolicamente capazes de biossintetizar H₂S. Somente 9,33% apresentaram comportamento killer e apenas 6,66% mostraram sensibilidade à proteína killer. Os resultados apresentados sugerem ter relação com as cultivares utilizadas no isolamento. Verificou-se a existência de diferenças genéticas entre as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* estudadas com todos os iniciadores utilizados. Os iniciadores que mais discriminaram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram (GTG)₅ e (GAC)₅.

ABSTRACT

Grape must conversion into wine involve combined actions of different genus and species of microorganism. The species *Saccharomyces cerevisiae* dominates intermediate and final stages of alcoholic fermentation. Generally, the oenological yeasts are characterized by their fermentative capacity, production of H₂S (hydrogen sulfide) and killer behavior. Embrapa Grape and Wine has a Yeast Collection that encompasses many autochthonous strains isolated of grape berries from different regions of Brazil. However, the genetic diversity of these yeasts are stilling known. This study has evaluated the fermentative capacity, production of H₂S, killer factor and killer factor sensibility of 150 yeasts isolated from the cultivars Malvasia Bianca (FMB14), Moscato Alexandria (FMA14) and Moscato Tradicional (MBTF14) all belonging from Farroupilha commune in Rio Grande do Sul State. The fermentative capacity has been tested along with the evaluation of H₂S production by the inoculation of the yeasts in sulfite must medium. The production and detection of factor killer and the evaluation of sensitive characteristics have been measured in Lorena/ELNC (80:20) solid medium. Yeasts with optimal fermentative characteristics and the ones producing killer toxin have been identified by amplification of ITS1-5.8S-ITS2 region by PCR -RFPL. This study also has evaluated the genetic diversity of 23 yeasts strains of *Saccharomyces cerevisiae*, belonging to the Yeast Collection of Embrapa Grape and Wine, employing PCR-RAPD technique. The primers (GTG)₅, (GAC)₅, (GACA)₄ and M13 have been used to detect the yeasts genetic diversity. The results showed that the majority of the yeasts analyzed have demonstrated low fermentative velocity combined with different levels of H₂S production. From the three cultivars analyzed, only Moscato Tradicional showed yeasts with a suitable fermentative capacity when compared to the reference yeasts EMBRAPA 1vvt97 e K1, and they were named as 29MBF14, 39MBTF14 and 50MBF14. It was verified that 84%, 76% and 36% of the isolated strains from Malvasia Bianca, Moscato Tradicional and Moscato Alexandria, respectively, were capable to biosynthesize H₂S. Concerning to killer behavior, 14%, 12% and 2% of the isolated strains from Moscato Tradicional, Moscato Alexandria and Malvasia Bianca, respectively, were capable of producing killer factor. These outcomes suggest the influence of the cultivar into the microflora biodiversity. Genetic differences were also demonstrated between the strains of *Saccharomyces cerevisiae* for all the primers tested. Primers GTG₅ and GAC₅ were the most discriminative.

Keywords: selected *Saccharomyces cerevisiae* yeasts; PCR-RAP, killer factor.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências e Tecnologia dos Alimentos pela oportunidade e a todos professores pelo aprendizado.

À FAPERGS pelo auxílio financeiro.

Professor Dr Vitor Manfroi, meu orientador, obrigada pela oportunidade, pelas ajudas, pela sua orientação, pela amizade, por não medir esforços e me auxiliar em tudo. Principalmente pelo exemplo de ser humano. Obrigada por tudo.

Pesquisador da Embrapa, Dr. Gildo, meu co-orientador pelos ensinamentos, pela oportunidade de estágio e pela orientação. Por explicar e sanar minhas dúvidas em todos os momentos, por me aconselhar, me guiar, pela sua amizade, respeito, pelo seu esforço em me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada pela oportunidade, por acreditar no meu potencial. Obrigada por tudo.

Ao meu pai, Adelar Canossa, pelas inúmeras esperas, pelas ajudas, compreensão, por me dar força, pela educação, por acreditar nos meus ideais e ser meu exemplo de ser humano! Obrigada!

A Denilze Canossa minha mãe, meu grande exemplo de persistência, obrigada pelo amor, carinho, incentivo, pela vida, pela educação, compreensão, pelo conforto em momentos difíceis, pelo teu abraço e por acreditar em meus ideais. Você é meu exemplo!

Ao meu namorado Eduardo Bridi pelo apoio e compreensão. Por compreender minha ausência por inúmeras vezes, por ser meu ombro amigo. Com você ao meu lado tudo foi mais fácil. Obrigada por tudo.

As colegas de laboratório Maria Antonieta (querida Chica), Marlova, Breno, Jessica, Fernanda, Bruna Agustini pela amizade, momentos de alegria e auxílio nos experimentos. Obrigada pela amizade!

A Bruna Dachery pelas experiências trocadas, pelas inúmeras ajudas, por me escutar em momentos difíceis que tive durante minha caminhada. Obrigada por ser minha amiga verdadeira!

Agradeço a Tais Leticia Bernardi pelo auxílio e por compartilhar seus ensinamentos, sempre em prontidão para ajudar. E acima de tudo pela sua amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realizar o Mestrado e aprendizado com qualidade.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa- por abrir as portas para a realização do meu projeto final.

A todas as pessoas que de alguma forma estiveram ao meu lado em momentos difíceis e na realização deste trabalho.

E acima de tudo a Deus. Pois ele quem me dá forças para continuar.

Muito Obrigada!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 OBJETIVOS GERAIS	2
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1 ORIGEM VIDEIRAS.....	3
3.2 AGENTES TRANSFORMANTES- LEVEDURAS	4
3.3 IMPORTANCIA DA UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS SELECIONADAS NA ELABORAÇÃO DE VINHO.....	5
3.4 CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS AUTÓCTONES	7
3.4.1 <i>Capacidade fermentativa</i>	7
3.4.2 <i>Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)</i>	9
3.4.3 <i>Fator Killer</i>	12
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS	15
3.5.1 <i>PCR</i>	15
3.5.2 <i>PCR-RFLP</i>	16
3.5.3 <i>DIFERENCIAÇÃO DE LINHAGENS POR RAPD</i>	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 COLETA DAS UVAS	20
4.2 PRESERVAÇÃO	20
4.3 LINHAGENS PADRÃO	21
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS ISOLADAS	22
4.4.1 <i>Teste da capacidade fermentativa</i>	22
4.4.2 <i>Acompanhamento da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)</i>	22
4.4.3 <i>Detecção de fator Killer e sensibilidade ao fator killer</i>	22
4.4.4 <i>Teste sensibilidade Killer/Killer</i>	23
4.4.5 <i>Identificação taxonômica de linhagens fermentescíveis e linhagens Killer por PCR-RFLP</i>	23
4.7 VARIABILIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS UTILIZANDO PCR-RAPD	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25

5.2 TESTE DE VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO	25
5.2 PRODUÇÃO DE H ₂ S.....	28
5.4 DETECÇÃO PROTEÍNA KILLER.....	33
5.5 SENSIBILIDADE E NEUTRALIDADE AO FATOR KILLER	34
5.6 SENSIBILIDADE KILLER/KILLER.....	36
5.7 IDENTIFICAÇÕES DAS LINHAGENS POR PCR-RFLP	37
5.8 DIVERSIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> POR PCR-RAPD	42
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. FASES CRESCIMENTO CELULAR DAS LEVEDURAS.....	9
FIGURA 2. ROTA METABÓLICA DA PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO DE LEVEDURAS	12
FIGURA 3. RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)	19
FIGURA 4. NÍVEIS DA PRODUÇÃO DE H ₂ S: “+++” ALTA PRODUÇÃO DE H ₂ S; “++” MÉDIA PRODUÇÃO, “+” BAIXA PRODUÇÃO E “-“ NENHUMA PRODUÇÃO.....	29
FIGURA 5. HALO DE MORTE PROVOCADO POR ALGUMAS DAS LEVEDURAS ISOLADAS NA LINHAGEM EMBRAPA 26B.	33
FIGURA 6. ALGUMAS LINHAGENS SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS AO FATOR KILLER.....	35
FIGURA 7. GEL AGAROSE 1,5% DAS LINHAGENS QUE APRESENTARAM POTENCIAL FERMENTATIVO COM OS INICIADORES ITS1 E ITS4.....	37
FIGURA 8. PERFIL ELETROFORETICO DA REGIÃO RDNA ITS1-5.8S-ITS2 AMPLIFICADA COM OS PRIMERS ITS1 E ITS4 DAS LINHAGENS KILLER ISOLADAS DA REGIÃO DE FARROUPILHA- RS.....	39
FIGURA 9. PERFIL ELETROFORETICO DA REGIÃO RDNA ITS1-5.8S-ITS2 AMPLIFICADA COM OS PRIMERS 28CANDIV3 E 28CANDIV 4 E ITS1 E ITS4 DAS LINHAGENS KILLER ISOLADAS DA REGIÃO DE FARROUPILHA- RS.....	39
FIGURA 10. PERFIS DOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO CFOI, HINFI E DDEI.	40
FIGURA 11. FOTO GEL DE AGAROSE 1,5% UTILIZANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 E 28CANDIV 3 E 28CANDIV 4.	41
FIGURA 12. PERFIL ELETROFORETICO UTILIZANDO O INICIADOR (GTG) ₅	44
FIGURA 13. DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UTILIZANDO O INICIADOR (GTG) ₅	44
FIGURA 14. PERFIL ELETROFORETICO UTILIZANDO O INICIADOR (GAC) ₅	45
Figura 15. DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UTILIZANDO O INICIADOR (GAC) ₅	45
FIGURA 16. PERFIL ELETROFORETICO UTILIZANDO O INICIADOR M13	46

FIGURA 17. DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UTILIZANDO O INICIADOR M13	46
FIGURA 18. PERFIL ELETROFORETICO UTILIZANDO O INICIADOR (GACA) ₄	47
FIGURA 19. DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UTILIZANDO O INICIADOR (GACA) ₄	47
FIGURA 20. PERFIL ELETROFORETICO DAS LINHAGENS PADRÃO UTILIZANDO O INICIADOR M13	48
FIGURA 21. PERFIL ELETROFORETICO DAS LINHAGENS PADRÃO UTILIZANDO OS INICIADORES (GTG) ₅ , (GAC) ₅ E (GACA) ₄	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PANORAMA GERAL DAS LINHAGENS KILLER, NEUTRA E SENSÍVEL ISOLADAS DA REGIÃO DE FARROUPILHA-RS	35
TABELA 2. LINHAGENS QUE APRESENTARAM FATOR KILLER POSITIVO SOBRE A LINHAGEM EMBRAPA 91B.	36
TABELA 3. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS FERMENTESCÍVEIS ISOLADAS DA CULTIVAR MOSCATO TRADICIOONAL.	38
TABELA 4. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS KILLER DAS LINHAGENS ISOLADAS DE FARROUPILA.	41

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. EVOLUÇÃO DE CO ₂ DAS LINHAGENS DA CULTIVAR MOSCATO TRADICIONAL, COMPARANDO COM AS LINHAGENS PADRÃO 1VVT/97 E K1.	27
GRÁFICO 2. VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LINHAGENS MAIS PROMISSORAS ISOLADAS DA CULTIVAR MOSCATO TRADICIONAL.....	28
GRÁFICO 3. PRODUÇÃO DE H ₂ S DAS LINHAGENS ISOLADAS EM FARROUPILHA/RS.	29
GRÁFICO 4. NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H ₂ S DAS LINHAGENS DA CULTIVAR MALVASIA BIANCA.....	31
GRÁFICO 5. NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H ₂ S DAS LINHAGENS DA CULTIVAR MOSCATO ALEXANDRIA.	31
GRÁFICO 6. NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H ₂ S DAS LINHAGENS DA CULTIVAR MOSCATO TRADICIONAL.	32
GRÁFICO 7. PORCENTAGEM DE LINHAGENS ISOLADAS DE CADA CULTIVAR EM RELAÇÃO A PRODUÇÃO DE H ₂ S.....	32

1. INTRODUÇÃO

A uva é a matéria prima para a produção de vinhos, sendo seu grau de maturação e composição química, fatores fundamentais na determinação da qualidade do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). O estado do Rio Grande do Sul é responsável por 90 % da produção nacional de vinhos e derivados (IBGE, 2013). Em 2014 houve um aumento de 1,64% na produção nacional de uvas, com destaque para os Estados da Bahia e de Santa Catarina (DE MELLO, 2015).

Segundo a portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988 “o vinho é exclusivamente a bebida resultante da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto simples ou virgem, com um conteúdo de álcool adquirido mínimo de 7% (V/V a 20 °C)”. Além da conversão de açúcares em etanol, as leveduras são responsáveis pela produção de ésteres e uma série de compostos importantes que contribuem com o aroma do vinho. Muitos estudos foram realizados desde que Pasteur, em 1866 demonstrou que as leveduras eram responsáveis pela transformação dos açúcares em etanol. Como exemplo, Robert Koch em 1879 desenvolveu a técnica de isolamento de culturas puras e demonstrou ser possível isolar linhagens com base em seu comportamento fermentativo e nas características de seus produtos. A partir disso, ficou claro que as fermentações alcóolicas realizadas espontaneamente são resultado da ação combinada de diversas espécies de leveduras. Embora haja interações, as linhagens pertencentes à espécie de *Saccharomyces cerevisiae*, são as principais responsáveis pelas transformações dos açúcares em etanol (CATALUÑA, 1984). Diante destes fatos, desenvolveram-se pesquisas com o intuito de melhorar a qualidade do produto final, elaborando bebidas fermentadas com microrganismos selecionados. Atualmente é possível restringir a ação de microrganismos não desejáveis nos processos fermentativos não estéreis, como na elaboração de vinho, por meio de inoculação de linhagens de leveduras selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas são responsáveis pela produção de diversos metabólitos que exercem influência sobre o aroma e o sabor do vinho. Por conta disso, tornou-se comum o isolamento e manutenção de linhagens desta espécie para a utilização na vinificação na busca do controle do processo (FLET, 2008).

O RAPD vem sendo utilizado para identificar e diferenciar leveduras de mesma espécie (COUTO et al., 1994). Estas técnicas contribuem como parâmetro de controle de qualidade e na taxonomia de leveduras (RATÓN, 2004). Deste modo é importante diferenciar

linhagens, que pertencem a mesma espécie mas apresentam diferenças genéticas. A variabilidade genética dos microrganismos pode contribuir para aumentar a complexidade do vinho e assim imprimir características específicas de cada região. Para isso é necessário determinar a variabilidade genética das linhagens pertencentes à espécie de *Saccharomyces cerevisiae*. O registro de Indicação Geográfica (IG) é conferido a produtos ou serviços que são característicos do seu local de origem, atribuindo aos produtos uma identidade própria distinguindo-os de produtos similares disponíveis no mercado. São produtos que apresentam uma qualidade única em função de seus recursos naturais como solo e clima. Existem duas modalidades de Indicação geográfica (IG): “Indicação de procedência (IP)” onde refere-se ao nome do local que se tornou conhecido por elaborar determinado produto ou serviço e “Denominação de Origem (DO)” que se refere ao nome do local que passou a designar produtos ou serviços, cuja as características podem ser atribuídas a sua origem geográfica. Os vinhos finos moscatéis produzidos no município de Farroupilha receberam recentemente a concessão do registro de Indicação geográfica (IG), esta região recebeu conhecimento na modalidade de Indicação de Procedência (www.inipi.gov.br).

Este trabalho tem por objetivo verificar a contribuição da PCR- RAPD no processo de determinação da diversidade genética das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da superfície de bagas de uva da regiões de Pinto Bandeira (RS) na safra de 2012, de Monte Belo do Sul (RS) e Colombo (PR). As linhagens utilizadas como padrão também foram incluídas. Além de caracterizar as linhagens isoladas a partir das bagas de uva das cultivares Malvasia Bianca, Moscato Alexandria e Moscato tradicional, oriundas da região de Farroupilha (RS), quanto a capacidade fermentativa, fator Killer e sensibilidade ao fator Killer e capacidade de biossintetizar sulfeto de hidrogênio (H₂S). Esta região ainda não possui linhagens com potencial fermentativo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Verificar a contribuição da PCR- RAPD do DNA genômico no processo de determinação da diversidade genética das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Selecionar leveduras presentes na superfície das bagas de uvas *Vitis Vinífera* cultivadas na região de Farroupilha, Rio Grande do Sul, Brasil para elaboração de vinhos espumante moscatel.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinação da diversidade genética das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* por PCR- RAPD
- Avaliar a capacidade fermentativa das linhagens isoladas
- Avaliar a produção de H₂S das linhagens isoladas
- Avaliar o aparecimento de crescimento de parede e formação de anel pelas leveduras durante o processo fermentativo
- Determinar a ausência ou presença do fator Killer nas leveduras isoladas
- Identificação genotípica por amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 com os iniciadores ITS1-ITS4 (PCR) de leveduras com potencial fermentativo e fenótipo killer
- Selecionar linhagens com potencial enológico para a elaboração de vinhos para a região de Farroupilha-RS

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ORIGEM VIDEIRAS

A viticultura no estado do Rio grande do Sul teve origem no século XVII. As uvas são os frutos da videira pertencentes ao gênero *Vitis*, cujas inflorescências são denominadas cachos de uva (NAVARRE, 1997).

A espécie *Vitis vinifera* utilizada para elaboração de vinhos espumante, é originária do Cáucaso, onde foi difundida por toda costa do mediterrâneo tanto para consumo *in natura* como para processamento. A viticultura brasileira teve início e se desenvolveu com as uvas da espécie *Vitis labrusca* ou *Vitis bourquina*, também conhecidas como uvas comuns, usadas na elaboração de vinhos de mesa. Na metade do século XX as variedades de uvas *Vitis vinifera* foram inseridas na viticultura brasileira para elaboração de vinhos finos e espumante (CAMARGO, 2009).

O gênero *Vitis* faz parte da família *Vitaceae*, a qual contém mais de 90 espécies. Além da limitação climática, a desvantagem no cultivo da *Vitis vinifera* está na sua baixa resistência a doenças fúngicas quando cultivadas em climas úmidos (REISCH et al., 1993).

3.2 AGENTES TRANSFORMANTES- LEVEDURAS

A transformação do mosto de uva em vinho é resultado da ação combinada, e até certo ponto sequenciada, de diversos gêneros e espécies (CLAVIJO; CALDERÓN; PANEQUE, 2010). *Saccharomyces cerevisiae* possui a seguinte posição na classificação: *Saccharomycetaceae*, *Saccharomycetales*, *Saccharomycetidae*, *Saccharomycetes*, *Saccharomycotina*, *Ascomycota*, *Fungi* (www.indexfungorum.org, 2015). Esta espécie se reproduz vegetativamente por brotamento multilateral. Suas células são globosas, elipsoidais ou cilíndrica. Podem formar pseudohifas mas não hifas com septos. A fase vegetativa é geralmente diploide ou poliploide. Depois da conjugação, formam ascas persistentes com um a quatro ascósporos, podendo ser globosos a ligeiramente elipsoidais (YARROW, 1984). A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo eucarioto unicelular, capaz de transformar de forma eficiente os açúcares da uva em álcool etílico e outros compostos como glicerol e ésteres. As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* por serem tolerantes ao etanol dominam o estágio intermediário e o final da fermentação. É muito comum no início do processo fermentativo, serem encontradas linhagens como *Pichia*, *Candida* e *Hanseniaspora* (COCOLIN et al., 2004). No ambiente das cantinas foram encontradas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera* e *Pichia* (SANGORÍN et al., 2007). Embora estas leveduras participem apenas do início da fermentação, elas produzem compostos de aroma que têm grande contribuição para a qualidade sensorial do vinho. Por isso, o estudo das propriedades metabólicas e fisiológicas das leveduras não-*Saccharomyces* pode ser importante para a indústria de vinhos (MAMEDE & PASTORE, 2004). A espécie *Kloeckera apiculata* por exemplo, possui capacidade de produzir altas concentrações de compostos voláteis como: álcoois superiores, ésteres e ácidos (GRANCHI et al., 2002). Há linhagens que morrem logo no início da fermentação e outras são eliminadas à medida que o processo fermentativo avança e outras que permanecem até o final da fermentação (FLEET et al., 1984). Para que as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* se desenvolvam sob a população microbiológica, essas devem apresentar características enológicas que permitam a sobrevivência das condições adversas apresentadas no meio fermentativo, como por exemplo, a diminuição de substrato (glicose), aumento de

etanol, quantidade limitada de nitrogênio e oxigênio e pH baixo (PARAPOULI et al., 2010). Embora a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada domine o processo de vinificação, outros gêneros autóctones também podem se desenvolver interferindo na qualidade e na complexidade do vinho. Espécies tais como, *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Candida colliculosa*, *Candida pulcherrima* e *Hansenula anomala* mostraram importante crescimento mesmo após a inoculação com uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* (HEARD & FLEET, 1985). A superfície de bagas maduras podem possuir, dependendo do estágio de maturação, *Aureobasidium pullulans* e espécies de *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* (FLEET, 2003) *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Zygoascus*, *Zygosaccharomyces* e *Torulaspota* (BARATA et al., 2012). Todos esses microrganismos estão de uma forma direta ou indireta relacionada com a complexidade e a qualidade do vinho, mesmo que sua participação no processo de vinificação seja aparentemente pequena.

3.3 IMPORTANCIA DA UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS SELECIONADAS NA ELABORAÇÃO DE VINHO

Os principais microrganismos envolvidos na fermentação alcoólica são as leveduras que transformam os açúcares presentes no mosto da uva em etanol, gás carbônico (CO₂) e vários compostos, entre eles, os aromáticos.

Já foi várias vezes aqui mencionado que há diversas espécies de leveduras presentes na superfície de bagas de uva, entretanto, Romano et al. (2003) comentam que apenas uma pequena porção delas participam da fermentação alcoólica. Deve-se levar em consideração, no entanto, que embora muitos gêneros não participem de todo o processo de vinificação de forma ativa, como se comportam as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, estes gêneros podem, durante o tempo que estiveram atuando, ter dado sua contribuição no que se refere ao desenvolvimento de aromas, entre outros importantes atributos. As leveduras, entendam-se as *Saccharomyces* e as não-*Saccharomyces*, são os agentes mais importantes que influenciam o sabor dos vinhos, sejam estes vinhos elaborados por meio de fermentações espontâneas, sejam por fermentações onde leveduras selecionadas são inoculadas. Tanto num processo como no outro, há interação com leveduras do vinhedo e do ambiente da própria cantina (LAMBRECHTS & PRETORIUS, 2000). Uvas maduras podem conter concentrações de leveduras que vão de 10⁴ a 10⁶ ufc/g enquanto em uvas não maduras, a quantidade de

levedura varia de 10^1 a 10^3 ufc/g (FLEET, 2003). O início da fermentação é dominado pelas espécies de não-*Saccharomyces* como: *Kluyveromyces thermotolerans*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum* e *Issatchenkia orientalis* todas caracterizadas pelo baixo poder fermentativo (CLAVIJO et al., 2010). Há vários relatos abordando a influência das leveduras autóctones presentes na superfície das uvas sobre a qualidade sensorial do produto final Romano et al. (2003); Jolly et al. (2003a, b, c). Além disso, pode atuar sobre o processo fermentativo (JOLLY et al., 2003a) sem apresentar inibição (JOLLY et al., 2003c).

Outras espécies de não-*Saccharomyces* podem ser encontradas no início da fermentação como *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Candida pulcherrima* e *Candida calliculosa*. Mamede & Pastore, (2004) mostraram que a espécie *Kloeckera apiculata* produziu grande quantidade de acetato de etila e acetato de isoamila, compostos estes de importância sensorial. O tipo de levedura encontrada na película da uva depende diretamente da cultivar, da safra e grau de maturação da uva (SABATE et al., 2002). Por outro lado, as variações climáticas de dois anos consecutivos não influenciaram nem as linhagens mais frequentemente encontradas no ambiente das cantinas, e nem a dinâmica de populações (SABATE et al., 1998). Sabe-se que o emprego de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* devidamente selecionadas, para o processo de elaboração de vinhos, é responsável pela melhoria na qualidade do produto, pois diminuem as diferenças do vinho de uma safra para outra (SILVA & SILVA, 1987). Dessa forma, as leveduras selecionadas a partir da microflora da região onde serão utilizadas possuem maior probabilidade de apresentar resultados satisfatórios, por estarem adaptadas às condições climáticas e práticas cultural. Estudos de seleção de leveduras vem sendo desenvolvido há anos na região da Serra Gaúcha, com o objetivo de obter linhagens autóctones ideais para elaboração de vinhos.

Sabate et al. (2002) observaram as linhagens isoladas de vinhedos foram predominantemente sem potencial enológico. Por esse motivo, Sabate et al. (2002) propuseram uma classificação para as linhagens de vinhedos, denominando as espécies oxidativas de residentes e fermentativas de transientes.

Selecionar e empregar leveduras com características enológicas adequadas são atitudes que promovem a melhoria da qualidade do vinho. O emprego de leveduras autóctones selecionadas pode ser um importante coadjuvante no processo de padronização e diferenciação do produto final, influenciando no aroma e na intensidade da cor do vinho (SILVA & MURATORE, 2006). As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de bagas de uvas, podem ser determinantes para a elaboração de vinhos com características

peculiares diferenciadas pelo alto poder fermentativo e sensibilidade a ação de fungicidas. A região da Serra Gaúcha apresenta clima úmido e por conta disso, demanda quantidades maiores de tratamentos fitossanitários contra doenças fúngicas. Segundo Santos & Chavarria (2012), no cultivo de uvas da cultivar *Vitis vinífera*, no estado do Rio Grande do Sul, são realizadas, em média, 14 pulverizações com fungicidas. Os fungicidas Captan e Folpan são utilizados no combate as moléstias fúngicas (GARRIDO & SÔNEGO, 2003). Resíduos de fungicidas podem estar envolvidos com arraste de fermentação ou até mesmo com a parada do processo fermentativo (SILVA et al., 2007) e ainda exercer influência sobre a seleção e desenvolvimento de linhagens de leveduras durante o processo fermentativo (CABONI & CABRAS, 2010).

3.4 CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS AUTÓCTONES

3.4.1 Capacidade fermentativa

É importante que a conversão de glicose a etanol se dê numa taxa de conversão elevada. A capacidade de transformação da levedura aliada à alta concentração de açúcares resulta numa atividade metabólica tal que pode ser visualizada pela intensa movimentação da massa líquida devido à liberação do CO₂. Esta corresponde à fase tumultuosa da vinificação. A conversão pode ser monitorada por análises químicas, avaliando a concentração de açúcares redutores totais e a quantidade de etanol formada, ou por processos físicos, medindo a densidade do mosto em processo fermentativo ou por gravimetria.

De acordo com FLET (1993), a fermentação alcoólica em vinhos é constituída por diversas etapas. Dentre elas, estão a complexidade da atuação e a interação microbiana. Dentre os gênero que podem estar presentes no mosto no estágio inicial da fermentação alcoólica estão as que apresentam baixo poder fermentativo, como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Hansenula* (HEARD & FLEET, 1985), *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces* *Rhodotorula* (FLEET, 2008). Junto a estes gêneros encontram-se também linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Algumas destas linhagens apresentam aptidão enológica e outras não. A inoculação do mosto com uma levedura selecionada minimiza a influência negativa da linhagem sem aptidão, mas sem impedir que linhagens não-*Saccharomyces* desempenhem o seu papel. Fleet (2008) têm alertado para a hipótese geralmente aceita, onde afirma que fermentações

conduzidas com linhagens selecionadas não poderiam usufruir dos benefícios promovidos pelos gêneros não- *Saccharomyces*, não ser necessariamente válida. As leveduras autóctones podem contribuir com a qualidade do vinho, além de dar contribuições únicas e, reservando para uma determinada área geográfica, nuances regionais típicas (HEARD, 1999; FLEET et al., 2002). Ao mesmo tempo em que estas linhagens atuam no processo fermentativo, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* caracterizada pelo seu alto poder fermentativo, domina o processo de vinificação e completa a fermentação do mosto (BARRE et al., 2000). As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são de extrema importância na elaboração de vinhos, sendo assim é importante selecionar linhagens com alta capacidade fermentativa, uma vez que, segundo da Silva et al. (2007), retardos no processo fermentativo em geral são acompanhados pela ação de outros microrganismos contaminantes mais resistentes, em geral as bactérias.

O processo de fermentação ocorre em anaerobiose. O metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* nessas condições, ao invés de ser conduzido para o sistema oxidativo, aí inclui a via do ciclo tricarbóxico e fosforilação oxidativa, é desviado para a formação de etanol.

A transformação da sacarose em etanol e CO₂ envolve, no mínimo 12 reações em sequência ordenada, cada uma catalisada por uma enzima específica. Em leveduras, a principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica é a glicólise. Uma molécula de glicose é metabolizada, resultando na produção de duas moléculas de piruvato. Em condições anaeróbicas, o piruvato é descarboxilado e o etanal resultante é reduzido pelo NADH⁺H⁺ e assim, convertido em etanol e CO₂. Para cada molécula de etanol formada, são geradas duas moléculas ricas em energia, ATP. O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar uma forma de energia (ATP Adenosina Trifosfato) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas. O início da fermentação do mosto é caracterizado pela adição de leveduras com aptidão enológica desejável. Segundo da Silva et al. (2005), a evolução de CO₂, medida por gravimetria, se assemelha às fases do crescimento celular em batelada, ou seja, Fases lag, exponencial, desaceleração e estacionária (Figura 1). A fase lag é responsável pela intensa multiplicação celular e adaptação ao meio (PIRT, 1985). Finalizada a adaptação no meio, inicia-se a fase exponencial, caracterizada pelo grande desprendimento de dióxido de carbono (CO₂), aumento de temperatura do mosto, redução da densidade e aumento na produção de álcool. Nesta fase, se observa, como já dito, um movimento intenso da massa líquida. A esta fase se dá o nome de tumultuosa. A fase de

desaceleração e estacionária são caracterizadas pela redução expressiva da velocidade liberação CO₂.

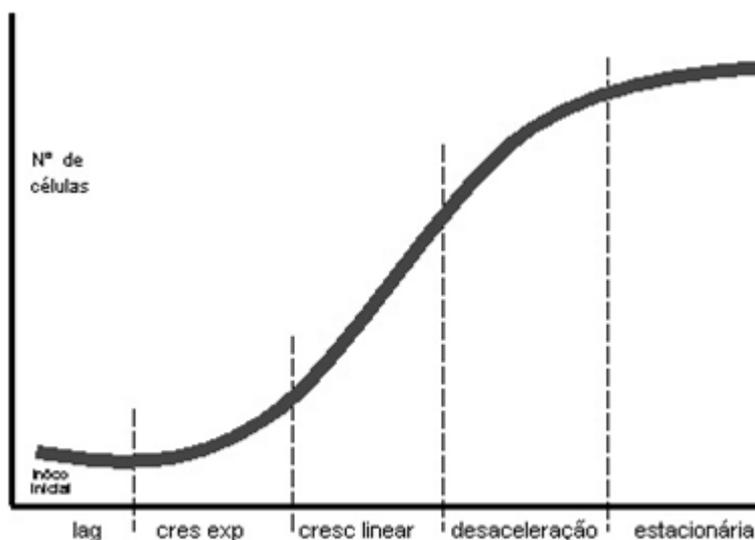


FIGURA 1. FASES CRESCIMENTO CELULAR DAS LEVEDURAS

FONTE: www.ebah.com.br

O mosto é inoculado com células de leveduras crescidas em meio líquido. A esta suspensão de células se dá o nome de "PÉ DE CUBA" ou simplesmente "inóculo". Podem-se também empregar leveduras secas ativas. Estas devem ser, antes de adicionadas ao mosto, hidratadas na temperatura e nas condições determinadas pelo fabricante. As células cultivadas devem estar, preferencialmente, na fase exponencial para encurtar a fase lag.

As leveduras devem ser selecionadas de acordo com o vinho que se deseja obter. Para isso, deve-se assegurar que a linhagem selecionada esteja em maior número, seja mais ativa que as linhagens autóctones e que as bactérias lácticas não iniciem suas atividades, quando necessárias, de forma prematura. Para prevenir a ação das bactérias no início da vinificação e restringir a atividade de determinados gêneros de leveduras autóctones, usa-se o SO₂ (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

3.4.2 Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)

Na indústria de bebidas alcoólicas o controle, a prevenção e remoção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) é de suma importância. A formação deste gás pode degradar os produtos elaborados, acarretando perdas econômicas. A produção ou não de H₂S durante a fermentação

alcoólica depende de vários fatores (SPIROPOULOS & BISSON, 2000), entre eles, a composição química do meio, a linhagem, a temperatura empregada durante o processo fermentativo, a concentração de compostos nitrogenados, o teor de compostos sulfurados, o estado de maturação da uva, resíduos de agrotóxicos, deficiência de alguns compostos orgânicos, pH e as práticas enológicas adotadas.

O H₂S é um composto indesejável, pois confere defeitos sensoriais, como aroma de ovo podre e é produzido como consequência do metabolismo das leveduras. A remoção do H₂S do vinho é complexa e problemática. É fundamental que, na elaboração de vinho sejam empregadas linhagens com capacidade de efetuar uma rápida combinação do H₂S formado com precursores nitrogenados ou com deficiência na atividade da sulfito redutase (WLODARCZYK et al., 2012).

A síntese de H₂S em *Saccharomyces cerevisiae* está relacionada com o metabolismo de alguns aminoácidos e podem ser controlada, alterando-se a composição do meio. Diferentes linhagens de levedura podem se comportar diferentemente com relação à formação de H₂S e à disponibilidade de fonte de nitrogênio prontamente assimilável (UGLIANO et al., 2009, 2011), indicando que a composição química do mosto pode estimular a formação do gás para umas linhagens e não para outras.

A formação de H₂S realizada por algumas linhagens de leveduras, é decorrente da utilização de fontes de íons de sulfatos (SO₄) (BERRY & WATSON, 1987) presentes no mosto.

Esse gás é produzido por via enzimática e possui relação com a redução de sulfato exógeno para a síntese de aminoácidos sulfurados (STRATFORD & ROSE, 1985; JORDAN & SLAUGHTER, 1986; JIRANEK et al., 1995). Os aminoácidos como metionina e cisteína, que são sulfurados, são compostos essenciais para o metabolismo das leveduras. Quando esses componentes estão em baixa quantidade no mosto da uva, a levedura necessita biossintetizá-los (LINDERHOLM et al., 2008). Como mostra a Figura 2, a levedura assimila o enxofre extracelular que está presente no suco de uva na forma de sulfato (CORDENTE et al., 2009). Avaliando a atividade da sulfito redutase de 21 linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* Mendes-Ferreira et al., (2002) observaram que apenas em uma linhagem a atividade da enzima era ausente. As linhagens que produziram H₂S variaram na intensidade e isso dependia da composição química do meio. O mesmo comportamento foi observado com relação às linhagens não-*Saccharomyces*. Linderholm et al., (2008), trabalhando com mutantes, observaram também que os níveis de produção de H₂S estavam

relacionados com as condições nutricionais. Os autores verificaram que a deleção de oito genes relacionados com a formação de H₂S aumentaram a produção deste composto. Quatro destes genes (CYS4, HOM2, HOM6 e MET17) promovem a formação de proteína que reduzem o sulfato. O gene MET17 é o responsável pela incorporação direta do H₂S na molécula receptora O-acetil-L-Homoserina para formar homocisteína. Por esse motivo, uma deleção neste gene acarreta acúmulo do sulfeto de hidrogênio. O HOM2, HOM6 estão envolvidos na síntese da O-acetil-L-Homoserina. Logo, o resultado obtido com essas duas deleções se assemelha ao que se obteve com a deleção no gene MET17. A deleção do gene CYS4 também aumenta a concentração de H₂S porque o nível de cisteína no meio é um fator regulador. Este gene participa da conversão de cistationina, molécula proveniente da cisteína, em homocisteína. No Brasil, um estudo foi realizado por Silva & Dalarmi, (2003) mostrou que 79% das linhagens isoladas da Região do Vale dos Vinhedos (BG) sintetizavam H₂S. Strauss et al., (2001) mostraram que 45 linhagens de diferentes espécies de leveduras não-*Saccharomyces* apenas uma não exibiu capacidade de produção de H₂S. Zambonelli et al., (1984) salientam que apenas 1,1%, entre 11.800 linhagens de *Saccharomyces* não sintetizaram H₂S.

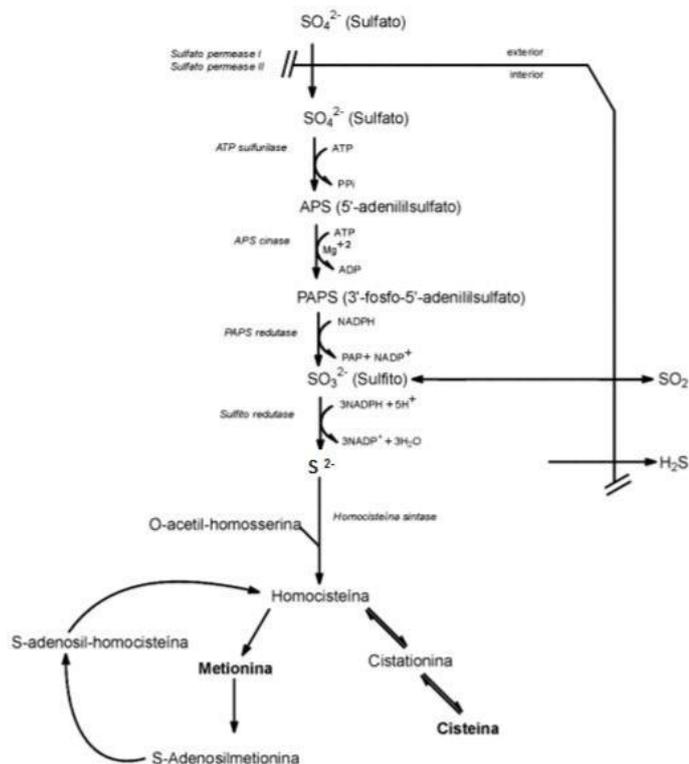


FIGURA 2. ROTA METABÓLICA DA PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO DE LEVEDURAS

FONTE: Neto e Mendes-Ferreira, (2005)

3.4.3 Fator Killer

Foi observado por Makower & Bevan, (1963) que determinadas linhagens, quando crescidas juntas, podiam apresentar dois comportamentos distintos. Uma linhagem poderia matar outra ou as duas poderiam conviver no mesmo ambiente sem apresentar inibição. A linhagem que mostrava capacidade de matar uma outra linhagem foi denominada de killer. A linhagem que morria por ação da linhagem killer foi chamada de sensível e a terceira linhagem que não apresentava capacidade de matar e nem de morrer foi designada como neutra. Este foi o primeiro relato do fenômeno killer em leveduras. Foi verificado também que o contato célula/célula não era necessário para que houvesse a reação de morte. Woods & Bevan (1968) demonstraram que este fenômeno tinha estreita relação com uma proteína instável e estabeleceram as condições para a estabilidade da molécula. Somers & Bevan

(1969) descobriram que o fator killer era controlado por dois tipos de determinantes genéticos citoplasmáticos. A natureza química destes determinantes genéticos de determinadas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foi definida por Berry & Bevan, (1972) e confirmada por Vodkin & Fink (1973). Mais tarde, os determinantes citoplasmáticos (VLPs) dsRNA também foram denominados V1 e V2, onde se verificou que V1 era independente do genes nucleares como MAK1 e V2 dependia tanto do gene MAK1 quanto da presença de V1 (MITCHELL et al., 1976), o que veio, de certa forma, confirmar os resultados obtidos por Woods & Bevan (1968) e Somers & Bevan (1969). A produção da toxina killer, de natureza glicoprotéica, depende, portanto dos segmentos de RNA de cadeia dupla, situados no citoplasma da célula, estes segmentos são os plasmídeos M-dsRNA e L-dsRNA, sendo o primeiro o responsável pela produção da toxina killer e resistência à mesma. O segundo responde por sua própria replicação e a do MdsRNA. Portanto, para que a levedura seja portadora da toxina killer deve conter os dois tipos de ds-RNA. Caso estiver presente apenas a forma de L-A dsRNA a levedura apresentará sensibilidade ao fator killer (SILVA, 2003).

Fenotipicamente, as leveduras foram agrupadas por Makower & Bevan (1963), conforme o comportamento em relação à toxina, como killer (K^+R^+), quando apresenta capacidade de matar linhagens sensíveis e mostra resistência à ação da sua própria toxina ou de sua mesma classe; neutra (K^-R^+), quando a levedura não possui capacidade de matar linhagens sensíveis e nem de ser morta por linhagens killer (WOODS & BEVAN, 1968; BUSSEY, 1972; SILVA, 1996). Há outros tipos de fenótipos, entre estes estão linhagens sensíveis supressivas, suicidas e super killer (WICKNER, 1976; BUSSEY, 1981).

Em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, foi relatada a ocorrência de três tipos de toxina: toxina killer K1, K2 e K28 (SCHMITT & TIPPER, 1990, 1992; TIPPER & SCHMITT, 1991; SCHMITT & SCHERNIKAU, 1997; SCHMITT & BREINIG, 2002; PÉREZ-NEVADO et al., 2006; EL-BANNA et al., 2011; MAQUEDA et al., 2012; SERVIENE et al., 2012; PIECZYNSKA et al., 2013; RODRÍGUEZ-COUSIÑO et al., 2013). As toxinas K1 e K2 podem apresentar modos de ação muito semelhantes, onde se ligam a receptores da parede celular de leveduras sensíveis interagindo com receptores da membrana celular, tornando-a permeável a íons e moléculas de alta massa molecular, como por exemplo moléculas de ATP (MARQUINA et al., 2002). A toxina K28 possui afinidade com a fração manoprotéica da parede celular das leveduras. A fração entra no núcleo por difusão passiva (SCHMITT et al., 1996), interage com proteínas essenciais do ciclo celular e atua impedindo

a síntese de DNA interrompendo, assim, seu ciclo celular no início da fase S (SCHMITT & BREINIG, 2006).

A toxina K1 possui atividade em uma estreita faixa de pH, 4,6-4,8, e pode ser inativada por agitação. A faixa de pH ótima para a toxina K2 varia de 2,9 a 4,9 (MARQUINA et al., 2002). Segundo Maqueda et al. (2012), o pH do mosto varia de acordo com a temperatura ambiental. Em geral, quando a temperatura ambiental é elevada durante o amadurecimento ou colheita, o pH se eleva. No caso específico dos experimentos conduzidos por estes autores, o pH variou de 3,1 a 3,6 em áreas mais frias e de 3,3 a 4,2 em áreas mais quentes. Portanto, a toxina K2 parece ser a única capaz de atuar na fermentação vínica (MARQUINA et al., 2002). A sensibilidade de linhagens de levedura ao tipo K2 se mostrou variável (LOPES et al., 2006, 2007). Por conta do efeito antibiótico das linhagens produtoras da toxina, muitos pesquisadores têm usado industrialmente leveduras killer em processos fermentativos não estéreis. Durante a fermentação do mosto pode ocorrer fenômenos de antagonismo entre as leveduras killer e sensíveis, ou até mesmo entre linhagens killer ou entre linhagens sensíveis, pois há diferentes graus de sensibilidade dentro de um mesmo fenótipo (SILVA, 1999). Esse fenômeno de antagonismo pode resultar em ameaça ao processo de vinificação (MARQUINA et al., 2002).

Na literatura encontra-se uma vasta descrição de microrganismos produtores da toxina killer. Dentre eles destacam-se: *Saccharomyces cerevisiae* de origem ambiental (SILVA, 1996) *Williopsis mrakii* (KAZANTSEVA & ZIMINA, 1989; HODGSON et al., 1994, 1995; WALKER et al., 1995; EL-BANNA et al., 2011), *Williopsis saturnus* (YAP et al., 2000; GUYARD et al., 2002a, b; BUZZINI et al., 2004; LIU & TSAO, 2009; OCHIGAVA et al., 2011), *Kluyveromyces lactis* (BOLEN et al., 1992; BUTLER et al., 1991; KITAMOTO et al., 1993; IZGÜ & ALTINBAY, 1997; KLASSEN et al., 2002) *Hansenula anomala* (ROSINI, 1983; KAGIYAMA et al., 1988; IZGÜ & ALTINBAY, 1997; PASSOTH et al., 2011), *Candida tropicalis* (IZGÜ & ALTINBAY, 1997; IZGÜ & ALTINBAY, 1997), *Ustilago maydis* (DAY & ANAGNOSTAKIS, 1973; KINAL et al., 1995; SANTOS et al., 2011b,a), *Kluyveromyces phaffii* (PALPACELLI et al., 1991; CIANI & FATICHENTI, 2001; COMITINI et al., 2004b; COMITINI & CIANI, 2010), *Picchia anomala* (COMITINI et al., 2004a; HERNÁNDEZ et al., 2008) e *Kluyveromyces wickerhamii* (COMITINI et al., 2004a; COMITINI & CIANI, 2011). Silva (1996) observou que o percentual de resistência ou imunidade de leveduras a uma determinada linhagem killer pode variar de acordo com o meio empregado. Mostrou que, em relação à linhagem *Saccharomyces cerevisiae* 91B84, 56.5%

das linhagens se mostraram resistentes em meio YEPD-MB mas este número aumentou para 81,2% em meio MA-MB. O emprego de leveduras selecionadas na vinificação pode exercer pressão sobre as linhagens autóctones, entretanto para que isso ocorra, a linhagem deve ter alta atividade fermentativa e quantidade suficiente para dominar o processo. Para melhor atividade destas leveduras é importante que elas sejam adicionadas imediatamente após esmagamento da uva. Segundo SILVA & MURATORE, 2006, não é necessário utilizar linhagens killer no processo com a finalidade de dominá-lo. Para que isso ocorra é suficiente que as leveduras sejam neutras

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS

3.5.1 PCR

A tendência da indústria vinicultora é continuar selecionando novas linhagens de leveduras na busca por melhoria no processo fermentativo de tal forma que as novas linhagens confirmem determinadas características de sabor e aroma ao vinho (FLEET, 2008).

A dinâmica das espécies de leveduras durante as fermentações alcoólicas interfere na composição química e na qualidade sensorial do vinho produzido. A identificação dos microrganismos que atuam no processo de elaboração de vinhos, por biologia molecular tem sido bastante utilizada (CARUSO et al., 2002; AGNOLUCCI et al., 2007, 2009; AGUSTINI et al., 2014).

Existem várias técnicas para identificação de leveduras. Os métodos mais empregados na diferenciação de leveduras são: hibridização DNA, cariótipo eletroforetico, análise de microssatélite, análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente, análise de DNA mitocondrial por polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição, RFLP (restriction fragmente length polymorphism) e análise de DNA cromossômico por RFLP (ESTEVE-ZARZOSO et al., 1999). Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, o DNA ribossomal (rDNA), que codifica as moléculas de RNA ribossomal (rRNA) que compõem os ribossomos, compreende 150 a 200 cópias in *tandem*, pertencentes ao cromossomo XII (PETES, 1979; JAMES et al., 2009). Cada uma destas repetições é formada por quatro genes do rRNA como: a subunidade grande (LSU ou 26S rRNA), a subunidade pequena (SSU ou 18S rRNA) e os genes 5S e 5.8S. Além disso, fazem parte destas repetições, os espaçadores transcritos internos (Internal Transcribed Spacers, ITS) e externos (External Transcribed

Spacers, ETS), flanqueados por regiões não transcritas (Nontranscribed Spacers, NTS) (FERNÁNDEZ-ESPINAR et al., 2006). O maior desafio ao se identificar leveduras recai na necessidade de diferenciar gêneros e espécies que taxonomicamente estão muito próximos, porém possuem propriedades diferentes no que se refere às suas características fermentativas. A biologia molecular possui técnicas para determinação taxonômica de leveduras que inclui a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR: Polymerase Chain Reaction). PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de segmento específico de DNA na presença de DNA polimerase. Cada ciclo de PCR envolve três etapas: Desnaturação, pareamento e extensão. A dupla fita de DNA alvo é desnaturada pela elevação da temperatura a 94°C. No pareamento, a temperatura é reduzida para 64°C, de modo que, ocorra a ligação DNA-DNA de cada primer (iniciador) com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo. Na terceira etapa, eleva-se a temperatura a 72°C para que o DNA polimerase realize a extensão com a adição de nucleotídeos, utilizando como molde a sequência alvo, a partir de cada terminal 3' do primer. A facilidade, a rapidez, a versatilidade e a sensibilidade da PCR tornam-na uma poderosa ferramenta para estudos genéticos moleculares, envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo.

3.5.2 PCR-RFLP

Dentre as metodologias baseadas na PCR, destaca-se a análise de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (do inglês, Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). O RFLP consiste na diferenciação de linhagens por análise de fragmentos de DNA, após a amplificação do gene alvo pela PCR, utilizando enzimas endonucleases que clivam em sequência palindrômica específica. A ação destas endonucleases, resulta normalmente em fragmentos que variam de tamanho conforme a espécie do microrganismo. O perfil de fragmentos revelado pela coloração do gel, é comparado com o perfil de espécies conhecidas e assim, identifica-se o microrganismo (GUILLAMÓN et al., 1998) Embora a técnica de RFLP consiga distinguir espécies (BELTRAN et al., 2002; BEDRIÑANA et al., 2010; BEZERRA-BUSSOLI et al., 2013; ALAM et al., 2014; DIDEHDAR et al., 2014; GALLARDO et al., 2014), nem sempre uma análise de PCR-RFLP do ITS1-5,8S rDNA-ITS2 consegue distinguir espécies. Nestes casos, outras técnicas, como RAPD, precisam ser empregadas no processo de discriminação (ANDRADE et al., 2006).

3.5.3 DIFERENCIAÇÃO DE LINHAGENS POR RAPD

Com o surgimento da PCR (Polymerase Chain Reaction), em meados da década de 80, houve uma verdadeira revolução em termos de pesquisas genéticas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Os avanços dos estudos moleculares trouxeram um aumento significativo dos conhecimentos na área de Genética de Populações, com diversas aplicações em estudos evolutivos, permitindo avaliar a diversidade genética diretamente ao nível de DNA, livre de influências do ambiente ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado (LACERDA et al. 2002). Entretanto, a necessidade de conhecimentos prévios sobre a sequência de nucleotídeos da espécie a ser estudada, e os custos elevados para a obtenção destes conhecimentos limitaram, durante alguns anos, a aplicação das novas técnicas desenvolvidas baseadas em PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Welsh & McClelland, (1990) desenvolveram o que chamaram de AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), uma técnica que utiliza primers de sequência arbitrária com cerca de 34 nucleotídeos, corrida eletroforética em géis de poliacrilamida e visualização das bandas por autorradiografia, os autores também usaram: 1% agarose 1 x TBE gel e visualizaram as bandas em brometo de etídeo. Em 1991, Caetano-Anóles et al. publicaram uma técnica similar denominada DAF (DNA Amplification Fingerprinting), que também utiliza géis de poliacrilamida, mas se baseia no uso de primers bem menores (entre 5 e 8 nucleotídeos). A técnica que acabou tornando-se a mais popular das três foi descrita por Williams et al., ainda em 1990, e recebeu o nome de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Foi com o desenvolvimento de técnicas de amplificação de DNA, utilizando primers (iniciadores) pequenos e de sequência arbitrária, que o uso da PCR se difundiu por todo o mundo. Isso permitiu a análise genética de diversas espécies a um custo relativamente baixo e de forma simplificada. Hadrys et al. (1992) apontam como vantagens da técnica do RAPD a aplicabilidade em trabalhar com genomas desconhecidos, poder ser aplicado em casos onde se tem apenas uma pequena quantidade de DNA, ser um processo eficiente e ter como característica o baixo custo analítico. Esta técnica tem aplicação em vários campos da ciência biológica. Tem sido usada para amplificação de fragmentos de DNA na caracterização de leveduras (REISS et al., 1998; DEAK et al., 2000; THEELEN et al., 2001), fungos filamentosos (GEISEN et al., 2001; BAU et al., 2005; ESTEBAN et al., 2006a; MARTORELL et al., 2005; ESTEBAN et al., 2006b; CABAÑAS et al., 2008; SEPAHVAND

et al., 2011; SINACORI et al., 2014), bactérias como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e plantas, como arroz (WELSH & MCCLELLAND, 1990), em tumores do tipo fibrosarcoma (KUCHIKI et al., 1999), para determinar a paternidade entre espécies de libélula altamente poligâmica denominada *Orthetrum coerulescens* (HADRYIS et al., 1993) e em estudos para a reconstrução filogenética de peixes do gênero *Xiphophorus* (BOROWSKY et al., 1995). Entre as diversos empregos, podem-se citar o estudo de mutagênese e de sinal normal e anormal de tradução, a determinação da estrutura populacional de um ecossistema, a verificação da história evolucionária, a construção de mapas genéticos e a definição de marcadores genéticos (WELSH et al., 1995).

A técnica de PCR-RAPD baseia-se na amplificação do DNA genômico com auxílio de apenas um iniciador, geralmente com 10 nucleotídeos. Devido à utilização de uma temperatura de pareamento relativamente baixa (35°C), os iniciadores se ligam a alvos inespecíficos gerando produtos de amplificação de DNA polimórficos (Figura 3). Os produtos de amplificação são separados e visualizados por eletroforese em gel (ALCOBA-FLÓRES et al., 2007). Os amplicons obtidos formam uma impressão digital que nada mais é do que uma combinação de amplicons de diferentes tamanhos. Se por um lado, a técnica, gerando este perfil, se torna espécie ou linhagem específica e possui o potencial de ser empregada no controle de qualidade de inóculos em processos fermentativos (ORBERA- RATÓN, 2004), por outro lado, pode, dependendo do primer empregado, não discriminar determinadas espécies (ERGON & GÜLAY, 2005).

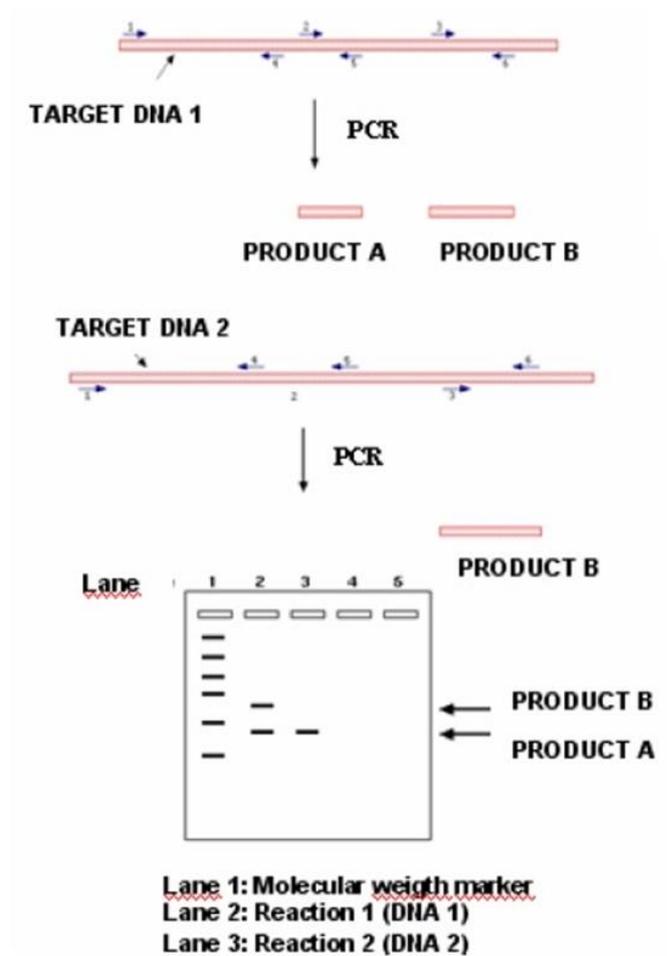


FIGURA 3. RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)

FONTE: ALCOBA-FLORES et al., (2007)

Saccharomyces cerevisiae vem sendo muito estudada não apenas pela sua grande importância na elaboração de bebidas e alimentos, mas também pela sua capacidade de causar sérios problemas de deterioração de alimentos. Isso aumenta o interesse por parte das indústrias em discriminar linhagens dessa espécie (COUTO et al., 1996).

Couto et al. (1994) utilizaram a técnica de RAPD para diferenciar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* e de *Zygosaccharomyces rouxii*.

Estudo realizado por Guerra et al. (2001) na caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* coletadas durante a fermentação espontânea de cachaça artesanal, utilizando o primer M13, observaram a grande diversidade genética ente linhagens, sugerindo haver grande número de genótipos individuais dentro das espécies. Capece et al. (2010) utilizaram o iniciador M13 para diferenciar 341 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de bagas de uva de diversas regiões da Sicília.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS UVAS

O isolamento das leveduras foi efetuado em bagas de uvas coletadas na safra de 2014. Foram utilizados cachos de uvas de três cultivares pertencentes à espécie *Vitis vinífera* (Malvasia Bianca, Moscato Alexandria e Moscato Tradicional), oriundas de vinhedos da região de Farroupilha- Rio Grande do Sul. O isolamento das linhagens foi realizado por diluição em série, seguida por plaqueamento em meio sólido mosto ágar (SILVA, 1996). O meio sólido conteve por 100 mL, 1 g de extrato de levedura (Bacto TM Yeast Extract) 2 g de ágar (Bacto TM Ágar) e 25mL de mosto de uva. As placas foram incubadas em estufa a 24 °C por 72 horas. As 150 linhagens isolada das variedades de Moscato Alexandria, Malvasia Bianca e Moscato Tradicional, receberam os códigos FMA14, FMB14 e MBTF14, respectivamente, com a numeração de 1 a 50 para inserção na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho. Os procedimentos para o isolamento das leveduras seguiu metodologia descrita por Silva & Silva, 1987. É importante salientar que todos os meios utilizados no presente trabalho foram esterilizados em autoclave horizontal (FABRE modelo 104) por 30 minutos a 121°C.

4.2 PRESERVAÇÃO

Durante os experimentos, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1VVT97, 1B84, 91B84, 26B84 e a linhagem comercial K1 Lallemand, assim como as demais linhagens isoladas do mosto de uva das cultivares mencionadas acima, foram mantidas a -80°C. Para isso, foi utilizado crioprotetor duplo (sacarose/glicerol) composto por: 20 g Sacarose, 5 ml de tampão citrato -fosfato (ácido cítrico + Fosfato de sódio 12 hidrato 0,1 M), 4,93 g MgSO₄.7H₂O, 45 mL H₂O (Esterilizar por filtração), 130 ml de Glicerol (esterilizado em autoclave e adicionado aos outros componentes depois de resfriado), H₂O q.s.p. 200 mL. As leveduras foram crescidas no meio G7100 composto por: Extrato de Levedura não Comercial (ELNC) - 114 mL, Sacarose - 100 g, H₂O q.s.p. 1000 mL, o meio foi autoclavado a 121 °C por 30 min. Seguiu-se o seguinte procedimento para o crescimento e preparo da suspensão para a manutenção:

1. Foram preparados tubos e triplicata;
2. Foi anotada a sequência definida das leveduras;
3. Foram vertidos 2 mL do meio G7100 em cada tubo;
4. As levedura foram transferidas para cada tubo;
5. A suspensão de células foi incubada por 24 h a 25°C em agitador rotativo (New Brunswick - G7, USA) a 150 rpm
6. Foi transferido 0,5 mL do crioprotetor duplo para microtubos Labcon de 1,5 mL e adicionou-se 0,5 mL da suspensão de células. A mistura foi mantida em ultra-freezer (Sanyo - USA) a -80 °C.

4.3 LINHAGENS PADRÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1VVT97, pertencente à Coleção do laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho, foi utilizada neste trabalho como levedura padrão, por apresentar características metabólicas potencialmente úteis na condução do processos fermentativos de alta qualidade. Esta levedura foi isolada a partir do mosto de uvas tintas da região do Vale dos Vinhedos Bento Gonçalves- RS (da Silva et al., 2005). Foram utilizadas três linhagens killer da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, denominadas Embrapa 1B84 (K^+R^w), Embrapa 91B84 que foram isoladas por da Silva (1996), e uma linhagem comercial K1 (K^+R^+), adquirida da empresa Lallemand (Canadá), que também é utilizada como linhagem padrão na avaliação do potencial fermentativo e padrão positivo na produção de sulfeto de hidrogênio. Foi utilizada, como linhagem sensível, *Saccharomyces cerevisiae* 26B84 (K^-R^-) isolada por da Silva (1996). A linhagem Embrapa 1B84 (K^+R^w), apesar de ser killer, é assim representada como distintivo de fraca capacidade de resistência à ação da toxina killer (TIPPER & BOSTIAN, 1984).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS ISOLADAS

4.4.1 Teste da capacidade fermentativa

Para acompanhar a curva de fermentação de cada linhagem isolada, avaliou-se a formação de CO₂ por gravimetria (GIUDICI & ZAMBONELLI 1992; CIANI & FERRARO 1996; CIANI & FATICHENTI 2001) em intervalos de 6 e 18 horas por 96 h (4 dias).

4.4.2 Acompanhamento da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

A detecção das linhagens produtoras de H₂S foi acompanhada pela metodologia definida por Silva & Silva (1984). Foram utilizadas fitas de papel filtro (chromatography Paper-WatmanInternational- 1CHR) com dimensões de 0,5 x 6,0 cm, sendo posteriormente colocadas em placa de Petri e mergulhadas em solução de acetato de chumbo 3% (Merck ®). As fitas foram fixadas em tubo de tampa rosqueável. A produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi determinada qualitativamente pela reação do H₂S com acetato de chumbo presente na tira de papel filtro, caracterizada pelo escurecimento da mesma. Foram utilizadas como linhagens padrão a 1vvt/97 como controle negativo e a linhagem comercial K1 como controle positivo. A produção de H₂S foi avaliada durante a determinação da capacidade fermentativa.

4.4.3 Detecção de fator Killer e sensibilidade ao fator killer

O teste de detecção ao fator killer juntamente com o de sensibilidade ao fator killer foram determinados de acordo com da Silva (1996). Foi empregado o meio Lorena/ELNC (SILVA & ALMEIDA, 2006) na proporção de 80 mL de mosto da cultivar Lorena e 20 ml de ELNC conforme descrito por Silva et al., 2011. A técnica de detecção do fator killer consiste em transferir com o auxílio da alça de cromo/níquel, massas pontuais em duplicata de células em estudo sob o meio sólido totalizando 16 linhagens em cada placa. Antes de aplicar as massas pontuais das linhagens, foram transferidos 100 mL de uma suspensão de células com 10⁷cél.mL⁻¹ da linhagem sensível 26B84, para placa de Petri, contendo o meio sólido. As células foram uniformemente espalhadas com o auxílio da alça de Drigalski.

O teste de sensibilidade ao fator killer foi realizado da seguinte forma: em cada placa foram semeadas 100 μL da suspensão de células contendo 10^7cél.mL^{-1} de cada linhagem isolada. As células foram uniformemente espalhadas na placa de Petri com o auxílio da alça de Drigalski. Posteriormente, foram aplicadas massas pontuais das linhagens killer K1, 1B e 91B em triplicata. Foi conduzido um experimento controle, onde a placa foi semeada com a linhagem sensível 26B84. Foram aplicados pontos contendo as células das linhagens killer K1, 1B e 91B. As placas foram mantidas em estufa 18 °C por 48 a 72 horas.

4.4.4 Teste sensibilidade Killer/Killer

A sensibilidade de linhagens Killer contra linhagens killer foi avaliada em placas de Petri contendo o meio Lorena/ELNC (80:20). O experimento teve o objetivo de detectar linhagens killer que são sensíveis a outras linhagens killer. O experimento foi conduzido da seguinte forma: semearam-se 100 μL da suspensão de 10^7cel/mL de linhagens killer em teste e as células foram espalhadas em toda a sua extensão com o auxílio da alça de Drigalski. Foram aplicadas massas pontuais das demais linhagens em teste que também tiveram comportamento killer. As linhagens testadas foram: 8 MAF/14, 19MAF/14, 33MAF/14, 37MAF/14, 46MAF/14, 47MAF/14 (oriundas da cultivar Moscato Alexandria), 33 FMB/14 (oriunda da cultivar Malvasia Bianca) e 3 MBTF/14, 10 MBTF/14, 12MBTF/14, 13MBTF/14, 23MBTF/14, 26MBTF/14, 28MBTF/14 (oriundas da cultivar Moscato Tradicional), foram empregadas também as linhagens killer de referência 1B84, 91B84 e K1. As placas foram acondicionadas em estufa a 24°C por 48 a 72 horas.

4.4.5 Identificação taxonômica de linhagens fermentescíveis e linhagens Killer por PCR- RFLP

A extração do DNA das linhagens foi realizada a partir do congelamento e descongelamento das suspensões conforme descrito por Silva et al. (2012). Foram utilizados os primers o ITS 1(5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (AGUSTINI et al., 2014). O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1,5%, corado com uma solução de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de brometo de etídeo durante 20 minutos e fotodocumentado por meio de fotodocumentador Biorad Molecular

Imager Gel DCOTM, empregando o software Image labTM Software (USA) (Biorad - USA). O programa utilizado foi o seguinte: um ciclo de desnaturação de 95 °C por cinco minutos; 40 ciclos de 95 °C por trinta segundos; 60 °C por um minuto; 72 °C por um minuto e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

A identificação das linhagens foi realizada pela técnica de RFLP. As enzimas endonucleases utilizadas foram: CfoI (Sigma) (5' CC↓GCG 3'), HinfI (Sigma) (5' GC↓CTNA 3') e DdeI (JenaBioscience) (5' C↓TNAG 3').

Para a diferenciação do gênero *Hanseniaspora*, foi utilizada a endonucleases DdeI (JenaBioscience) (5' C↓TNAG 3'). As reações com as enzimas citadas a cima foram realizadas conforme instruções do fabricante. A detecção dos amplicons gerados com a ação das endonucleases se deu por eletroforese em gel de agarose 3% em solução tampão TBE1x. O volume final da reação foi de 10 µl, esse volume foi posteriormente homogeneizado com 3 µl do tampão de corrida e aplicado no gel.

4.7 VARIABILIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS UTILIZANDO PCR-RAPD

A metodologia empregada para extração do material genômico foi descrita por Silva et al.(2012). Após ter crescido em meio mosto ágar por 24 a 48 horas em estufa a 24°C, uma alíquota das células foi adicionada em 600 mL de água ultra pura e posteriormente a mistura foi homogeneizada em vórtex. No presente trabalho, a técnica de PCR-RAPD foi utilizada para investigar a variação genética entre as leveduras da espécie de *Saccharomyces cerevisiae* pertencentes a coleção do Laboratório de Microbiologia-CNPUV. As linhagens foram isoladas de bagas de uva das regiões de Pinto Bandeira (RS) na safra de 2012, Colombo (PR), e Monte Belo do Sul (RS). As 5 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da coleção do Laboratório de Microbiologia- CNPUV utilizadas foram: 1vvt97, 91B84, 1B84, 26B84, A1, A5, A8, A10, A12, A15, A16, A18, A21, A25, A30, A33, A35, A36, A38, A40 (Pinto Bandeira, RS), 2MB13 (Monte Belo do Sul - RS). Foram também incluídas a linhagem comercial K1 da Lallemand e a linhagem 2CO13 de Colombo. A diferenciação das linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada por PCR-RAPD de acordo com o procedimento descrito por Caruso et al. (2002); Andrighetto et al. (2000); Couto et al. (1996).

Os iniciadores utilizados foram: (GACA)₄, (GTG)₅, (GAC)₅, M13 (5' GAG GGT GGC GGT TCT 3').

As reações foram realizadas em termociclador (Proflex PCR System Applied

USA). Os programas utilizados foram:

GAC: um ciclo de desnaturação de 94 °C por cinco minutos; 40 ciclos de: 94 °C por quinze segundos; 45 °C quarenta e cinco segundos; 72 °C por um minuto e três segundos e um ciclo final de 72 °C por 4 minutos.

GTG: um ciclo de desnaturação de 94 °C por cinco minutos; 40 ciclos de: 94 °C por quinze segundos; 55 °C quarenta e cinco segundos; 72 °C por um minuto e três segundos e um ciclo final de 72 °C por 4 minutos.

M13: um ciclo de desnaturação de 95 °C por cinco minutos; 35 ciclos de: 95 °C por trinta segundos; 35 °C por um minuto; 72 °C por um minuto e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

GACA: um ciclo de desnaturação de 94 °C por cinco minutos; 40 ciclos de: 94 °C por quinze segundos; 36 °C por quarenta e cinco segundos; 72 °C por um minuto e um ciclo final de 72 °C.

A PCR-RAPD foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução tampão de TBE 1x (Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 2 mM). As separações eletroforéticas foram realizadas em sistema horizontal a 120 V com duração de 2 horas. Como referência de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb DNA Ladder (Invitrogen-USA). A revelação da PCR-RAPD foram realizadas por imersão do gel em brometo de etídeo a 0,5 µg.mL⁻¹ durante 20 minutos e após realizada a fotodocumentação por meio de fotodocumentador Biorad Molecular Imager Gel DCOTM, empregando o software Image labTM Software (USA) (Biorad – USA).

5. Resultados e Discussão

5.2 TESTE DE VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO

O papel primário das leveduras vínicas é catalisar a rápida, completa e eficiente conversão do açúcar da uva, em especial as hexoses, em etanol, dióxido de carbono e outros componentes, como ésteres ácidos voláteis e glicerol, considerados de grande importância como metabólitos indutores de *flavour*. A célula vai responder aos estímulos ao longo da vinificação, uma vez que a disponibilidade e as concentrações de certos nutrientes se alteram a cada momento (BAUER & PRETERIUS, 2000). A mudança constante verificada é uma característica do processo de fermentação em batelada.

Apenas três linhagens (29MBTF/14, 39MBTF/14 e 50 MBTF/14) apresentaram potencial fermentativo, sendo estas provenientes da cultivar Moscato Tradicional. Este resultado é visível quando comparado com a evolução exponencial de CO₂ que apresentaram as linhagens referência *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97 e a K1 (Lallemand) (Gráficos 1 e 2). Destas, embora em pouca quantidade apenas a linhagem 29 MBTF/14 produziu H₂S. Portanto, apenas duas linhagens da série MBTF14, o que corresponde a 4%, apresentaram alta velocidade de fermentação sem produzir H₂S. A produção de CO₂, no processo fermentativo, e de etanol, entre outros fatores, pode variar de acordo com a espécie de levedura utilizada, temperatura de incubação da cultura e composição do meio de cultura. Sabe-se que a produção de etanol está diretamente vinculada à formação de ATP (energia metabólica) e oxidação de agentes que participam do processo de oxi-redução. Processos metabólicos essenciais vinculados ao crescimento celular, requerem biossíntese de energia, a qual está, em geral, correlacionada diretamente à produção de CO₂ (THORNTON, 1991).

Como a vinificação não pode ser realizada em meio estéril é importante dispor de uma levedura para inocular que apresente uma fase “lag” relativamente curta. Diminuindo a fase “lag” pode-se reduzir a interferência de microrganismos indesejáveis no processo fermentativo (AMORIN et al., 1998). A ausência de fermentação ou a lentidão no processo pode ocasionar o domínio da fermentação por linhagens presentes no mosto sobre a linhagem selecionada e, conseqüentemente, efeitos indesejáveis como produção de H₂S.

As leveduras não-*Saccharomyces* crescem bem durante estágios iniciais da fermentação, quando a concentração de etanol ainda é baixa, sendo substituídas posteriormente por *Saccharomyces* tolerantes ao etanol a elevadas concentrações de açúcares. O foi observado, neste estudo, o fato de haver um número muito grande de linhagens sem aptidão enológica. Fato este também verificado por Sabate et al. (2002). Estudo realizado por Kraková et al. (2011), a fim de investigar a diversidade genética das leveduras presentes no mosto e durante a fermentação, na Eslovenia, demonstrou que linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram encontradas somente durante a fermentação alcóolica, onde, na fase inicial do processo, as linhagens que predominavam foram as não- *Saccharomyces*. O isolamento de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* parece ter relação com a cultivar. Wlodarczyk et al. (2012), isolando leveduras das cultivares Cabernet Franc, Ancellotta e Tannat da região de Pinto Bandeira- RS, encontraram somente 16 linhagens todas oriundas da cultivar Ancellotta, com potencial fermentativo para elaboração de vinhos, ou seja, alta velocidade de fermentação, com características neutras, em relação ao fator Killer e nula produção de sulfeto

de hidrogênio. A baixa incidência de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* antes da fermentação pode dever-se ao fato de estas se encontrarem em concentrações muito reduzidas, dificultando o seu isolamento. Pode ser também verdadeiro que o processo de vinificação, nestes casos, não seja efetuado por microrganismos provenientes do vinhedo, mas se dê por ação de linhagens contaminantes de *Saccharomyces cerevisiae* presentes no ambiente da cantina. Segundo Barata et al., 2012, a proporção existente entre os microrganismos que habitam a baga da uva depende do estágio de maturação e da disponibilidade de nutrientes.

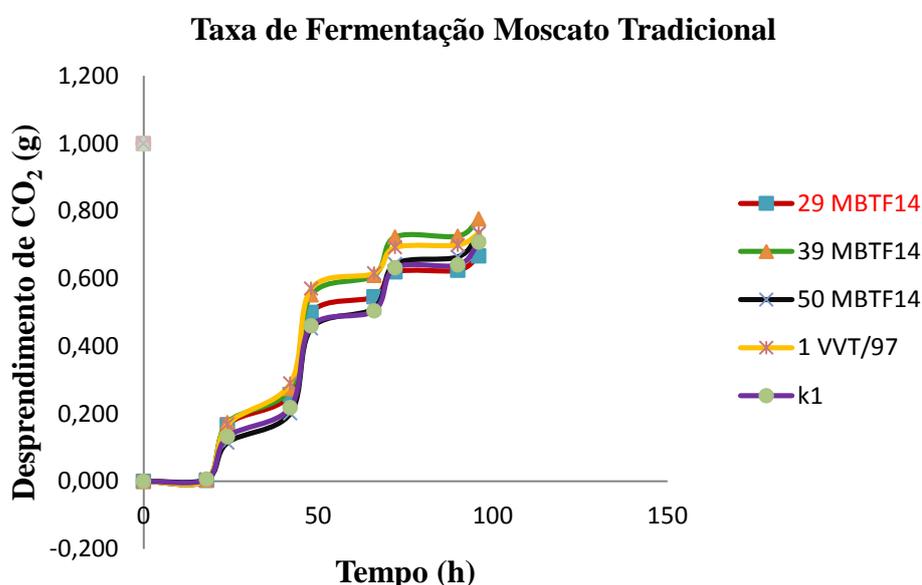


GRÁFICO 1. EVOLUÇÃO DE CO₂ DAS LINHAGENS DA CULTIVAR MOSCATO TRADICIONAL, COMPARANDO COM AS LINHAGENS PADRÃO 1VVT/97 E K1

FONTE: Autor (2015)

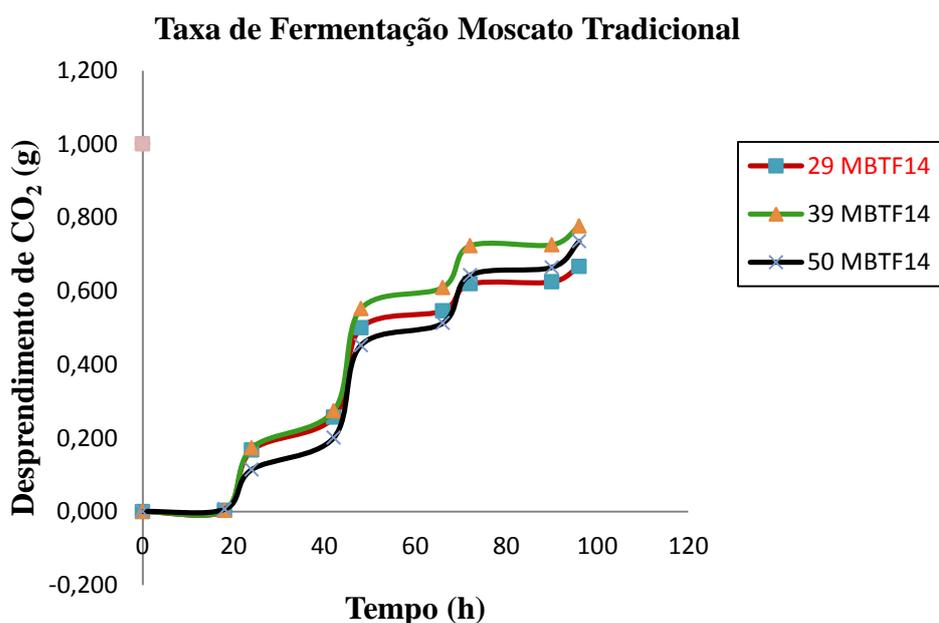


GRÁFICO 2. VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LINHAGENS MAIS PROMISSORAS ISOLADAS DA CULTIVAR MOSCATO TRADICIONAL

FONTE: Autor (2015).

5.2 PRODUÇÃO DE H₂S

Considerando todas as séries, aqui estudadas, o que fez um total de 150 linhagens isoladas observou-se que 23,33%, 19,33% e 23,33%, das linhagens apresentaram respectivamente, baixo, médio e alto desprendimento de H₂S. As linhagens foram subdividas de acordo com a produção de H₂S. As linhagens foram subdividas de acordo com a produção de H₂S pela notação “+++” indicando linhagens com alta produção, “++” com produção média e “+” linhagens com produção baixa (Figura 4). Como está apresentado no Gráfico 3, a maioria (66%) apresentaram-se capazes de produzir H₂S.



FIGURA 4. NÍVEIS DA PRODUÇÃO DE H₂S: “+++” ALTA PRODUÇÃO DE H₂S; “++” MÉDIA PRODUÇÃO, “+” BAIXA PRODUÇÃO E “-“ NENHUMA PRODUÇÃO

FONTE: Autor (2015)

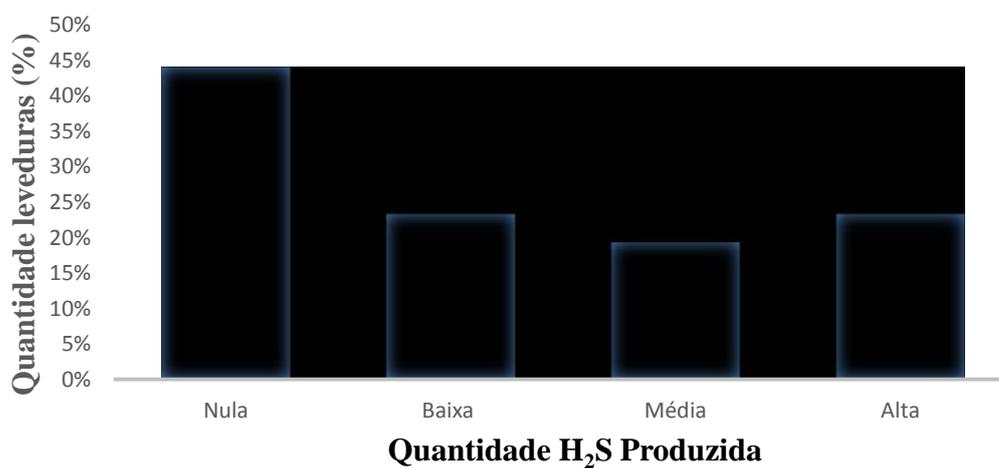


GRÁFICO 3. PRODUÇÃO DE H₂S DAS LINHAGENS ISOLADAS EM FARROUPILHA/RS

FONTE: Autor (2015)

A formação de sulfeto de hidrogênio é realizada durante a fermentação alcóolica pelas leveduras e sua ocorrência em vinhos e nas demais bebidas alcóolica está associada a cheiro de

ovo podre (UGLIANO et al., 2011; EISENMAN, 2013; WINTER et al., 2011). Por outro lado, se forem adicionadas suplementações nutricionais ao meio de fermentação, pode ocorrer a formação de 3- mercaptohexano-1-ol (3MH) e acetato de 3- mercaptohexil (3MHA), responsáveis pelo aroma frutado e decréscimo na concentração de H₂S (WINTER et al., 2011).

A biossíntese de sulfeto redutase pode ser realizado pelas leveduras da espécie de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo bastante comum a presença deste gás nos vinhos. Rankine (1963) encontrou valores que variaram de 0,1 a 1,0 mg.L⁻¹. O sulfeto de hidrogênio é um gás, que, apresenta um limiar de percepção baixo (0,9 a 1,5 ppb) (LABORATORIES, 2001) sendo a principal causa de perdas da qualidade aromática dos vinhos (JIRANEK et al., 1995; CORDENTE et al., 2009; HUANG et al., 2014).

A remoção do H₂S do vinho é complexa e problemática, pois é necessária a areação do vinho, e conseqüentemente a perda de compostos voláteis importantes, causando também possíveis oxidações. Por isso, é fundamental que, na elaboração de vinho sejam empregadas linhagens com capacidade de efetuar uma rápida combinação do H₂S formado com precursores nitrogenados ou com deficiência na atividade da sulfeto redutase (MENDES-FERREIRA et al., 2002; CORDENTE et al., 2009).

Os gráficos 4, 5 e 6 demonstram a produção de H₂S de cada linhagem isolada da região de Farroupilha- RS. A produção de sulfeto de hidrogênio pareceu variar de acordo com a cultivar. Foram isoladas linhagens que apresentaram produção de H₂S de, respectivamente, 84%, 76% e 36% das cultivares Malvasia Bianca, Moscato Tradicional e Moscato Alexandria isoladas de áreas distintas da região de Farroupilha conforme gráfico 7. A variação encontrada pode ser explicada pela composição química das diferentes cultivares empregadas, a qual privilegiou determinados tipos de microrganismos. Pode também ser devido ao tipo de tratamento fitossanitário recebido por cada cultivar. O uso de fungicidas no cultivo da videira pode ser uma fonte de precursores ou de indutores seletivos para a formação do H₂S. Estes produtos podem conter resíduos de enxofre elementar, o qual é diretamente reduzido a H₂S (JIRANECK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995). Wlodarczyk et al. (2012) observaram que 35,8% das 120 linhagens isoladas da região de Pinto Bandeira- RS provenientes de cultivares tintas, apresentaram desprendimento de sulfeto de hidrogênio.

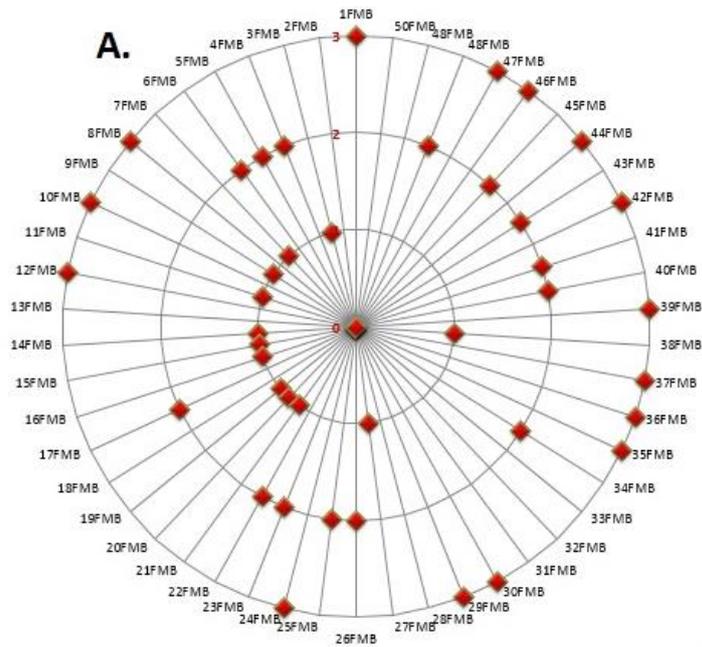


GRÁFICO 4. NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H₂S DAS LINHAGENS DA CULTIVAR MALVASIA BIANCA

FONTE: Autor (2015)

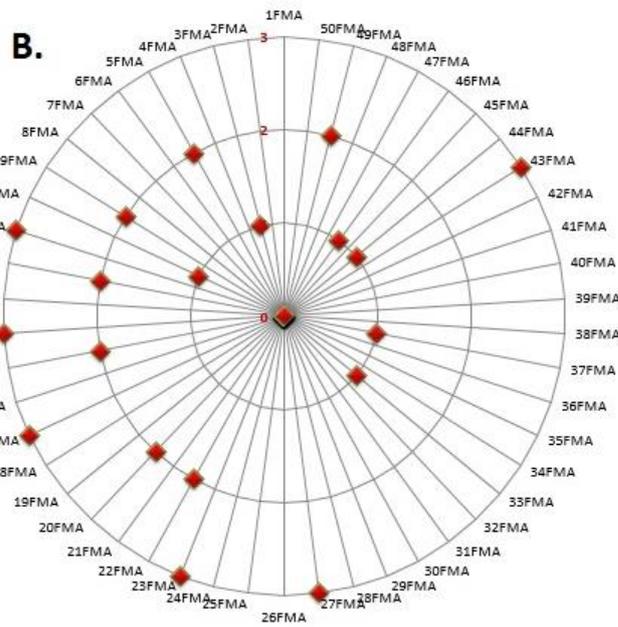


GRÁFICO 5. NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H₂S DAS LINHAGENS DA CULTIVAR MOSCATO ALEXANDRIA

FONTE: Autor (2015)

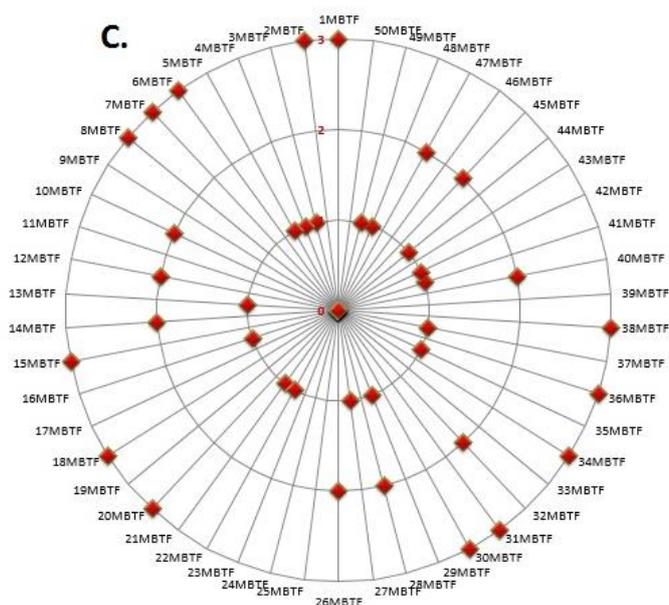


GRÁFICO 6. NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H₂S DAS LINHAGENS DA CULTIVAR MOSCATO TRADICIONAL

FONTE: Autor (2015)

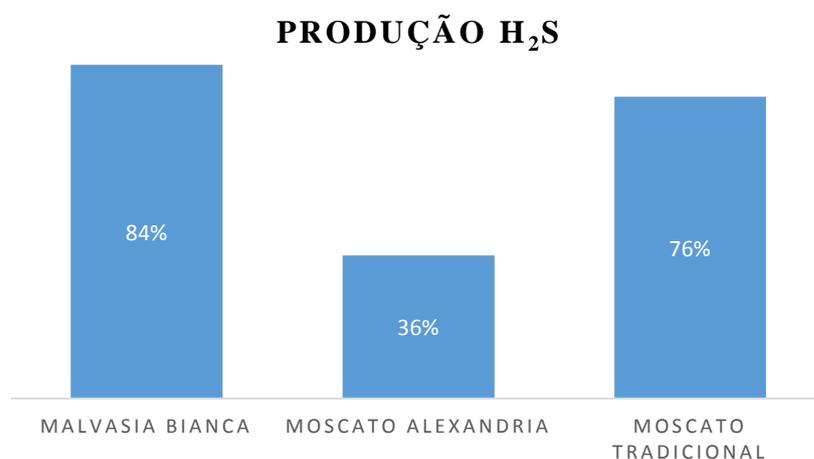


GRÁFICO 7. PORCENTAGEM DE LINHAGENS ISOLADAS DE CADA CULTIVAR EM RELAÇÃO A PRODUÇÃO DE H₂S

FONTE: Autor (2015)

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que apenas 34% do total de linhagens isoladas apresentam uma atividade extremamente baixa da enzima sulfito redutase ou são aptas em promoverem uma rápida combinação do H₂S formado com precursores nitrogenados.

Os resultados de produção de H₂S apresentados pelas leveduras isoladas de Farroupilha/RS se assemelham aos apresentados por Silva & Dalarmi (2003). Neste estudo houve o isolamento de 100 linhagens a partir de cachos de uvas Cabernet Sauvignon no Vale dos Vinhedos na safra de 2003, onde 79 linhagens (79%) produziram H₂S. Em estudo realizado em Pinto Bandeira na safra de 2012 foram selecionadas 79 linhagens de duas cultivares tintas e 46,84% apresentaram capacidade de biossintetizar H₂S (CANOSSA et al., 2012).

5.4 DETECÇÃO PROTEÍNA KILLER

Das 150 linhagens isoladas das bagas das cultivares da região de Farroupilha/RS, apenas 14 apresentaram comportamento killer (9,33%), provocando a morte da linhagem sensível Embrapa 26B. Isto foi observado pela formação do halo de morte em torno da linhagem testada (Figura 5). Das 14 linhagens Killer, 64,28% foram também produtoras de H₂S sendo portanto fortes candidatas a prejudicar tanto a fermentação quanto a qualidade do produto final, mesmo que sejam microrganismos não-*Saccharomyces* (SILVA, 1996). Estudo realizado por Silva (1996) no município de Bento Gonçalves- RS, demonstrou que 24,7% dos microrganismos isolados apresentaram fenótipo killer.

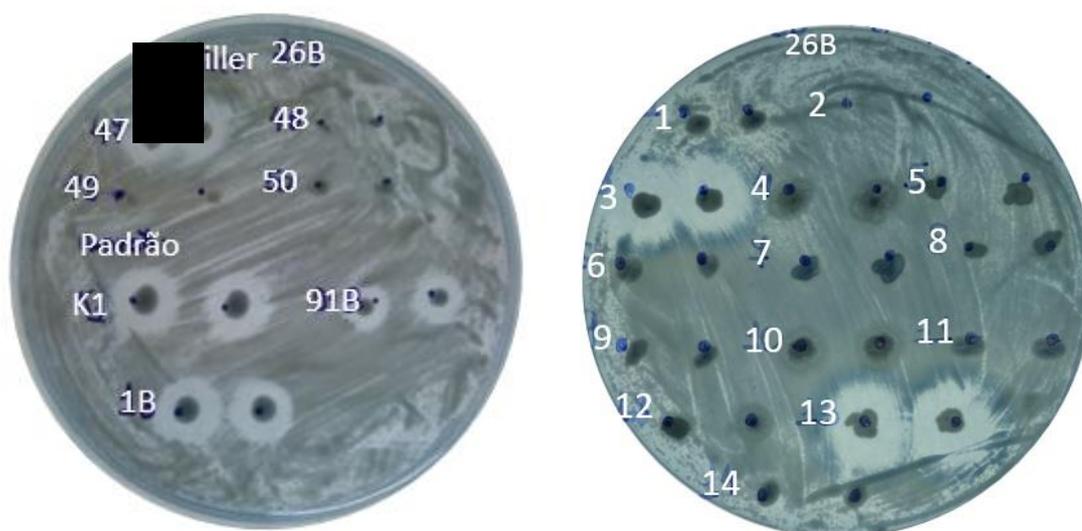


FIGURA 5. HALO DE MORTE PROVOCADO POR ALGUMAS DAS LEVEDURAS ISOLADAS NA LINHAGEM EMBRAPA 26B

FONTE: Autor (2015)

As linhagens que apresentaram comportamento killer foram 8FMA, 19FMA, 33FMA, 37FMA, 46FMA e 47FMA da cultivar Moscato Alexandria, 3MBTF, 10MBTF, 12MBTF, 13MBTF, 23MBTF, 26MBTF e 28MBTF que pertencem a cultivar Moscato Tradicional e apenas uma da cultivar Malvasia Bianca sendo a 33FMB. Foi observado que 42% das linhagens isoladas de mosto em fermentação das variedades Malbec e Merlot apresentaram fenótipo Killer (SANGORRÍN et al., 2001). Na região de Pinto Bandeira- RS 6,33% das linhagens apresentaram comportamento Killer (CANOSSA, et al., 2012). Estudo também realizado na região Norte da Patagônia, mostrou que 35% das linhagens isoladas apresentaram fenótipo killer (SANGORRÍN et al., 2007). É importante selecionar leveduras neutras, ou seja, com fenótipo K^-R^+ , em processos não estéreis onde linhagens sensíveis possam contribuir, com sua atividade metabólica, para aumentar a qualidade ou mesmo imprimir características regionais ao produto elaborado (SILVA 1996; ORTIZ et al.2013). Silva, (1996) ressalta ainda que as leveduras devem ser selecionadas por suas características enológicas e não por sua atividade “killer”.

O mosto conta com a presença de inúmeros microrganismos autóctones de comportamento desconhecido que podem comprometer a qualidade do vinho. Com o objetivo de reduzir a carga destes microrganismos utiliza-se SO_2 e, posteriormente, inocula-se a levedura selecionada. Linhagens com comportamento “killer” têm sido utilizadas com finalidade de inibir microrganismos autóctones desconhecidos, entretanto essa característica não garante por si só, a predominância de uma determinada levedura no processo. Por conta disso se faz necessário conhecer o perfil das linhagens autóctones existentes no mosto e sua capacidade de resistir ao fator “killer” como citado por Silva (1999a).

5.5 SENSIBILIDADE E NEUTRALIDADE AO FATOR KILLER

Na região de Farroupilha, na safra de 2014 apenas 6,66% (Tabela 1) das linhagens isoladas apresentaram sensibilidade a proteína killer e 84% das linhagens apresentaram-se neutras (Figura 6).

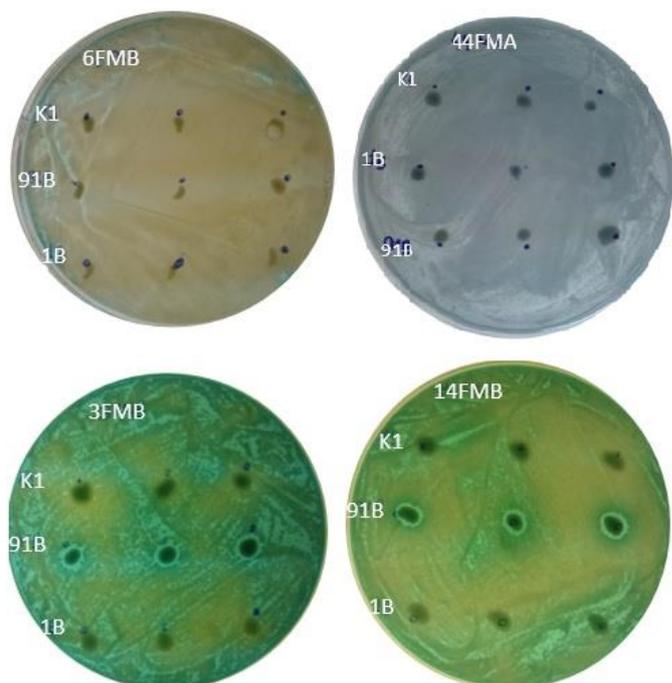


FIGURA 6. ALGUMAS LINHAGENS SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS AO FATOR KILLER

FONTE: Autor (2015)

TABELA 1. PANORAMA GERAL DAS LINHAGENS KILLER, NEUTRA E SENSÍVEL ISOLADAS DA REGIÃO DE FARROUPILHA-RS

Fenótipo	Leveduras	Total	Total em porcentagem(%)
Sensível	33FMB/14, 7 FMB/14, 14 FMB/14, 4MBTF/14, 8 MBTF/14, 11 MBTF/14, 24 MBTF/14, 25 MBTF/14, 45 MBTF/14, 48 MBTF/14	10	6,66
<i>Killer</i>	33FMB/14, 8FMA/14, 19 FMA/14, 33 FMA/14, 37 FMA/14, 46 FMA/14, 27 FMA/14, 3MBTF/14, 10 MBTF/14, 12 MBTF/14, 13 MBTF/14, 23 MBTF/14, 26 MBTF/14, 28 MBTF/14	14	9,33
Neutro	Demais Linhagens	124	84
Total		150	100

FONTE: Autor (2015)

Além dos fatores ambientais típicos da região de origem das leveduras, a atividade killer depende também da interação entre a população microbiana existente na microflora da uva. As leveduras sensíveis à toxina killer dependem de alguns fatores, tais como, o tipo da toxina que as linhagens killer produzem, a linhagem de leveduras expostas à toxina, bem como a fase de crescimento da mesma e o estado da cultura (BARTUNEK et al., 2001). Na Espanha, 64%

das leveduras isoladas apresentaram fenótipo neutro, enquanto 38% apresentaram-se killer (ORTIZ et al., 2013). Na Patagônia- Argentina, 40% das leveduras isoladas apresentaram sensibilidade ao fator Killer e apenas 25% apresentaram-se neutras (SANGORRÍN et al., 2007). Na região de Pinto Bandeira, RS, no ano de 2012, nenhuma das 79 linhagens isoladas apresentou sensibilidade ao fator killer (CANOSSA et al., 2012). A frequência de linhagens killer, sensível e neutra depende do ambiente de onde foram isoladas e especialmente das linhagens de referência empregadas (CANOSSA et al., 2014).

5.6 SENSIBILIDADE KILLER/KILLER

Uma linhagem “killer” pode apresentar sensibilidade à outra linhagem killer. Este teste teve o objetivo de detectar linhagens killer que sejam sensíveis à outra levedura killer, comparando-as uma com as outras para observar a formação ou não do halo de morte.

Silva (1999b) mostrou que a linhagem 1B apresentou ao mesmo tempo a característica killer, neutra e sensível, uma vez que matou a linhagem sensível 26B, apresentando resistência à linhagem K1 e foi sensível à ação da proteína killer da linhagem 91B. O mesmo ocorreu em um estudo realizado por Canossa et al. (2012), onde as linhagens padrão 91B e 1B foram mortas pelas linhagens oriundas da região de Farroupilha 12 MPB/12 e 30MPB/12, ambas produtoras da toxina killer.

Nenhuma das linhagens testadas apresentou sensibilidade à outra linhagem killer. Entretanto a linhagem padrão killer 91B foi morta pelas linhagens 19FMA/14, 37FMA/14, 47FMA/14 e 33FMB/14 (Tabela 2). No processo de vinificação pode haver interações entre leveduras killer autóctones entre si e entre leveduras selecionadas e leveduras autóctones autóctones, uma vez que interações entre linhagens killer também já foram observadas por Starmer et al. (1987), Silva (1996), Soares & Sato (1999), Silva (1999b), Yap et al. (2000), Pérez-Nevado et al. (2006).

TABELA 2. LINHAGENS QUE APRESENTARAM FATOR KILLER POSITIVO SOBRE A LINHAGEM EMBRAPA 91B

Linhagens padrão

Linhagens killer	K1	1B	91B
19FMA/14	-	-	+
37FMA/14	-	-	+
47FMA/14	-	-	+
33FMA/14	-	-	+

FONTE: Autor (2015)

5.7 IDENTIFICAÇÕES DAS LINHAGENS POR PCR-RFLP

As linhagens, que mostraram intensa fermentação, ou seja, 29MBTF/14, 39MBTF/14 e 50MBTF14 apresentaram fragmentos de amplificação em aproximadamente 880 pares de base (Figura 7). A quantidade de pares de base do amplicon obtido é característica da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (GUILLAMÓN et al., 1998). As linhagens isoladas da cultivar Moscato Tradicional com velocidade de fermentação elevada, foram identificadas, portanto, *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 3).

Segundo Beltran et al. (2002) as linhagens predominantes na superfície da uva da cultivar Garnatxa e dependendo do ano de colheita, foram as espécies *Candida stellata* e *Hanseniaspora uvarum*. Em 1996, os autores encontraram apenas a espécie *Hanseniaspora uvarum* e em 1999, apenas *Saccharomyces cerevisiae*.

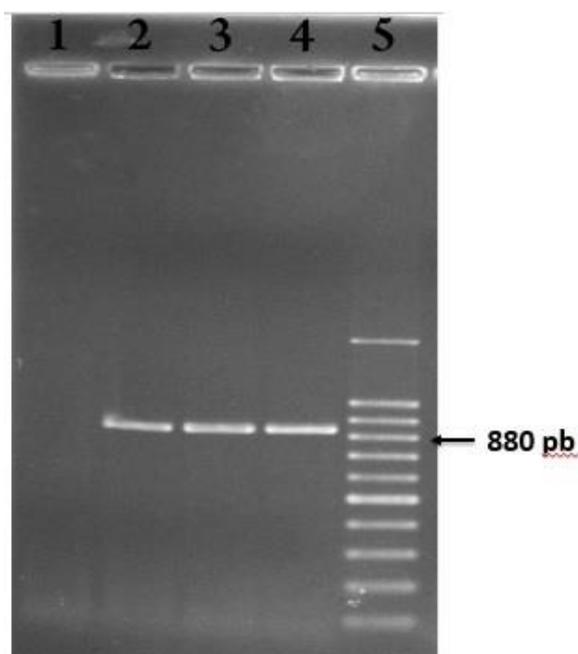


FIGURA 7. GEL AGAROSE 1,5% DAS LINHAGENS QUE APRESENTARAM POTENCIAL FERMENTATIVO COM OS INICIADORES ITS1 E ITS4

LINHA: 1- Branco, 2- 29MBTF/12, 3-39MBTF/14, 4- 50MBTF/14, 5- Marcador

FONTE: Autor (2015)

TABELA 3. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS FERMENTESCÍVEIS ISOLADAS DA CULTIVAR MOSCATO TRADICIONAL

Linhagens	Resultado do Genótipo com IT1-ITS4	Capacidade fermentativa	Comportamento Killer	Produção H₂S
29MBTF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutra	Baixa
39MBTF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutra	Nula
50MBTF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alta	Neutra	Nula

FONTE: Autor (2015)

As 14 linhagens killer isoladas de diferentes cultivares também foram identificadas (Tabela 4). A linhagem 8FMA14 apresentou fragmento em 450 pares de base, após realização de PCR com os iniciadores ITS1 e ITS4. A região ITS1-5.8S-ITS2 das linhagens 10MBTF14, 12MBTF14, 13MBTF14, 23MBTF14, 26MBTF14, 28MBTF14, 33FMB14, 19FMA14, 37FMA14 e a 47FMA14 não puderam ser amplificadas, utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 (Figura 8). Estas mesmas linhagens foram submetidas a uma nova PCR, utilizando os iniciadores 28Candiv3 e 28Candiv4. Estes iniciadores foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia- CNPUV para identificar especificamente as linhagens da espécie *Candida diversa*, pois normalmente tem-se observado que os primers ITS1 e ITS4, talvez por questão de falta de pareamento. Desta forma, foi possível identificar as linhagens em estudo, confirmando se tratar da espécie *Candida diversa*. A amplificação com os iniciadores 28Candiv3 e 28Candiv4 foram obtidos fragmentos de 292 pares de base (Figura 9). Hierro et al. (2006) isolaram principalmente linhagens das espécies *Hanseniaspora uvarum* e *Candida diversa* do mosto de uvas brancas. As demais linhagens killer em estudo como a 3MBTF14, 33FMA14 e 46FMA14 apresentaram amplificação, com os iniciadores ITS1 e ITS4 estimada em 750 pares de base, podendo se tratar das espécies *Hanseniaspora opuntiae* ou *Hanseniaspora uvarum*.

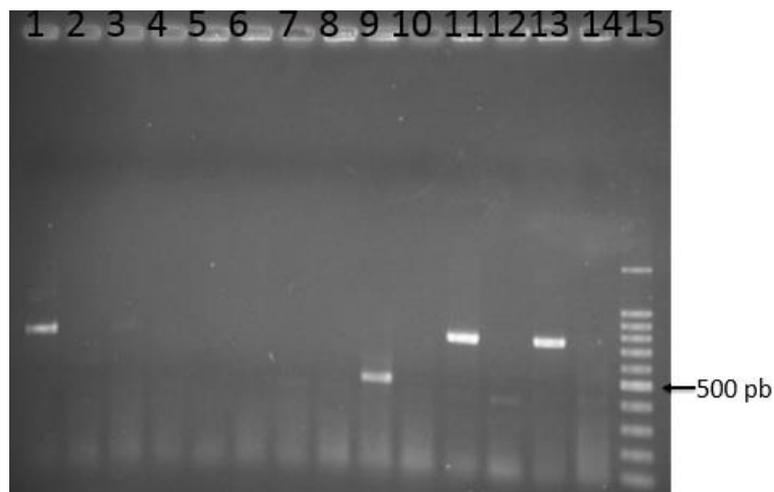


FIGURA 8. PERFIL ELETROFORETICO DA REGIÃO RDNA ITS1-5.8S-ITS2 AMPLIFICADA COM OS PRIMERS ITS1 E ITS4 DAS LINHAGENS KILLER ISOLADAS DA REGIÃO DE FARROUPILHA- RS

LINHA: 1- 3MBTF14; 2- 10MBTF14; 3- 12MBTF14; 4- 13MBTF14; 5- 23MBTF14; 6- 26MBTF14; 7-28MBTF14; 8-33FMB14; 9- 8FMA14; 10-19FMA14; 11-33FMA14; 12- 37FMA14; 13-46FMA14; 14-47FMA14; 15-Marcador

FONTE: Autor (2015)

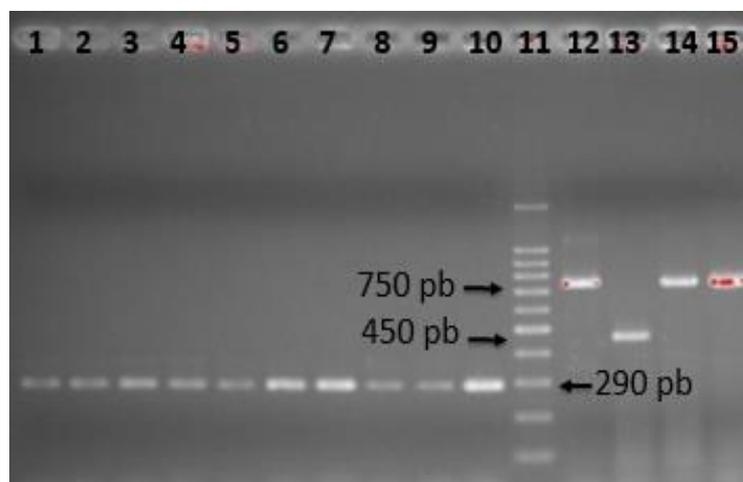


FIGURA 9. PERFIL ELETROFORETICO DA REGIÃO RDNA ITS1-5.8S-ITS2 AMPLIFICADA COM OS PRIMERS 28CANDIV3 E 28CANDIV 4 E ITS1 E ITS4 DAS LINHAGENS KILLER ISOLADAS DA REGIÃO DE FARROUPILHA- RS

LINHA:1-10MBTF; 2- 12MBTF; 3- 13MBTF; 4- 33FMB; 5- 23 MBTF; 6- 26 MBTF; 7- 28 MBTF; 8-19 FMA; 9-37 FMA; 10- 47FMA; 11- Marcador; 12- 3MBTF; 13-8 FMA; 14- 46FMA; 15- 33 FMA

FONTE: Autor (2015)

Para a diferenciação destas espécies foi utilizada a técnica de PCR-RFLP com as enzimas de restrição CfoI, HinfI e DdeI (Figura 10). A linhagem 3MBTF14 apresentou fragmentos com tamanhos de 300-70-80 pares de base, utilizando a enzima DdeI. Estes fragmentos são característicos da espécie *Hanseniaspora uvarum* (WANG & LIU, 2013).

Leveduras isoladas da cultivar Campbell, na Coréia, tinham como a espécie representativa a *Hanseniaspora uvarum* (Hong & Park, 2013). A levedura 8FMA14 apresentou fragmentos em: 200-100 pares de base com a enzima CfoI e 230-240 com a HinfI. Segundo Agustini et al. (2014), estes fragmentos são característicos da espécie *Starmerella bacillaris*. As linhagens 33FMA14 e 46FMA14 apresentaram amplificação em 750 pares de base utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4. O produto de PCR foi clivado com a enzima de restrição DdeI, apresentando fragmentos em 50-200-500, entretanto estes fragmentos não correspondiam a nenhuma espécie citada na literatura. Foi efetuada uma nova PCR com os primers 28Candiv 3 e 28Candiv 4, apresentando amplificação em 292 pb, o que corresponde à *Candida diversa* (Figura 11).

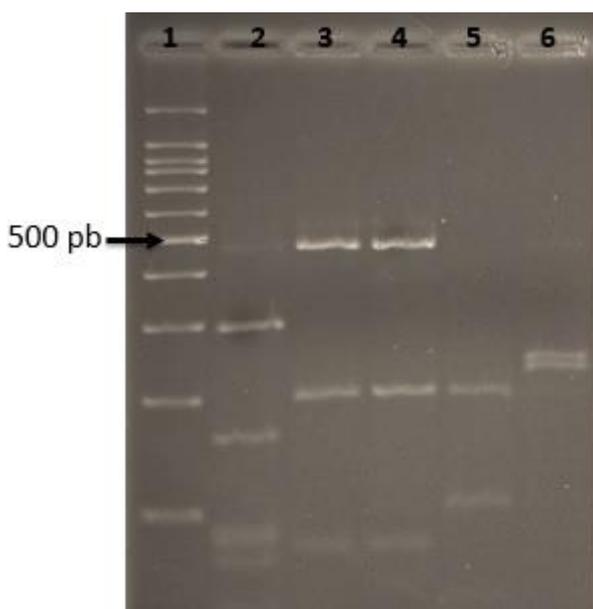


FIGURA 10. PERFIS DOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO CFOI, HINFI E DDEI

LINHA:1- MARCADOR; 2- 3MBTF (DdeI); 3- 33FMA (DdeI); 4- 46 FMA (DdeI); 5- 8FMA (CfoI); 6- 8FMA (HinfI)

FONTE: Autor (2015)

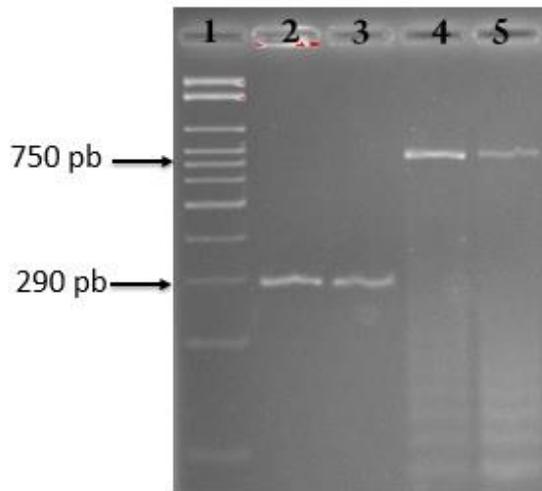


FIGURA 11. FOTO GEL DE AGAROSE 1,5% UTILIZANDO OS INICIADORES ITS1 E ITS4 E 28CANDIV 3 E 28CANDIV 4

LINHA: 1- Marcador; 2- 33FMA(CAND); 3- 46FMA(CAND); 4- 33FMA(ITS), 5- 46FMA(ITS)

FONTE: Autor (2015)

TABELA 4. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS KILLER DAS LINHAGENS ISOLADAS DE FARROUPILA

Linhagens Killer	Resultado do Genótipo com IT1-ITS4	Produção de H₂S
33FMB	<i>Candida diversa</i>	Média
8FMA	<i>Starmerella bacillaris</i>	Nula
19FMA	<i>Candida diversa</i>	Nula
37FMA	<i>Candida diversa</i>	Baixa
33FMA	<i>Candida diversa</i>	Baixa
46FMA	<i>Candida diversa</i>	Baixa
47FMA	<i>Candida diversa</i>	Média
3MBTF	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Baixa
10MBTF	<i>Candida diversa</i>	Média
12MBTF	<i>Candida diversa</i>	Média

13MBTF	<i>Candida diversa</i>	Baixa
23MBTF	<i>Candida diversa</i>	Nula
26MBTF	<i>Candida diversa</i>	Média
28MBTF	<i>Candida diversa</i>	Média

FONTE: Autor (2015)

Todas linhagens em questão foram devidamente identificadas (Tabela 4). A microflora mostrou-se diversificada, considerando que apenas as linhagens killer e linhagens que apresentaram intensa fermentação tenham sido identificadas. A espécie de *Candida diversa* foi a mais representativa, entre as linhagens killer. Diversas espécies de leveduras podem ser isoladas a partir da baga da uva, entre estas estão: *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Candida*, *Hansenula*, *Hanseniospora*, *Pichia*, *Zigossacharomyces* (HEARD & FLEET, 1986). Estudo recente realizado por Englezos et al. (2015), demonstrou que linhagens pertencentes à espécie de *Starmerella bacillaris* possuem aplicação potencial em vinificações aliadas a linhagem *Saccharomyces cerevisiae*, agregando importantes características ao produto final.

5.8 DIVERSIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS *Saccharomyces cerevisiae* POR PCR-RAPD

Se por um lado, as leveduras reduzem o risco de deterioração e alterações com relação ao aroma do vinho, por outro, podem também causar perdas de determinados aromas e sabores (ROMANO et al., 2003). As leveduras podem ser isoladas em diferentes fases de fermentações espontâneas (PULVIRENTI et al., 2009) ou diretamente da superfície das bagas de uvas (SILVA, 1996).

A variabilidade genética de leveduras tem sido objeto de estudo por parte de muitos pesquisadores (COUTO et al., 1996; ANDRIGHETTO et al., 2000; CARUSO et al., 2002; ANDRADE et al., 2006, 2009; BOVO et al., 2009; CAPECE et al., 2010, 2012; SANGORRÍN et al., 2013). A variabilidade genética dos microrganismos pode contribuir aumentando a complexidade do vinho imprimindo características específicas de determinadas regiões.

O uso da PCR-RAPD permite obter a chamada “Impressão digital” formada por diferentes fragmentos amplificados com tamanhos diferentes, gerando um padrão que é

espécie-específica ou linhagem-específica e a técnica vêm sendo utilizada para a diferenciação genética de leveduras vínicas (ORBERA-RATÓN, 2004).

Os iniciadores (GTG)₅, (GAC)₅ e M13 geraram produtos de amplificação em todas linhagens em estudo (Figuras 12, 14, 16, 20 e 21). Entretanto, o iniciador (GACA)₄ não foi capaz de formar fragmentos de amplificação para todas linhagens em questão (Figuras 18 e 21). Isso sugere que este primer não encontrou sítios compatíveis necessários para amplificar regiões do DNA de algumas linhagens.

A análise de RAPD com o iniciador (GTG)₅ e (GAC)₅ permitiu a discriminação de dois grupos dentro da espécie de *Saccharomyces cerevisiae*. O primeiro grupo constituído pelas linhagens K1, 1vvt97, A36 e 26B e K1, 1vvt97, 26B; 1B, 91B como mostram os Dendrogramas das Figuras 13 e 15. Isso mostra que as linhagens k1, 1vvt97 e 26B possuem similaridades, quando a análise é realizada com estes iniciadores. Um menor grau de diversidade foi obtido com os iniciadores M13 e (GACA)₄, permitindo também a obtenção de dois grupos, porém com menor diferenciação. As linhagens agrupadas foram 1vvt97, 91B e 1B contra a 1vvt97 respectivamente (Figuras 17 e 19). A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* 1vvt97 apresentou diferenças genéticas com relação às demais linhagens em estudo. Segundo Couto et al. (1996), o nível de discriminação por RAPD depende primordialmente do iniciador utilizado. Caruso et al. (2002) diferenciaram leveduras vínicas, utilizando os iniciadores (GTG)₅ e (GAC)₅. Neste estudo o iniciador (GTG)₅ gerou um polimorfismo genético entre estas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Estes mesmos iniciadores geraram o mesmo perfil para todas linhagens de *Kloekera apiculata*. Estudando a diversidade genética de leveduras relacionadas com carne seca curada, Andrade et al. (2006) verificaram que a PCR-RAPD com o iniciador (GACA)₄ proporcionou uma maior discriminação que os iniciadores (GAC)₅ e (GTG)₅. O iniciador (GTG)₅ foi utilizado por Englezos et al. (2015) para diferenciação de linhagens de *Starmerella bacillaris* e apresentou similaridade acima de 70%. O iniciador M13 apresentou resultados insatisfatórios na diferenciação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (AGNOLUCCI et al., 2007). Por outro lado Cocolin et al. (2004) relatam que o iniciador M13 mostrou ser o mais apropriado na diferenciação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. O iniciador M13 mostrou-se apto na diferenciação de estirpes de leveduras isoladas de queijos (ANDRIGHETTO et al., 2000).

Todos iniciadores utilizados apresentaram-se aptos na diferenciação das linhagens em estudo. No geral, a técnica de RAPD permitiu a obtenção de dois grupos de leveduras,

mostrando que há diferenças genótípicas entre as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* em questão.

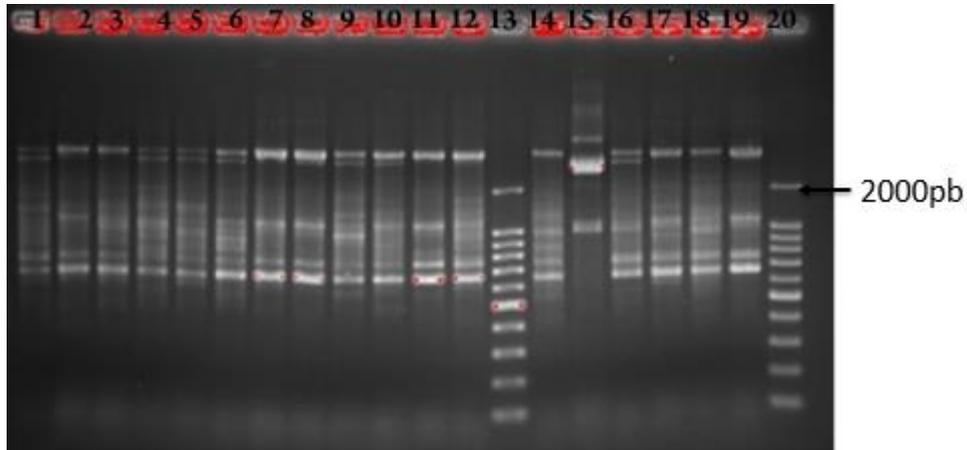


FIGURA 12. PERFIL ELETROFORETICO UTILIZANDO O INICIADOR (GTG)₅

LINHA: 1- A1; 2- A5; 3- A8; 4- A10; 5- A12; 6- A15; 7- A16; 8-A18; 9- A21; 10-A25; 11-A30; 12-A33; 13-MARCADOR; 14-A35; 15-A36; 16-A38; 17-A40; 18-2MB13; 19-2CO13; 20-MARCADOR

FONTE: Autor (2015)

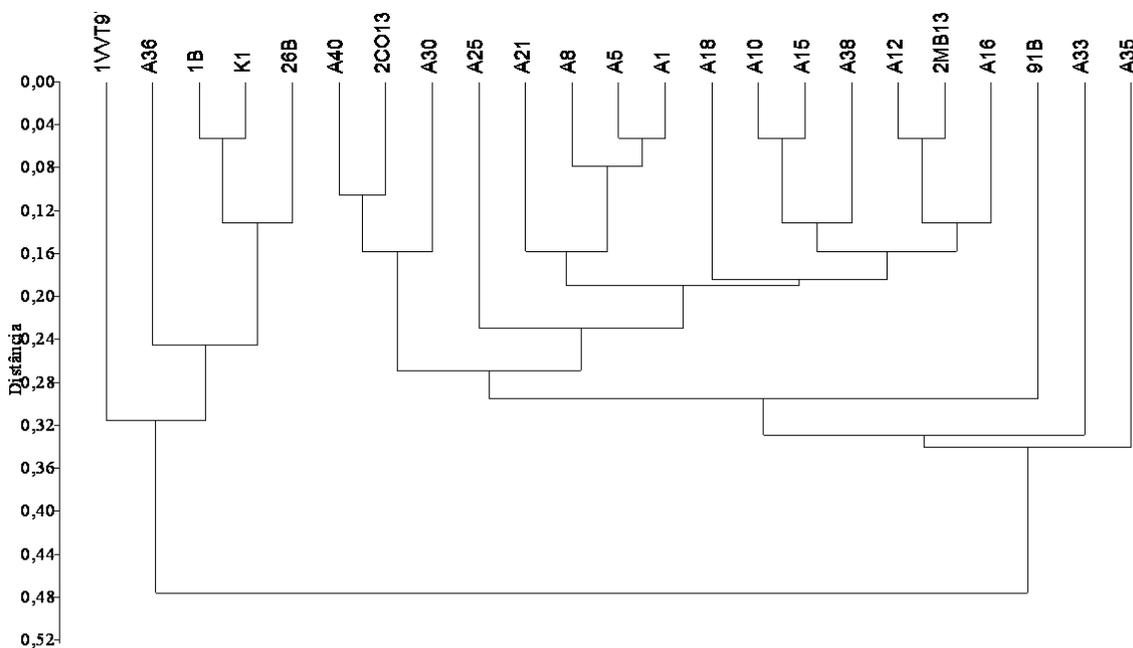


FIGURA 13. DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZANDO O INICIADOR (GTG)₅

FONTE: Autor (2015)

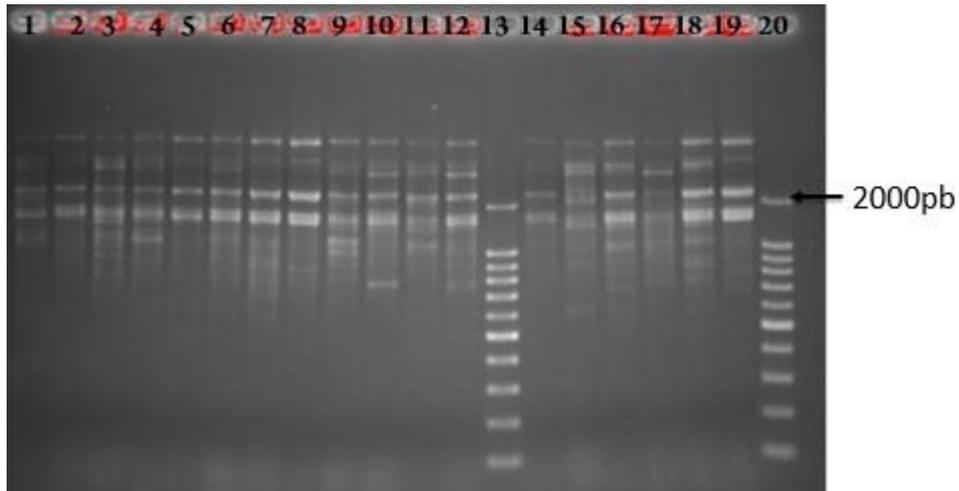


FIGURA 14. PERFIL ELETROFORETICO UTILIZANDO O INICIADOR (GAC)₅

LINHA: 1- A1; 2- A5; 3- A8; 4- A10; 5- A12; 6- A15; 7- A16; 8- A18; 9- A21; 10- A25; 11- A30; 12- A33; 13- MARCADOR; 14- A35; 15- A36; 16- A38; 17- A40; 18- 2MB13; 19- 2CO13; 20- MARCADOR

FONTE: Autor (2015)

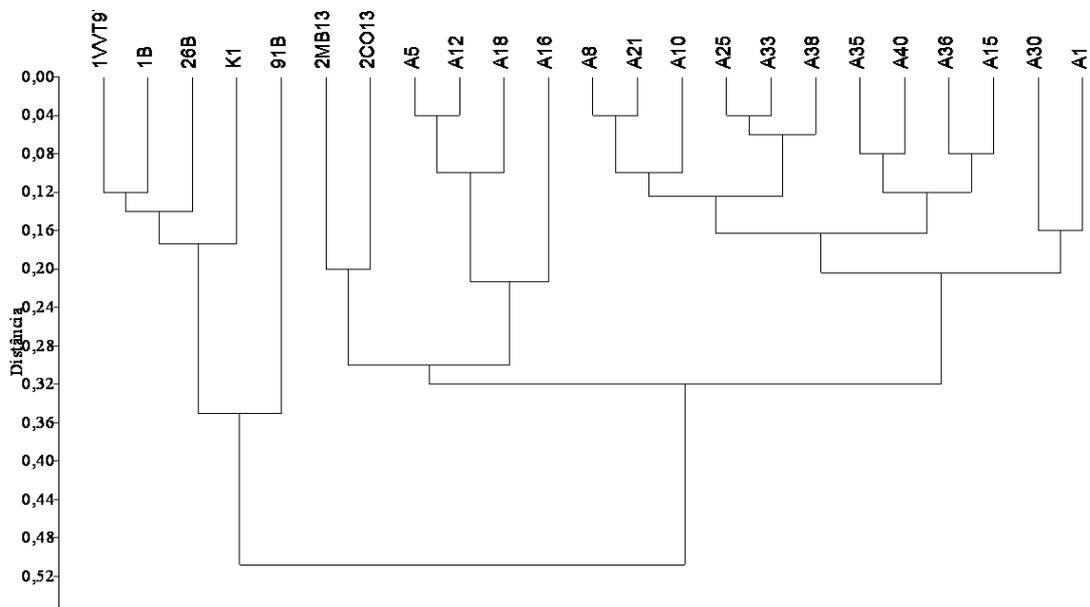


Figura 15. DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZANDO O INICIADOR (GAC)₅

FONTE: Autor (2015)

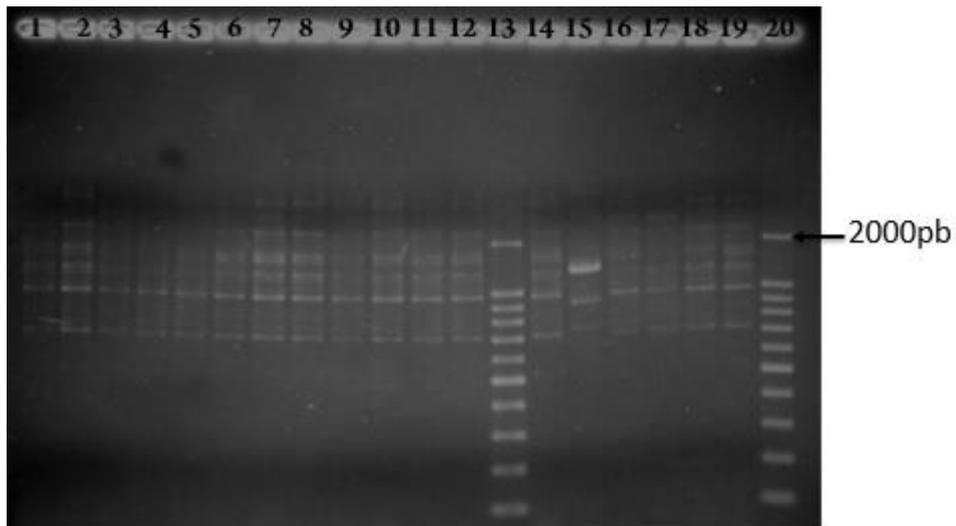


FIGURA 16. PERFIL ELETROFORETICO UTILIZANDO O INICIADOR M13

LINHA: 1- A1; 2- A5; 3- A8; 4- A10; 5- A12; 6- A15; 7- A16; 8- A18; 9- A21; 10- A25; 11- A30; 12- A33; 13- MARCADOR; 14- A35; 15- A36; 16- A38; 17- A40; 18- 2MB13; 19- 2CO13; 20- MARCADOR

FONTE: Autor (2015)

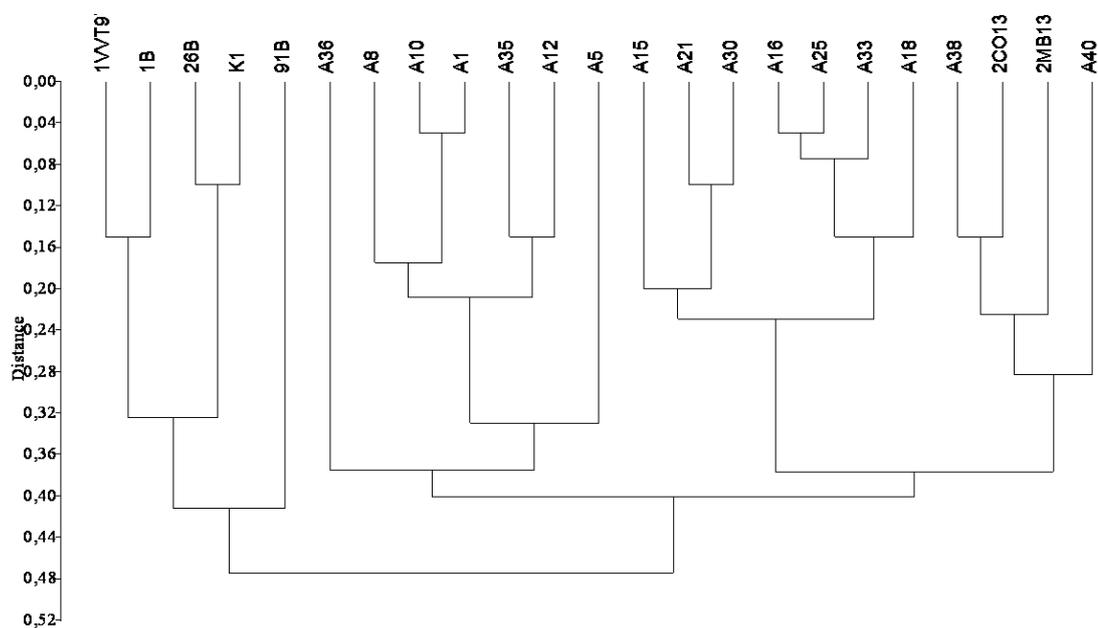


FIGURA 17. DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZANDO O INICIADOR M13

FONTE: Autor (2015)

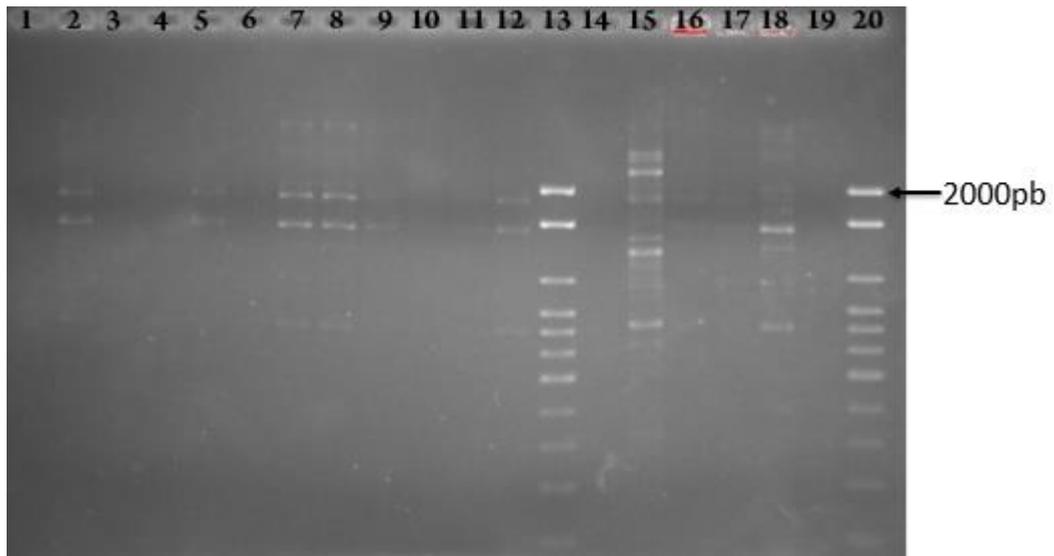


FIGURA 18. PERFIL ELETROFORETICO UTILIZANDO O INICIADOR (GACA)₄

LINHA: 1- A1; 2- A5; 3- A8; 4- A10; 5- A12; 6- A15; 7- A16; 8- A18; 9- A21; 10- A25; 11- A30; 12- A33; 13- MARCADOR; 14- A35; 15- A36; 16- A38; 17- A40; 18- 2MB13; 19- 2CO13; 20- MARCADOR

FONTE: Autor (2015)

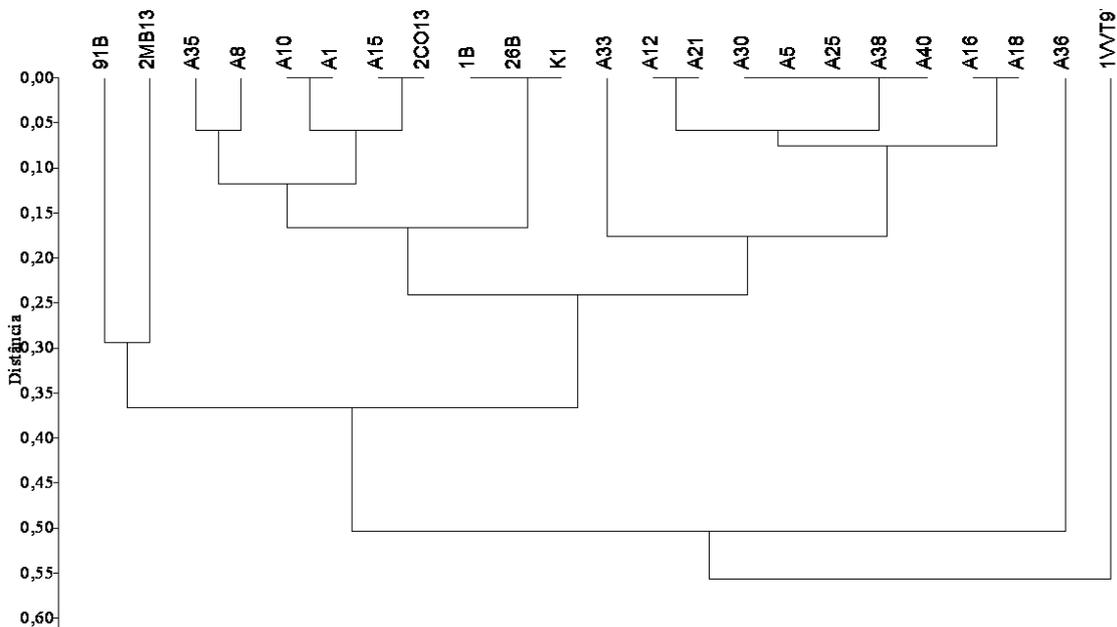


FIGURA 19. DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA DAS LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZANDO O INICIADOR (GACA)₄

FONTE: Autor (2015)

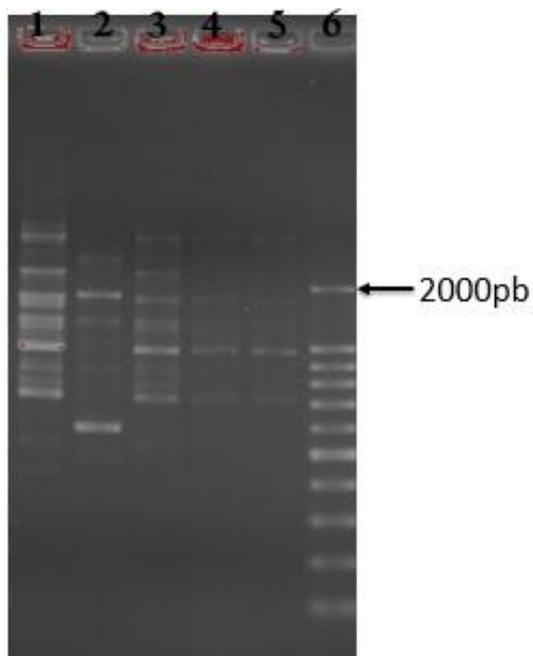


FIGURA 20. PERFIL ELETROFORETICO DAS LINHAGENS PADRÃO UTILIZANDO O INCIADOR M13

LINHA: 1- 1- 1VVT97; 2- 91B; 3- 1B; 4- 26B; 5-K1; 6- MARCADOR

FONTE: Autor (2015)

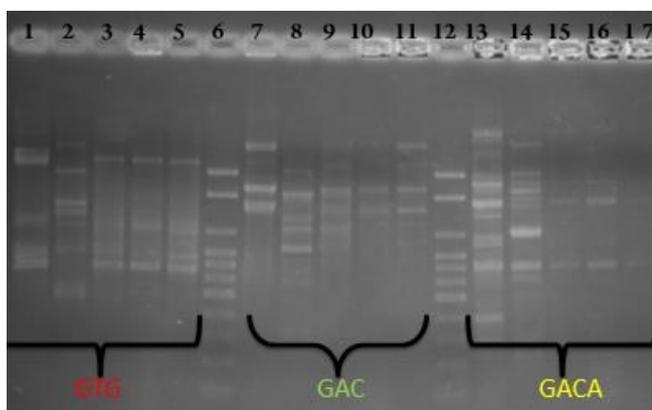


FIGURA 21. PERFIL ELETROFORETICO DAS LINHAGENS PADRÃO UTILIZANDO OS INCIADORES $(GTG)_5$, $(GAC)_5$ E $(GACA)_4$

LINHA: 1- 1VVT97; 2- 91B; 3- 1B; 4- 26B; 5-K1; 6- MARCADOR $(GTG)_5$ / 1- 1VVT97; 2- 91B; 3- 1B; 4- 26B; 5-K1; 6- MARCADOR $(GAC)_5$ / 1- 1VVT97; 2- 91B; 3- 1B; 4- 26B; 5-K1; 6- MARCADOR $(GACA)_4$

FONTE: Autor (2015)

6. CONCLUSÕES

Linhagens aptas para elaboração de vinhos não são tão frequentes, sendo que a presença de tais linhagens nas bagas de uva depende de diversos fatores. Dentre estes fatores parece ter relação com a cultivar da qual estas leveduras são isoladas, assim como a formação de H₂S pelas leveduras. A cultivar empregada para isolamento de linhagens, pode privilegiar a presença de determinada microbiota pela sua composição química, a qual poderá ou não favorecer a formação deste gás.

A diferenciação genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* por PCR-RAPD mostrou ser uma boa ferramenta para diferenciar geneticamente linhagens da mesma espécie. Contudo uma maior discriminação de algumas linhagens depende estritamente dos oligonucleotídeos empregado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNOLUCCI, M., SCARANO, S., SANTORO, S., SASSANO, C., TOFFANIN, A., NUTI, M. (2007). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous *Saccharomyces* spp. strains associated to natural fermentation of 'Malvasia delle Lipari'. *Lett Appl Microbiol*, 45(6):657–662.

AGNOLUCCI, M., VIGENTINI, I., CAPURSO, G., MERICO, A., TIRELLI, A., COMPAGNO, C., FOSCHINO, R., NUTI, M. (2009). Genetic diversity and physiological traits of *brettanomyces bruxellensis* strains isolated from tuscan sangiovese wines. *Int J Food Microbiol*, 130(3):238–244.

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. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(12):5645–5654.

ALAM, M. Z., ALAM, Q., JIMAN-FATANI, A., KAMAL, M. A., ABUZENADAH, A. M., CHAUDHARY, A. G., AKRAM, M., HAQUE, A. (2014). Candid identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(5):1437–1451.

ALCOBA-FLÓREZ, J., DEL PILAR ARÉVALO-MORALES, M., PÉREZ-ROTH, E., LAICH, F., RIVERO-PÉREZ, B., MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. (2007). Yeast molecular identification and typing. In *Méndez-Vilas, A., editor, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, pages 535–546. Formatex.

- AMORIN, L. P. et al. (1998). Aplicação de leveduras secas regionais em microvinificações controladas. In: *Anais do IV Simpósio de Viticultura do Alentejo*. v.2. Évora (Portugal), p 47-55.
- ANDRADE, M. J., RODRÍGUEZ, M., CASADO, E. M., BERMÚDEZ, E., CÓRDOBA, J. J. (2009). Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compounds production. *Food Microbiol*, 26(6):578–586.
- ANDRADE, M. J., RODRÍGUEZ, M., SÁNCHEZ, B., ARANDA, E., CÓRDOBA, J. J. (2006). DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *Int J Food Microbiol*, 107(1):48–58.
- ANDRIGHETTO, C., PSOMAS, E., TZANETAKIS, N., SUZZI, G., LOMBARDI, A. (2000). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett Appl Microbiol*, 30(1):5–9.
- BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., AND LOUREIRO, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol*, 153(3):243–259.
- BARRE, P; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEULTAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; SALMON, J.M. La levedura de fermentación alcohólica. In: FLANZY, C. *Enología: fundamentos científicos e tecnológicos*. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, 2000, p. 274-315.
- BARTUNEK, M., JELINEK, O., VONDREJS, V. (2001). Susceptibility of individual cells of *saccharomyces cerevisiae* to the killer toxin k1. *Biochem Biophys Res Commun*, 283(2):526–530.
- BAU, M., CASTELLÁ, G., BRAGULAT, M. R., CABAÑES, F. J. (2005). DNA-based characterization of ochratoxin-A-producing and nonproducing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. *Res Microbiol*, 156(3):375–381.
- BAUER, F. F. PRETORIUS, I. S. (2000). Yeasts stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine. - a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21:27–51.
- BEDRIÑANA, R. P., SIMÓN, A. Q., VALLES, B. S. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiol*, 27(4):503–508.
- BELTRAN, G., TORIJA, M. J., NOVO, M., FERRER, N., POBLET, M., GUILLAMÓN, J. M., ROZÉS, N., MAS, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst Appl Microbiol*, 25(2):287–293.
- BERRY, D. R. WATSON, D. C. (1987). Chapter 11 - production of organoleptic compounds. In .D. R. BERRY, I. RUSSELL, G. G. S., editor, *Yeast Biotechnology* (First Edition), chapter 11, pages 345–367. Allen & Unwin, London.
- BERRY, E. A., BEVAN, E. A. (1972). A new species of double-stranded RNA from yeast. *Nature*, 239:279–280.

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. *Curr Microbiol*, 67(3):356–361.

BOLEN, P. L., KURTZMAN, C. P., LIGON, J. M., MANNARELLI, B. M., BOTHAST, R. J. (1992). Physical and genetic characterization of linear DNA plasmids from the heterothallic yeast *saccharomycopsis crataegensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 61(3):195–205.

BOROWSKY, R. L., MCCLELLAND, M., CHENG, R., WELSH, J. (1995). Arbitrarily primed DNA fingerprinting for phylogenetic reconstruction in vertebrates: the Xiphophorus model. *Mol Biol Evol*, 12(6):1022–1032.

BOVO, B., ANDRIGHETTO, C., CARLOT, M., CORICH, V., LOMBARDI, A., GIACOMINI, A. (2009). Yeast population dynamics during pilot-scale storage of grape marcs for the production of Grappa, a traditional Italian alcoholic beverage. *Int J Food Microbiol*, 129(3):221–228.

BRASIL; Lei Nº 10970, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2004; Altera dispositivos da Lei no 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. In: Publicado no Diário Oficial da União de 16/11/2004, Seção 1, Página 1.

BUSSEY, H. (1972). Effects of yeast killer factor on sensitive cells. *Nat New Biol*, 235(55):73–75.

BUSSEY, H. (1981). Physiology of killer factor in yeast. *Adv Microb Physiol*, 22:93–122.

BUTLER, A. R., PORTER, M., STARK, M. J. (1991). Intracellular expression of *kluveromyces lactis* toxin gamma subunit mimics treatment with exogenous toxin and distinguishes two classes of toxin-resistant mutant. *Yeast*, 7(6):617–625.

BUZZINI, P., CORAZZI, L., TURCHETTI, B., BURATTA, M., MARTINI, A. (2004). Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *williopsis saturnus dbvpg 4561* against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiol Lett*, 238(2):359–365.

CABAÑAS, R., BRAGULAT, M. R., ABARCA, M. L., CASTELLÁ, G., CABAÑES, F. J. (2008). Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. *Food Microbiol*, 25(5):642–647.

CABONI, P., CABRAS, P. (2010). Pesticides' influence on wine fermentation. *Adv Food Nutr Res*, 59:43–62.

CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B. J. & GRESSHOFF, P. M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 9: 553-556.

CAMARGO, U. A. (2009). Variedades de uva. In GUERRA, C. C., MANDELLI, F., TONIETTO, J., ZANUS, M. C., CAMARGO, U. A., editors, *Conhecendo o essencial sobre*

uvas e vinhos. number 48 in Documentos, chapter 2, pages 17–30. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Embrapa Uva e Vinho., Bento Gonçalves - RS.

CANOSSA, S., AGUSTINI, B. C., DA SILVA, G. A. (2014). Convivência harmônica entre linhagens de leveduras killer e sensíveis. In *Anais do XII Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos*, Foz do Iguaçu, PR. Sociedade Brasileira de Microbiologia - SBM.

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

CAPECE, A., ROMANIELLO, R., SIESTO, G., PIETRAFESA, R., MASSARI, C., POETA, C., ROMANO, P. (2010). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *Int J Food Microbiol*, 144(1):187–192.

CAPECE, A., ROMANIELLO, R., SIESTO, G., AND ROMANO, P. (2012). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian "heroic vine growing area". *Food Microbiol*, 31(2):159–166.

CARUSO, M., CAPECE, A., SALZANO, G., ROMANO, P. (2002). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Lett Appl Microbiol*, 34(5):323–328.

CASTÓN, J. R., TRUS, B. L., BOOY, F. P., WICKNER, R. B., WALL, J. S., STEVEN, A. C. (1997). Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol*, 138(5):975– 985.

CATALUÑA, E. *Uvas e vinhos*. Rio de Janeiro: Ed. Globo, 1984.

CIANI, M., FATICHENTI, F. (2001). Killer toxin of *kluveromyces phaffii* dbvpg 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 67(7):3058–3063.

Ciani, M. and Ferraro, L. (1996). Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(1):128–132.

CLAVIJO, A., CALDERÓN, I. L., PANEQUE, P. (2010). Diversity of *saccharomyces* and non- *saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the serranía de ronda (spain) vine-growing region. *Int J Food Microbiol*, 143(3):241–245.

COCOLIN, L., PEPE, V., COMITINI, F., COMI, G., CIANI, M. (2004). Enological and genetic traits of *saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Res*, 5(3):237–245.

COMITINI, F., CIANI, M. (2010). The zymocidal activity of *tetrapisispora phaffii* in the control of *Hanseniaspora uvarum* during the early stages of winemaking. *Lett Appl Microbiol*, 50(1):50–56.

COMITINI, F., CIANI, M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *brettanomyces/dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol Lett*, 316(1):77– 82.

COMITINI, F., INGENIIS, J. D., DE, J. I., PEPE, L., MANNAZZU, I., CIANI, M. (2004a). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol Lett*, 238(1):235–240.

COMITINI, F., PIETRO, N. D., ZACCHI, L., MANNAZZU, I., CIANI, M. (2004b). *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology*, 150(Pt 8):2535–2541.

CORDENTE, A. G., HEINRICH, A., PRETORIUS, I. S., SWIEGERS, J. H. (2009). Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res*, 9(3):446–459.

COUTO, M. M. B., EIJSMA, B., HOFSTRA, H., IN'T VELD, J. H. H., VAN DER VOSSSEN, J. M. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol*, 62(1):41–46.

COUTO, M. M. B., VAN DER VOSSSEN, J. M., HOFSTRA, H., IN 'T VELD, J. H. H. (1994). Rapid analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *Int J Food Microbiol*, 24(1-2):249–260.

DA RESSURREIÇÃO GARRIDO, L. SÔNEGO, O. R. (2003). Doenças fúngicas e medidas de controle. sistema de produção, 4. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/tabdoenca.htm>.

DAY, P., ANAGNOSTAKIS, S. (1973). The killer system in *ustilago maydes*: heterokaryon transfer and loss of determinants. *Phytopathology*, 63:1017–1018.

DEAK, T., CHEN, J., BEUCHAT, L. R. (2000). Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol*, 66(10):4340–4344.

DIDEHDAR, M., MEHBOD, A. S. A., ESLAMIRAD, Z., MOSAYEBI, M., HAJIHOSSEIN, R., GHORBANZADE, B., KHAZAEI, M. R. (2014). Identification of *malassezia* species isolated from patients with pityriasis versicolor using PCR-RFLP method in markazi province, central iran. *Iran J Public Health*, 43(5):682–686.

EISENMAN, L. (2013). Hydrogen sulfide in fermentations.

EL-BANNA, A., EL-SAHN, A. M., SHEHATA, M. (2011). Yeasts producing killer toxins: An overview. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* Vol. 8, No. 2, pp. 41-53, 2011, 8(2):41–53.

- ENGLEZOS, V., RANTSIOU, K., TORCHIO, F., ROLLE, L., GERBI, V., COCOLIN, L. (2015). Exploitation of the non-saccharomyces yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations. *Int J Food Microbiol*, 199:33–40.
- ERGON, M. C., GÜLAY, Z. (2005). Molecular epidemiology of candida species isolated from urine at an intensive care unit. *Mycoses*, 48(2):126–131.
- ESTEBAN, A., ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CABAÑES, F. J. (2006a). Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *Int J Food Microbiol*, 108(2):188–195.
- ESTEBAN, A., ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CABAÑES, F. J. (2006b). Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *Int J Food Microbiol*, 108(2):188–195.
- 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 J Syst Bacteriol*, 49 Pt 1:329–337.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2a. ed. Brasília, *EMBRAPA/CENARGEN*, 220 pp.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T., MARTORELL, P., LLANOS, R. D., QUEROL, A. (2006). Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. In Querol, A. Fleet, G., editors, *The Yeast Handbook: Yeasts in Food and Beverages*, volume 2, chapter 3, pages 54-82. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- FLEET, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*, 86(1-2):11–22.
- FLEET, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res*, 8(7):979–995.
- FLEET, G. H., LAFON-LAFOURCADE, S., RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. *Appl Environ Microbiol*, 48(5):1034–1038.
- FLEET, G. H., PRAKITCHAIWATTANA, C., BEH, A. L., HEARD, G. (2002). Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts. The yeast ecology of wine grapes. *Signospot, Trivadrum* 695 023, Kerala, India.
- FLEET, G. H. (1993) The microorganisms of winemaking-isolation enumeration and identification. *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet GH, ed.), p.1-27. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- GALLARDO, G., RUIZ-MOYANO, S., HERNÁNDEZ, A., BENITO, M. J., CÓRDOBA, M. G., PÉREZ-NEVADO, F., MARTÍN, A. (2014). Application of issr-pcr for rapid strain typing of *debaryomyces hansenii* isolated from dry-cured iberian ham. *Food Microbiol*, 42:205–211.

- GEISEN, R., CANTOR, M. D., HANSEN, T. K., HOLZAPFEL, W. H., JAKOBSEN, M. (2001). Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *Int J Food Microbiol*, 65(3):183–191.
- GIUDICI, P., ZAMBONELLI, C. (1992). Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43(4):370–374.
- GRANCHI, L., GANUCCI, D., MESSINI, A., VINCENZINI, M. (2002). Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *kloeckera cortices* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res*, 2(3):403–407.
- GUERRA, J. B., ARAÚJO, R. A., PATARO, C., FRANCO, G. R., MOREIRA, E. S., MENDONÇA-HAGLER, L. C., ROSA, C. A. (2001). Genetic diversity of *saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal brazilian cachaça. *Lett Appl Microbiol*, 33(2):106–111.
- GUILLAMÓN, J. M., SABATÉ, J., BARRIO, E., CANO, J., QUEROL, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol*, 169(5):387–392.
- GUYARD, C., DEHECQ, E., TISSIER, J.-P., POLONELLI, L., DEI-CAS, E., CAILLIEZ, J.-C., MENOZZI, F. D. (2002a). Involvement of [beta]-glucans in the wide-spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin. *Mol Med*, 8(11):686–694.
- GUYARD, C., SÉGUY, N., CAILLIEZ, J.-C., DROBECQ, H., POLONELLI, L., DEI-CAS, E., MERCENIER, A., MENOZZI, F. D. (2002b). Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* high molecular weight secreted killer toxin with broadspectrum antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother*, 49(6):961–971.
- HADRYS, H., BALICK, M., SCHIERWATER, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol*, 1(1):55–63.
- HADRYS, H., SCHIERWATER, B., DELLAPORTA, S. L., DE-SALLE, R., BUSS, L. W. (1993). Determination of paternity in dragonflies by Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting. *Mol Ecol*, 2(2):79–87.
- HEARD, G. (1999). Novel yeasts in winemaking - looking to the future. *Food Australia*, 51(8):347–352.
- HEARD, G. M., FLEET, G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *appl environ microbiol*, 50(3):727–728.
- HEARD, G. M., FLEET, G. H. (1986). Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Austr.*, 38:22–25.
- HERNÁNDEZ, A., MARTÍN, A., CÓRDOBA, M. G., BENITO, M. J., ARANDA, E., PÉREZ-NEVADO, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Int J Food Microbiol*, 121(2):178–188.

HIERRO, N., GONZÁLEZ, A., MAS, A., GUILLAMÓN, J. M. (2006). Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res*, 6(1):102–111.

HODGSON, V. J., BUTTON, D., WALKER, G. M. (1995). Anti-candida activity of a novel killer toxin from the yeast *williopsis mrakii*. *Microbiology*, 141 (Pt 8):2003–2012.

HODGSON, V. J., WALKER, G. M., BUTTON, D. (1994). A rapid colorimetric assay of killer toxin activity in yeast. *FEMS Microbiol Lett*, 120(1- 2):201–205.

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 Microbiol*, 34(1):207–214.

HUANG, C., RONCORONI, M., GARDNER, R. C. (2014). MET2 affects production of hydrogen sulfide during wine fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(16):7125–7135.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Economia.2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201301.pdf>. Acesso em: 15 de jul. 2015

IZGÜ, F., ALTINBAY, D. (1997). Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on gram-positive pathogenic bacteria. *Microbios*, 89(358):15–22.

IZGÜ, F., ALTINBAY, D. (1997). Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on gram-positive pathogenic bacteria. *Microbios*, 89(358):15–22.

JAMES, S. A., O'KELLY, M. J. T., CARTER, D. M., DAVEY, R. P., VAN OUDENAARDEN, A., ROBERTS, I. N. (2009). Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal dna array of *saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. *Genome Res*, 19(4):626–635.

JIRANEK, V., LANGRIDGE, P., HENSCHKE, P. A. (1995). Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl Environ Microbiol*, 61(2):461–467.

JOLLY, N. P., AUGUSTYN, O. P. H., AND PRETORIUS, I. S. (2003a). The effect of non-*saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S. Afr. J. Vitic. Vitic.* 24(2):55–62.

JOLLY, N. P., AUGUSTYN, O. P. H., PRETORIUS, I. S. (2003b). The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape must from production regions of the western Cape, South Africa. *S. Afr. J. Vitic. Vitic.* 24(2):35–42.

JOLLY, N. P., AUGUSTYN, O. P. H., PRETORIUS, I. S. (2003c). The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *S. Afr. J. Vitic. Vitic.* 24(2):63–69.

JORDAN, B., SLAUGHTER, J. C. (1986). Sulphate availability and cysteine desulphydration activity as influences on production of hydrogen sulphide by *Saccharomyces cerevisiae* during growth in a defined glucose-salts medium. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 87(4):525–531.

- KAGIYAMA, S., AIBA, T., KADOWAKI, K., MOGI, K. (1988). Newkiller toxins of halophilic *Hansenula anomala*. *Agric. Biol. Chem.*, 52(1):1–7.
- KAZANTSEVA, D. I. AND ZIMINA, M. S. (1989). [killer-yeast strains with a broad spectrum of action: a search among collection strains and preliminary classification]. *Mikrobiologiya*, 58(2):291–297.
- KINAL, H., PARK, C. M., BERRY, J. O., KOLTIN, Y., BRUENN, J. A. (1995). Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a *kex2p* pathway in plants. *Plant Cell*, 7(6):677–688.
- KITAMOTO, H. K., OHMOMO, S., NAKAHARA, T. (1993). Selection of killer yeasts (*kluveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making. *J Dairy Sci*, 76(3):803–811.
- KLASSEN, R., JABLONOWSKI, D., SCHAFFRATH, R., MEINHARDT, F. (2002). Genome organization of the linear *pichia etchellsii* plasmid ppe1a: evidence for expression of an extracellular chitin-binding protein homologous to the alpha-subunit of the *kluveromyces lactis* killer toxin. *Plasmid*, 47(3):224–233.
- KRAKOVÁ, L. et al. (2012). Yeast diversity investigation of wine-related samples from two different Slovakian wine-producing areas through a multistep procedure. *Food Science and Technology*, v. 46, p. 406–411.
- KUCHIKI, H., YASUDA, J., KAYAMA, T., MURAKAMI, Y., SEKIYA, T. (1999). Detection of dna abnormalities by arbitrarily primed pcr fingerprinting: amplification of the *mdm2* gene in a mediastinum fibrosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 258(2):271–277.
- LABORATORIES, E. (2001). ETS volatile sulfide analysis.
- LACERDA, D. R., ACEDO, M. D. P., FILHO, J. P. L., LOVATO, M. B. (2002). A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Instituto de Ciências Biológicas UFMG*. p. 87–92.
- LAMBRECHTS, M., PRETORIUS, I. (2000). Yeasts and its importance to wine aroma. *S. Afr. J Enol. Vitic.* 21:97–129.
- LINDERHOLM, A. L., FINDLETON, C. L., KUMAR, G., HONG, Y., BISSON, L. F. (2008). Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 74(5):1418–1427.
- LIU, S.-Q., TSAO, M. (2009). Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *Int J Food Microbiol*, 131(2-3):280–282.
- LOPES, C. A., LAVALLE, T. L., QUEROL, A., CABALLERO, A. C. (2006). Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89(1):147–156.

- LOPES, C. A., RODRÍGUEZ, M. E., SANGORRÍN, M., QUEROL, A., CABALLERO, A. C. (2007). Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34(2):139–149.
- MAKOWER, M. AND BEVAN, E. A. (1963). The inheritance of a killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In Geerts, S., editor, *Genetics today. Xith International Congress of Genetics.*, volume 1, page 202. Pergamon Press, Oxford.
- MAQUEDA, M., ZAMORA, E., ÁLVAREZ, M. L., RAMÍREZ, M. (2012). Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces sensu stricto* killer yeasts in the spontaneous grape must fermentations of Southwestern Spain. *Appl Environ Microbiol*, 78(3):735–743.
- MARQUINA, D., SANTOS, A., PEINADO, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. *Int Microbiol*, 5(2):65–71.
- MARTORELL, P., FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T., QUEROL, A. (2005). Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *Int J Food Microbiol*, 101(3):293–302.
- MELLO, L. M. R. (2015). Panorama da vitivinicultura brasileira 2014. Hortifrúti.
- MENDES-FERREIRA, A., MENDES-FAIA, A., LEÃO, C. (2002). Survey of hydrogen sulphide production by wine yeasts. *J Food Prot*, 65(6):1033–1037.
- MITCHELL, D. J., HERRING, A. J., BEVAN, E. A. (1976). The genetic control of DS-RNA viruslike particles associated with *Saccharomyces cerevisiae* killer yeast. *Heredity*, 37(1):129–134.
- NAVARRÉ, C. (1997). *Enologia: Técnica de Produção do Vinho*. p. 308. Publicações Europa- América. LDA.
- OCHIGAVA, I., COLLIER, P. J., WALKER, G. M., HAKENBECK, R. (2011). Williopsis saturnus yeast killer toxin does not kill streptococcus pneumoniae. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(3):559–566.
- OLIVEIRA MAMEDE, M. E., PASTORE, G. M. (2004). Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da “serra gaúcha” (RS). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24(3):453–458.
- ORBERA-RATÓN, T. (2004). Molecular identification methods of yeasts of biotechnological interest. *Rev Iberoam Micol*, 21(1):15–19.
- ORTIZ, M. J., BARRAJÓN, N., BAFFI, M. A., ARÉVALO- VILLENA, M., BRIONES, A. (2013). Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. *LWT - Food Science and Technology*, 50:371–377.
- PALPACELLI, V., CIANI, M., ROSINI, G. (1991). Activity of different ‘killer’ yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol Lett*, 68(1):75–78.

- PARAPOULI, M., HATZILOUKAS, E., DRAINAS, C., PERISYNAKIS, A. (2010). The effect of debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavour. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37(1):85–93.
- PASSOTH, V., OLSTORPE, M., SCHNÜRER, J. (2011). Past, present and future research directions with *Pichia anomala*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(1):121–125.
- PETES, T. D. (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome xii. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(1):410–414.
- PIECZYNSKA, M. D., DE VISSER, J. A. G. M., KORONA, R. (2013). Incidence of symbiotic dsrna 'killer' viruses in wild and domesticated yeast. *FEMS Yeast Res*, 13(8):856–859.
- PIRT, S. J. (1985). Principles of Microbe and Cell Cultivation. 0-632-01455-5. Blackwell Scientific, Oxford, Osney Mead, Oxford, OX2 0EL, 2nd edition.
- PULVIRENTI, A., RAINIERI, S., BOVERI, S., GIUDICI, P. (2009). Optimizing the selection process of yeast starter cultures by preselecting strains dominating spontaneous fermentations. *Can J Microbiol*, 55(3):326–332.
- PÉREZ-NEVADO, F., ALBERGARIA, H., HOGG, T., GIRIO, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*, 108(3):336–345.
- RANKINE, B. C. (1963). Nature, origin and prevention of hydrogen sulphide aroma in wines. *J. Sci. Fd Agric.*, 14:79–91.
- REISCH, B. E. A. (1993). Wine and juice grape varieties for cool climates. Cornell Cooperative Extension Publication, New York.
- REISS, E., TANAKA, K., BRUKER, G., CHAZALET, V., COLEMAN, D., DEBEAUPUIS, J. P., HANAZAWA, R., LATGÉ, J. P., LORTHOLARY, J., MAKIMURA, K., MORRISON, C. J., MURAYAMA, S. Y., NAOE, S., PARIS, S., SARFATI, J., SHIBUYA, K., SULLIVAN, D., UCHIDA, K., YAMAGUCHI, H. (1998). Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol*, 36 Suppl 1:249–257.
- RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D., DONÈCHE, B., LONVAUD, A. (2006). Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications, volume 1. John Wiley & Sons Ltda, West Sussex PO19 8SQ, England, 2 edition.
- RODRÍGUEZ-COUSIÑO, N., GÓMEZ, P., ESTEBAN, R. (2013). L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus doublestranded RNA: possible role of killer toxinencoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Appl Environ Microbiol*, 79(15):4661–4674.
- ROMANO, P., FIORE, C., PARAGGIO, M., CARUSO, M., CAPECE, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol*, 86(1-2):169–180.

- ROSINI, G. (1983). The occurrence of killer characters in yeasts. *Can J Microbiol*, 29(10):1462–1464.
- SABATE, J., CANO, J., ESTEVE-ZARZOSO, B., GUILLAMÓN, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol Res*, 157(4):267–274.
- SABATE, J., CANO, J., QUEROL, A., GUILLAMÓN, J. M. (1998). Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett Appl Microbiol*, 26(6):452–455.
- SANGORRÍN, M. P., GARCÍA, V., LOPES, C. A., SÁEZ, J. S., MARTÍNEZ, C., GANGA, M. A. (2013). Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeasts. *J Appl Microbiol*, 114(4):1066–1074.
- SANGORRÍN, M. P., LOPES, C. A., GIRAUDO, M. R., CABALLERO, A. C. (2007). Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *Int J Food Microbiol*, 119(3):351–357.
- SANGORRÍN, M. P., ZAJONSKOVSKY, I. E., LOPES, C. A., RODRÍGUEZ, M. E., DE VAN BROECK, M. R. G., CABALLERO, A. C. (2001). Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from northwestern Patagonia (Argentina). *J Basic Microbiol*, 41(2):105–113.
- SANTOS, A., NAVASCUÉS, E., BRAVO, E., MARQUINA, D. (2011a). Ustilago maydis killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Int J Food Microbiol*, 145(1):147–154.
- SANTOS, A., NAVASCUÉS, E., BRAVO, E., MARQUINA, D. (2011b). Ustilago maydis killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Int J Food Microbiol*, 145(1):147–154.
- SANTOS, H. P., CHAVARRIA, G. (2012). Cultivo de videira em ambiente protegido. In *Fruticultura em ambiente protegido*. p. 278, Brasília. Embrapa.
- SCHMITT, M. J., BREINIG, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev*, 26(3):257–276.
- SCHMITT, M. J., BREINIG, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol*, 4(3):212–221.
- SCHMITT, M. J., KLAVEHN, P., WANG, J., SCHÖNIG, I., TIPPER, D. J. (1996). Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*, 142 (Pt 9):2655–2662.
- SCHMITT, M. J., SCHERNIKAU, G. (1997). Construction of a cDNA-based K1/K2/K28 triple killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 35(4):281–285.

SCHMITT, M. J., TIPPER, D. J. (1990). K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 10(9):4807–4815.

SCHMITT, M. J., TIPPER, D. J. (1992). Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast*, 8(5):373–384.

SEPAHVAND, A., SHAMS-GHAHFAROKHI, M., ALLAMEH, A., JAHANSHIRI, Z., JAMALI, M., RAZZAGHI- ABYANEH, M. (2011). A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus flavus* from indoor and outdoor hospital environments. *Folia Microbiol (Praha)*, 56(6):527–534.

SERVIENE, E., LUKSA, J., ORENTAITE, I., LAFONTAINE, D. L. J., URBONAVICIUS, J. (2012). Screening the budding yeast genome reveals unique factors affecting K2 toxin susceptibility. *PLoS One*, 7(12):e50779.

SILVA, G. A. (1996). The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46(2):112–121.

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

SILVA, G. A. (1999b). Evidência de uma linhagem de levedura com característica killer, neutra e sensível. In Tonietto, J. and Guerra, C. C., editors, *Anais do IX Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, page 169, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.

SILVA, G. A., BERNARDI, T. L., SCHAKER, P. D. C., MENEGOTTO, M., VALENTE, P. (2012). Rapid yeast DNA extraction by boiling and freezethawing without using chemical reagents and DNA purification. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 55(2):319–327.

SILVA, G. A., DALARMI, L. (2003). Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra de 2003. In Zanús, M. C., Laureano, O., de Melo, G. W. B., de Souza Seben, S., editors, *Anais do X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, page 214, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.

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

SILVA, G. A., GAVA, R., SÔNEGO, O. R., RESSURREIÇÃO GARRIDO, L. (2007). Fungicidas empregados na viticultura e sua ação sobre atividade de leveduras autóctones e selecionada. *VI SINAFERM e XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*.

SILVA, G. A., GURAK, P. D., DS CASTRO, H. M., FARIAS, D. (2005). Influência da concentração de levedura sobre o vinho tinto Cabernet Sauvignon. In Guerra, C. C., de Souza Seben, S., editors, *Anais do X Congresso Latino- Americano de Viticultura e Enologia/XI*

Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia/II Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura e Enologia/, page 345, Bento Gonçalves-RS. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.

SILVA, G. A., MURATORE, L. (2006). The influence of yeast strain on the colour of Cabernet Sauvignon red wines. *Brazilian Archives Biology and Technology*, 49(special):165–171.

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(3):601–612.

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

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

SINACORI, M., FRANCESCA, N., ALFONZO, A., CRUCIATA, M., SANNINO, C., SETTANNI, L., MOSCHETTI, G. (2014). Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. *Food Microbiol*, 38:284–294.

SOARES, G. A., SATO, H. H. (1999). Killer toxin of *saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against fleischmann and itaiquara commercial brands of yeast. *Revista de Microbiologia*, 30:253–257.

SOMERS, J. M., BEVAN, E. A. (1969). The inheritance of the killer character in yeast. *Genet Res*, 13(1):71–83.

SPIROPOULOS, A., BISSON, L. F. (2000). MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 66(10):4421–4426.

STARMER, W. T., GANTER, P. F., ABERDEEN, V., LACHANCE, M. A., PHAFF, H. J. (1987). The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol*, 33(9):783–796.

STRATFORD, M., ROSE, A. H. (1985). Hydrogen sulphide production from sulphite by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journcrl of Gerteral Microbiology*, 131:1417–1424.

STRAUSS, M. L., JOLLY, N. P., LAMBRECHTS, M. G., VAN RENSBERG, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*saccharomyces* wine yeasts. *J Appl Microbiol*, 91(1):182–190.

THEELEN, B., SILVESTRI, M., GUÉHO, E., VAN BELKUM, A., BOEKHOUT, T. (2001). Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res*, 1(2):79–86.

- THORNTON, R. J. (1991). Wine yeast research in New Zealand and Australia. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4):327–345.
- TIPPER, D. J., BOSTIAN, K. A. (1984). Doublestranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. *Microbiol Rev*, 48(2):125–156.
- TIPPER, D. J., SCHMITT, M. J. (1991). Yeast dsrna viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol*, 5(10):2331–2338.
- UGLIANO, M., FEDRIZZI, B., SIEBERT, T., TRAVIS, B., MAGNO, F., VERSINI, G., HENSCHKE, P. A. (2009). Effect of nitrogen supplementation and *saccharomyces* species on hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds in shiraz fermentation and wine. *J Agric Food Chem*, 57(11):4948–4955.
- UGLIANO, M., KOLOUCHOVA, R., HENSCHKE, P. A. (2011). Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38(3):423–429.
- VAN DER WESTHUIZEN, T., AUGUSTYN, O., KHAN, W., PRETORIUS, I. (2000). Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the western cape in south africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21(1):10–16.
- VILANOVA, M., SIEIRO, C. (2006). Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. albariño. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33(11):929–933.
- VODKIN, M. H., FINK, G. R. (1973). A nucleic acid associated with a killer strain of yeast. *PROC NATL ACAD SCI U S A*, 70(4):1069–1072.
- WALKER, G. M., MCLEOD, A. H., HODGSON, V. J. (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett*, 127(3):213–222.
- WANG, C., LIU, Y. (2013). Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. *Food Microbiol*, 33(2):172–177.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18(24):7213–7218.
- WELSH, J., RAMPINO, N., MCCLELLAND, M., PERUCHO, M. (1995). Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis. *Mutat Res*, 338(1- 6):215–229.
- WICKNER, R. B. (1976). Killer of *Saccharomyces cerevisiae*: a double-stranded ribonucleic acid plasmid. *Bacteriol Rev*, 40(3):757–773.
- WICKNER, R. B., LEIBOWITZ, M. J. (1976). Two chromosomal genes required for killing expression in killer strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 82(3):429–442.

WINTER, G., HENSCHKE, P. A., HIGGINS, V. J., UGLIANO, M., CURTIN, C. D. (2011). Effects of rehydration nutrients on H₂S metabolism and formation of volatile sulfur compounds by the wine yeast v13. *AMB Express*, 1:36.

WLODARCZYK, S. R., DE SOUZA, R. C., BONFIM, T. M., BRAND, D., SILVA, G. A. da. (2012). Evaluation of isolated yeasts from grapes of Pinto Bandeira region, Bento Gonçalves (RS) in relation to production of H₂S and fermentation rate. *BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports*, 11(2):24–27.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.

WOODS, D. R., BEVAN, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, 51(1):115–126.

www.ebah.com.br/content/ABAAABEIwAL/crescimento-microbiano. Acesso: 13/02/15

www.inipi.gov.br. Acesso 24/06/2015

www.indexfungorum.org (2015). Index fungorum. Acesso: 02/04/15

YAP, N. A., DE BARROS LOPES, M., LANGRIDGE, P., HENSCHKE, P. A. (2000). The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. *J Appl Microbiol*, 89(3):381–389.

YARROW, D. (1984). *Saccharomyces* Meyen ex Reess In: *N.J.W. Kreger-van-Rij The yeasts a taxonomic study*, volume Third, chapter 22, pages 379–386. Elsevier, Groningen, The Netherlands, third edition.

ZAMBONELLI, C., SOLI, M., GUERRA, D. (1984). A study of H₂S non-producing strains of wine yeasts. *Ann Microbiol*, 34:7–15.