

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
MARCELLE BALDUINO DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE UVAS
SAUVIGNON BLANC DE PARREIRAIS DE CAMPO BELO DO SUL (SC), SAFRA
DE 2016**

Laboratório de Microbiologia Aplicada

Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho

Araras, 2016



RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

NOME DO ESTAGIÁRIO:

Marcelle Balduino de Almeida

NOME DO PROFESSOR ORIENTADOR:

Ane H. de Medeiros

NOME DO PROFISSIONAL ORIENTADOR:

Gildo Almeida da Silva

NOME DA UNIDADE DE REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO

Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho - Embrapa

LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO

Bento Gonçalves (RS)

PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO

4 de Agosto de 2016 à 2 de Dezembro de 2016

RESUMO

O processo de transformação de mosto de uva em vinho por fermentação envolve uma série de fatores combinados, sendo o emprego de leveduras autóctones selecionadas um contribuinte para elaboração e diferenciação de vinhos. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização de 47 linhagens de leveduras coletadas de bagas de uvas da cultivar Sauvignon Blanc do município de Campo Belo do Sul (SC). As linhagens foram avaliadas quanto a capacidade fermentativa, produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio) e comportamento em relação ao fator killer. A capacidade fermentativa foi avaliada juntamente com formação de H₂S meio Mosto Sulfito. O comportamento ao fator killer foi avaliado em meio sólido Mosto Lorena/ELNC (80:20). Nenhuma das 47 linhagens apresentaram comportamento fermentativo adequado. Verificou-se que 14,9% das linhagens mostraram-se metabolicamente capazes de produzir H₂S. Somente 6,38% apresentaram comportamento killer e 4,25% mostraram sensibilidade ao fator killer. Das 47 linhagens 5 puderam ser identificadas por meio da amplificação por PCR da região ITS1-5.8S-ITS2, seguido por análise de restrição enzimática com as endonucleases Cfo I, Hae II, Hinf I e Dde I.

1 INTRODUÇÃO

A vitivinicultura brasileira teve seu início por volta de 1532 com a introdução da primeira videira trazida por colonizadores portugueses, porém, passou a ter importância por volta de 1870, quando imigrantes italianos chegaram à Serra Gaúcha no Rio Grande do Sul (Protas et al., 2014; Silva et al., 2014).

A criatividade aliada à diversidade climática encontrada no Brasil levaram o país a uma vitivinicultura original, dividida entre seis principais regiões produtoras, sendo elas Serra Gaúcha, Campanha, Serra do Sudeste, Santa Catarina e Vale do São Francisco. A área de produção soma 83,7 mil hectares, com mais de 1,1 mil vinícolas espalhadas pelo Brasil. O país é o quinto maior produtor de vinho no Hemisfério Sul e atualmente pode ser considerado um dos mercados mais crescentes (Silva et al., 2014; Ibravin, 2016).

Quando observada a elevada produtividade de sucos de uvas e vinhos, o Rio Grande do Sul pode ser usado como referencial para o país, correspondendo a 90% da produção nacional. Porém, apesar da crescente ascensão no setor, a qualidade de uvas para processamento ainda não apresenta grande potencial enológico quando comparado aos principais concorrentes, como Chile, Argentina, Itália, França e Portugal, o que afeta a capacidade competitiva do setor no segmento de vinhos finos (Mello, 2016).

Levando essa realidade em consideração, nos últimos anos vêm sendo implementadas as Indicações Geográficas, com o objetivo de valorizar a origem e identidade dos produtos. A produção é voltada para a área geográfica definida por fatores naturais e culturais, promovendo o conceito de terroir e agregando valor ao produto final (Mello, 2016; da Silva et al., 2016). O vinho é uma bebida que surgiu junto com a própria civilização, se trata do elixir mais antigo que a história conhece (Taitelbaum, 2005). Segundo a legislação “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.)” (UVIBRA). Esse processo de transformação do mosto de uva em vinho é fortemente influenciado pelos microrganismos, envolvendo uma gama de ações de diferentes gêneros e espécies, sendo que as espécies de *Saccharomyces cerevisiae* lideram o processo de vinificação. Por isso leveduras que conduzem as etapas de elaboração de vinho devem apresentar características e aptidão enológica adequadas para que seja possível a elaboração de um vinho de qualidade. Leveduras podem conferir aromas

agradáveis e contribuir para a complexidade do vinho (Clemente-Jimenez et al., 2004; Manfroi, 2009; Canossa et al., 2015).

Apesar de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* dominarem as fermentações em vinho, muitas leveduras não-*Saccharomyces* podem estar presentes durante todo o processo de produção. Diante da diversidade biológica presente distintamente em cada região e na busca por elaboração de vinhos de qualidade, vem sendo investido tempo em pesquisas e tecnologias que levam em consideração o conhecimento do terroir microbiológico (Silva et al., 2014; da Silva et al, 2016).

A microbiota autóctone de leveduras presentes em uvas é composta por diversos gêneros e espécies, sendo que esta complexidade biológica é influenciada por vários fatores, como a variedade da uva, seu estado e sua saúde, condições ambientais e sanitárias, entre outros. Estes microrganismos podem desempenhar papel importante no processo de elaboração do vinho e influenciar em diversos aspectos relevantes, alteração de aroma e sabor, bem como cor e adstringência dos vinhos (da Silva et al., 2016).

Atualmente o uso de leveduras comerciais selecionadas de *Saccharomyces* é muito comum, pois a padronização do processo permite redução de riscos. No entanto, a utilização de culturas iniciais padronizadas na indústria vitivinícola gerou perdas nas propriedades organolépticas e o estreitamento na distinção entre vinhos produzidos com diferentes cultivares. Por essa razão, estudos voltados para novas linhagens de leveduras podem valorizar o produto final (Sorrentino et al., 2013). Segundo Tristezza et al. (2014) o uso de linhagens de leveduras autóctones selecionadas pode ser uma poderosa ferramenta para elevar a qualidade das propriedades organolépticas e sensoriais de vinhos regionais. Levando em consideração que essas leveduras são melhores adaptadas a determinado mosto, elas são capazes de exaltar peculiaridades do vinho ali produzido.

Leveduras autóctones com aptidão enológica podem ser avaliadas e selecionadas quanto a sua capacidade fermentativa, produção de sulfeto de hidrogênio e em relação ao seu comportamento killer, sensível e neutro (Canossa et al., 2014).

Durante o processo de fermentação do mosto, os principais açúcares presentes (glicose e frutose) são transformados em etanol e dióxido de carbono, juntamente com outros metabólitos. Geralmente, o mosto apresenta quantidades muito similares de glicose e frutose, no entanto, sabe-se que *Saccharomyces cerevisiae* apresentam preferência pela glicose,

fazendo com que essa seja consumida primeiramente no meio e assim uma discrepância entre esses dois açúcares é gerada (Berthels et al., 2004).

O processo pelo qual ocorre a transformação de carboidratos em etanol e gás carbônico é exercido por meio do metabolismo anaeróbico e segue uma sequência de no mínimo 12 reações. Na fermentação, alcoólica o ácido pirúvico, produto final da glicólise, é convertido, por meio de descaboxilação a acetaldeído e esse por sua vez segue sofre uma reação de oxi-redução, se transformando em etanol. Todas as reações desse processo são realizadas por enzimas específicas que podem ser influenciadas por diversos fatores, como temperatura, pH e nutrientes (Conn e Stumpf, 1975). É de conhecimento geral que nem todas as espécies de leveduras possuem aparato enzimático para conduzir o processo de fermentação alcoólica, por isso a importância da caracterização e identificação das linhagens.

Durante a fermentação leveduras produzem diversos compostos, além do etanol, que, quando liberados no meio, influenciam no sabor do vinho, de modo que a qualidade do produto se torna dependente do tipo de composto liberado e de sua concentração. O tipo de composto que será liberado no meio é influenciado principalmente pelas espécies de leveduras, o tipo do mosto e as condições em que a fermentação ocorre (Suomalaine e Lehtonen, 1979; Herraiz et al., 1989; Mauricio et al., 1997).

Sabe-se que alguns dos microrganismos que participam na fermentação de bebidas podem produzir sulfeto de hidrogênio (H_2S), um produto secundário da fermentação, que confere aroma desagradável similar ao de ovos podres. O nariz humano é muito sensível a esse gás fazendo com que pequenas quantidades de H_2S sejam facilmente percebíveis e assim estragar um vinho. Quando detectada a presença de sulfeto de hidrogênio, deve ser realizada uma correção, se esse gás não for removido pode reagir e formar mercaptanos, que por sua vez podem ser oxidados em dissulfetos, produzindo odores desagradáveis e mais difíceis de serem removidos (Eisenman, 2013). Entre estes compostos estão o etilmercaptano (fósforo queimado, terra), o metilmercaptano (repolho podre) e o dietildissulfeto (borracha queimada e alho) (ETS Laboratories, 2011).

De acordo com Rankine (1964), o limiar de percepção de H_2S em um vinho neutro varia entre 50 e 80 $\mu g.L^{-1}$. Diversos fatores podem ser descritos como condicionadores da produção de sulfeto de hidrogênio durante a vinificação, sendo eles: taxa e temperatura da fermentação; estado de maturação da uva; linhagem de levedura; concentração em compostos

nitrogenados e teor de compostos sulfurados. No entanto, um dos fatores que mais se destaca é a capacidade que leveduras possuem de produzir H_2S , isso envolve a incorporação de sulfato na célula e sua redução por via enzimática. A incapacidade de uma levedura em produzir H_2S pode ser relacionada a ausência de atividade da enzima sulfito redutase (Neto e Ferreira, 2005). Durante a vinificação, é de suma importância que as linhagens empregadas não formem esse gás, pois sua remoção é um processo complexo e pode gerar grandes perdas econômicas. Como já dito, muitos são os fatores que podem influenciar na produção de H_2S pelas leveduras, no entanto, poucos são os fatores que podem impedi-la, sendo a seleção adequada de linhagens o melhor critério a ser adotado (da Silva e da Silva, 1987).

Além dos diversos compostos que as leveduras podem produzir, determinadas linhagens ainda podem apresentar o fenótipo killer. O fenômeno killer é determinado pela capacidade de algumas leveduras em liberar proteínas ou glicoproteínas, de baixo peso molecular, que matam leveduras sensíveis, independente do gênero ou espécie. Foi detectado pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae*, em 1963, por Bevan e Makeover. As linhagens de leveduras foram classificadas como 'killer', capazes de secretar toxina e matar células sensíveis (K^+R^+); 'sensíveis', aquelas eliminadas pela linhagem killer (K^-R^-) e 'neutras', aquelas insensíveis ao fator killer e que não produzem a toxina (K^-R^+) (Bevan e Makeover, 1963; Woods e Bevan, 1968; da Silva, 1996).

Paralelos entre a secreção de toxina killer de leveduras e a produção de bacteriocinas podem ser encontrados, visto que a produção de ambas está associada à imunidade específica e à toxicidade é restrita. A proteína killer é formada por genes cromossomais ou por meio da combinação com elementos extracromossomais. Os genes extracromossomais podem ser plasmídeos lineares de DNA ou RNA de cadeia dupla, semelhante a partículas virais, que codificam precursores de toxinas e que dependem de um plasmídeo semelhante para sua manutenção. Baseado no tamanho, os plasmídeos são classificados em tamanho médio (Medium) M-dsRNA e grande (Large) L-dsRNA., Ambos estão presentes no citoplasma da levedura e são conhecidos como VLPs (virus like particles). O MdsRNA possui um único ORF (Open Reading Frame), responsável por conferir a imunidade celular e codificar a produção de toxinas. O L-dsRNA codifica uma RNA polimerase (C Pol) responsável pela replicação, possui duas ORFs, ORFI que codifica a principal capa protéica, Gag e ORFII que

codifica uma RNAPolimerase dependente de RNA, Pol, sintetizada como uma proteína de fusão Gag-Pol (Ribas and Wickner, 1998), Convém salientar que o plasmídeo L- dsRNA sintetiza sua própria proteína capsidial assim como a do plasmídeo M-dsRNA. O M- dsRNA é satélite de L-dsRNA. Assim, o plasmídeo M-dsRNA só estará presente se o plasmídeo L- dsRNA também estiver. Dessa forma, os plasmídeos M-dsRNA e L-dsRNA devem estar presentes para que seja possível a expressão do fator killer (Bussey et al., 1982; Tipper and Bostian, 1984; da Silva, 1996; Zargoc et al., 2001). Young e Yagiu (1978) classificaram as leveduras killer em dez grupos distintos de comportamento, de K1 a K10. Zhu & Bussey (1989) incluíram a classe K11. Os tipos K1, K2 e K3 são específicos para o gênero *Saccharomyces*, enquanto os tipos de K4 a K11 podem ser encontrados em outros gêneros (Young & Yagiu, 1978; da Silva, 1996). Mais recentemente, baseando-se em padrões de interação Schmitt & Breining (2006) classificaram, em *Saccharomyces cerevisiae*, três grupos principais, K1, K2 e K28. Verificou-se que o grupo K3 se tratava de um mutante do K2 (Wingfield et al., 1990).

Linhagens de leveduras killer podem apresentar sensibilidade a toxinas de outras leveduras killer, no entanto, apresentam imunidade quanto a sua própria toxina. A imunidade está relacionada com o plasmídeo M-dsRNA e é considerado killer-específico. A resistência é menos específica e está relacionada a alterações nucleares que podem afetar sítios receptores das células e a diversos fatores externos como, toxinas killer formadas por outros grupos, temperatura, pH, composição do meio de cultura, fase de crescimento (Wickner e Leibowitz, 1976; Wickner, 1976; Tipper and Bostian, 1984).

Leveduras autóctones presentes em uvas podem apresentar característica killer e são distribuídas diferentemente em várias áreas produtoras de vinho. A utilização de leveduras killer no setor enológico surgiu porque partia-se do princípio que estas, quando presentes, podiam dominar o processo de fermentação e eliminar as linhagens não desejáveis. No entanto, é preciso ressaltar que o fenômeno killer é efetivo para linhagens sensíveis. No mosto pode haver outras linhagens killer e neutras. Assim, a presença de linhagens neutras pode desafiar a predominância das linhagens killer (Zargoc et al., 2001) e podem até proteger linhagens sensíveis da ação da toxina killer (da Silva, 1996).

Segundo da Silva (1996), células sensíveis podem variar seu comportamento em relação ao fator killer, por conta da grande especificidade da toxina, o grau de sensibilidade, bem como o grau de agressividade da levedura killer.

Visto que leveduras desempenham um papel de suma importância para elaboração de vinhos de qualidade e levando em consideração que linhagens de leveduras autóctones selecionadas podem colaborar para o processo de diferenciação de vinhos, o município de Campo Belo do Sul - SC foi incluso nesse trabalho, pois apesar de não ser uma região vinícola apresenta grande potencial para o desenvolvimento vitivinícola (da Silva, 2016).

A cultivar Sauvignon Blanc, uva branca da qual as leveduras estudadas foram isoladas, é de origem francesa. Apesar de ainda não ter mostrado todo seu potencial no Brasil, já começou a aparecer em vinhos promissores. É uma uva delicada, apresenta aromas herbáceos, de frutas e algumas especiarias. A característica mais marcante em termos gustativos é sua elevada acidez, o que torna os vinhos produzidos a partir dela muito interessantes. De forma textual, Guedes afirma: “Poucas uvas do mundo conseguem ser tão interessantes quanto a Sauvignon Blanc, que muda de expressão em cada um dos locais onde é plantada” (Guedes, 2005). Além disso, essa cultivar possui precursores indoros que podem ser convertidos em compostos aromáticos interessantes como o 3-mercaptopentan-1-ol (3MH), 3-mercaptopentil acetato (3MHA) (Tominaga et al., 2006), 4-mercaptopentan-2-ol (4MMP), 4-mercaptopentan-2-ol (4MMP-OH) (Gachons et al., 2002; Dubourdieu et al., 2006).

Pretendeu-se nesse trabalho caracterizar e identificar linhagens de leveduras autóctones, isoladas de uvas Sauvignon Blanc do município de Campo Belo do Sul (SC), em relação a capacidade fermentativa, produção de sulfeto de hidrogênio e característica killer.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foram isoladas 47 linhagens de leveduras de uvas Sauvignon Blanc de um parreiral localizado em Campo Belo do Sul (Santa Catarina, Brasil). A linhagem padrão K1 foi comprada de Lallemand Inc. (Montreal, Canadá). e as demais linhagens tomadas como padrão foram obtidas da Coleção de Culturas do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (Embrapa-CNPUV, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil). A abreviação dos gêneros aqui empregada será aquela definida por Kreger van Rij (1984).

2.2 Velocidade de fermentação e evolução de sulfato de hidrogênio

As leveduras isoladas foram avaliadas, em meio Mosto Sulfito (da Silva and da Silva, 1984) quanto a sua capacidade de fermentação, ao mesmo tempo em que a produção de H₂S estava sendo observada. Durante os ensaios os tubos foram mantidos em estufa incubadora Lab-Line Imperial II Radiant Incubator (Illinois, USA) a 24°C.

A capacidade de fermentação foi monitorada por gravimetria (Houtman e Plisseis, 1985; Haloui et al., 1988; Bely et al., 1990; Giudici e Kunkee, 1994; da Silva et al., 2011) durante 4 dias com intervalo de medição de 8 e 16 horas e comparado com as linhagens padrão *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT/97 e *Sacch. cerevisiae* K1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A produção de H₂S foi continuamente monitorada pelo mesmo período. Foram utilizadas fitas de papel filtro impregnadas com acetato de chumbo a 3% (da Silva e da Silva, 1984; Giudici e Kunkee, 1994). As fitas de papel foram inseridas na parte superior dos tubos de ensaio com tampa rosqueável, de modo que a metade da fita permaneceu dentro do tubo acima do meio já inoculado. O chumbo reage com enxofre para formar sulfeto de chumbo e esta reação faz com que a cor do papel filtro passe, gradativamente, de branca para marrom escuro. A avaliação qualitativa da produção de H₂S pode ser evidenciada pela intensidade da cor marrom do papel filtro. Os resultados foram expressos como negativo (-) ou positivo com a seguinte classificação: fraca (+), média (++) e alta (+++).

2.3 Fator killer, sensibilidade ao fator killer e neutralidade

Os ensaios para determinar os fenótipos killer (K+R+), sensíveis (K-R-) e neutras (K-R+) foram realizados no meio Mosto Lorena (80:20), segundo da Silva et al. (2011). Todas as placas inoculadas foram incubadas a 24°C durante um período de 48 a 72 horas.

2.3.1 Teste killer

Para avaliação da capacidade killer, as linhagens sensíveis *Sacch. cerevisiae* Embrapa 26B84, *Candida californica* 12MCF14, *Issatchenkia terricola* 21MCF14, *C. californica* 40MCF14, *C. californica* 41MCF14, *C. californica* 42MCF14, *Hanseniaspora uvarum* 50MCF14, *Zygosaccharomyces bisporus* 12TASL15, *Zygosacch. bisporus* 15TASL, *C. californica* 33TASL15, *C. californica* 43TASL15, *Zygosacch. bisporus* 46TASL15, *C. californica* 27bMCF14, 1GTRU15 (a ser sequenciada) foram plaqueadas como um tapete e cada uma das 47 linhagens da série estudada foram usadas como massa pontual, em duplicata. Se a levedura plaqueada como massa pontual for cercada por uma zona de inibição clara e uma zona de morte azul, esta levedura é considerada killer.

2.3.2 Teste de sensibilidade

Para avaliar a sensibilidade, as 47 linhagens da série estudada foram plaqueadas como tapete e, como massa pontual, foram empregadas em duplicata, as linhagens killer *Saccharomyces* 1B84, 91B84 e K1 e as linhagens killer não-*Saccharomyces*, *Candida diversa* 17MCF14, *H'spora uvarum* 28MCF14, *C. diversa* 29MCF14, *H'spora opuntiae* 33MCF14, *C. diversa* 51MCF14, *C. diversa* 52MCF14, *C. diversa* 53MCF14, *C. diversa* 2GCEpU16, *C. diversa* 8 GCEpU16, *C. diversa* 36GCEpU16, *C. diversa* 40GCEpU16, *C. diversa* 41GCEpU16, *C. diversa* 2MBR2F14, *C. diversa* 9MBR2F14, *C. diversa* 10MBR14, *C. diversa* 27MBR14, *C. diversa* 33MBR14, *C. diversa* 34MBR14, *C. diversa* 37MBR14, *C. diversa* 19GTEpU16, *C. diversa* 28GTEpU16, *C. diversa* 32GTEpU16, *C. diversa* 12MPB12, *C. diversa* 30MPB12, *H'spora opuntiae* 7GTGU15, *H'spora opuntiae* 13GTRU15, *H'spora opuntiae* 37GPEpU15, *C. diversa* 44TASL15. Se as massas pontuais forem cercadas por uma zona clara de inibição e uma zona de morte azul a levedura plaqueada como tapete é considerada sensível.

As linhagens *Sacch. cerevisiae* 1B84, *Sacch. cerevisiae* 91B84, *Sacch. cerevisiae* K1 e *Sacch. cerevisiae* 26B84 serviram como padrão para remover o efeito do meio de cultura, em casos negativos, sobre o processo killer, uma vez que deve haver morte da linhagem 26B84, quando esta é usada como tapete.

2.4 Identificação taxonômica das linhagens

Parte das linhagens estudadas já tinham sido previamente identificadas por MALDI-TOF-MS. No entanto, as linhagens 8SBCBSb16, 13SBCBSb16, 18SBCBSb16, 21SBCBSb16, 24SBCBSb16 e 28SBCBSb16, ainda não tinham sido identificadas, para tal foram realizadas técnicas de biologia molecular.

2.4.1 Extração de DNA

A extração do material genético das linhagens de leveduras foi realizada por meio da técnica de congelamento e descongelamento definida por Silva et al. (2012).

2.4.2 Amplificação da região ITS do DNA ribossomal

A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foram utilizados os primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').

Tabela 1 - Composição do meio reacional para amplificação

Reagentes	Volume
Água ultra-pura	13,95 µl
Tampão Taq DNA polimerase 10X	2,50 µl
Cloreto de Magnésio 50mM	0,75 µl
Nucleotídeos trifosfatados 1mM	4,50 µl
Primer ITS1 20pmol/µl	1,0 µl
Primer ITS4 20pmol/µl	1,0 µl
DNA amostral	0,3 µl

Fonte: Elaborada pela autora

Os microtubos permaneceram no termociclador (Profex™ PCR System) por aproximadamente 2 horas utilizando o programa nomeado como ITS2. O programa consistiu do seguinte esquema de reação: Fase inicial de desnaturação a 95°C por cinco min. Em seguida, foram aplicados 40 ciclos, iniciando com 95°C por 30 segundos para etapa de desnaturação, 60°C por 1 min. para o pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 72°C por 1 min. para extensão da cadeia. Para concluir, uma etapa de extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 1,5%. Para aplicação no gel, 1,2 µl de tampão de corrida (Loading Buffer 6X, composto por azul de bromofenol 0,25%; xileno cainho FF 0,25% e glicerol 30%) foi misturado a 4,5 µl do produto de PCR, para cada amostra. Foram utilizados 4 µl do marcador de massa molecular (DNA Ladder Low Range 100bp, Norgen, Canadá) em um dos poços do gel para fazer estimativas de tamanho dos amplicons. O gel foi submetido à corrente elétrica de 90V até o corante atingir aproximadamente 3 cm da borda do gel. Para revelação das bandas, o gel foi mantido imerso em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos e a visualização e a fotodocumentação foram realizadas no transiluminador UV (302 nm, Bio-Rad Gel Doc™).

2.4.3 Polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP)

A clivagem dos amplicons da região ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada por RFLP utilizando endonucleases específicas.

As enzimas utilizadas foram Hinf I (*Haemophilus influenzae*, 5' G↓ANTC 3' - 5' CTNA↑G 3'); Hae III (*Haemophilus aegyptius*, 5' GC↓CC 3' - 3' CC↑GG 5'); Cfo I (*Clostridium formicoaceticum*, 5' G CG↓C 3' - 3' C↑GC 5') e Dde I (*Desulfovibrio desulfuricans*, 5' C↓TNAG 3' - 3' GANT↑C 5').

Tabela 2 - Composição do meio reacional para as clivagens enzimáticas

Reagentes	Hae III, Hinf I (Invitrogen)	Cfo I, Dde I (Promega)
Água ultra-pura	3,50 µl	3,65 µl
Tampão específico	1,00 µl	1,00 µl
BSA	—	0,10 µl
Enzima	0,50 µl	0,25 µl
Amplicon	5,00 µl	5,00 µl
Volume Total	10 µl	10 µl

Fonte: Elaborada pela autora

Para as linhagens 13SBCBSb16, 21SBCBSb16, e 28SBCBSb16 foram empregadas as enzimas Cfo I, Hae III e Hinf I. Para as linhagens 8SBCBSb16 e 24SBCBSb16 foram empregadas as enzimas Cfo I e Hinf I. Para a linhagem 18SBCBSb16 foram empregadas as enzimas Cfo I e DdeI.

Os tubos contendo as reações foram mantidos em estufa à 37°C por tempo determinando segundo o fabricante. O tempo de reação necessário para clivagem do amplicon é diferente de enzima para enzima. Após decorrido o tempo necessário para cada reação, 4 µl de tampão de corrida (Loading Buffer 6X, composto por azul de bromofenol 0,25%; xileno cainho FF 0,25% e glicerol 30%) foram adicionados aos 10 µl de reação presentes em cada tubo. Os 14 µl finais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3%. Foram utilizados 4,8 µl do marcador de massa molecular (DNA Ladder Low Range 100bp, Norgen, Canadá) em um dos poços do gel para fazer estimativas dos tamanhos dos fragmentos resultantes das restrições enzimáticas. O gel foi submetido à corrente elétrica de 120V até o corante atingir aproximadamente 1 cm da borda do gel. Para revelação das bandas, o gel foi mantido imerso em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos. A visualização e a fotodocumentação foram realizadas no transiluminador UV (302 nm, Bio-Rad Gel Doc™).

O tamanho do amplicon da região ITS juntamente com os tamanhos dos fragmentos resultantes das restrições enzimáticas foram comparados com dados presentes no estudo de Agustini et al. (2014) e também com outros dados da literatura científica para conclusão da identificação taxonômica das linhagens.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Velocidade de Fermentação

As linhagens de leveduras isoladas de uvas Sauvignon Blanc do município de Campo Belo do Sul - SC (série SBCBSb16), utilizadas nesse trabalho, não apresentaram grande capacidade fermentativa. Observou-se que das 47 linhagens apenas quatro delas (8,51%), 13SBCBSb16, 16SBCBSb16, 30SBCBSb16 e 47SBCBSb16, exibiram alguma atividade metabólica fermentativa, embora limitada quando comparadas às linhagens padrão 1VVT/97 e K1. As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT/97 e K1 foram utilizadas como testemunhas, visto que apresentam alta atividade fermentativa e esta pode ser observada após 24 horas. Leveduras consomem o açúcar presente no mosto de uva, convertendo-o a CO₂ e etanol. Estequiometricamente falando, para cada de CO₂ liberado, em condições anaeróbias, é possível formar a mesma quantidade molar de etanol. Portanto, quanto maior a quantidade de de CO₂ que evoluído, teoricamente, maior também será a quantidade de etanol gerada. A velocidade de fermentação das linhagens da série SBCBSb16 e das linhagens padrão 1VVT/97 e K1 é mostrada nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5.

A linhagem 13 da série SBCBSb16 corresponde à levedura da espécie *Hanseniaspora vineae*. *Hanseniaspora* spp. é um ascomiceto e uma das principais leveduras, denominadas não-*Saccharomyces*, encontradas na superfície de uvas e maçãs, nas indústrias e máquinas de colheita/processamento desses frutos, bem como nos primeiros estádios do processo de bebidas fermentadas. A espécie *Hanseniaspora vineae*, apesar de apresentar capacidade fermentativa baixa, tem sido de grande interesse por produzir diversos compostos aromáticos. Vinhos elaborados com essa espécie e com fermentação sequencial, empregando *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram aumento de aromas frutados e grande formação de ésteres de acetato (Viana et al., 2011b,a; Medina et al., 2013; Giorello et al., 2014; Lleixà et al., 2016).

As linhagens 16, 30 e 47 da série SBCBSb16 correspondem à espécie *Starmerella bacillaris*, antes denominada *Candida zemplinina* (Masneuf-Pomarède et al., 2015). Trata-se de uma levedura não-*Saccharomyces* comumente encontrada em associação com outras espécies, podendo influenciar fortemente a composição do produto final (Heard and Fleet, 1985; Ciani, 1997; Jolly et al., 2006; Tofalo et al., 2012; Englezos et al., 2015). Linhagens

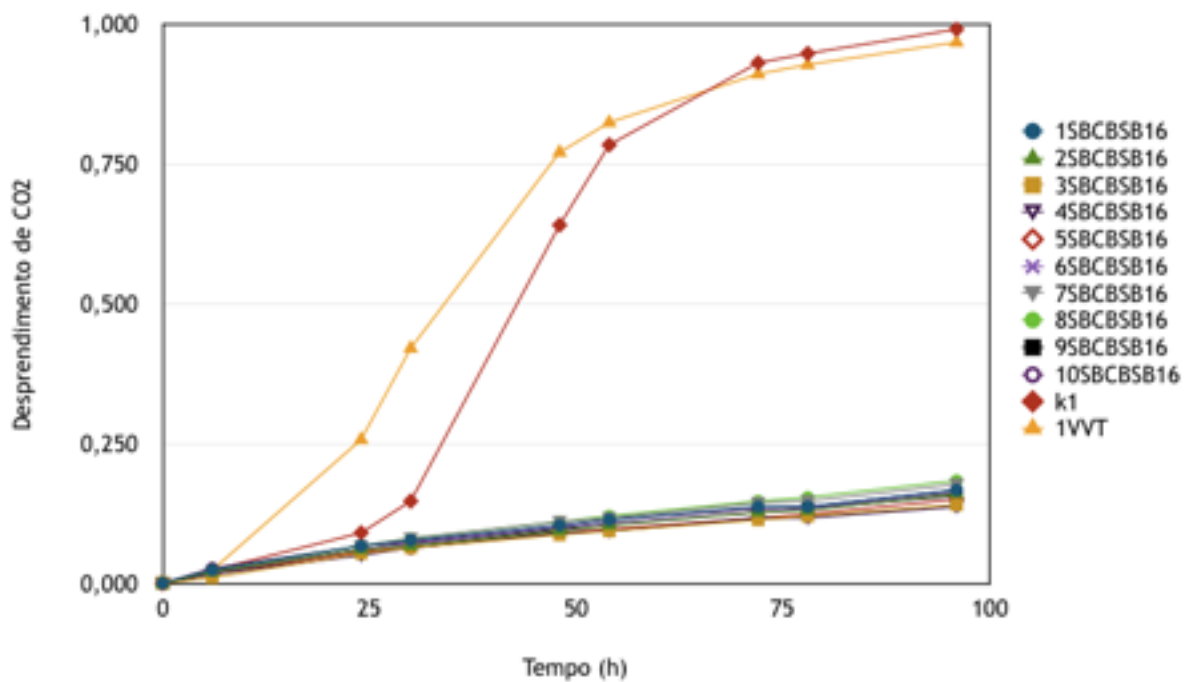
não-*Saccharomyces* desse gênero são conhecidas como leveduras frutófilas e apresentam importância enológica, uma vez que formam baixos teores de etanol e ácido acético, produzem glicerol e são capazes de metabolizar o ácido málico (Tofalo et al., 2012) e ainda podem conferir ao vinho a nota de mel (Soden et al., 2000).

Sipiczki (2004), descreveu *Starmerella bacillaris* (*Candida zemplinina*) como uma espécie acidogênica e altamente osmotolerante, capazes de crescer em presença de etanol e em baixas temperaturas. Propriedades que podem ser exploradas para a produção de vinho doce, caracterizado por sua alta concentração de açúcar e fermentação em baixas temperaturas. A combinação de *Saccharomyces cerevisiae* com *Starmerella bacillaris* tem grande potencial de exploração uma vez que esta última geralmente produz baixos teores de ácido acético e forma quantidades relevantes de glicerol, sendo capazes de consumir o açúcar no início da fermentação, aliviando o estresse osmótico da *Sacch. cerevisiae* (Magyar and Tóth, 2011; Rantsiou et al., 2012; Tofalo et al., 2012). Tofalo et al. (2002) explicam a tendência de formação de glicerol como a principal causa da baixa capacidade fermentativa e o baixo crescimento dessa espécie.

Conforme mencionado anteriormente apenas 8,51% das linhagens de leveduras da série SBCBSb16 apresentaram, apesar de baixa, alguma capacidade fermentativa o que torna claro a não existência da espécie *Saccharomyces cerevisiae* entre elas, uma vez que esta apresenta grande potencial fermentativo. A predominância de leveduras não-*Saccharomyces* pode ser atribuída a diversos parâmetros que influenciam na microflora da uva como, variedade da uva, região geográfica, condições climáticas, e práticas vitivinícolas e enológicas (Heard e Fleet, 1988; Pramatef-taki et al., 2000). Van der Westhuizen et al. (2000) ainda fazem considerações a respeito de pulverizações químicas, uma vez que estas podem afetar a biodiversidade da microflora presente nas uvas. Sabe-se que o processo de fermentação espontânea é complexo e realizado por ação sequencial de diversos gêneros e espécies de leveduras, influenciando e determinando uma vasta gama de diferentes produtos finais que contribuem para as características dos vinhos. Segundo Rapp and Versini (1995), etanol e dióxido de carbono são os principais produtos voláteis e dão uma contribuição significativa no sabor do vinho. Ácidos orgânicos, ésteres, álcoois superiores e em menor quantidade, acetaldeído, fazem parte do grupo de compostos que constituem o “bouquet de fermentação”. Muitos estudos confirmaram a importância de espécies não-*Saccharomyces* durante as

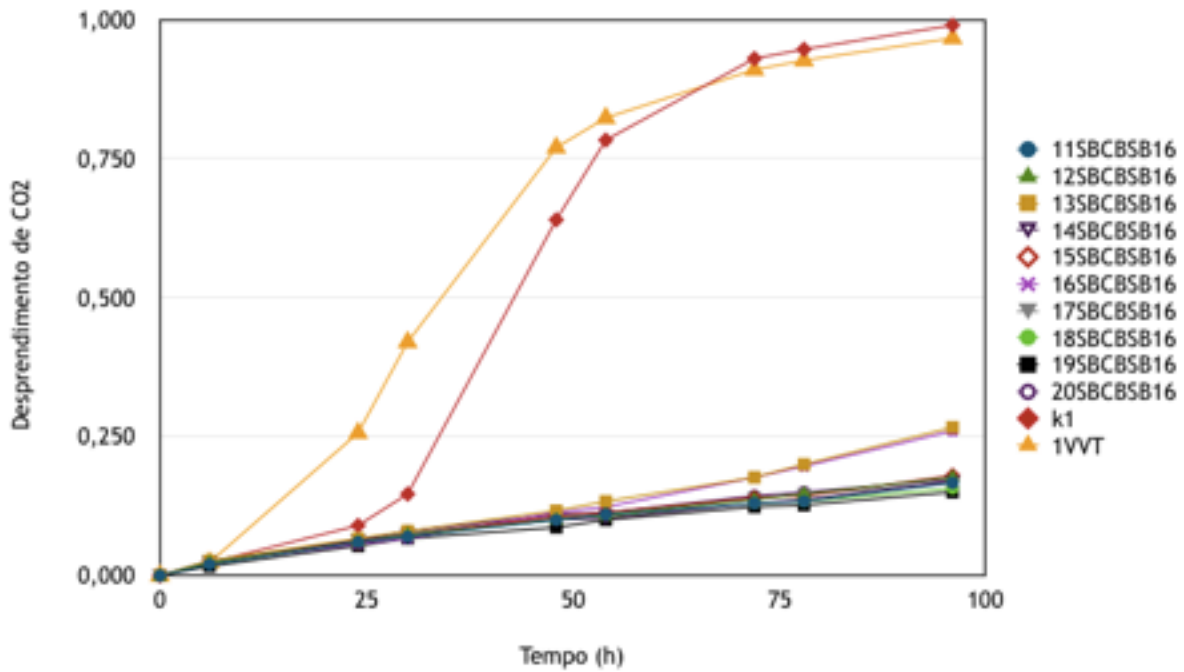
fermentações espontâneas (Fleet, 2008; Romano et al., 2003). Apesar de leveduras não-*Saccharomyces* serem caracterizadas por seu baixo poder fermentativo, sendo *Hanseniaspora* spp. e *Candida* spp. as mais frequentemente encontradas, o crescimento delas é significativo e tem grande influencia na composição do vinho (Heard and Fleet, 1986; Romano et al., 2003).

Figura 1 - Velocidade de fermentação das linhagens 1SBCBSb16 a 10SBCBSb16, K1 e 1VVT/97



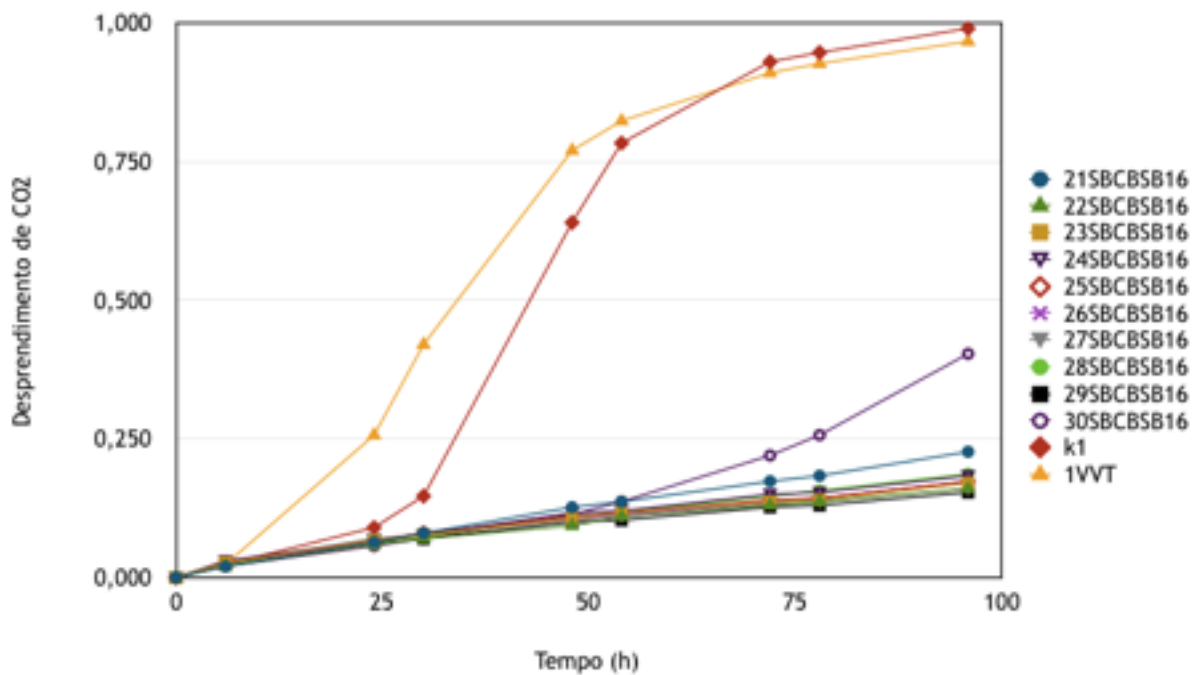
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 2 - Velocidade de fermentação das linhagens 11SBCBSb16 a 20SBCBSb16, K1 e 1VVT/97



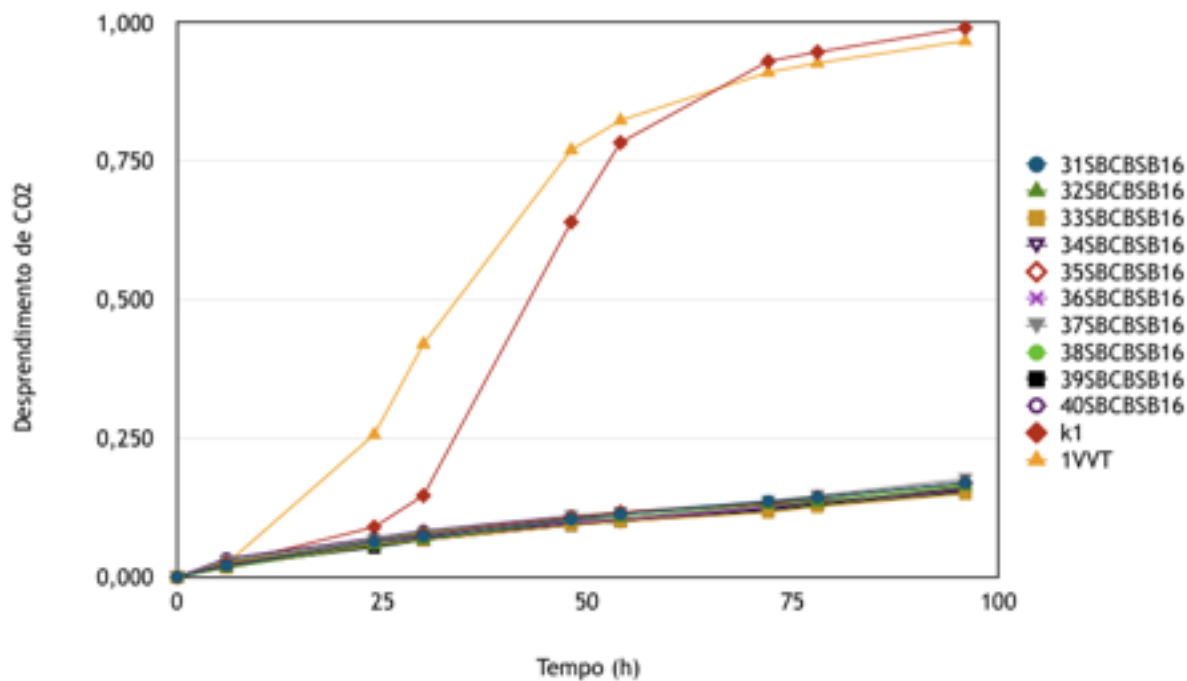
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 3 - Velocidade de fermentação das linhagens 21SBCBSb16 a 30SBCBSb16, K1 e 1VVT/97



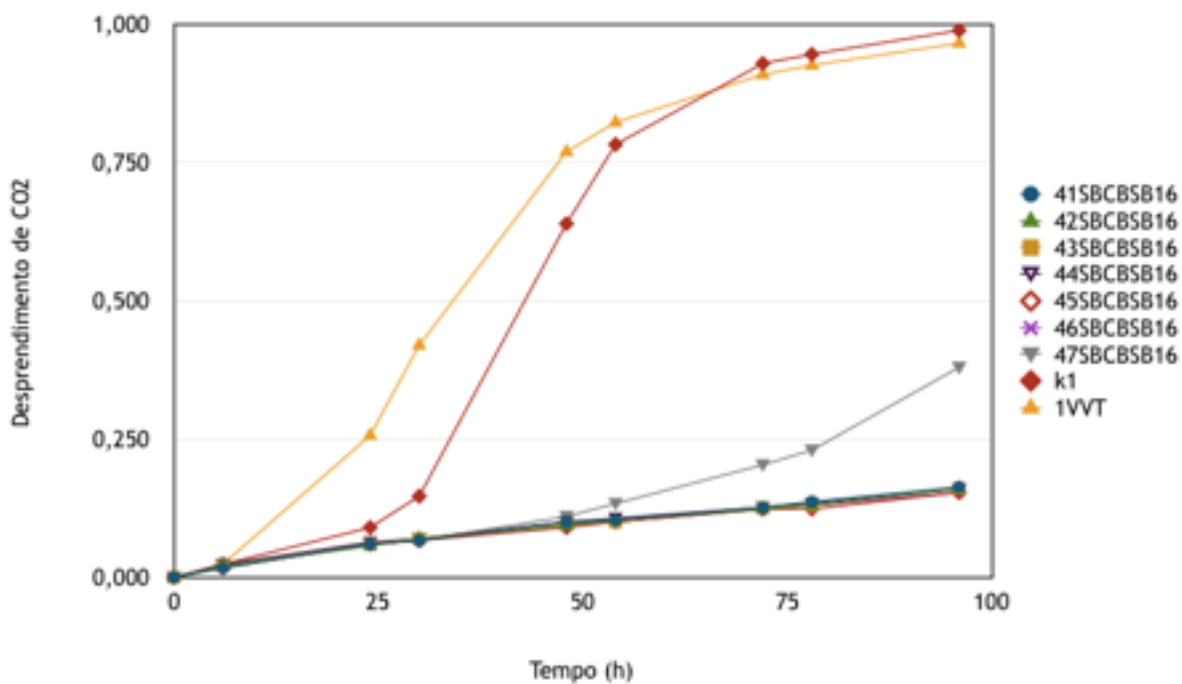
Fonte: Elaborada pela autora

Figura 4 - Velocidade de fermentação das linhagens 31SBCBSb16 a 40SBCBSb16, K1 e 1VVT/97



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 5 - Velocidade de fermentação das linhagens 41SBCBSb16 a 47SBCBSb16, K1 e 1VVT/97

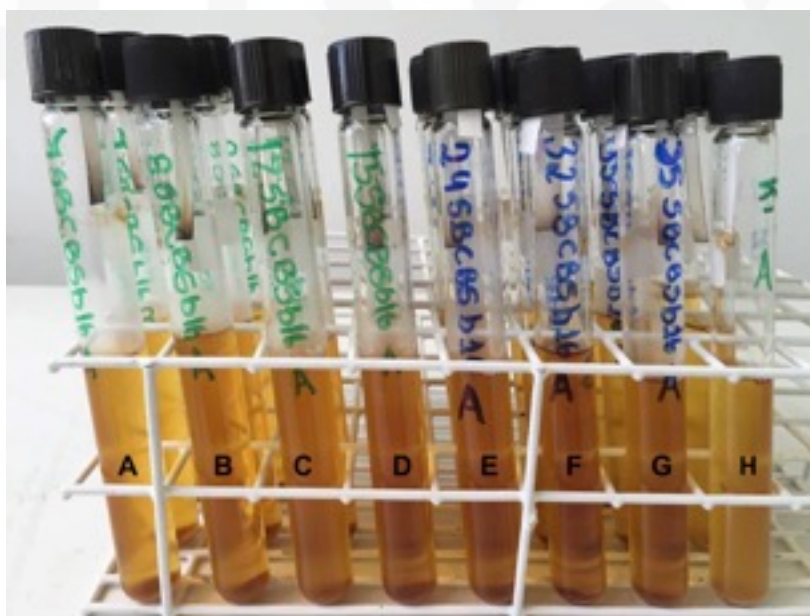


Fonte: Elaborada pela autora

3.2 Produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Para avaliação da capacidade de produção de H₂S a coloração escura da fita era esperada em caso positivo. Observou-se que das 47 linhagens testadas, sete foram positivas, correspondendo a 14,9%. Verificou-se, portanto, que 85,1% das linhagens apresentaram produção nula. Dentre as linhagens produtoras, cinco apresentaram alta taxa de produção (+++) e duas apresentaram média taxa de produção (++) . A linhagem K1, utilizada como padrão, apresentou taxa de produção baixa (+). As linhagens da série SBCBSb16 que apresentaram alta produção de H₂S foram: 7, 8, 12, 15 e 35. As linhagens que apresentam média produção foram: 24 e 32. Sendo as linhagens 7, 8, 15, 24 e 35, correspondentes à espécie *Issatchenkia terricola*, a linhagem 12 correspondente à espécie *Hanseniaspora uvarum* e a linhagem 32 correspondente à espécie *Candida diversa*.

Figura 6 - Experimento realizado para avaliação da capacidade de fermentação e produção de H₂S



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: Tubo A: 7SBCBSb16. Tubo B: 8SBCBSb16. Tubo C: 12SBCBSb16. Tubo D: 15SBCBSb16. Tubo E: 24SBCBSb16. Tubo F: 32SBCBSb16. Tubo G: 35SBCBSb16. Tubo H: K1.

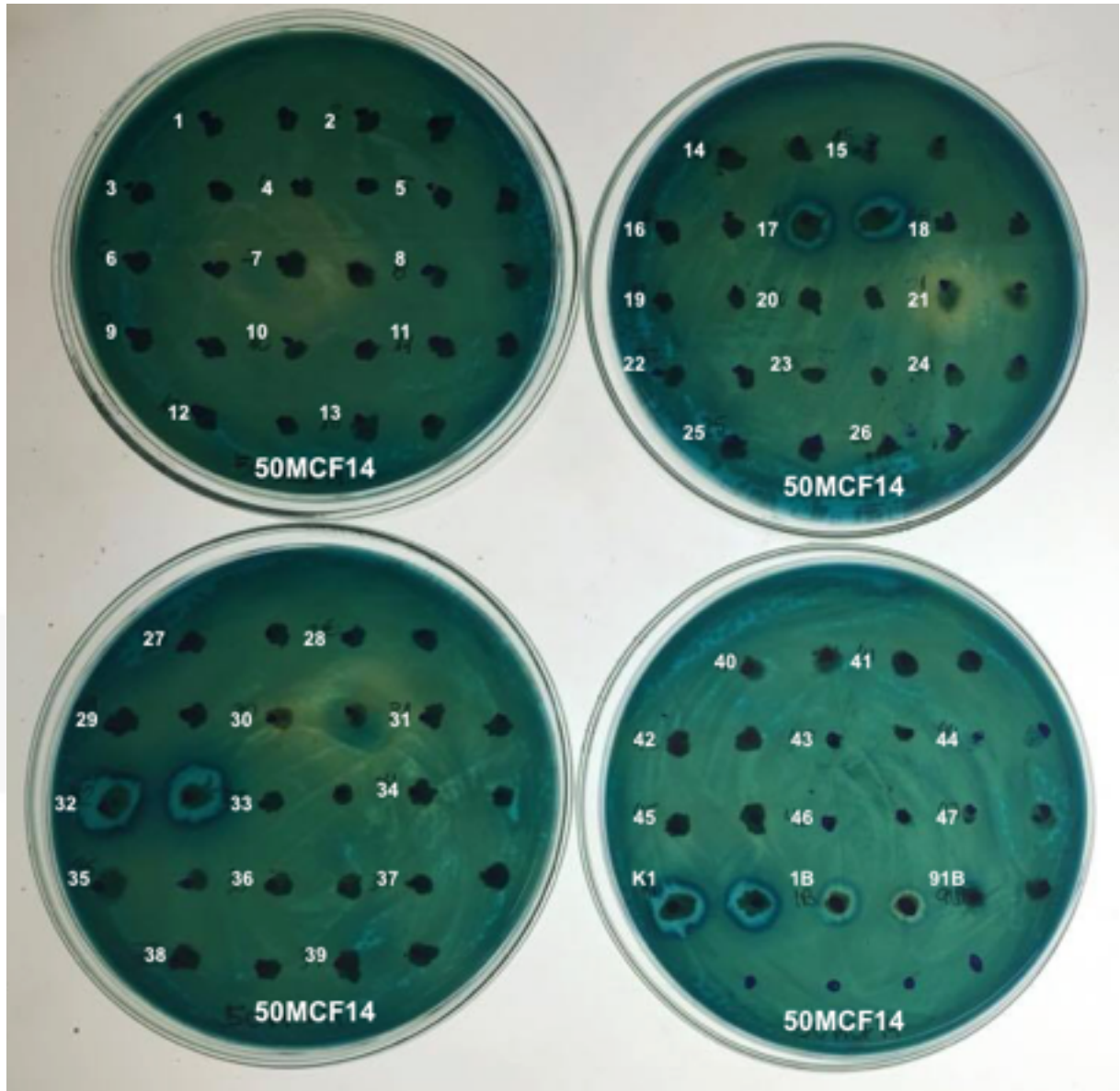
Wlodarczyk et al. (2012) avaliaram, em triplicata, 120 linhagens isoladas da região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) com relação à produção de sulfeto de hidrogênio. Observaram que 35,8% das linhagens apresentaram produção de H₂S. Canossa et al. (2012) verificaram que 61% das 100 linhagens de leveduras coletadas de bagas de uvas das cultivares Malvasia Bianca e Moscato de Alexandria da região de Farroupilha (RS) mostravam-se capazes de produzir H₂S. Bonet et al. (2015), analisando o comportamento de 50 linhagens de leveduras isoladas de bagas de uva Goethe da região de Urussanga (SC) verificaram que 70% se mostravam produtoras de H₂S.

Pode-se observar que a diversidade quanto aos resultados referentes à produção de H₂S presente nas diferentes áreas geográficas não podem ser atribuída a uma única variável. Uma gama de diversos fatores vem sendo apontados como possíveis condicionadores da produção de H₂S durante o processo de fermentação vínica, entre eles estão, estado de maturação da uva, concentração de compostos nitrogenados no meio, teor de compostos sulfurados, práticas enológicas, temperatura de fermentação e espécie de levedura presente. A presença de metionina e cisteína, aminoácidos que contém enxofre, podem direcionar para uma produção acentuada de H₂S se não houver a presença de precursores nitrogenados para reagir com o H₂S formado no meio (Neto e Mendes-ferreira, 2005; Cordente et al., 2009; Wlodarczyk et al., 2012).

3.3 Avaliação do comportamento killer da série SBCBSb16

Observou-se que dentre as 47 linhagens de leveduras analisadas, três apresentaram comportamento killer (K+R+), ou seja, 6,38% das linhagens tivera capacidade de matar as leveduras sensíveis. As linhagens da série SBCBSb16 que apresentaram comportamento killer foram 8, 17 e 32. A linhagens 8 foi identificada como *Issatchenkia terricola* e as linhagens 17 e 32 correspondem à espécie *Candida diversa*. A linhagem 8 apresentou perfil killer apenas para uma das 14 leveduras sensíveis testadas, sendo que essa ainda não foi identificada (1GTRU15). A linhagem 17 apresentou perfil killer para 13 das leveduras testadas, sendo killer para uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* e para 12 não-*Saccharomyces*. A linhagem 32 apresentou perfil killer para 11 das leveduras sensíveis, sendo killer para apenas uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* e para dez não-*Saccharomyces*.

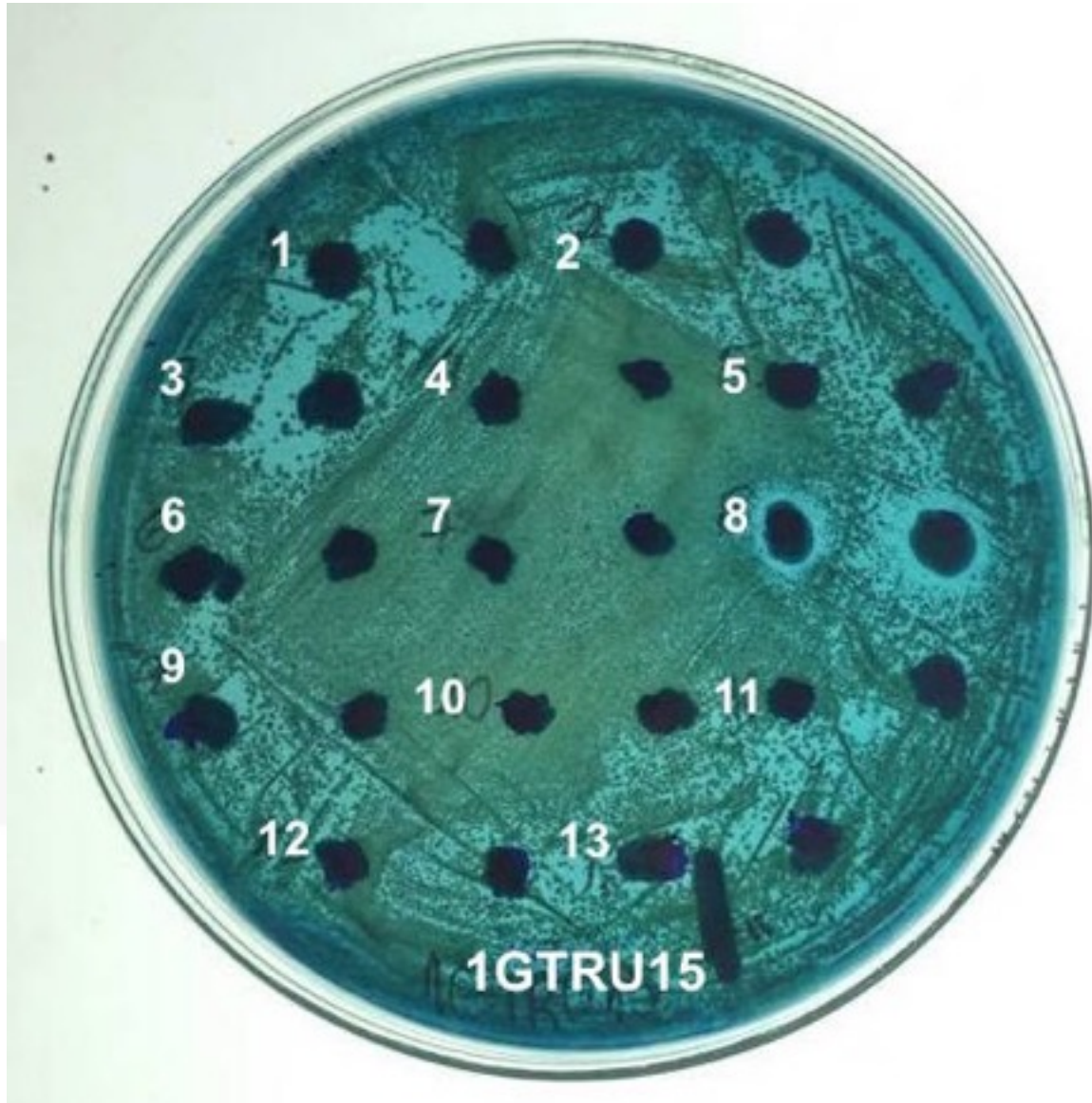
Figura 7 - Perfil killer de todas as linhagens da série SBCBSb16 testadas em relação a linhagem *Hanseniaspora uvarum* 50MCF14



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: É possível visualizar as linhagens da série SBCBSb16 em pontos duplicados e o halo de inibição aparente nas linhagens 17 e 32, assim como nas linhagens padrões K1 e 1B84.

Figura 8 - Perfil killer das linhagens de 1SBCBSb16 a 13SBCBSb16 em relação a linhagem 1GTRU15 (ainda não identificada)



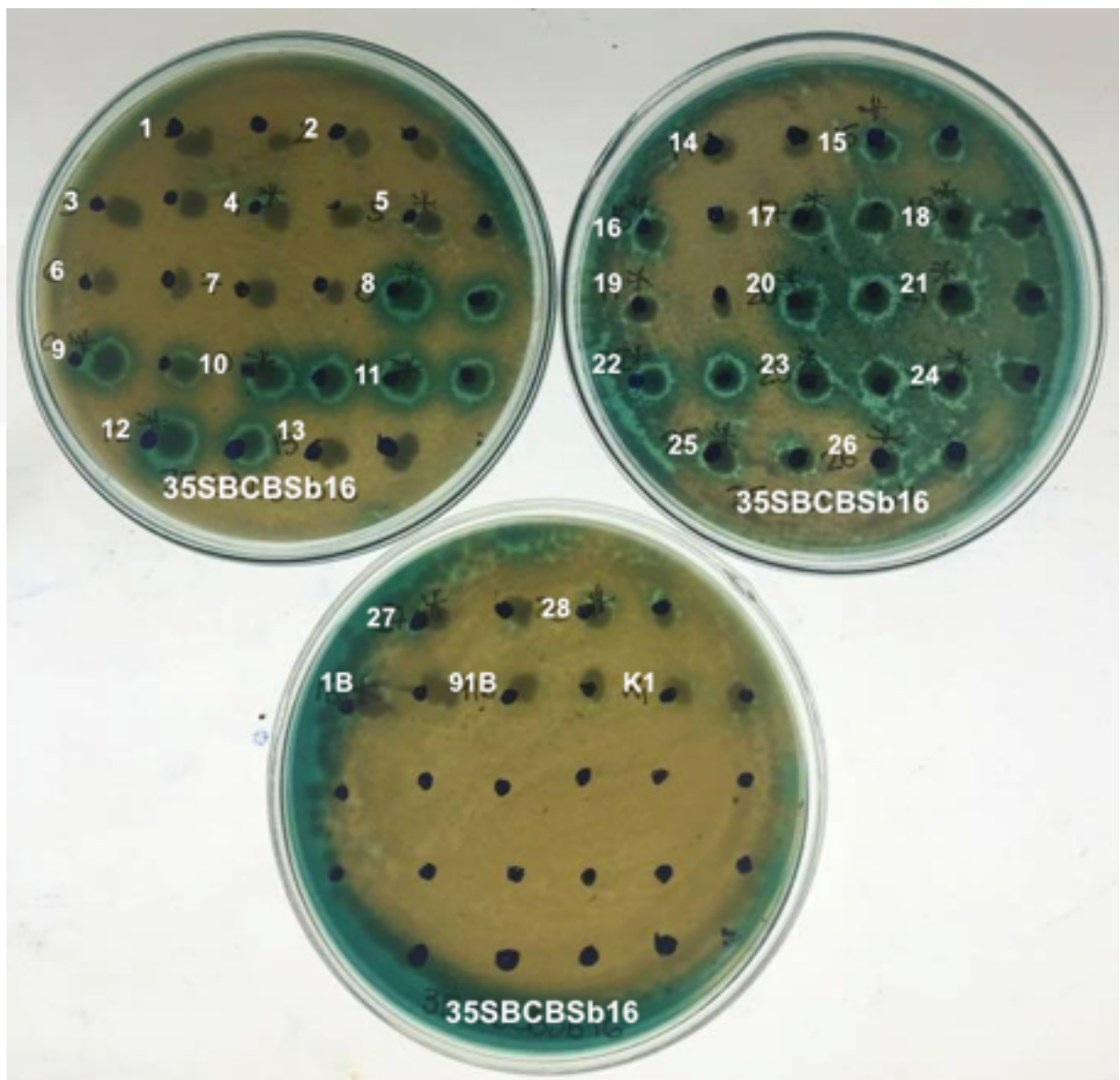
Fonte: Elaborada pela autora

Nota: É possível visualizar as linhagens de 1 a 13 da série SBCBSb16 em pontos duplicados e o halo de inibição aparente na linhagem 8.

3.4 Sensibilidade da série SBCBSb16 ao fator killer

As linhagens da série SBCBSb16 também foram testadas quanto a sensibilidade em relação a 28 linhagens não-Saccharomyces das séries MCF14, GCEpU16, MBR2F14, GTEpU16, MPB12, GTGU15, GTRU15, GPEpU15 e 44TASL15. Observou-se a presença de duas linhagens sensíveis, sendo 4,25% sensíveis a pelo menos uma das linhagens testadas. As linhagens que apresentaram sensibilidade foram 24 e 35, ambas pertencentes à espécie *Issatchenkia terricola*.

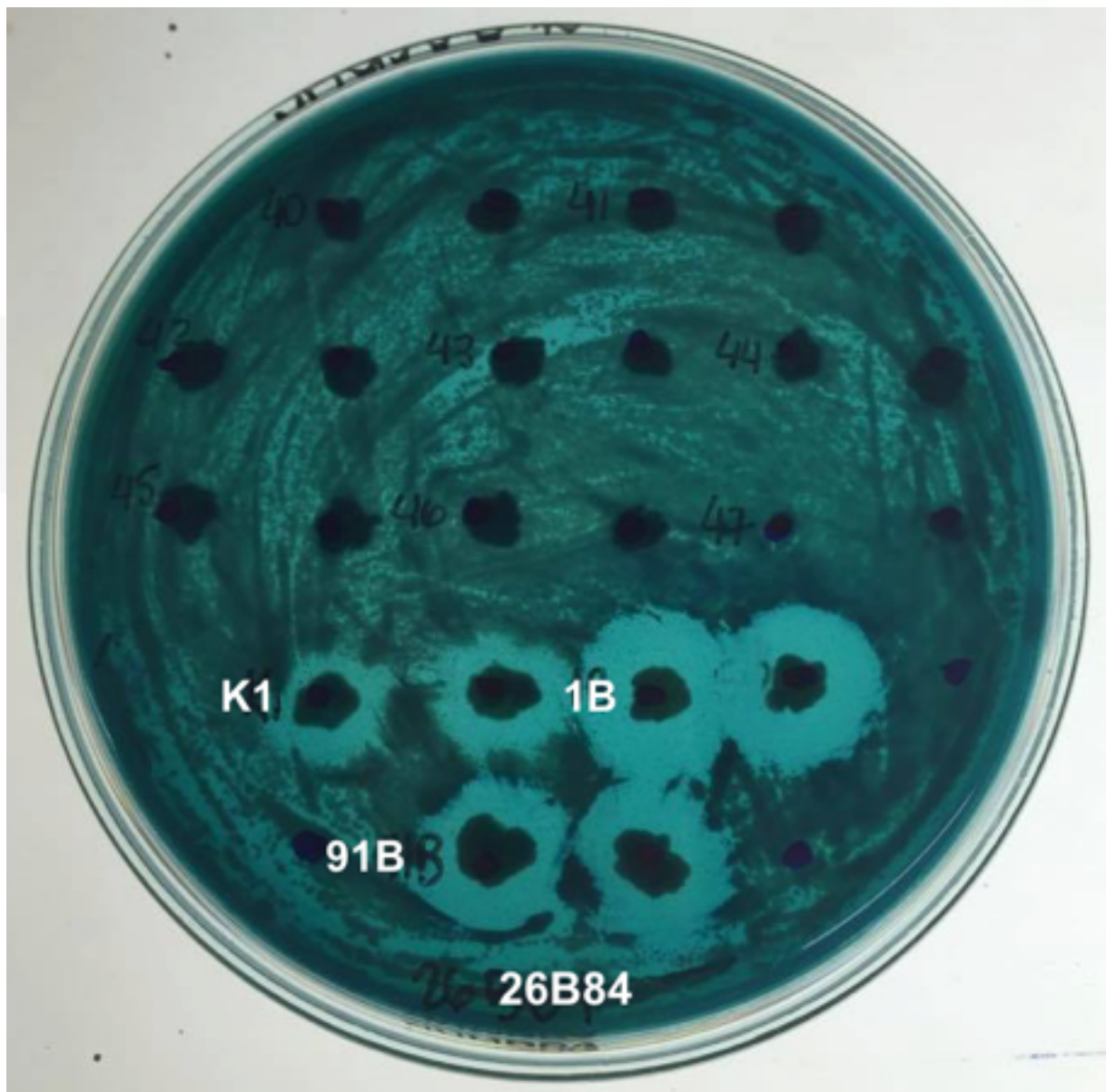
Figura 9 - Perfil de sensibilidade da linhagem 35SBCBSb16 em relação as linhagens killer



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: É possível visualizar o halo de inibição nas linhagens killer quando a linhagem 35SBCBSb16 estava sendo utilizada como tapete. Linhagens killer não-*Saccharomyces* estão representadas pelos números dispostos na placa. 1: 17MCF14, 2: 28MCF14, 3: 29MCF14, 4: 33MCF14, 5: 51MCF14, 6: 52MCF14, 7: 53MCF14, 8: 2GCEpU16, 9: 8GCEpU16, 10: 36GCEpU16, 11: 40GCEpU16, 12: 41GCEpU16, 13: 2MBR2F14, 14: 9MBR2F14, 15: 10MBR2F14, 16: 27MBR2F14, 17: 33MBR2F14, 18: 34MBR2F14, 19: 37MBR2F14, 20: 19GTEpU16, 21: 28GTEpU16, 22: 32GTEpU16, 23: 12MPB12, 24: 30MPB12, 25: 7GTGU16, 26: 13GTRU16, 27: 37GPEpU15, 28: 44TASL15. Linhagens *Saccharomyces*: pontos 1B, 91B e K1.

Figura 10 - Perfil killer das linhagens padrão de *Saccharomyces cerevisiae* K1, 1B84 e 91B84



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: É possível visualizar o halo de inibição das linhagens K1, 1B84 e 91B84 quando a linhagem padrão 26B84 estava sendo utilizada como tapete.

As demais leveduras da série SBCBSb16 testadas apresentaram comportamento neutro, representando 89,36% das linhagens, ou seja, não mataram e não foram eliminadas pela toxina killer.

Sabe-se que o meio de cultura utilizado para detecção do fator killer pode influenciar nos resultados (da Silva, 1996). Neste trabalho o meio de cultura utilizado foi o Mosto Lorena (80:20) (da Silva et al., 2011). O meio de cultura YEPD também pode ser utilizado para realização do teste, no entanto, muitas vezes não apresenta resultados consistentes, pois o fator killer pode estar presente e não ser detectado (Woods e Bevan, 1968; da Silva, 1996). Além disso, a inativação da proteína killer por agitação forte é também dependente do meio de cultura (Wilson e Whittaker, 1989). Wlodarczyk et al. (2012) em estudo realizado para comparação de meios de cultura quanto à resposta killer comprovaram os resultados obtidos por da Silva et al. (2011) quanto à influência do meio empregado. Das linhagens testadas, 55% apresentaram comportamento killer quando utilizado o meio mosto Lorena (80:20) e 30% quando utilizado o meio YEPD.

A distribuição e a frequência de leveduras killer encontradas em regiões vitivinícolas ou até mesmo em uma única fermentação é variável e influenciada por diversos fatores como, estágio de fermentação, período de colheita, área de produção, relação inicial de linhagens killer com linhagens sensíveis, presença de substâncias adsorventes de proteínas, condições ambientais, fase de crescimento das células, presença de leveduras neutras capazes de proteger as linhagens sensíveis, suscetibilidade de linhagens sensíveis à toxina killer, tamanho do inóculo, tipo de tratamento do mosto e processo de vinificação (Woods e Bevan, 1968; Heard e Fleet, 1986; Vagnoli et al., 1993; da Silva, 1996; Vagnoli et al., 1993; Wlodarczyk, 2013).

Em estudo realizado com leveduras isoladas das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot na região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS), verificou-se que somente 6,33% das linhagens apresentaram comportamento killer e nenhuma linhagem apresentou comportamento positivo para sensibilidade (Canossa et al., 2012). Outro estudo realizado em Bento Gonçalves (RS), verificou que entre as linhagens isoladas da cultivar Riesling Itáliaico 56,5% foram resistentes a linhagem killer 91B84, enquanto 32,9% apresentaram sensibilidade (da Silva, 1996). Na região de Urussanga (SC) não foi observada nenhuma linhagem positiva quanto a produção do fator killer, enquanto 26% das linhagens se mostram neutras (Bonet et

al., 2015). Canossa et al. (2014), avaliando linhagens de leveduras coletadas de cultivares Malvasia Bianca e Moscato de Alexandrina da região de Farroupilha (RS), observaram que 7% das linhagens apresentavam comportamento killer e 3% demonstravam sensibilidade.

Em estudo realizado na França o genótipo killer teve uma variação de 0 a 100%. Na cidade de Touraine não foi encontrada nenhuma linhagem killer, enquanto que nas cidades Beaujolais e Gard o fenótipo killer apareceu em 80 a 100% das leveduras testadas (Cuinier e Gros, 1983).

A determinação do fenótipo killer é difícil de ser efetuada, uma vez que sua detecção é influenciada por diversos fatores, é dependente da linhagem sensível selecionada, do tipo de meio de cultura empregado (Tipper e Bostian, 1984; da Silva, 1996) e da interação entre as leveduras que se encontram no mosto (da Silva, 1996; Wlodarczyk, 2013). Da Silva (1996) sugere a seleção e utilização de linhagens neutras, visto que elas não morrem em presença das linhagens killer ao mesmo tempo que não interferem no desenvolvimento de linhagens autóctones presentes durante fermentação, favorecendo a diferenciação dos vinhos.

3.5 Identificação genotípica das leveduras

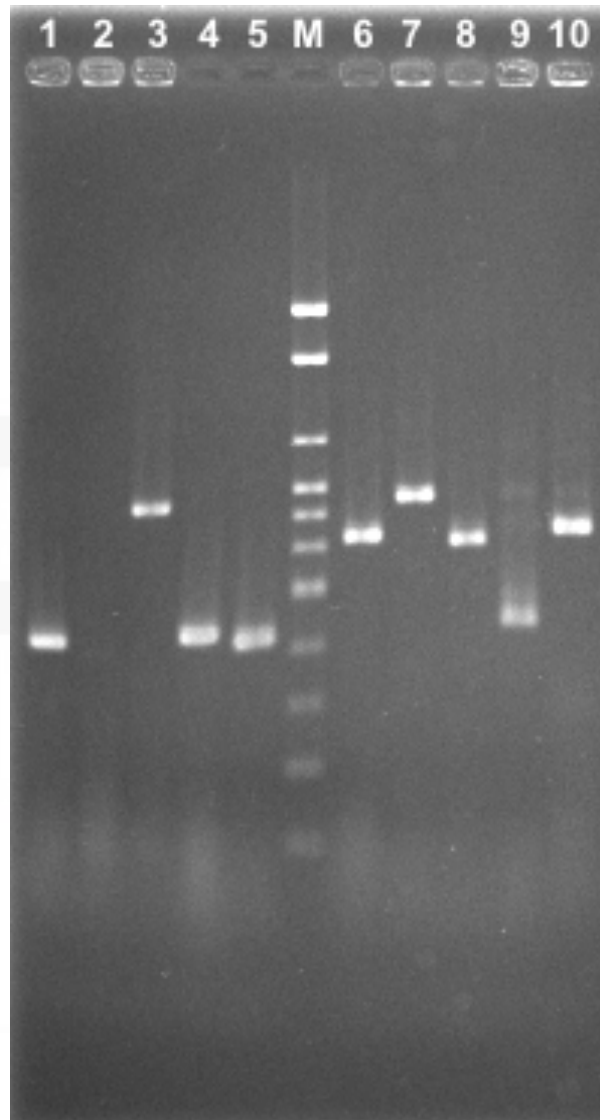
As linhagens da série SBCBSb16 já tinham sido previamente identificadas por MALDI-TOF-MS, no entanto, as linhagens 8SBCBSb16, 13SBCBSb16, 18SBCBSb16, 21SBCBSb16, 24SBCBSb16 e 28SBCBSb16 ainda não haviam sido identificadas por este método, portanto, estas linhagens foram escolhidas para identificação por meio da técnica de PCR e RFLP. A região ITS1-5.8S-ITS2, pode ser utilizada para diferenciação e identificação de leveduras, por se tratar de uma região pouco conservada entre diferentes espécies, no reino dos fungos, ao longo da evolução (Bruns et al., 1991).

No presente trabalho, empregando a técnica definida por (da Silva et al., 2012), obteve-se sucesso na extração de DNA, uma vez que foi possível continuar e realizar as etapas seguintes. A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 por meio da técnica de PCR mostrou tamanhos diferentes entre os fragmentos obtidos (Figura 11). As linhagens apresentaram os seguintes tamanhos de pares de base (pb):

- 8SBCBSb16 — 400pb
- 13SBCBSb16 — 610pb
- 18SBCBSb16 — 730pb

- 21SBCBSb16 — 590pb
- 24SBCBSb16 — 420pb
- 28SBCBSb16 — 640pb

Figura 11 - Gel com produtos de PCR-ITS



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: linha 5: 8SBCBSb16, linha M: Marcador, linha 6: 13SBCBSb16, linha 7: 18SBCBSb16, linha 8: 21SBCBSb16, linha 9: 24SBCBSb16, linha 10: 28SBCBSb16.

Na maioria das vezes não é possível identificar espécies por meio apenas da técnica de PCR pois, os amplicons podem ser muito semelhantes mesmo quando se trata de espécies distintas. Sendo assim, a utilização da técnica de RFLP é necessária. O produto de PCR é então submetido à ação de enzimas de restrição. Para as linhagens 13, 21 e 28 foram utilizadas as enzimas Cfo I, Hae III e Hinf I, para as linhagens 8 e 24, as enzimas usadas foram Cfo I e Hinf I e para a linhagem 18, as enzimas Cfo I e Dde I foram empregadas.

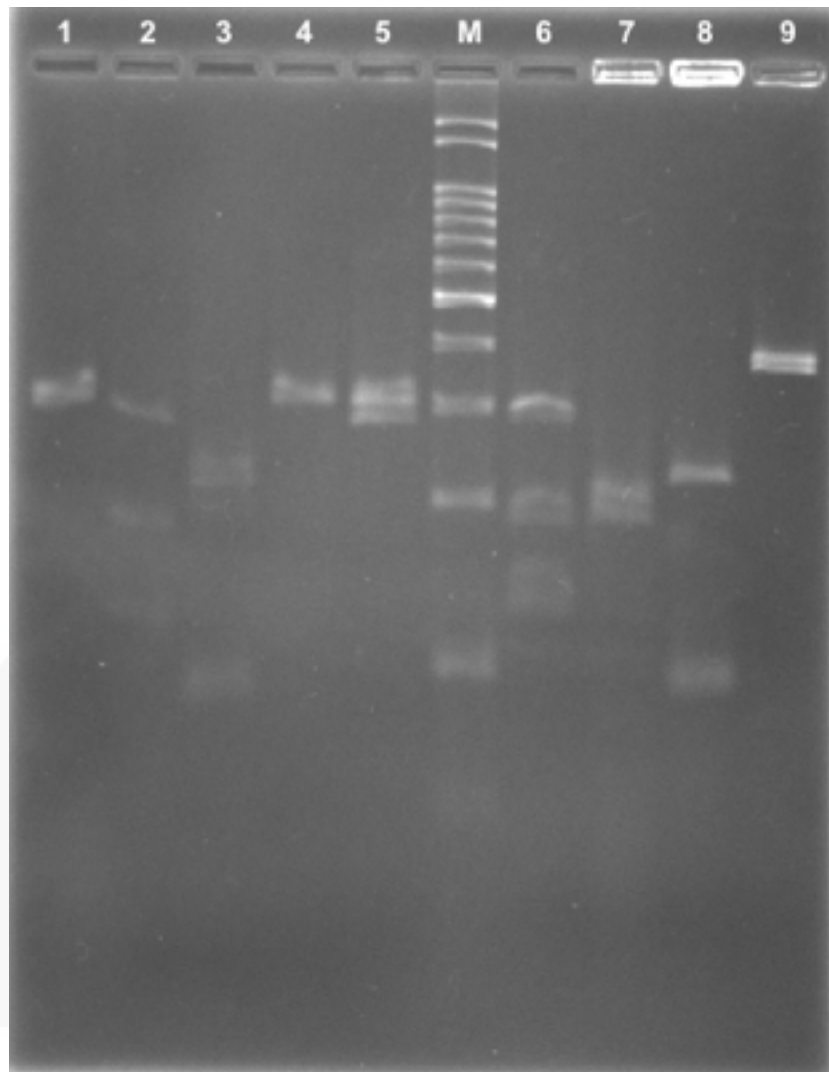
Tabela 3 - Tamanho dos fragmentos (pb) de restrição enzimática das linhagens analisadas

Linhagem	Cfo I	Hae III	Hinf I	Dde I
8SBCBSb16	50, 70, 80, 100, 120	—	100, 100, 210	—
13SBCBSb16	50, 290, 300	80, 120, 410	310, 310	—
18SBCBSb16	110, 315, 320	—	—	150, 290
21SBCBSb16	50, 540	80, 140, 370	120, 180, 290	—
24SBCBSb16	50, 70, 80, 100, 120	—	90, 220	—
28SBCBSb16	570	610	310, 310	—

Fonte: Elaborado pela autora

Após a realização do PCR-RFLP, foi possível a identificação de cinco linhagens, sendo as linhagens 8SBCBSb16 e 24SBCBSb16 pertencentes à espécie *Issatchenkia terricola*, a linhagem 13SBCBSb16 pertencente à espécie *Yarrowia lipolytica* (sinônimo de *Candida oleophila*), a linhagem 18SBCBSb16 pertencente à espécie *Hanseniaspora uvarum* e 28SBCBSb16 pertencente à espécie *Saccharomycopsis crataegensis*. A linhagem 21SBCBSb16 não pode ser identificada, portanto, deverá ser realizado seu sequenciamento genético.

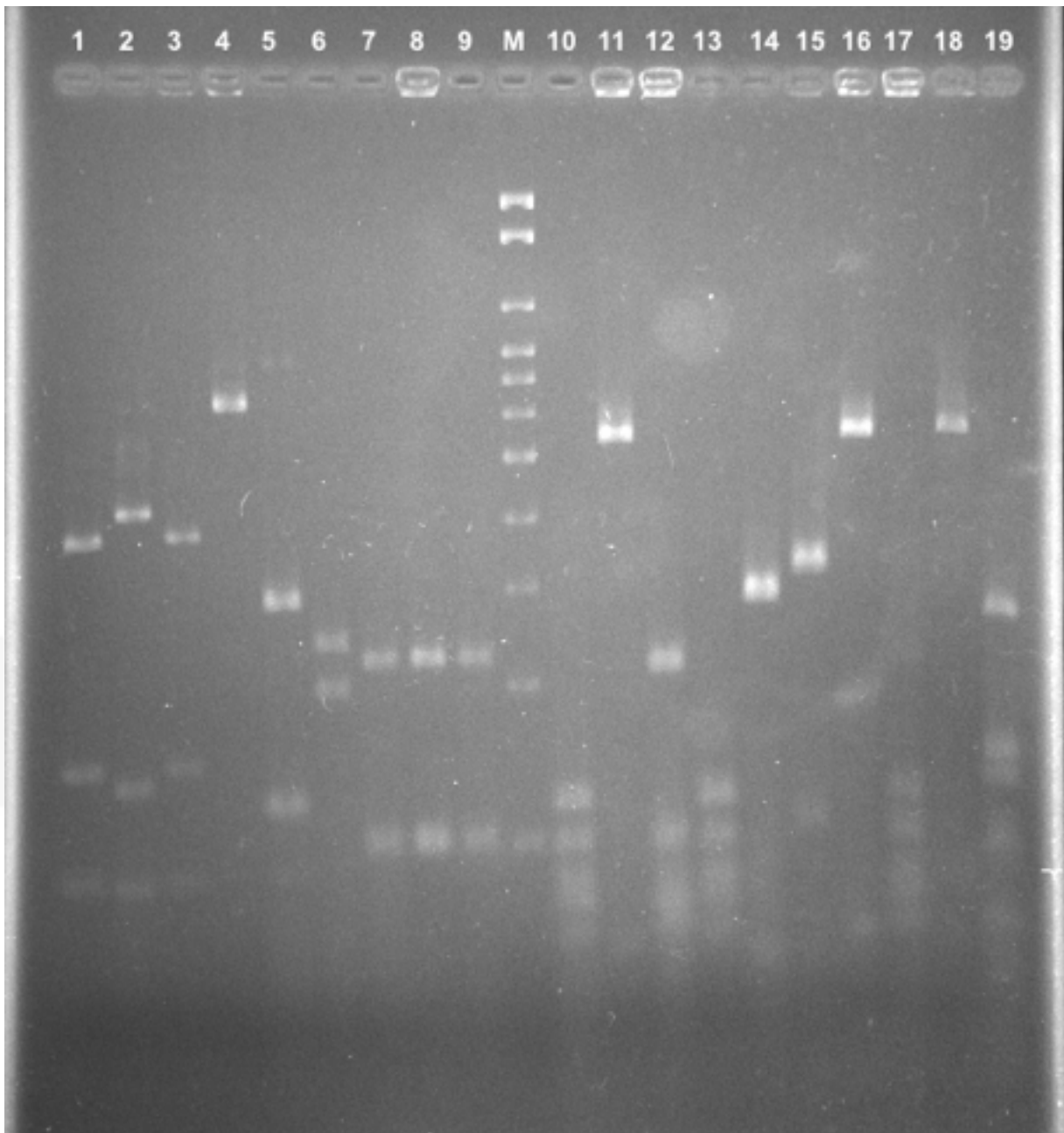
Figura 12 - Gel com perfis de fragmentação utilizando a enzima Hinf I



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: linha 1: 13SBCBSb16, linha 2: 21SBCBSb16, linha 3: 24SBCBSb16, linha 4: 28SBCBSb16, linha M: Marcador.

Figura 13 - Gel com perfis de fragmentação utilizando as enzimas Cfo I, Hae III e Dde I



Fonte: Elaborada pela autora

Nota: linha 2: 13SBCBSb16 (Hae III), linha 3: 21SBCBSb16 (Hae III), linha 4: 28SBCBSb16 (Hae III), linha 8: 8SBCBSb16 (Hinf I), linha 14: 8SBCBSb16 (Cfo I), linha 15: 13SBCBSb16 (Cfo I), linha 16: 18SBCBSb16 (Cfo I), linha 17: 21SBCBSb16 (Cfo I), linha 18: 24SBCBSb16 (Cfo I), linha 19: 28SBCBSb16 (Cfo I), linha M: Marcador.

Com o passar do tempo e com novas descobertas na área, observou-se que leveduras não- *Saccharomyces* são ecologicamente e metabolicamente significativas no processo de fermentação do vinho, e assim, passou-se a estabelecer uma exploração mais criativa e controlada de seu uso (Fleet, 2008). Howell et al. (2006) concluíram que a utilização de culturas mistas impactam o desempenho de linhagens individuais dentro de uma mistura. Vinhos elaborados com culturas mistas de leveduras apresentaram aromas diferentes daqueles obtidos quando produzidos com uma mesma linhagem de leveduras.

Sabe-se que algumas espécies de leveduras não-*Saccharomyces* apresentam limitação quanto a capacidade de fermentar completamente os açúcares presentes no mosto e a capacidade de produzir concentrações adequadas de etanol. No entanto, muitas delas apresentam relevância quanto a outras propriedades enológicas. Como por exemplo, algumas espécies de *Hanseniaspora*, capazes de produzir misturas de voláteis e maiores quantidade de glicosidases e proteases do que espécies de *Saccharomyces* (Dizy e Bisson, 2000; Mendoza et al., 2007; Moreira et al., 2008; Fleet, 2008; Maturano et al., 2012; López et al., 2015).

Yarrowia lipolytica é considerada produtora de lipases (Bigey et al., 2003) e apresenta potencialidade de utilização em processos fermentativos (Maráz, 2002). Algumas linhagens se mostraram sensíveis à ação killer de algumas espécies de *Candida* (Zarowska et al., 2004) o que não foi observado neste trabalho. A linhagem isolada se mostrou neutra com relação a 31 linhagens killer e a 14 linhagens sensíveis.

Estudos demonstram, embora alguns dados nem sempre sejam consistentes, que leveduras semifermentativas e fermentativas predominantes, isoladas de uvas durante sua maturação, são principalmente espécies de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Kluyveromyces*. Em bagas de uvas muito maduras, danificadas ou infectadas com fungos filamentosos, as populações de leveduras são mais elevadas e incluem maior incidência de espécies fermentativas, tais como, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes* e *Zygoascus* Martini et al. (1996); Jolly et al. (2003); Raspor et al. (2006); Barata et al. (2008); Nisiotou et al. (2007).

A diversidade microbiológica associada à uva está aliada a diversos fatores regionais, varietais e climáticos. Essa biogeografia microbiana ajuda a explicar padrões regionais nas propriedades sensoriais dos vinhos. Visto que essa variação na microbiota regional efetivamente modulam qualidades do produto final, esta deve ser experimentada, assim como

todas as características do terroir do vinho. Essa biodiversidade revela a oportunidade de desenvolvimento de estratégias adaptadas para melhoria da qualidade e diferenciação dos vinhos regionais (Bokulich et al., 2013, 2014, 2015, 2016).



4 CONCLUSÃO

Leveduras autóctones, naturalmente presentes em bagas de uvas, apresentam metabolismo distintos e muitas vezes não demonstram aptidão enológica adequada para serem utilizadas em culturas simples. Resultados obtidos nesse trabalho deixam claro e reforçam a necessidade de continuação dos estudos de caracterização, identificação e seleção de leveduras com características adequadas para elaboração de vinhos de qualidade para região do município de Campo Belo do Sul (SC).



Referências

- AGUSTINI, B. C. et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied Microbial and Cell Physiology**. v. 98, n. 12, p. 5645-5654, 2014.
- BARATA, A. et al. *Ascomycetous* yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, n. 4, p. 1182-1191, 2008.
- BERTHELS, N. J. et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**. v. 4, n. 7, p. 683-689, 2004.
- BEVAN, E. A.; MAKOVER, M. The physiological basis of the killer character in yeast. **Proceeding of the Fifth International Conference on Genetics**. v. 1, p. 202-203, 1963.
- BIGEY, F. et al. Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. **Yeast**. v. 20, n. 3, p. 233-248, 2003.
- BOKULICH, N. A. et al. Microbial biogeography of the transnational fermented milk matsoni. **Food Microbiology Journal**. v. 50, p. 12-19, 2015.
- BOKULICH, N. A. et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 111, n. 1, p. 139-148, 2013.
- BOKULICH, N. A. et al. Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. **Plos One**. v. 8, n. 6, 2013.
- BOKULICH, N. A. et al. A new perspective on microbial landscapes within food production. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 37, p. 182-189, 2016.
- BONET, J. et al. Caracterização de leveduras isoladas de bagas de uva Goethe da região de Urussanga (SC) para a elaboração de vinhos. In: XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia, 15., 2015, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. p. 390.
- BRUNS, T. D., WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 22, p. 525-564, 1991.
- BUSSEY, H. et al. Yeast killer plasmid mutations affecting toxin secretion and activity and toxin immunity function. **Journal of Molecular and Cellular Biology**. v. 2, n. 4, p. 346-354, 1982.
- CANOSSA, S. et al. Caracterização das leveduras isoladas de uvas das cultivares Malvasia Bianca e Moscato Alexandria da região de Farroupilha-RS. In: XII Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Uva e Vinho, 12.; VIII Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e

Vinho, 8., 2014, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2014. p. 47.

CANOSSA, S. et al. Características das linhagens isoladas de bagas de uva da cultivar Moscato tradicional da região de Farroupilha-RS. In: XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia, 15., 2015, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. p. 412.

CANOSSA, S.; WLODARCZYK, S. R.; da SILVA, G. A. Características de leveduras isoladas das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves. In: X Encontro de Iniciação Científica, 10.; VI Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 6., 2012, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012. p. 48.

CIANI, M. Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeast. **Recent Research in Developments in Microbiology**. v. 1, p. 317-331, 1997.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M. et al. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology Journal**. v. 21, n. 2, p. 149-155, 2004.

CONN, E. C.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica**. 3. ed. Trad. Lélia Menucci. São Paulo: Edgard Blucher, 1975.

CORDENTE, A. G. et al. Isolation of sulfide reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. **FEMS Yeast Research**. v. 9, n. 3, p. 446-459, 2009.

CUINIER, M.C.; GROS, C. Enquete sur la repartition des levures “killer” en France. **Vignes et Vins**. v. 318, p. 25-27, 1983.

da SILVA, M. A. A. A.; da SILVA, G. A. **Leveduras nacionais selecionadas para elaboração de vinho**. Circular Técnica (CNPUV), 1987. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/536784>>. Acesso em: 21 Nov. 2016.

da SILVA, G. A. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. **Applied Microbiology and Biotechnology Journal**. v. 46, n. 2, p. 112-121, 1996.

da SILVA, G. A. et al. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 55, n. 2, p. 319-327, 2012.

da SILVA, G. A. et al. Production of functional killer protein in batch cultures upon a shift from aerobic to anaerobic conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 51, n. 3, p. 601-612, 2011.

da SILVA, G. A. et al. Autochthonous yeast populations from different brazilian geographic indications. In: 39th World Congress of Vine and Wine, 7., 2016, Bento Gonçalves. **Bio Web of Conferences**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2016. p. 10.

DIZY, M.; BISSON, L. Proteolytic activity of yeast strains during grape juice fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.51, p. 155–167, 2000.

DUBOURDIEU, D. et al. The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: The example of Sauvignon Blanc. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 57, n. 1, p. 81-87, 2006.

EISENMAN, L. **Hydrogen sulfide in fermentations**. Technical report. Disponível em: <<http://www.gencowinemakers.com/docs/Hydrogen%20Sulfide%20in%20Fermentations.pdf>>. Acesso em: 21 Nov. 2016.

ENGLEZOS, V. et al. Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: physiological and molecular characterizations. **International Journal of Food Microbiology**. v. 199, p. 33-40, 2015.

ETS Laboratories. **Volatile Sulfides: Detection and Prevention**. Disponível em: <<https://www.etslabs.com/library/31>>. Acesso em: 23 Nov. 2016.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**. v. 8, n. 7, p. 979-995, 2008.

GACHONS, C. P. D., TOMINAGA, T.; DUBOURDIEU, D. Localization of s-cysteine conjugates in the berry: Effect os skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc must. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 53, p. 144-146, 2002.

GIORELLO, F. M. et al. Genome sequence of the native apiculate wine yeast *Hanseniaspora vineae* t02/19af. **Genome Announcements Journal**. v. 2, n. 3, 2014.

GUEDES, H. E. P. Sauvignon Blanc: uma uva versátil e enigmática. **Revista Wine Style**. 4. ed. p. 60-63, 2005.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. **Applied and Environmental Microbiology Journal**. v. 50, n. 3, p. 727-728, 1985.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. Occurence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wine. **Food Technology in Australia**. v. 38, n. 1, p. 22-25, 1986.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology Journal**. v. 53, n. 9, 1987.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 65, n. 1, p. 23-28, 1988.

HERRAIZ, T. et al. Differences between wines fermented with and without sulphur dioxide using various selected yeasts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 49, n. 2, p. 249-258, 1989.

HOWELL K. S. et al. Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. **FEMS Yeast Research**. v. 6, n. 1, p. 91–101, 2006.

IBRAVIN. **Panorama geral**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/Panorama-Geral>>. Acesso em: 16 Nov. 2016.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. **South African Journal of Enology and Viticulture**. v. 24, n. 2, p. 35–42, 2003.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The role and use of non-*Saccaromyces* yeast in wine production. **South African Journal for Enology and Viticulture**. v. 27, n. 1, p. 15-39, 2006.

LIEIXÀ, J. et al. Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers Microbiology**. v. 16, n. 7, p. 338, 2016.

LÓPEZ, S.; MATEO, J. J.; MAICAS, S. Screening of *Hanseniaspora* strains for the production of enzymes with potential interest for winemaking. **Fermentation Journal**. v. 2, n. 1. p. 1, 2015.

MAGYAR, I.; TÓTH, T. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology Journal**. v. 28, n. 1, p. 94-100, 2011.

MANFROI, V. Enologia. In: GIOVANINNI, E.; MANFROI, V. **Viticultura e Enologia: Elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros**. Bento Gonçalves: IFRS, 2009. P. 245-247.

MAQUEDA, Z.; ÁLVAREZ, M. L.; RAMÍREZ, M. Characterization, ecological distribution, and population dynamics os *Saccharomyces* Sensu Stricto killer yeasts in the spontaneous grape must fermentations of southwestern Spain. **Applied and Environmental Microbiology Journal**. v. 78, n. 3, p. 735-743, 2012.

MARÁZ, A. From yeast genetics to biotechnology. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Journal**. v. 49, n. 4, p. 483-491, 2002.

MARTINI, A.; CIANI, M.; SCORZETTI, G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 47, n. 4, p. 435-440, 1996.

MASNEUF-POMARÈDE, I. et al. The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. **FEMS Yeast Research**. v. 15, n. 5, p. 1-11, 2015.

MATURANO, Y. P. et al. Multienzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 155, n. 1-2, p. 43-50, 2012.

MAURICIO, J. C. et al. The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 75, n. 2, p. 155-160, 1997.

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

MELLO, L. M. R. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>>. Acesso em: 16 de Novembro de 2016.

MENDOZA, L. M.; NADRA, M. C. M.; FARÍAS, M. E. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. **Biotechnology Letters Journal**. v. 29, n. 7, p. 1057-1063, 2007.

MOREIRA, N. et al. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**. v. 124, n. 3, p. 231-238, 2008.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 2, p. 275-278, 2005.

NISIOTOU, A. A.; SPIROPOULOS, A. E.; GEORGE-JOHN, E. N. Yeast Community Structures and Dynamics in Healthy and *Botrytis*-Affected Grape Must Fermentations. **Applied and Environmental Microbiology Journal**. v. 73, n. 21, p. 6705-6713, 2007.

PRAMATEFTAKI, P. V.; LANARIDIS, P.; TYPAS, M. A. Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. **Journal of Applied Microbiology**. v. 89, n. 2, p. 236-248, 2000.

PROTAS, J. F. da S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas.** Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>>. Acesso em: 16 Nov. 2016.

RANKINE, B.C. Hydrogen sulphide production by yeast. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v. 15, p. 872-877, 1964.

RANTISIOU, K. et al. *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. **Applied and Environmental Microbiology Journal.** v. 78, n. 6, p. 1987-1994, 2012.

RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds wines. **Developments in Food Science.** v. 37, p. 1659-1694, 1995.

RASPOR, P. et al. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. **International Journal of Food Microbiology.** v. 109, n. 1-2, p. 97-102, 2006.

RIBAS, J. C.; WICKNER, R. B. The gag domain of the gag-pol fusion protein directs incorporation into the I-a double-stranded RNA viral particles in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry.** v. 273, n. 15, p. 9306-9311, 1998.

ROMANO, P. et al. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology.** v. 86, n. 1-2, p. 169-180, 2003.

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

SILVA, M. C.; ALVES, L. C. A produção de vinhos na América do Sul: comparativo entre Brasil e os países produtores do continente. **Dissertação de Mestrado,** Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2014.

SIPICZKI, M. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. **Journal of Basic Microbiology.** v. 44, n. 6, p. 471-479, 2004.

SODEN, A. et al. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research.** v. 6, n. 1, p. 21-30, 2000.

SORRENTINO, A. et al. Characterization of free volatile compounds in Fiano wine produced by different selected autochthonous yeasts. **Chemical Engineering Transactions Journal.** v. 32, p. 1837-1842, 2013.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing.** v. 85, n. 3, p. 149-156, 1978.

TIPPER, D. J.; BOSTIAN, K. A. Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. **Microbiology Reviews.** v. 48, n. 2, p. 125-156, 1984.

TOFALO, R. et al. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. **Food Microbiology Journal.** v. 29, n. 1, p. 18-26, 2012.

TOMINAGA, T. et al. Stereoisomeric distribution of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in dry and sweet white wines made from *Vitis vinifera* (Var. Sauvignon Blanc and Semillon). **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 54, n. 19, p. 7251-7255, 2006.

TRISTEZZA, M. et al. Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of Susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy. **International Journal of Microbiology.** v. 2014, n. 2014, p. 1-11, 2014.

UVIBRA. **Legislação.** Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/legislacao_portaria229.htm>. Acesso em: 16 Nov. 2016.

VAGNOLI, P. et al. Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the Tuscany region of Italy. **Applied and Environmental Microbiology Journal.** v. 59, n. 12, p. 4037–4043, 1993.

VAN DER WESTHUIZEN, T. J.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. **South African Journal of Enology and Viticulture.** v. 21, n. 1, p. 3-9, 2000.

VIANA, F. et al. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*–*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production. **International Journal of Food Microbiology.** v. 151, n. 2, p. 235-240, 2011a.

VIANA, F. et al. 2-phenylethyl acetate formation by immobilized cells of *Hanseniaspora vineae* in sequential mixed fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture.** v. 62, n. 1, p. 122-126, 2011b.

WICKNER, R. B. Killer of *Saccharomyces cerevisiae*: a double-stranded ribonucleic acid plasmid. **Bacteriological Reviews.** v. 40, n. 3, p. 757-773, 1976.

WICKNER, R. B. Mutants of the killer plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* dependent on chromosomal diploidy for expression and maintenance. **Genetics.** v. 82, n. 2, p. 273-285, 1976.

WICKNER, R. B.; LEIBOWITZ, M. J. Two chromosomal genes required for killing expression in killer strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics.** v. 82, n. 3, p. 429-442, 1976.

WILSON, C.; WHITTAKER, P. A. Factors affecting activity and stability of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin. **Applied and Environmental Microbiology Journal**. v. 55, n. 3, p. 695-699, 1989.

WINGFIELD, B. D. et al. K3 killer yeast is a mutant K2 killer yeast. **Mycological Research**. v. 94, n. 7, p. 901-906, 1990.

WLODARCZYK, S. R. et al. Evaluation of isolated yeasts from grapes of Pinto Bandeira region, Bento Gonçalves (RS) in relation to production of H₂S and fermentation rate. **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 1, n. 2, p. 26-29, 2012.

WLODARCZYK, S. R. Caracterização de leveduras vínicas provenientes do município de Pinto Bandeira (RS) e da região metropolitana de Curitiba (PR). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

WOODS, D. R.; BEVAN, E. A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**. v. 51, n. 1, p. 115-126, 1968.

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

ZAGORC, T. et al. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. **Food Microbiology Journal**. v. 18, p. 441-451, 2001.

ZAROWSKA, B. et al. Factors affecting killer activity of some yeast species occurring in rokpól cheese. **Folia Microbiologica (Praha)**. v. 49, n. 6, p. 713-717, 2004.

ZHU, H.; BUSSEY, H. The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. **Applied and Environmental Microbiology Journal**. v. 55, n. 8, p. 2105-2107, 1989.

ANÁLISE CRÍTICA

1. Objetivos propostos no plano de estágio e os de fato alcançados

O plano de estágio estava claro e objetivo. Foram propostos dois objetivos principais:

- Caracterização da diversidade de leveduras da série SBCBSb16.
- Identificação por biologia molecular das linhagens não identificadas por MALDI-TOF-MS.

Foi possível a realização de todos os itens propostos, como atividades a serem desenvolvidas, no plano de estágio. O entendimento e execução de todas as atividades realizadas foi possível graças a clareza e objetividade do plano proposto. Os resultados demonstraram a necessidade de continuação dos estudos de caracterização, identificação e seleção de leveduras com características adequadas para elaboração de vinhos de qualidade.

2. Dificuldades encontradas na execução do plano junto à unidade concedente do estágio

As únicas e poucas dificuldades encontradas durante a execução do plano de estágio se restringiram a minha falta de conhecimento teórico e prático sobre a área em questão. Contudo, não houve qualquer tipo de comprometimento do plano proposto para o estágio, sendo possível sua completa execução.

3. Contribuição para a vida profissional

A realização do estágio supervisionado na Embrapa Uva e Vinho me proporcionou crescimento profissional e pessoal. Tive a oportunidade de colocar em prática alguns conhecimentos teóricos que haviam sido vistos durante a permanência na universidade e adquirir conhecimento mais aprofundado na área. Além do treinamento técnico e acadêmico, foi possível vivenciar a dinâmica de uma empresa de inovação tecnológica focada na geração de tecnologias aplicáveis na agropecuária brasileira. Foi interessante fazer parte de algo que de fato tem aplicabilidade e influencia um setor em ascensão.