

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE EM BENTO GONÇALVES
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

JERSSICA BONET

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ORIUNDAS DA CULTIVAR GOETHE
TRADICIONAL, PROVENIENTES DA PROPRIEDADE EPAGRI, URUSSANGA-SC**

BENTO GONÇALVES

2016

JERSSICA BONET

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ORIUNDAS DA CULTIVAR GOETHE
TRADICIONAL, PROVENIENTES DA PROPRIEDADE EPAGRI, URUSSANGA-SC**

Monografia apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Profº. Dr. Fábio Luís Maciel

Co-orientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

BENTO GONÇALVES

2016

JERSSICA BONET

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ORIUNDAS DA CULTIVAR GOETHE
TRADICIONAL, PROVENIENTES DA PROPRIEDADE EPAGRI, URUSSANGA-SC**

Monografia apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof^o. Dr. Fábio Luís Maciel
Co-orientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Ma. Daiana Maffessoni
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Eng^a. Patrícia Bazzo
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

Ma. Sheila Canossa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

BENTO GONÇALVES

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me concedido o dom da vida e ter me guiado em todos os momentos.

À minha família, em especial a meus anjos, Jurandir e Neide, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

À Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS) e a todos meus queridos professores, vocês foram a base.

Ao professor Dr. Fábio Luis Maciel, orientador deste trabalho, por todo carinho, paciência e dedicação a mim concedidos.

À Embrapa Uva e Vinho pela grande oportunidade de aprendizado.

Ao querido pesquisador da Embrapa, Dr. Gildo Almeida da Silva, pela orientação, ensinamentos, carinho e paciência.

Às minhas queridas colegas do Lab. de Microbiologia Aplicada, Maria Antonietta (Chica), Bruna C. Agustini e Sheila Canossa, obrigada pela parceria, amizade, carinho e ajuda ao longo desses meses, vocês foram fundamentais na execução deste projeto.

Às minhas queridas colegas e amigas do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Bruna, Flávia, Luiza e Patrícia, levarei vocês sempre em meu coração. Obrigada por terem tornado essa caminhada muito mais leve e agradável.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para concretização deste projeto, serei eternamente grata.

Muito Obrigada!

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Na indústria vinícola, um dos avanços tecnológicos mais significativos é o controle microbiológico do processo fermentativo. No entanto, ainda que se tenham leveduras comerciais importadas para a realização de processos fermentativos, e essas serem bastante efetivas, a utilização de linhagens autóctones (selvagens) apresentam uma série de vantagens, dentre elas pode-se citar, a maior adaptação das mesmas às condições climáticas e à matéria-prima local, além de características organolépticas únicas do vinho obtido localmente. Dessa forma, o isolamento e a caracterização de leveduras locais é uma estratégia bastante promissora, tendo o intuito de aportar características peculiares e tipicidade aos seus vinhos. Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar leveduras obtidas a partir de material biológico (bagas) oriundas da cultivar Goethe da região de Urussanga-SC. Para tal fim, avaliou-se a capacidade fermentativa das leveduras isoladas, bem como a velocidade desse processo, a produção de H₂S por parte das linhagens isoladas e a presença ou ausência de fator killer também foram avaliados. A partir dos testes realizados, constatou-se que nenhuma das leveduras isoladas teve potencial fermentativo quando comparadas a linhagens padrões, conhecidas por serem fermentativas. Das 50 linhagens isoladas 30% não são produtoras de sulfeto de hidrogênio, apenas 4% produzem quantidade elevada de sulfeto, 22% produzem quantidade média de sulfeto e 44% produzem baixa quantidade de sulfeto. Dentre todas as linhagens analisadas, nenhuma delas demonstrou possuir potencial killer quando testadas com uma linhagem sensível padrão. Quando submetidas a testes de sensibilidade, 26% se mostraram neutras, ou seja, não produzem a toxina killer e nem são afetadas pela mesma. Dez linhagens foram escolhidas para serem identificadas por PCR-RFLP, das quais oito conseguiram ser identificadas, sugerindo serem leveduras das espécies *Hanseniaspora opuntiae* e *Issatchenkia terricola*.

Palavras-chave: Leveduras selecionadas. Caracterização. Potencial killer. PCR-RFLP.

ABSTRACT

In the wine industry, one of the most significant technological advances is the microbiological control of the fermentation process. However, even if imported commercial yeasts are used to carry out fermentative processes, and these are very effective, the use of autochthonous (wild) strains has a number of advantages. Among them, it is possible to mention the greater adaptation to the climatic conditions and the local raw material, as well as unique organoleptic characteristics of the wine obtained locally. In this way, the isolation and characterization of local yeasts is a very promising strategy, with the purpose of providing peculiar characteristics and typicality to their wines. This work aimed to isolate and characterize yeasts obtained from biological material (berries) from the Goethe of the Urussanga-SC region. For this purpose, the fermentative capacity of the isolated yeasts, as well as the speed of this process, the production of H₂S by isolated strains and the presence or absence of killer factor were also evaluated. From the tests performed, it was verified that none of the yeasts isolated had fermentative potential when compared to standard lineages, known to be fermentative. From the 50 isolated strains, 30% do not produce hydrogen sulphide, only 4% produce a high amount of sulfide, 22% produce an average amount of sulphide and 44% produces a low amount of sulfide. Among all strains analyzed, none of them showed potencial killer when tested with a standard susceptible lineage. When submitted to sensitivity tests, 26% were neutral, that is, they do not produce the killer toxin and are not affected by it. Ten strains were chosen to be identified by PCR-RFLP, of which eight could be identified, suggesting to be yeasts of the species *Hanseniaspora opuntiae* e *Issatchenkia terrícola*.

Keywords: Selected yeasts. Description. Potential killer. PCR-RFLP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Origem genealógica da variedade de uva Goethe.....	21
Figura 2 – Uva Goethe.....	21
Figura 3 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . A) Aspectos macroscópicos da cultura; B) Micrografia eletrônica de varredura do estágio de reprodução assexuada por brotamento; C) Estrutura celular.....	25
Figura 4 – Diagrama da Glicólise.....	29
Figura 5 – Fases de crescimento das células de leveduras.....	30
Figura 6 – Via de redução do sulfato em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
Figura 7 – Processamento e secreção da proteína killer.....	38
Figura 8 – Localização da região ITS1 – 5.8S – ITS2 no rDNA nuclear.....	41
Figura 9 – Sede da Embrapa Uva e Vinho (CNPUV), município de Bento Gonçalves/RS.....	42
Figura 10 – Desengaçadeira utilizada para separar o caule do grão.....	44
Figura 11 – Produção de H ₂ S após 96h de fermentação. A) Alta produção (+++). B) Média produção (++) . C) Baixa produção (+). D) Produção nula (-).....	56
Figura 12 – Perfil eletroforético da região ITS1-5.8S-ITS2 amplificada pelos iniciadores ITS1 e ITS2.....	60
Figura 13 – Perfil eletroforético das leveduras amplificadas pelos iniciadores ITS1, ITS4, CANDIV3 e CANDIV4.....	63
Figura 14 – Perfil eletroforético dos fragmentos de restrição das linhagens 1, 2, 5, 9,14, 15, 21, 24, 30 e 50 da série GTEpU com utilização das enzimas de restrição <i>CFOI</i> e <i>HinfI</i>	64
Figura 15 – Perfil eletroforético dos fragmentos de restrição das linhagens 2, 30 e 50GTEpU com a utilização das enzimas <i>CFOI</i> , <i>HinfI</i> e <i>HaeIII</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Área plantada de videiras no Brasil, em hectares.....	19
Tabela 2 – Características desejáveis em leveduras do vinho.....	32
Tabela 3 – Composição do meio reacional para a reação de PCR para a amplificação da região ITS rDNA.....	49
Tabela 4 – Tamanho, em pares de bases, dos produtos ITS-PCR para as possíveis espécies suspeitas para a identificação da linhagem 5GTEpU.....	61
Tabela 5 – Tamanho, em pares de bases, dos produtos de ITS-PCR para as possíveis espécies suspeitas para a identificação da linhagem 50GTEpU.....	61
Tabela 6 – Tamanho, em pares de bases, dos produtos de ITS-PCR para as possíveis espécies suspeitas para a identificação da linhagem 2GTEpU.....	62
Tabela 7 – Tamanho, em pares de bases, dos proutos de ITS-PCR para as possíveis espécies suspeitas para a identificação das linhagens 14, 15 e 30GTEpU.....	62
Tabela 8 – Custos relativos a aquisição de equipamentos utilizados para o isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC.....	66
Tabela 9 – Custos relativos a aquisição de materiais de laboratório utilizados para o isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC.....	67
Tabela 10 – Custos relativos a aquisição de reagentes e material biológico utilizados para o isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC.....	68
Tabela 11 – Recursos humanos necessários à realização dos experimentos isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC.....	70
Tabela 12 – Relação de custos totais necessários à realização dos experimentos envolvendo o isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC.....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Evolução do desprendimento de CO ₂ através da capacidade fermentativa das linhagens isoladas da Uva Goethe, coletadas da propriedade Epagri de Urussanga, SC. A) Linhagens 01GTEpU a 10GTEpU e as padrão K1e 1VVT/97. B) Linhagens 11GTEpU a 20GTEpU e as padrão K1 e 1VVT/97. C) Linhagens 21GTEpU a 30GTEpU e as padrão K1 e 1VVT/97. D) Linhagens 31GTEpU a 40GTEpU e as padrão K1 e 1VVT/97. E) Linhagens 41GTEpU a 50GTEpU/15 e as padrão K1 e 1VVT/97.....	52
Gráfico 2 – Nível de produção de H ₂ S pelas linhagens isoladas da cultivar Goethe Tradicional da propriedade Epagri – Urussanga, SC.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SC – Santa Catarina

H₂S – sulfeto de hidrogênio

PCR – polimerase chain reaction

RFLP – restriction fragment length polymorphism

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

ha – hectares

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IG – Indicação Geográfica

PROGOETHE – Associação dos Produtores da Uva e do Vinho Goethe de Urussanga / SC

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

DO – Denominação de origem

CO₂ – dióxido de carbono

pH – concentração de hidrogênio

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

ATP – adenosina trifosfato

NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

DNA – ácido desoxirribonucleico

SO₂ – dióxido de enxofre

dsRNA – ácido ribonucleico de dupla fita

CNPUV – Centro Nacional de Pesquisa da Uva e do Vinho

ADP – adenosina difosfato

ITS – espaçador interno

RNA – ácido ribonucleico

Cél/mL – células por mililitro

MA – meio mosto ágar

MS – meio mosto sulfito

ME80 – meio mosto 80

ELNC – extrato de levedura não comercial

g.L⁻¹ – grama por litro

mL – mililitro

ml.L⁻¹ – mililitro por litro

GTEpU – Cultivar Goethe Tradicional propriedade Epagri – Urussanga, SC.

°C – graus Celsius

pb – pares de bases

MgCl₂ – cloreto de magnésio

h – hora

min – minutos

RS – Rio Grande do Sul

cm – centímetro

PbS – sulfeto de chumbo

μL – microlitro

rDNA DNA – ribossomal

V – volts

ETS – espaçador externo

UV – ultravioleta

nm – nanômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVOS GERAIS	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	VITIVINICULTURA NO BRASIL.....	18
3.1.1	Viticultura no Vale da Uva Goethe em Urussanga	20
3.2	PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE VINHOS	22
3.3	LEVEDURAS UTILIZADAS NA ELABORAÇÃO DE VINHOS	24
3.3.1	Utilização de leveduras selecionadas na elaboração de vinhos	25
3.3.1.1	<i>Bioquímica da fermentação alcoólica</i>	26
3.3.1.2	<i>Fases do processo de fermentação alcoólica</i>	28
3.4	SELEÇÃO DE LEVEDURAS	30
3.4.1	Critérios básicos visando a seleção de leveduras vínicas	31
3.4.1.1	<i>Velocidade de fermentação</i>	32
3.4.1.2	<i>Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)</i>	33
3.4.1.3	<i>Fator killer</i>	35
3.5	IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS VÍNICAS	38
3.5.1	Identificação através de PCR-RFLP	39
4.	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO	40
4.2	MATERIAL BIOLÓGICO	41
4.2.1	Coleta de amostras para isolamento de leveduras	41
4.2.2	Linhagem de levedura padrão de comparação	42
4.2.3	Linhagens de leveduras killer e sensível	42
4.3	PREPARO DO MOSTO BASE PARA ELABORAÇÃO DO MEIO DE CULTUR..	42
4.4	MEIOS DE CULTURA	43
4.4.1	Meio mosto ágar (MA) – manutenção das culturas	43
4.4.2	Meio mosto sulfito (MS) – meio de fermentação	44
4.4.3	Meio mosto 80 (ME80) – detecção de fator killer	44
4.5	ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	44
4.6	MANUTENÇÃO DAS CULTURAS MICROBIANAS.....	45

4.7	EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	45
4.7.1	Teste de velocidade de fermentação.....	46
4.7.2	Teste de produção de H₂S	46
4.7.3	Teste de detecção de fator killer e sensibilidade das linhagens selecionadas	46
4.8	IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS POR PCR-RFLP	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	49
5.2	TESTE DE VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO.....	50
5.3	TESTE DE PRODUÇÃO DE H ₂ S	54
5.4	TESTE DE DETECÇÃO DE FATOR KILLER E SENSIBILIDADE DAS LINHAGENS SELECIONADAS	57
5.5	IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS PREVIAMENTE SELECIONADAS DA SÉRIE GTEpU/15	58
5.6	VIABILIDADE ECONÔMICA	65
7.	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O vinho é um produto que possui complexas interações microbiológicas durante todo o processo fermentativo. Louis Pasteur em 1863, através da sua descoberta da fermentação espontânea, demonstrou que as leveduras eram as grandes responsáveis pela transformação do açúcar presente em mostos em etanol. E a partir do conhecimento do processo de biotransformação de açúcares da uva em etanol e dióxido de carbono, os produtores iniciaram o controle do processo ainda na vinha (PRETORIUS, 2000). Desde então várias pesquisas em torno do melhoramento do processo de fermentação alcoólica com o uso de leveduras vnicas selecionadas foram desenvolvidas. Atualmente, há uma série de tecnologias disponíveis que permitem isolar e selecionar determinadas linhagens de leveduras, sendo sua aplicação cada vez mais propagada. Na indústria vinícola, um dos avanços tecnológicos mais significativos é o controle microbiológico do processo fermentativo através da inoculação de linhagens selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, dessa forma, os produtos finais obtidos no processo fermentativo, em geral, apresentam qualidade superior aos oriundos da fermentação espontânea.

Ainda que o mercado disponibilize leveduras comerciais importadas para a realização de processos com atuação bastante efetiva, a utilização de linhagens autóctones apresentam uma série de vantagens, dentre elas pode-se citar, a maior adaptação das mesmas às condições climáticas e à matéria-prima local, além de características organolépticas únicas do vinho obtido localmente a partir da utilização dessas linhagens nativas (SILVA *et al.*, 2008b).

No processo de seleção de leveduras, existem critérios rígidos que devem ser seguidos, sob pena de se reduzir a qualidade do vinho. Entre eles, cabe destacar, a estabilidade genética da linhagem selecionada, a deficiência bioquímica na biossíntese de sulfeto de hidrogênio, a resistência ao fator killer, a velocidade de fermentação elevada, bem como a formação de compostos orgânicos relacionados com o aroma e o sabor. Dessa forma, a utilização de leveduras selecionadas é de extrema importância no processo de vinificação, uma vez que pode ser decisiva para a elaboração de vinhos com aromas intensos, delicados e persistentes. Devido a isso, inúmeras leveduras são isoladas em diversas regiões vitivinícolas do mundo e selecionadas conforme os critérios mencionados. Há um grande número de leveduras ofertadas no mercado nacional, no entanto, todas são importadas de outros países, o que encarece o produto final, além de nem sempre tais leveduras apresentarem características biológicas adequadas à elaboração de um produto com alto padrão de qualidade.

O setor vitivinícola brasileiro está se conscientizando da necessidade da utilização de leveduras selecionadas para a obtenção de melhoria e uniformidade na qualidade do produto final, sendo que muitas empresas de grande porte já adotam esse tipo de tecnologia. Dessa forma, o isolamento e a caracterização de leveduras locais é uma estratégia bastante promissora, tendo em vista a possibilidade das mesmas, durante o processo fermentativo, aportarem características peculiares e personalidade aos vinhos das principais regiões vinícolas nacionais, em especial vinhos elaborados na Serra Gaúcha, na região da Campanha e na Serra do Sudeste Gaúcho, bem como na região de Urussanga, conhecida como o “Vale da Uva Goethe”, localizado ao sul do Estado de Santa Catarina, que se destaca pela elaboração de vinhos com características típicas.

Desta forma, o presente estudo teve como propósito caracterizar e identificar o potencial fermentativo de leveduras isoladas na região de Urussanga (SC), que carece de linhagens autóctones selecionadas para a elaboração de vinhos locais com características diferenciadas, tipicidade e identidade.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral isolar e caracterizar leveduras obtidas a partir de bagas de uvas da cultivar Goethe, cultivada na região de Urussanga (SC), conhecida como “Vale da Uva Goethe”, que possui 87,5% dos genes de *Vitis vinifera* e 12,5% dos genes de *Vitis labrusca*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade fermentativa das linhagens isoladas, bem como a velocidade desse processo;
- Detectar a produção ou não de H₂S por parte das linhagens isoladas;
- Determinar a presença ou ausência de fator killer nas linhagens isoladas ;
- Identificar algumas das linhagens isoladas utilizando métodos moleculares, como PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme – Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 VITIVINICULTURA NO BRASIL

Dados históricos revelam que a primeira introdução da videira no Brasil foi feita pelos colonizadores portugueses em 1532, através de Martin Afonso de Souza, na então Capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo. A partir desse momento e introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do país, com cultivares de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e Espanha (MELLO, 2015). Por volta de 1830-1840, com a imigração italiana, ocorreu o ressurgimento da viticultura no estado de São Paulo, utilizando, principalmente, *Vitis labrusca*, cultivar Isabel (NUNES, 2008). Entretanto, com o passar do tempo, constatou-se que também é possível cultivar uvas onde há clima com prevalência de altas temperaturas, como no semi-árido brasileiro (CPATSA, 2015). E nas primeiras décadas do século XIX surgiram as primeiras doenças fúngicas, advindas da importação de uvas americanas procedentes da América do Norte, o que levou a um declínio da viticultura colonial. A cultivar Isabel passou a ser plantada em diversas regiões do país, tornando-se base para o desenvolvimento da vitivinicultura comercial nos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo. Logo após, no início do século XX, no Estado do Rio Grande do Sul, foi incentivado o cultivo de castas viníferas através de estímulos governamentais, nesse mesmo período, a atividade vitivinícola expandiu-se para outras regiões do sul e sudeste do país, sempre em zonas com período hibernal definido e com o predomínio de cultivares americanas e híbridas.

A vitivinicultura brasileira ocupou, no ano 2007, o 17º lugar mundial em área cultivada com uvas e a 19ª colocação em produção de acordo com dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas – FAO). Dados de 2010 também mostram que 43% da uva cultivada no Brasil foi utilizada para a elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, mostrando o potencial da atividade de produção de vinho no país (MELLO, 2015).

A vitivinicultura no Brasil ocupa uma área de 81.000 ha, segundo o IBGE. Situa-se entre o paralelo 30°S, no Estado do Rio Grande do Sul, e o paralelo 9°S, na região Nordeste do País. Devido à diversidade ambiental, existem polos com viticultura característica de regiões temperadas, com um período de repouso hibernal definido, polos em áreas subtropicais onde normalmente a videira é cultivada com dois ciclos anuais, definidos em função de um período de temperaturas mais baixas no qual há risco de geadas e polos de viticultura tropical onde é possível a realização de sucessivas podas, com até três ciclos vegetativos ao ano (MAPA, 2015).

Avaliando-se a área plantada com videiras é possível estimar a elaboração de vinhos no território brasileiro (SCHNEIDER, 2006). Na Tabela (1) estão listadas as principais regiões vitivinícolas do país. As regiões que merecem destaque são: Serra Gaúcha, Campanha e Serra do Sudeste do Rio Grande do Sul, Vale do Submédio do São Francisco (Pernambuco/Bahia), Vale do Rio do Peixe (Santa Catarina), região Sul de Santa Catarina, Leste e Noroeste de São Paulo, Norte e Sul de Minas Gerais, Norte e Leste do Paraná (IBRAVIN, 2015).

Tabela 1 – Área plantada de videiras no Brasil, em hectares

Estado/Ano	2007	2008	2009	2010
Pernambuco	7.137	7.083	7.104	8.801
Bahia	4.096	4.376	3.724	3.273
Minas Gerais	878	911	854	853
São Paulo	11.639	10.770	9.750	9.750
Paraná	5.700	5.800	5.800	5.800
Santa Catarina	4.915	4.836	4.937	5.052
Rio Grande do Sul	48.428	49.819	50.415	50.389
Brasil	84.220	83.552	82.584	83.718

Fonte: Adaptado: Mello (2015)

A variabilidade, tanto de climas quanto de solos, no Brasil, proporciona a obtenção de produtos com características diferenciadas, aptas a agradar os diferentes consumidores (GUERRA *et al.*, 2009; PÖTTER, 2009).

Dessa forma, o Brasil é considerado uma das melhores regiões no mundo para o cultivo de uvas destinadas a produção de vinhos e espumantes. O Brasil exporta vinhos para 22 países, dentre os principais destaca-se Estados Unidos, Alemanha, Inglaterra e República Tcheca (IBRAVIN, 2015).

3.1.1 Viticultura no Vale da Uva Goethe em Urussanga

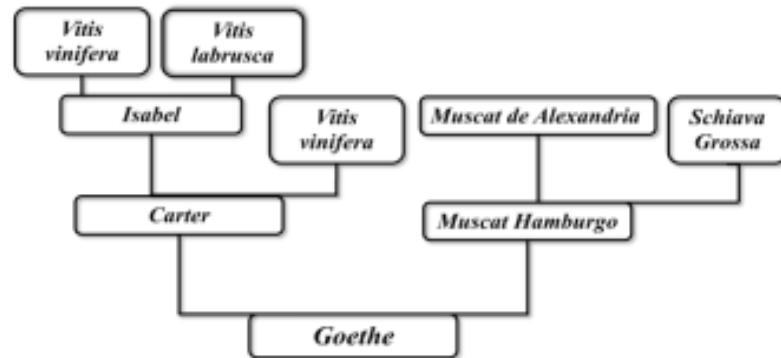
Em Santa Catarina, dentre as regiões vitivinícolas tradicionais, destaca-se a região Carbonífera do Sul do Estado, formada pelos municípios de Urussanga, Pedras Grandes, Braço do Norte, Nova Veneza e Morro da Fumaça. Essa região se distingue por apresentar uma uva característica, chamada Goethe, que possui qualidades próprias que diferenciam seu vinho das demais variedades cultivadas no Brasil. Na região são produzidas aproximadamente 600 toneladas/ano da variedade Goethe em 88,4 hectares de vinhedos, distribuídos em 58 propriedades rurais (VELLOSO, 2008).

Essa região caracteriza-se pelo clima subtropical úmido, com verões secos e sem estação seca, o inverno é frio e úmido com geadas ocasionais. A altitude média é de 49 metros acima do nível do mar, apresenta terrenos com uma topografia acidentada com paisagem predominante (VELLOSO, 2008).

A região de Urussanga foi colonizada por imigrantes italianos, que trouxeram como bagagem uma forte tradição vitivinícola. Deste modo, tanto a produção como o consumo de vinho tornou-se um hábito comum no cotidiano de seus habitantes. Desmembrando a história, pode-se observar a tradição e a cultura do povo dessa região, existindo certa notoriedade em seus vinhos brancos elaborados com a uva Goethe. Essa variedade de uva possui características singulares e ótima adaptação às condições locais, o que confere um fator diferencial aos vinhos produzidos (VELLOSO, 2008).

A denominação Goethe tem origem no nome de Johann Wolfgang Von Goethe, poeta e romancista alemão e grande apreciador de vinhos. Também conhecida como Roger's 1, essa variedade foi criada por Edward Stanniford Roger nos Estados Unidos a partir do cruzamento das variedades Muscat Hamburgo (*Vitis vinifera*) e Carter, uma variedade híbrida de Isabel (MARIOT, 2003) (Figura 1).

Figura 1 – Origem genealógica da variedade de uva Goethe



Fonte: Adaptado de Mariot, (2003)

A uva Goethe pode ser caracterizada por apresentar cachos pequenos, bagas grandes, coloração inicialmente branca, tornando-se rosada à medida que amadurece (Figura 2). A casca possui pouca espessura, o que reduz o acúmulo de compostos como polifenóis (SARTOR, 2009).

Figura 2 – Uva Goethe



Fonte: Sartor (2009)

A produção de vinhos utiliza o nome geográfico das zonas de produção como um sinal de qualidade para vinhos de maior reputação desde a antiguidade. A vitivinicultura mundial reconhece centenas de Indicações Geográficas (IG), como patrimônio coletivo das regiões e países que as consolidaram. O Brasil está inserindo-se nesse contexto e já possui alguns produtos com Indicação Geográfica registrada e outros com o processo em andamento. Isso resulta em um aumento da qualidade dos produtos, agregando valor e aumentando a competitividade no mercado nacional e mundial (TONIETTO, 2002).

O registo de Indicação Geográfica estabelece uma ligação entre a qualidade e o território, ou seja, a qualidade diferenciada de um determinado produto a qual não pode ser encontrada em produtos equivalentes provenientes de outros locais. Os vinhos foram os primeiros produtos a obter esse tipo de registo, visto que possuem grande influência de fatores edafo-climáticos da região na qual é produzido. Além desses fatores, a qualidade do vinho também é influenciada pelo fator humano. Dessa, a Indicação Geográfica além de valorizar as particularidades do produto (vinho), valoriza o território no qual é produzido (VELLOSO, 2008).

Em diversos países a Indicação Geográfica é um elemento essencial na distinção, identificação e valorização dos produtos. A PROGOETHE (Associação de Produtores da Uva e do Vinho Goethe da Região de Urussanga) surgiu com o objetivo de buscar a diferenciação e valorização dos vinhos Goethe, produzidos na região de Urussanga no Sul do Estado de Santa Catarina como um produto nobre, de valor agregado, que possa promover a geração de renda e o desenvolvimento regional. “Vales da Uva Goethe” foi o nome escolhido pelos membros da associação para a obtenção do registo de Indicação Geográfica (IG) (VELLOSO, 2008).

Devido às características singulares dos vinhos produzidos nesta Região, a uva e o vinho Goethe receberam em Fevereiro de 2012 o registo de Indicação Geográfica (IG) tornando-se a primeira IG do Estado de Santa Catarina. O reconhecimento e o registo de uma Indicação Geográfica junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) é o primeiro passo para futuramente a obtenção de uma Denominação de Origem (DO). A IG consiste em selo concedido aos vinhos com origem nos “Vales da Uva Goethe”, que além de sua qualidade, relaciona características históricas e culturais que os diferenciam dos demais (PROGOETHE, 2015).

Com a qualidade, tipicidade e identidade comprovadas, os vinhos Goethe são reconhecidos como verdadeiros *terroirs* devido uma estreita relação com as condições específicas de clima-solos. Além disso, a produção dos vinhos Goethe está fortemente ligada à imigração italiana do século XIX, com importância cultural para a Região.

3.2 PROCESSO DE ELABORAÇÃO DE VINHOS

A palavra vinho é originada de *Vitis*, que em latim é o nome científico de videira. O vinho é uma bebida obtida através de fermentação alcoólica de mosto de uva, devendo essa ser fresca, sadia e madura, o que resulta em uma bebida com uma graduação alcoólica de 8,6% a 14% em volume (IBRAVIN, 2015). O vinho era a única bebida considerada de fácil

armazenamento e saudável até os primeiros anos do século XVII. Atualmente, o vinho é sinônimo de cultura, de complemento alimentar e é considerado como um estilo de vida em algumas sociedades. Devido a estes fatos, o vinho desempenha um papel importante na economia de muitos países (PRETORIUS, 2000). Ao observarmos os primórdios da vinificação, embora diferentes técnicas tenham sido inovadas na produção de variados estilos de vinhos, os princípios básicos continuam praticamente os mesmos (PRETORIUS, 2000), da mesma forma, a utilização de agentes biológicos da vinificação, conhecidos como leveduras (MENEGOTTO, 2010).

As leveduras são fundamentais e predominantes no antigo e complexo processo de vinificação. O principal papel das leveduras utilizadas na vinificação é acelerar a conversão rápida, completa e eficiente dos açúcares da uva em etanol, dióxido de carbono (CO₂) e metabólitos menores (PRETORIUS, 2000).

A matéria-prima principal na indústria vinícola é a uva, a partir dela é que se obtém o mosto para a posterior elaboração do vinho. A composição das uvas tem grande influência na caracterização do produto final, no caso, o vinho. Essa caracterização se dá por meio do seu teor de açúcares, para a utilização na fermentação, pelo teor de nitrogênio, potássio, acidez, aromas vegetativos e seu estado sanitário (ZOECKLEIN *et al.*, 2001).

O vinho é um produto bastante complexo, sendo elaborado a partir do mosto de uvas fermentado por leveduras e bactérias que estão presentes na uva e que persistem durante todo o processo fermentativo. Dessa forma, a cultivar da uva, bem como as práticas de cultivo fornecem as bases do sabor do vinho, devido aos impactos que os micro-organismos presentes nas bagas das uvas acarretam na individualidade e sutileza do produto final (FLEET, 2003).

As principais substâncias encontradas no vinho após a fermentação do mosto são açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, sais de ácidos minerais e orgânicos, compostos fenólicos, substâncias nitrogenadas, pectinas, mucilagens, gomas, compostos voláteis e aromáticos, vitaminas e anidrido sulfuroso, e dentre os principais açúcares encontrados na uva são D-glicose e D-frutose, apresentando proporções praticamente iguais durante a fase de maturação (AQUARONE, 2005).

Louis Pasteur, em 1863, revelou ao mundo a atividade microbiana, até então desconhecida, demonstrando que o principal catalisador na fermentação do mosto da uva são as leveduras. Devido ao conhecimento adquirido, os produtores desta bebida puderam iniciar o controle do processo ainda na videira e acompanhá-lo até o momento de seu engarrafamento (PRETORIUS, 2000).

Os micro-organismos possuem papel fundamental na determinação da composição química do vinho, devido a sua influência na qualidade da uva antes e durante a colheita, e principalmente, durante a fermentação (FLEET, 2003).

A fermentação de mostos de uvas para a produção de vinhos de qualidade envolve um complexo processo de seleção bioquímica (PRETORIUS, 2000). Entre os micro-organismos encontrados, as leveduras tem ação dominante sobre o processo, devido ao seu papel na condução da fermentação alcoólica (FLEET, 2003).

As bagas das uvas são compostas por uma variedade grande de espécies de leveduras, essas variam de acordo com a cultivar, posição geográfica, clima, práticas culturais e estágio de maturação das mesmas. Uvas que se encontram maduras podem apresentar uma concentração de leveduras que vão de 10^4 a 10^6 células/cm² (FLEET *et al.*, 2002).

3.3 LEVEDURAS UTILIZADAS NA ELABORAÇÃO DE VINHOS

Muitos gêneros e espécies de leveduras são encontrados no mosto, no entanto, a principal espécie é a *Saccharomyces cerevisiae* (QUEROL *et al.*, 2003). Possuindo esta a capacidade de transformar totalmente os açúcares da uva em álcool etílico e outros compostos como glicerol e ácidos voláteis (MENEGOTTO, 2010).

A transformação do mosto de uva em vinho por fermentação é resultado da ação combinada de diversos gêneros e espécies (CLAVIJO; CALDERÓN; PANEQUE, 2010). As espécies *Saccharomyces cerevisiae* álcool-tolerantes dominam o estágio intermediário e final da fermentação vínica. Entretanto, no início do processo gêneros como *Pichia*, *Candida* e *Hanseniaspora* são as mais encontradas (CLAVIJO; CALDERÓN; PANEQUE., 2010; SANGORRIN *et al.*, 2007).

Inicialmente, todos os vinhos são elaborados com a utilização da microflora natural para que ocorra uma fermentação espontânea, sem a inoculação dita artificial, para iniciar o processo. Várias leveduras que se encontram na superfície da baga da uva participam da fermentação espontânea, sendo elas do gênero *Kloeckera*, *Hanseniaspora* e *Candida* que predominam nas fases iniciais, seguidas por espécies como *Metschnikowia* e *Pichia* que predominam nos estágios intermediários, quando a concentração de etanol está em 3-4%. Sendo as fases finais da fermentação espontânea dominadas pelas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* álcool-tolerantes (PRETORIUS, 2000).

Para que as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* se sobreponham à população microbiana, elas devem exibir características fisiológicas e enológicas que permitam a

superação de condições de estresse provocadas pela exaustão gradativa de glicose, aumento gradativo de etanol, baixo pH, quantidade limitada de nitrogênio e condições anaeróbicas (PARAPOULLI *et al.*, 2010). Essa competição entre micro-organismos pode, inclusive, ocorrer entre linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o que pode impedir o desenvolvimento de algumas destas. Nesse caso, a qualidade do produto final pode ser comprometida se a linhagem inibida tiver sido a inoculada (SILVA, 2003).

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, que possuem formas esféricas ou ovais e estão amplamente distribuídas na natureza, comumente encontradas cobrindo folhas e frutos. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 3) pertence ao filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae, sendo sua multiplicação através de brotamento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

Figura 3 – *Saccharomyces cerevisiae*. A) Aspectos macroscópicos da cultura; B) Micrografia eletrônica de varredura do estágio de reprodução assexuada por brotamento; C) Estrutura celular.



Fonte: Disponível em www.kent.ac.uk/bio/ (University of Kent Biosciences).

3.3.1 Utilização de leveduras selecionadas na elaboração de vinhos

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas facilitam o controle da fermentação, diminuindo as diferenças na qualidade do vinho de uma safra para outra (SILVA; SILVA, 1987). No entanto, algumas características somente são obtidas a partir da presença de outros gêneros e espécies, dessa forma, o uso exclusivo de leveduras selecionadas pode não permitir que traços de substâncias desejáveis sejam formados (CAPECE *et al.*, 2010). Isso se dá pelo fato de as demais leveduras presentes na microflora da uva serem capazes de produzir altas concentrações de compostos voláteis como álcoois superiores, ésteres de ácidos e compostos de carbono conhecidos como produtos secundários da fermentação, os quais contribuem grandemente para a qualidade sensorial do vinho (MAMEDE; PASTORE, 2004;

MARO; ERCOLINI; COPPOLA 2007). As vinícolas modernas usam leveduras selecionadas uma vez que se conhecem suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e enológicas (SILVA; SILVA, 1987).

A seleção de uma linhagem autóctone traz vantagens adicionais, pois leveduras nativas associadas com variedades de uva específicas e áreas geográficas específicas podem conferir ao vinho produzido uma característica regional, refletindo a biodiversidade da área produtora (PARAPOULLI *et al.*, 2010).

Ainda, a associação de mosto de uva e leveduras da mesma região faz com que o consumidor tenha uma imagem positiva, promovendo dessa forma, benefícios econômicos ao vinicultor (CAPECE *et al.*, 2010). Portanto, leveduras autóctones selecionadas e adequadas colaboram no processo de padronização e diferenciação do produto final (SILVA, 2003).

Diversos estudos têm sido feitos com leveduras selecionadas. Agnolucci *et al.* (2007) procuraram caracterizá-las genética e fenotipicamente pela realização de testes como a produção de fator killer, capacidade de fermentação, produção de sulfeto de hidrogênio e atividade proteolítica. Um melhor entendimento de linhagens específicas isoladas do mosto de uva é necessário para aperfeiçoar o processo de fermentação vínica, no que diz respeito à qualidade.

3.3.1.1 Bioquímica da fermentação alcoólica

A fermentação é definida como o processo bioquímico no qual o receptor final de elétrons é um composto orgânico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). A transformação do açúcar em etanol envolve, no mínimo, 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular, sendo, dessa forma nessa região da célula que a fermentação alcoólica ocorre. As enzimas glicolíticas sofrem ação de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura, entre outros), uns estimulam, outros reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho da levedura. Os produtos finais da degradação do açúcar dependem das condições ambientais em que a levedura se encontra (LIMA, 2001). O sucesso da fermentação vínica depende da viabilidade das leveduras, as quais fermentam glicose e frutose, resultando na formação majoritária dos metabólitos etanol e gás carbônico (SILVA, 2003; GUIMARÃES, 2005).

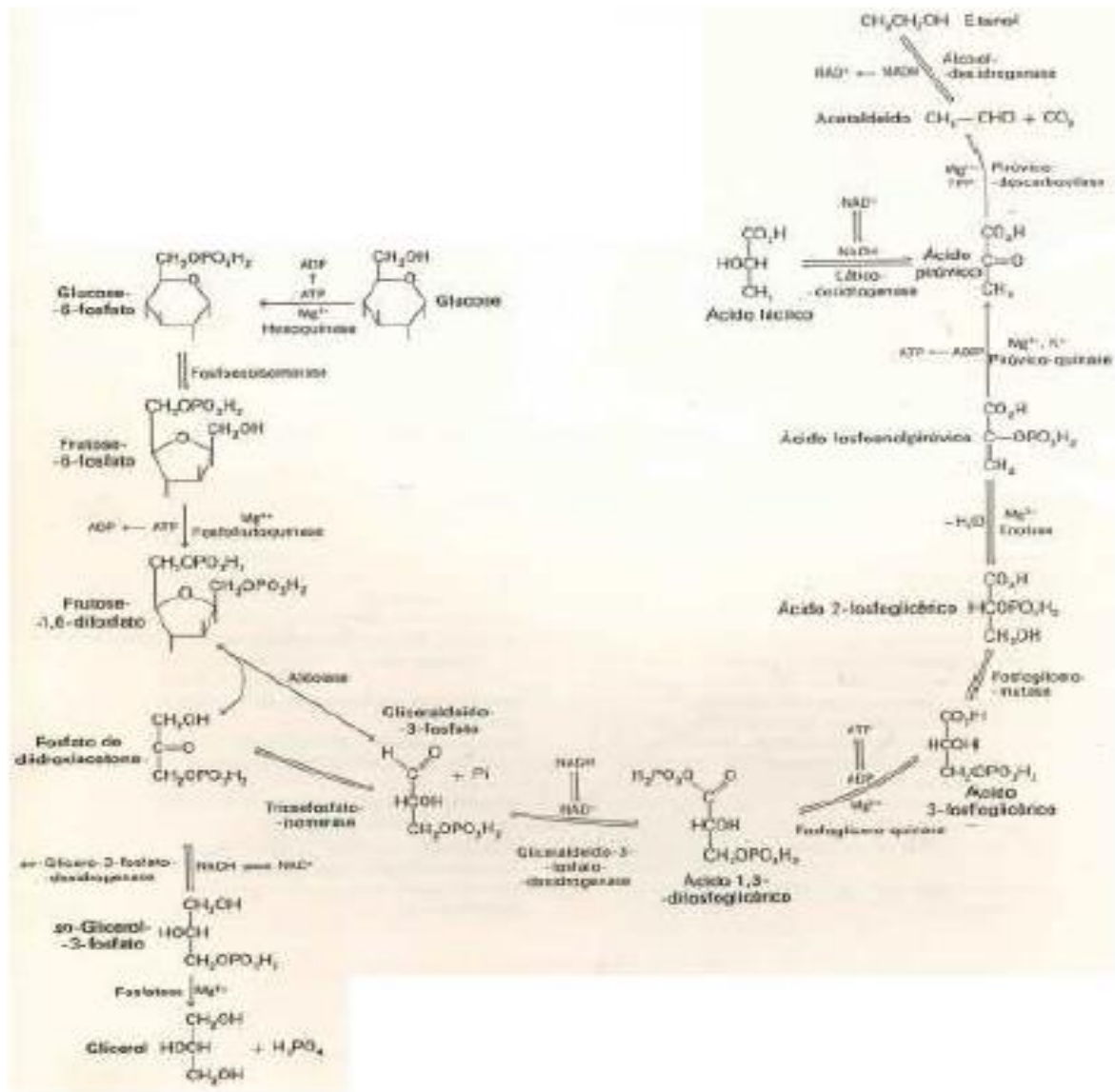
A maioria dos micro-organismos oxida carboidratos como sua fonte primária de energia celular, sendo a glicose a principal fonte de energia utilizada pelas células. Vários micro-

organismos possuem capacidade de fermentar diversos substratos, no entanto, o produto final irá depender do micro-organismo utilizado, do substrato e das enzimas presentes e ativas.

O catabolismo das leveduras é realizado, principalmente, através da glicólise (Figura 4). Envolve uma sequência de, no mínimo, doze reações químicas. Como resultado deste conjunto de reações, cada molécula de hexose gera duas de piruvato, quatro de ATP e uma de NADH, mas como duas moléculas de ATP são consumidas no processo preparativo, o ganho energético líquido por hexose consumida é de duas moléculas de ATP. O piruvato produzido pode ser utilizado em diferentes caminhos metabólicos, entretanto, as leveduras devem regenerar NAD^+ a partir do NADH^+H^+ para restabelecer o potencial oxi-redutor do citoplasma propício ao início de um novo processo glicolítico, o que pode ser feito pela redução do etanal ou do diidroxiacetona-3-fosfato. No primeiro caso, há formação de etanol e no segundo, produção de Sn-glicerol-3-fosfato, via esta necessária para a síntese de glicerol (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2008).

Um dos grupos de micro-organismos que realizam o processo de fermentação alcoólica são as leveduras, especialmente as do gênero *Saccharomyces*. Seu principal objetivo é o de metabolizar o açúcar e gerar energia química – ATP para posterior realização de trabalhos fisiológicos e biossintéticos necessários à manutenção celular e o crescimento (PASCHOALINI; ALCARDE, 2011). O etanol e o CO_2 resultantes se constituem em produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula que está em anaerobiose e, devido a isto, são excretados (LIMA, BASSO E AMORIM, 2001). Em condições especiais, o etanol, entre outros produtos de excreção, pode ser oxidado metabolicamente.

Figura 4 – Diagrama da Glicólise



Fonte: CONN *et. al* (1980)

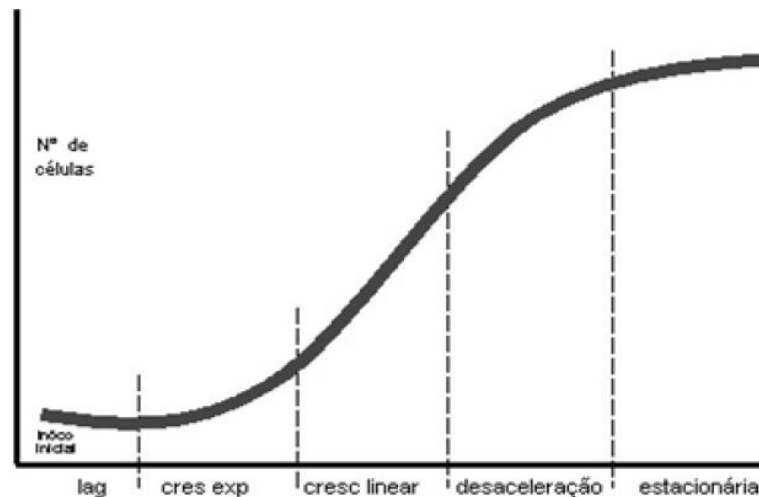
3.3.1.2 Fases do processo de fermentação alcoólica

O mosto de uva é praticamente completo em se tratando de nutrientes, no entanto, permite a sobrevivência de apenas um número limitado de espécies microbianas. O baixo pH e o elevado teor de açúcares exerce uma forte pressão seletiva sobre os micro-organismos, levando a sobrevivência e proliferação de apenas algumas espécies de bactérias e fungos. Esta seletividade aumenta gradativamente devido ao estabelecimento das condições de anaerobiose durante a fermentação, onde nutrientes se esgotam e os níveis de etanol sofrem um aumento, eliminando assim espécies microbianas sensíveis a presença de álcool (PRETORIUS, 2000).

O processo industrial de fermentação alcoólica é dividido em três fases: fermentação preliminar ou pré-fermentação, fermentação principal ou tumultuosa e fermentação complementar ou lenta. A fermentação preliminar se inicia com a inoculação de leveduras ao mosto e é caracterizado pela multiplicação das mesmas, com o consequente consumo de açúcares e uma baixa produção alcoólica. Portanto, deve-se utilizar uma quantidade maior de leveduras de rápida multiplicação, visto que o processo de produção de álcool requer alta produtividade. Ocorrendo o aumento da produção de álcool, que é evidenciado pela produção de gás carbônico, obtém-se o final desta fase e o início da fase de fermentação principal ou tumultuosa. Esta fase da fermentação acaba quando ocorre a diminuição da liberação de gás. E na pós-fermentação verifica-se a diminuição da temperatura do vinho, a elevação da acidez e a diminuição da atividade de fermentação da levedura pela ação do acúmulo de determinadas substâncias, do esgotamento dos carboidratos e das toxinas dos contaminantes (ALCARDE, [200--]).

Silva *et al* (2005) descreveu a existência de distintas fases durante o processo e evolução de CO₂ no mosto em processo de fermentação. Estas fases compreendem: Fase *lag*, Fase *log* ou crescimento exponencial, Fase estacionária e Fase de declínio ou Morte Celular (Figura 5).

Figura 5 –Fases de crescimento das células de leveduras



Fonte: www.ebah.com.br

A fase *lag* ocorre quando o número de células não possui muita variação, pois não ocorre proliferação celular imediatamente após o contato com o novo meio de cultivo e o período de adaptação pode ter duração de horas ou dias. Durante esta fase ocorre um período de latência com intensa atividade metabólica, principalmente síntese de DNA e enzimas. Quando as células iniciam o processo de divisão entrando no processo de crescimento ou aumento logarítmico é

a denominada Fase *log* ou exponencial. Esta fase se caracteriza pela multiplicação das células em velocidade máxima e constante. O período de equilíbrio celular é denominado de Fase estacionária e é onde a velocidade de crescimento diminui e o número de células mortas é equivalente ao número de células novas, tornando a população celular estável. Em determinado momento a população microbiana entra na fase de morte celular ou declínio, devido ao fato do número de células mortas exceder o número de células novas (PERES; CURI, 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

E para leveduras, Aquarone *et al.* (2001) reportam que a fase *lag* se dá no momento em que a levedura entra em contato com o mosto, ocorrendo, além das características acima citadas, uma pequena elevação da temperatura e despreendimento de pequenas quantidades de CO₂, além da produção de grande quantidade de células com um forte poder fermentativo. Já na fase exponencial, ele cita que ocorre um grande despreendimento de CO₂ devido a grande quantidade de células para desdobrar os açúcares fermentescíveis do mosto, ocorrendo também a elevação rápida da temperatura e a elevação da percentagem de álcool e acidez.

3.4 SELEÇÃO DE LEVEDURAS

Para a elaboração de vinhos de qualidade, um dos fatores mais importantes é a utilização de leveduras previamente selecionadas. Uma boa seleção de levedura é de extrema importância, pois garante a elaboração de um produto com alto padrão de qualidade. O setor vitivinícola entende a necessidade da utilização de leveduras selecionadas para a obtenção de um produto final de qualidade. Algumas empresas deste setor brasileiras utilizam leveduras importadas, podendo estas leveduras não apresentar qualidade adequada, como produção de H₂S, gerando dessa forma, um produto com odor desagradável (SILVA *et al.*, 2012).

Leveduras isoladas e selecionadas a partir da microflora local, onde serão utilizadas, apresentam maior probabilidade de resultados superiores quando comparadas a leveduras isoladas de outras regiões. Leveduras autóctones apresentam vantagens como, fermentação completa e regular, maior produção de etanol, controle de acidez volátil, clarificação rápida do vinho e melhoria da sua estabilidade biológica, fatores estes que estão aliados a uma boa adaptação ao clima e a práticas de cultivo da região em questão (SILVA, 2008). Um dos fatores primordiais para a elaboração de vinhos de qualidade, com um bom rendimento e velocidade no processo de fermentação é a linhagem que é selecionada para tal fim (SILVA, 1987).

Estabelecer propriedades enológicas feitas através de critérios de seleção estabelecidos é essencial, esses critérios podem ser divididos em favoráveis (tolerância ao etanol, bom

rendimento na transformação dos açúcares em etanol, capacidade de crescer em altas concentrações de açúcares) e desfavoráveis (produção de sulfeto de hidrogênio, produção de espuma e acidez volátil) (ESTEVE-ZARZOZO *et al.*, 2000; GUIMARÃES, 2005).

No território brasileiro, o emprego de leveduras selecionadas no processo de elaboração de vinhos constitui um dos fatores primordiais para a melhoria da qualidade do produto. Dessa forma, a colocação no mercado nacional de leveduras autóctones selecionadas representa certamente uma melhoria na qualidade do vinho brasileiro (SILVA, 1987).

3.4.1 Critérios básicos visando a seleção de leveduras vínicas

A necessidade de produtos de alta qualidade exigidos pelas práticas modernas e por um mercado cada vez mais exigente, faz com que se procure por linhagens de leveduras especializadas que possuam uma ampla gama de características necessárias para a melhoria das propriedades enológicas (PRETORIUS, 2000). As propriedades enológicas mais importantes que devem estar presentes em uma levedura vínica estão, o completo e rápido consumo de açúcar do mosto com contínua transformação destes açúcares em etanol, a não produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), a alta capacidade de floculação principalmente ao final da fermentação, a alta tolerância ao dióxido de enxofre (SO₂) e ao etanol e a resistência a altas pressões osmóticas, capacidade da cepa em degradar substâncias pécticas (GUIMARÃES, 2005), além da não formação de película e anel (Tabela 2).

Tabela 2 – Características desejáveis em leveduras do vinho

PROPRIEDADES FERMENTATIVAS	PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS
Início rápido da fermentação	Alta estabilidade genética
Alta eficiência da fermentação	Alta tolerância ao sulfeto
Alta tolerância ao etanol	Baixa atividade de ligação sulfeto
Alta osmotolerância	Baixa formação de espuma
Baixa temperatura	Propriedades de floculação
Produção moderada de biomassa	Sedimentos compactos
CARACTERÍSTICAS DE SABOR	Resistência à dessecação
Baixa formação de sulfeto	Propriedade killer
Baixa produção de acidez volátil	Marcação genética
Alta produção de álcool	Atividade proteolítica

Liberação dos precursores de aromas	Baixa demanda de nitrogênio	
Alta produção de glicerol	PROPRIEDADES METABÓLICAS COM IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE	
Atividade hidrolítica		Baixa formação de sulfito
Autólise aprimorada		Baixa formação de aminas biogênicas
Atividade esterase atenuada	Carbamato de baixo potencial de etilo (ureia)	

Fonte: Tradução do autor (2015) de PRETORIUS (2000).

Uma das mais conhecidas e importantes leveduras vínicas no mercado é a *Saccharomyces cerevisiae*. Tanto que tecnologistas do vinho definem as qualidades requeridas para a definição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como “iniciadora seletiva para elaboração de vinho” em duas categorias: primárias, àquelas estruturalmente associadas à formação do etanol pela fermentação; e secundárias, àquelas relacionadas à produção de compostos que afetam outros parâmetros como o corpo do vinho, o buquê e o aparecimento de sabores desagradáveis. Convencionalmente, as condições primárias envolvem o alto vigor fermentativo, ou seja, a alta concentração de etanol obtida a partir de grandes quantidades de açúcares; a alta pureza fermentativa, que expressa a relação entre a acidez volátil (em g de ácido acético/l) e etanol (% volume) ao final do processo fermentativo e a alta taxa fermentativa, a qual mede a capacidade de uma levedura em completar rapidamente o processo fermentativo. Esta é representada em gramas de gás carbônico desenvolvidas no período de 24 horas, calculadas como a média medições em 3 dias consecutivos. As condições secundárias afetam outro nível de qualidade do vinho, ou seja, as características organolépticas, as quais são mais difíceis de serem representadas em termos analíticos devido ao fato de que resultam das interações de inúmeros sub-produtos da fermentação primária (MARTINI, 2003).

3.4.1.1 Velocidade de fermentação

A principal atividade de leveduras é a fermentação alcoólica, a velocidade de consumo de açúcar é um fator importante devido ao mosto utilizado para a vinificação não ser esterilizado e, dessa forma, a levedura selecionada terá que competir com as leveduras nativas que estão

presentes, com isso, quanto mais rápido a levedura selecionada iniciar a degradação do açúcar, maior será a chance de se sobressair perante as demais.

A fermentação alcoólica em vinhos é constituída por diversas etapas. Dentre elas, estão a complexidade da atuação e a interação microbiana. No processo inicial da fermentação alcoólica, as espécies que predominam no mosto são as que possuem um baixo poder fermentativo, como *Candida sp.*, *Hanseniaspora sp.*, *Pichia sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Kluyveromyces sp.*. Após esta etapa, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizada pelo seu alto poder fermentativo, domina e completa a fermentação do mosto (FLEET, 2003). O resultado da fermentação espontânea depende não apenas do número e diversidade de leveduras presentes no mosto, mas também da química da uva e do protocolo de processamento, o que torna essa combinação difícil de se prever (PRETORIUS, 2000).

A espécie utilizada tem grande influência neste processo e as suas características devem ser severamente analisadas. Existem algumas leveduras que possuem um gene ativo nas células que inicia floculação, no entanto, a floculação pode ter outras causas, como fatores ambientais, pH, temperatura e contaminação por bactérias e ainda a idade das células das leveduras (NASCIMENTO, 2012).

Dessa forma, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são de extrema importância na elaboração de vinhos, sendo interessante selecionar estas leveduras com alta capacidade fermentativa, uma vez que, segundo Silva *et al.* (2007), retardos no processo fermentativo em geral são acompanhados pela ação de outros micro-organismos contaminantes mais resistentes, em geral bactérias que comprometem a qualidade do produto final gerando prejuízos econômicos. A utilização de leveduras não selecionadas implica na descaracterização qualitativa do vinho, uma vez que pode ocorrer flutuação desde momento inicial até o término do processo fermentativo.

3.4.1.2 Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H_2S)

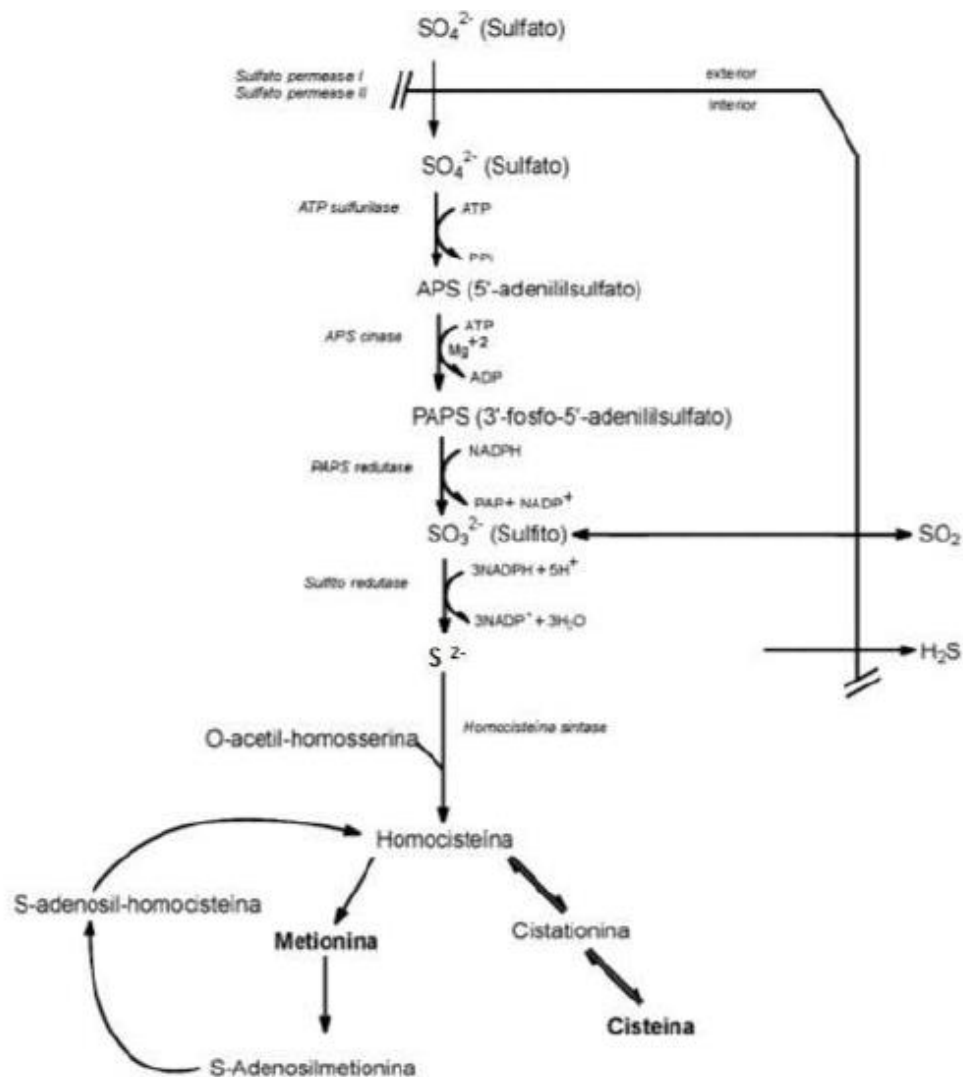
O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é um poderoso composto produzido por leveduras durante a fermentação e é um fenômeno muito comum. Sua ocorrência em vinhos e em outras bebidas fermentadas tem sido associado a odores desagradáveis como ovo podre e esgoto (UGLIANO; KOLOUCHOVA; HENSCHKE, 2011). Em processos fermentativos, leveduras podem acumular H_2S , SO_2 e mercaptanos. Avaliando 600 linhagens de leveduras autóctones isoladas de Bedriãna; Simón; Valles (2010) verificaram que seis linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* eram produtoras de H_2S , 43 não produziram o gás e as demais linhagens apresentaram produção

moderada, são diversos os motivos que levam à formação de sulfeto de hidrogênio. Em fermentações de mosto para a elaboração de vinho, mesmo inoculado com leveduras selecionadas, foi detectada a evolução de H₂S durante a fase de fermentação, existem no mercado diferentes métodos analíticos para a medição do sulfeto de hidrogênio produzido durante a fermentação, dentre eles, nitrato de prata, acetato de chumbo e cloreto de mercúrio. Esses métodos de detecção foram estudados por Ugliano & Henschke (2010), ambos os métodos exibiram resultados satisfatórios, porém, o tubo com cloreto de mercúrio sofreu interferências devido à presença simultânea de mercaptanos, o que resultou em uma errônea quantificação do H₂S produzido (UGLIANO; HENSCHKE, 2010). E nos últimos anos, há um crescente aumento no interesse por leveduras fermentadoras de vinho que apresentem uma menor produção de sulfitos e sulfeto de hidrogênio. A ausência de compostos orgânicos sulfurados, como cisteína, metionina, glutatona e S-adenosil metionina, obriga as leveduras a sintetizá-los a partir da redução de enxofre inorgânico (SWIEGERS *et al.*, 2005). Dessa forma, sulfitos e H₂S são produzidos durante a biossíntese de aminoácidos sulfurados, como metionina e cisteína. Todos os micro-organismos para a biossíntese de aminoácidos sulfurados requerem uma capacidade de acumulação de átomos de enxofre a partir do meio de crescimento e, em seguida, a transformação desses átomos em sulfeto (THOMAS; SURDIN-KERJAN, 1997). A concentração de H₂S formada depende da disponibilidade de compostos orgânicos sulfurados, da linhagem da levedura, das condições do processo fermentativo, da atividade enzimática e da composição do meio de cultivo (JIRANEK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995). Além disso, leveduras podem formar maior concentração de sulfeto de hidrogênio quando as concentrações de nitrogênio prontamente assimilável e de sais de diamônio fosfato também aumentam (UGLIANO *et al.*, 2009). *Saccharomyces cerevisiae* também pode degradar aminoácidos contendo enxofre para a utilização do hidrogênio livre, resultando na liberação de H₂S e outros compostos de enxofre voláteis como subprodutos. No entanto, a concentração de aminoácidos contendo enxofre no mosto da uva não é considerável para ser responsabilizado pelos altos níveis de sulfeto de hidrogênio observados ao final da fermentação, neste caso, a levedura é apenas indiretamente responsável pela formação de H₂S, que ocorre espontaneamente, como uma consequência das condições redutoras estabelecidas na fermentação anaeróbica em um baixo pH (LINDERHOLM *et al.*, 2008). Dessa forma, a produção de H₂S pelas leveduras envolve incorporação de sulfato (SO) na célula e sua redução (Figura 6). Alguns autores como (DE VERO; SOLIERI; GIUDICI, 2011) estudaram estratégias de seleção de cepas de leveduras que são deficientes na produção de sulfitos e sulfeto de hidrogênio, eles utilizaram molibdato e resistência a cromato como fenótipo selecionável para variantes deficientes em sulfato

permease, as quais não conseguem produzir sulfitos e nem sulfeto de hidrogênio. Dessa forma, possibilitou-se a seleção de leveduras com características enológicas melhoradas, visto que sulfeto de hidrogênio é um subproduto do metabolismo de algumas leveduras que é indesejável ao vinho.

Dessa forma, as leveduras utilizadas devem produzir baixos níveis de ácidos voláteis e de H_2S (MARTINS, HORII, PIZZIRANIKLEINER, 1998).

Figura 6 – Via de redução do sulfato em *Saccharomyces cerevisiae*



Fonte: NETO & MENDES-FERREIRA (2005).

3.4.1.3 Fator killer

A descoberta do fenômeno killer ocorreu quando, em 1963, Bevan e Makover observaram que durante o co-cultivo de diferentes linhagens de *Saccharomyces Cerevisiae*,

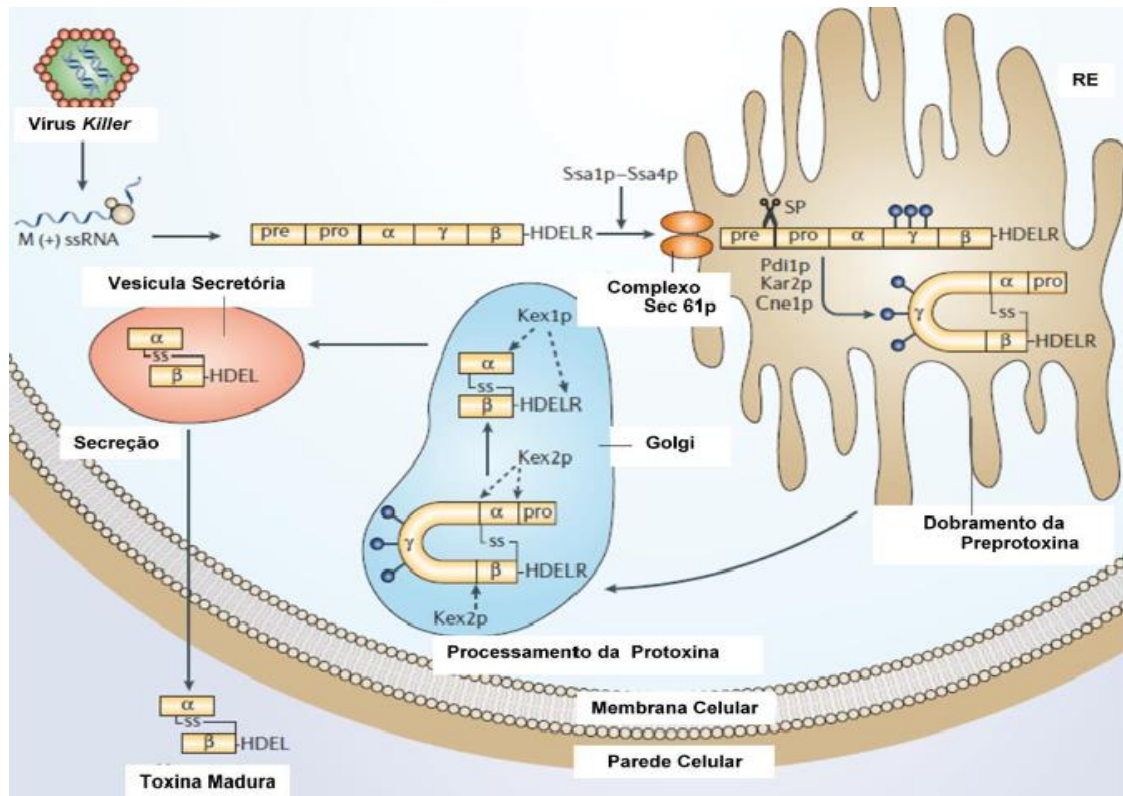
algumas leveduras eram mortas enquanto outras nada sofriam (BEVAN; MAKOVER, 1963). Esta diferença resultou na classificação das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* quanto ao fenótipo killer. As leveduras foram agrupadas por estes próprios autores em killer (K^+R^+), sensíveis (K^-R^-) ou neutras (K^-R^+). As leveduras killer matam as sensíveis, enquanto as neutras resistem ao ataque das killer e não atacam letalmente as sensíveis (WOODS; BEVAN, 1968; WICKNER, 1974; SILVA, 1996).

Com um grupo haploide de 16 cromossomos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi bem caracterizada tanto genética quanto fenotipicamente. O número aproximado de genes do seu genoma é de 6000, os quais têm um tamanho médio de 2 kb e poucos íntrons (GOFFEAU *et al.*, 1996). Algumas partes de ácido nucleico também compõem o genoma, como o DNA mitocondrial e os plasmídeos. O primeiro codifica componentes da maquinaria de tradução e proteínas da mitocôndria, enquanto o segundo encarrega-se de realizar sua própria replicação. Várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* contêm partículas semelhantes a vírus de RNA fita dupla (dsRNA) transmitido por herança não-mendeliana. Além dos componentes requeridos para a transcrição e replicação viral, esse dsRNA também codifica a chamada toxina killer (SHERMAN, 1991). Entretanto, não há apenas um, mas dois plasmídeos em linhagens killer. Um deles, o M dsRNA, carrega informação genética responsável tanto pela formação da toxina quanto da resistência a mesma. O outro segmento, o L-A dsRNA, codifica a síntese de seu próprio capsídeo proteico assim como o do M dsRNA (GEORGOPOULOS; LEIBOWITZ, 1987).

Dessa forma, para que a levedura seja portadora da atividade killer, deve conter os dois tipos de RNA. Se estiver presente apenas a forma L-A dsRNA, a levedura é considerada sensível (GEORGOPOULOS; LEIBOWITZ, 1987; SILVA, 2003).

A toxina killer pode se apresentar tanto na forma intracelular quanto extracelular (PFEIFFER; RADLER, 1984). Após a tradução do transcrito viral, é formada a preprotoxina killer (Figura 7). A preprotoxina contém um peptídeo líder N-terminal que direciona a proteína para o retículo endoplasmático. No lúmen deste compartimento celular ocorre a remoção desse peptídeo e o dobramento inicial da toxina (SCHMITT; BREINIG, 2006). A protoxina formada é processada no complexo de Golgi. A protease Kex2p cliva o peptídeo α -N-terminal e remove a sequência- γ glicosilada que separava a subunidade- α hidrofóbica da subunidade- β hidrofílica. Para finalizar o processo, a carboxipeptidase Kex1p cliva o α -C-terminal. A toxina heterodimérica madura é composta pelas subunidades α e β ligadas covalentemente uma a outra por pontes dissulfeto (BREINIG; TIPPER; SCHMITT, 2002; SCHMITT; BREINIG, 2006).

Figura 7 – Processamento e secreção da proteína killer



Fonte: Schmitt e Breinig (2006).

Alterações no processamento podem modificar o fenótipo de uma levedura, passando de killer para sensível. Um estudo utilizando a técnica de mutagênese sítio-dirigida mostrou que a peptidase-sinal, localizada no retículo endoplasmático, não é ativa quando há troca de uma glicina por um triptofano em seu sítio de clivagem. Como consequência, tem-se uma inibição da secreção da proteína e a formação do fenótipo sensível (RIFFER *et al.*, 2002). Dessa forma, a alteração em um gene pode modificar o fenótipo killer de uma levedura (SCHMITT; TIPPER, 1995).

O fenótipo killer varia de acordo com o meio, condições empregadas para o crescimento das leveduras e a linhagem utilizada (SILVA, 1996). Componentes tais como peptona e extrato de levedura, comumente encontrados em meio de crescimento celular estimulam a produção da proteína killer (WOODS; BEVAN, 1968). A presença de ADP também aumenta a produção deste fator (KOTANI; SHINMYIO; ENATSU, 1977).

A capacidade killer está presente em vários gêneros e espécies. Além da *Saccharomyces cerevisiae*, também é encontrada no *Williopsis mrakii*, *Kluyveromyces lactis*, *K. wickerhamii*, *K. phaffii*, *Hansenula anomala*, *Candida tropicalis*, *Ustilago maydis*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala* e *P. inositovora* (SILVA, 2003; POLI, 2009).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS VÍNICAS

A casca da uva madura contém uma grande variedade de espécies. A levedura *Hanseniaspora uvarum* é a espécie predominante, enquanto a *Saccharomyces cerevesiae* é encontrada em baixa quantidade (BELTRAN *et al.*, 2002). Outros gêneros também estão presentes, os quais se manifestam no estágio inicial da fermentação vínica. Entre eles, destacam-se: *Candida spp.*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces* e *Kluyveromyces* (CAPECE; SALZANO; ROMANO, 2003). Deste modo, faz-se necessário identificar as linhagens isoladas.

As primeiras técnicas de identificação de microrganismos baseavam-se nas características fisiológicas e morfológicas dos mesmos (KREGER-VAN RIJ, 1984; ESTEVE-ZARZOZO *et al.*, 1999; BARNETT, J.A.; PAYNE; YARROW, 1990). No entanto, estes métodos podem gerar resultados imprecisos por serem fortemente influenciados pelas condições de cultura do micro-organismo (YAMAMOTO *et al.*, 1991; GUILLAMÓN *et al.*, 1998; RATON, 2004).

Os métodos de identificação baseados em técnicas de biologia molecular têm sido empregados por diversos autores (CAPECE; SALZANO; ROMANO, 2003; SHI *et al.*, 2012; ROSCHUMILLAS *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010). Estas técnicas se baseiam na presença ou ausência de similaridades no DNA, RNA ou em proteínas. Entre os métodos utilizados destacam-se: hibridização DNA-DNA, cariótipo eletroforético, análise de microssatélite, análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente, análise de DNA mitocondrial por polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e análise de DNA cromossômico por RFLP (ESTEVE-ZARZOZO *et al.*, 1999).

A análise de DNA cromossômico por RFLP consiste na diferenciação de microrganismos por análise de fragmentos de DNA gerados pela clivagem de enzimas de restrição em sequências palindrômicas. A clivagem realizada pelas endonucleases resulta em fragmentos que variam de tamanho conforme a espécie do micro-organismo (RATON, 2004). Esta técnica tem sido bastante empregada para a detecção de muitas espécies de fungos e leveduras. Os fragmentos de escolha são, comumente, os que codificam o RNA ribossômico e os espaçadores que o compõem (FERNANDEZ-ESPINAR *et al.*, 2000). Guillamón *et al.* (1998) utilizou o método PCR-RFLP para a identificação de espécies de leveduras vínicas, os autores amplificaram a região ITS1 - 5,8S - ITS2 do rDNA com os iniciadores (primers) ITS1 e ITS4. O produto da reação de PCR, submetido ou não à ação de endonucleases de restrição,

foi separado em gel de agarose e visualizado com brometo de etídio. Deste modo, o estudo mostrou os perfis eletroforéticos de cada micro-organismo em 42 situações diferentes. Primeiramente, os autores analisaram o tamanho dos fragmentos do produto da reação de PCR. Em seguida, compararam os fragmentos formados após a ação das enzimas de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*.

3.5.1 Identificação através de PCR-RFLP

Uma técnica muito empregada na análise de DNA e RNA é o RFLP. Esta técnica compreende a quebra do DNA por enzimas de restrição em regiões com sequências de bases determinadas e a separação dos fragmentos resultantes se dá por eletroforese. Distintos perfis de bandas podem ser observados diretamente sob luz ultravioleta após coloração do gel com brometo de etídio.

A análise da restrição do DNA mitocondrial vem sendo muito utilizada em estudos de leveduras, pois gera um pequeno número de fragmentos, se comparado com o DNA genômico, conduzindo a eletroferogramas pouco complexos, e também, devido ao elevado polimorfismo dos perfis obtidos. No que diz respeito ao último aspecto, tem-se revelado muito útil na diferenciação de linhagens enológicas (CASAL; SCHULLER; PAIS, 2004).

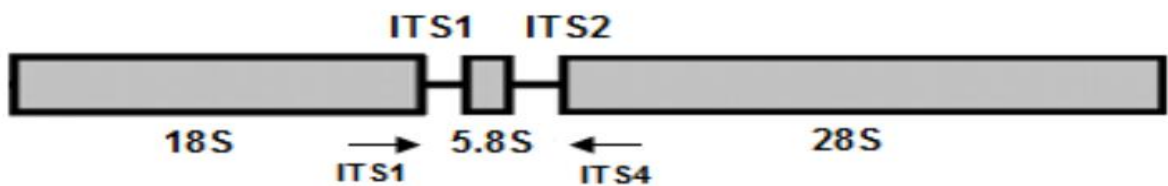
A técnica conhecida como PCR (*polimerase chain reaction*) é uma reação em cadeia da polimerase, ela constitui uma ferramenta básica para inúmeras metodologias de análise de DNA, se baseia na amplificação de determinados segmentos de DNA. O início do processo se dá com a desnaturação da molécula de DNA de dupla hélice por aplicação de uma elevada temperatura, após, ocorre o abaixamento da temperatura, dois oligonucleotídeos de cadeia simples, complementares às regiões flanqueadas do fragmento que se quer amplificar e que funcionam como *primers* (iniciadores), esses *primers* ligam-se a essas regiões, dando início à síntese de DNA através de uma enzima chamada DNA polimerase termoestável. Ciclos de desnaturação, de ligação de *primers* e de extensão dos mesmos via DNA polimerase são repetidos inúmeras vezes, resultando na amplificação do segmento alvo, uma das grandes vantagens da técnica é a possibilidade de utilização de pequenas quantidades de DNA para ser efetuada a análise, o qual também não necessita estar muito purificado. A amplificação pode ser efetuada a partir de células lisadas sem posterior extração ou purificação do DNA (CASAL; SCHULLER; PAIS, 2004; SILVA *et al.* 2012)

Ambas as técnicas, PCR e RFLP podem ser utilizadas em conjunto, dessa forma, o DNA é replicado pela PCR analisado pelo método de RFLP. As enzimas utilizadas para separação de

replicação do DNA são retiradas de isolados de bactérias da espécie *Thermus aquaticus*, cujo habitat é quente, esta característica faz-se importante, uma vez que as altas temperaturas ajudam na desnaturação do DNA (NASCIMENTO, 2012).

As regiões genômicas se encontram no cromossomo XII da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, este cromossomo contém cerca de 150 a 200 cópias *in tandem* codificando o DNA ribossomal e cada unidade de repetição é composta por suas regiões codificadoras. As regiões amplamente estudadas são a 18S, 5.8S e 28S, as quais são separadas por espaçadores (Figura 8) (WHITE, 1990). Estes compreendem dois espaçadores internos, ITS1 e ITS2 (*internal transcribed spacers*) e espaçadores externos, ETS1 e ETS2 (*external transcribed spacers*). A região 5.8S e ITS são amplamente utilizadas por exibirem grande variedade interespecífica e as regiões 18S e 28S são menos empregadas devido a dificuldade de manipulação de seus grandes fragmentos (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999).

Figura 8 – Localização da região ITS1 – 5.8S – ITS2 no rDNA nuclear



Fonte: Adaptado de White *et al.* (1990).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

A parte experimental do projeto foi realizada no Centro de Pesquisa Embrapa Uva e Vinho (CNPUV) (Figura 9), no Laboratório de Microbiologia e Fermentação, localizado em Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul- Brasil, sob supervisão do Dr. Gildo Almeida da Silva.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA foi criada no ano de 1973 e está vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), atualmente é constituída por 46 unidades de Pesquisa, 16 escritórios que vão de Norte a Sul do País e 17 unidades administrativas, estando presente em praticamente todos os Estados da Federação,

com as mais diferentes linhas de pesquisa. Atualmente conta com um quadro de 2.444 pesquisadores.

A Embrapa Uva e Vinho (CNPUV) possui um quadro de recursos humanos composto de 41 pesquisadores e estagiários, contando com uma infraestrutura física que inclui laboratórios, biblioteca, casas de vegetação, apoio administrativo e campos experimentais. Desenvolve atividades de pesquisa na área agropecuária, tendo como vista ser um centro de excelência mundial na geração de conhecimento, tecnologia e inovação para o setor vitivinícola, enológico e frutícola de clima temperado. A empresa também dispõe de estações experimentais de Fruticultura Temperada, em Vacaria-RS e de Viticultura Tropical em Jales-SP, desenvolvendo atividades de pesquisa com uva vinho, maçã e pera.

Figura 9 – Sede da Embrapa Uva e Vinho (CNPUV), município de Bento Gonçalves/RS.



Fonte: Embrapa Uva e Vinho

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

4.2.1 Coleta de amostras para isolamento de leveduras

Para o isolamento das leveduras foram coletados cachos de uva da cultivar Goethe Tradicional, cultivadas em vinhedos da Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) em Urussanga-SC, conhecido como Vale da Uva Goethe, no mês de Janeiro de 2015, as leveduras foram isoladas no dia 19/01/15.

Os cachos de uvas coletados foram acondicionados em sacos plásticos estéreis e transportados até o Laboratório de Microbiologia e Fermentação da Embrapa Uva e Vinho em Bento Gonçalves-RS. As bagas das uvas, acondicionadas em sacos plásticos (34cm x 23,5cm), foram cuidadosamente esmagadas com as mãos para a liberação do mosto, o qual foi utilizado como veículo para o isolamento das leveduras que estavam contidas sobre a película dos frutos.

4.2.2 Linhagem de levedura padrão de comparação

Como levedura padrão de comparação foi empregada a linhagem neutra *Saccharomyces cerevisiae* 1vvt/97, pertencente à Coleção de Leveduras do Laboratório de Microbiologia e Fermentação da Embrapa Uva e Vinho, a qual foi isolada a partir do mosto de uvas tintas cultivadas na região do Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves-RS, por Silva em 1997 (SILVA, 2005a). A outra linhagem padrão utilizada foi a linhagem comercial de *Saccharomyces Cerevisiae* K1, adquirida da empresa Lallemand, Canadá.

4.2.3 Linhagens de leveduras killer e sensível

Foram utilizadas duas linhagens killer da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, denominadas Embrapa 91B (K^+R^+), denominada killer resistente e Embrapa 1B (K^+R^w), denominada killer suicida, caracterizadas por Silva (1996), além de uma linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae* K1 (K^+R^+), adquirida da empresa Lallemand, Canadá. Como linhagem sensível, foi empregada uma suspensão de células com concentração de 10^7 cél/mL da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 26B (K^-R^-), caracterizada por Silva (1996).

4.3 PREPARO DO MOSTO BASE PARA ELABORAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Para o preparo do meio de cultura utilizou-se mosto obtido da cultivar BRS Lorena, o mosto é obtido através de esmagamento das bagas. Este procedimento é realizado por uma

máquina denominada desengaçadeira-esmagadeira (ENOVENETA, modelo 40) (Figura 10), a qual é utilizada para separar a ráquis (ramificação que confere a forma típica em cacho) e esmagar a uva.

Figura 10 – Desengaçadeira utilizada para separar o caule do grão



Fonte: www.enobrasil.com.br

4.4 MEIOS DE CULTURA

Para a realização do experimento utilizou-se três meios de cultivo: 1) Meio Mosto Ágar (MA), descrito por Silva (1996) e 2) Meio Mosto Sulfito (MS) definido por Silva & Silva (1987) e 3) Meio Mosto 80 (ME80) segundo Poli (2009). Para o preparo do meio ME80 faz-se necessário utilizar o meio ELNC, o qual foi preparado segundo Silva & Almeida (2006). A composição e o preparo dos referidos meios será apresentada a seguir.

4.4.1 Meio mosto ágar (MA) – manutenção das culturas

O meio mosto ágar (MA) foi utilizado para o isolamento das leveduras presentes no mosto da uva e para a conservação das mesmas. É composto por 10 g.L^{-1} de extrato de levedura (Bacto™ Yeast Extract), 20 g.L^{-1} de ágar (Bacto™ Agar) e 25% de mosto de uva.

Para o preparo do meio MA, separou-se dois frascos Erlenmeyers de 1.000 mL. No primeiro frasco adicionou-se ágar (20 g.L^{-1}), completando-se com um volume de 500 mL de água destilada. No segundo frasco, foram adicionados extrato de levedura comercial (10 g.L^{-1}), mosto de uva da cultivar BRS Lorena (250 mL.L^{-1}), completando-se com um volume de 500 mL de água destilada. Os frascos contendo os meios de cultura foram esterilizados

separadamente, em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 min e, posteriormente, misturados em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar, marca Trox). Em seguida, o meio de cultura foi transferido para placas de Petri (9,5 cm de diâmetro) e tubos de ensaio (17cm x 1,5cm) para posterior utilização.

4.4.2 Meio mosto sulfito (MS) – meio de fermentação

O meio mosto sulfito é utilizado para testes de velocidade de fermentação de microorganismos e formação de H₂S. É composto por 1,0 g.L⁻¹ de sulfito de sódio (QM[®] Sódio Sulfito Anidro), 10 g.L⁻¹ de triptona (Bacto[™] Tryptone) e completados para 1.000 mL com mosto de uva.

Para o preparo do meio MS, separou-se dois frascos Erlenmeyers de 2.000 mL. Adicionou-se aos frascos sulfito de sódio (1,0 g.L⁻¹), triptona (10 g.L⁻¹) e completou-se com um volume de 1.000 mL de mosto de uva da cultivar BRS Lorena. Os frascos contendo o meio de cultura foram esterilizados em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 min.

4.4.3 Meio mosto 80 (ME80) – detecção de fator killer

Meio de cultivo sólido utilizado para detecção de fator killer. O respectivo meio é composto por 80% de mosto de uva da cultivar BRS Lorena, 20% de ELNC (extrato de levedura não comercial, segundo Silva & Almeida (2006), 10 g.L⁻¹ de ágar (Bacto[™] Agar) e uma solução de 5% de azul de metileno (Merck), segundo Poli (2009).

Para o preparo do meio ME80, separaram-se dois frascos Erlenmeyers de 1.000 mL. Ao primeiro frasco foram adicionadas 10 g.L⁻¹ de ágar, completando-se o volume final de 200 mL com o meio ELNC. No segundo frasco, foram adicionados 12 mL de uma solução de 5% de azul de metileno e completado para 800 mL com mosto de uva da cultivar BRS Lorena. O pH do ELNC foi ajustado para 6,5 e os frascos foram esterilizados separadamente em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 min e, posteriormente, misturados. O meio de cultura foi transferido para placas de Petri, previamente esterilizadas em autoclave horizontal (FABBE, modelo 104) a 121 °C durante 30 min, para posterior utilização.

4.5 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

As bagas da uva Goethe Tradicional-Epagri, acondicionadas em sacos plásticos estéreis, foram cautelosa e cuidadosamente esmagadas com as mãos, em capela de fluxo laminar (marca Trox), com a finalidade de obtenção do mosto da uva. Retirou-se, com o auxílio de uma pipeta estéril, uma alíquota de 1,0 mL do mosto e transferiu-se para os tubos de ensaio (10cm x 1cm), em seguida foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) e 0,1 mL de cada diluição foi assepticamente transferida para o centro de uma placa de Petri (9,5cm de diâmetro), contendo meio mosto MA (item 4.4.1), a semeadura procedeu-se com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. As placas foram incubadas a 24°C por 72 horas, em estufa modelo Imperial II Incubator[®] (Lab-Line, Melrose Park, USA).

As colônias isoladas, contendo características macroscópicas de levedura foram purificadas por meio de esgotamento (técnica esta que consiste em depositar a levedura sobre uma parte da placa de Petri e após espalhá-la com a auxílio de uma alça de Drigalski) em meio MA. Foram isoladas 50 linhagens da cultivar Goethe Tradicional-Epagri proveniente de Urussanga-SC. Cada linhagem recebeu um código (GTepU/15) precedido do respectivo número, de 01 a 50 para inserção na coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia e Fermentação da Embrapa Uva e Vinho. Os procedimentos metodológicos para o isolamento das leveduras foram os mesmos descritos por Silva & Silva (1987).

4.6 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS MICROBIANAS

As leveduras isoladas do mosto de uva da cultivar Goethe Tradicional-Epagri, bem como a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1VVT/97 e a linhagem comercial *Saccharomyces cerevisiae* K1, foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinado MA (item 4.4.1).

Após a inoculação, as culturas foram incubadas em estufa modelo Imperial II Incubator[®] (Lab-Line, Melrose Park, USA), a 24 °C por 48 horas para crescimento celular e, posteriormente, armazenadas em local apropriado (sala de repicagem) a 20 °C. As leveduras isoladas do mosto de uva da cultivar Goethe Tradicional-Epagri foram repicadas posteriormente para sua manutenção. A repicagem consiste em retirar uma alíquota de levedura e espalhar sobre um novo meio de cultura, nesse caso meio MA e levá-las para crescimento, isso pode ser feito repetidas vezes.

4.7 EXPERIMENTOS REALIZADOS

4.7.1 Teste de velocidade de fermentação

Para o teste de velocidade de fermentação foi empregado o meio MS (item 4.4.2). Em tubos de ensaio (20 mL) contendo tampa rosqueável (Vidrolabor[®]), previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 min foram adicionados: meio MS (9,0 mL) e inóculo celular (1,0 mL) na concentração de 10⁷ células/mL de cada linhagem. A fermentação foi conduzida a 24 °C, com ausência de agitação, em estufa Imperial II Incubator[®] (Lab-Line, Melrose Park, USA)

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) durante cinco dias consecutivos, com duas pesagens diárias, com intervalos de 6h e 18h.

4.7.2 Teste de produção de H₂S

Para a realização do teste de produção de H₂S foram preparadas fitas de papel de filtro (chromatography Paper- Watman International – 1CHR) com dimensões de 0,5 x 7,5 cm. As fitas foram colocadas em placa de Petri e mergulhadas em solução 3% de acetato de chumbo (MERK[®]). Retirou-se o excesso de acetato de chumbo e deixou-se secar em estufa modelo Imperial II Incubator[®] (Lab-Line, Melrose Park, USA) a 80 °C. As fitas foram fixadas em condições assépticas na tampa dos tubos de ensaios rosqueáveis (Vidrolabor[®]).

A produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) foi determinada qualitativamente pela reação do H₂S com o acetato de chumbo impregnado na tira de papel de filtro. Quando ocorre a produção de H₂S, este volatiliza e reage com o acetato de chumbo presente na fita, produzindo dessa forma, sulfeto de chumbo (PbS) e escurecimento da mesma.

4.7.3 Teste de detecção de fator killer e sensibilidade das linhagens selecionadas

A detecção do fator killer foi determinada de acordo com Silva & Almeida (2006), para tal fim utilizou-se o meio de cultivo ME80 descrito no item (4.4.3). A técnica consistiu em transferir, com o auxílio de uma alça de platina, uma pequena quantidade de células das linhagens a serem testadas, ou seja, as 50 leveduras isoladas da varietal Goethe Tradicional, sob forma de pontos de inóculo dispersos no meio de cultivo, sendo que cada uma das linhagens foi representada por dois pontos distintos de inóculo em cada placa de cultura, totalizando dezesseis linhagens por placa, previamente à inoculação por ponto de cada linhagem, o meio de cultura

foi semeado com 100 µl de uma suspensão de 10^7 cél/mL da linhagem de levedura sensível (26B).

Para o teste de sensibilidade das linhagens selecionadas, utilizou-se o protocolo descrito em Silva & Almeida (2006). O meio de cultivo utilizado foi o ME80, descrito no item 2.4.3. Para tanto, a placa foi semeada, com o auxílio de uma alça de Drigalski, com a linhagem isolada e selecionada. Pontos de inóculo das linhagens conhecidas por serem killers como K1, 1B, 91B, 17MCF14, 28MCF14, 29MCF14, 33MCF14, 51MCF14, 52MCF14, 53MCF14, 12MPB12 E 30MPB12 foram dispersos no meio de cultivo. As placas foram mantidas em estufa Imperial II Incubator® (Lab-Line, Melrose Park, USA), a 24 °C por três dias.

4.8 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS POR PCR-RFLP

A extração do material genético das linhagens foi realizada através de congelamento/descongelamento descrito por Silva *et al.* (2012). Nesta, o material genômico das leveduras sofre extrusão por congelamento seguido do descongelamento de uma suspensão de células.

As suspensões foram preparadas em uma concentração aproximada de 10^6 células.mL⁻¹ com o uso de 100 µL de água ultrapura. Em seguida as suspensões foram homogeneizadas e colocadas para congelar a -20°C. Assim que ocorreu o congelamento, as mesmas foram descongeladas a temperatura ambiente e foram homogeneizadas durante 2 minutos, para então serem utilizadas na PCR.

A identificação e diferenciação das espécies de leveduras foi realizada pela metodologia de PCR-RFLP da região ITS de acordo com o procedimento descrito por Guillamón *et al.* (1998). Para tanto, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar um fragmento de tamanho entre 300 pb a 900 pb compreendendo as regiões ITS1, rDNA 5.8S e ITS2. A composição do meio reacional usado na reação de amplificação está descrita na Tabela 3. As reações foram realizadas em termociclador BioRad PTC-100 (Califórnia, EUA). O programa utilizado foi o seguinte: um ciclo de desnaturação de 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por um minuto e 72°C por um minuto; e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

Tabela 3 – Composição do meio reacional para a reação de PCR para a amplificação da região ITS rDNA

Componentes	Concentração
Tampão Tris-HCl 200mM	55 µL
Água ultrapura	134,2 µL
DNTP	49,5 µL
Primer –ITS1	11 µL
Primer – ITS2	11 µL
Taq Polimerase (GoTaq – Promega)	3,3 µL

Fonte: Autor (2015)

A detecção dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução tampão de TBE 1x (Tris 90mM, Ácido Bórico 90mM, EDTA 2mM). Uma alíquota de 5 µL do produto de PCR foi homogeneizada com 1,5 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30%) antes de ser depositada no gel. A separação dos *amplicons* foi realizada por eletroforese em sistema horizontal a 90 V com duração de 1 hora e 30 minutos. Como referência de tamanho molecular foi utilizado o marcador 100 pb (DNA *Ladder*, Invitrogen, Brasil).

O amplicon resultante foi digerido, de forma individual, com três endonucleases de restrição, sendo elas: *CFOI* (5' C↓GCG3'), *HinfI* (5' G↓CTNA 3') e *HaeIII* (5' GG↓CC 3'). As clivagens enzimáticas seguiram as orientações do fabricante quanto ao tempo e ao meio reacional.

A detecção dos fragmentos gerados pela ação das enzimas foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 3% em solução tampão de TBE 1x. O volume da reação foi homogeneizado com 3,0 µL do tampão de aplicação 6x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%, glicerol 30%) antes de ser aplicado no gel.

Após o término da eletroforese, a revelação dos *amplicons* ou do perfil de fragmentação deste, foi realizada por imersão do gel em brometo de etídeo a 0,5 µg.mL⁻¹ durante 15 minutos. A fotodocumentação foi realizada sob luz UV com comprimento de onda de excitação em 302 nm por meio de fotodocumentador Biorad Molecular Imager Gel DCOTM, empregando o software Image lab™ Software (USA) (Biorad - USA). As linhagens submetidas a amplificação foram as leveduras 1, 2, 5, 9, 14, 15, 21, 24, 30 e 50 da série GTEpU/15, o critério para a escolha de leveduras que iriam para identificação foram as distintas características

fisiológicas das leveduras em questão quanto a sensibilidade, neutralidade e resistência ao fator killer e produção de sulfeto de hidrogênio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

O mosto da cultivar da Uva Goethe da propriedade Epagri do Vale de Urussanga- SC permitiu o isolamento, após 72 horas de crescimento em meio MA à 24 °C, de uma variedade de colônias, das quais foram selecionadas 50 leveduras para análise. Dentre elas, uma que posteriormente constatou-se ser, de fato, uma bactéria (35GTEpU/15), a constatação se deu através de características macroscópicas da colônia. Estas leveduras isoladas foram utilizadas como material biológico para a realização dos testes de seleção de linhagens enológicas com potencial para elaboração de vinhos de qualidade. Tais linhagens foram transferidas para tubos e receberam nomenclatura que diz respeito à variedade e ao local da colheita, bem como o ano de isolamento, nesse caso, GTEpU/15 (variedade Goethe Tradicional da propriedade Epagri de Urussanga-SC, no ano de 2015), tendo sido preservadas em meio sólido inclinado e armazenadas a -80 °C, passando a integrar a Coleção de Leveduras do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho.

Segundo Poletto, Silva e Poli (2008) o emprego de leveduras autóctones selecionadas é importante coadjuvante para a padronização do produto final, sendo assim, a sua preservação é de extrema importância. Em trabalho realizado pelos mesmos autores, constatou-se que repetidas repicagens, por longo períodos, causam mudanças significativas no metabolismo dos micro-organismos. Em testes realizados com 89 linhagens ocorreu um aumento de 225% na produção de H₂S e a formação de película em linhagens que não possuíam esta característica, deste modo, evidencia-se que este método de preservação deve ser utilizado apenas por curtos períodos de tempo para que não ocorra possíveis perdas das características originais devido a variações genéticas.

O método de criopreservação, congelamento a -80°C é indicado para a preservação de culturas por um longo período de tempo, pois reduzem o metabolismo a ponto de induzir latência artificial (SILVA; COSTA; RECHE, 2008). Silva & Silva (1984) realizaram um estudo envolvendo o isolamento de leveduras com o objetivo de identificar linhagens com potencial para vinificação, os autores obtiveram 89 linhagens de leveduras que se encontram armazenadas em ultrafreezer à -80°C, as quais pertencem a Coleção de Micro-organismos do Laboratório de

Microbiologia do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho da Embrapa (CNPUV). Dentre as leveduras isoladas por estes autores destaca-se a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 26B/84 que no ano de 1985 participou da vinificação de 5.000.000 de litros de vinho branco, além desta, destaca-se as linhagens 81B/84 e 82B/84 que também se mostraram aptas para a elaboração de vinhos, com desempenho semelhante à linhagem 26B/84. Com isso, conclui-se que é possível obter linhagens de bagas de uva com aptidão enológica.

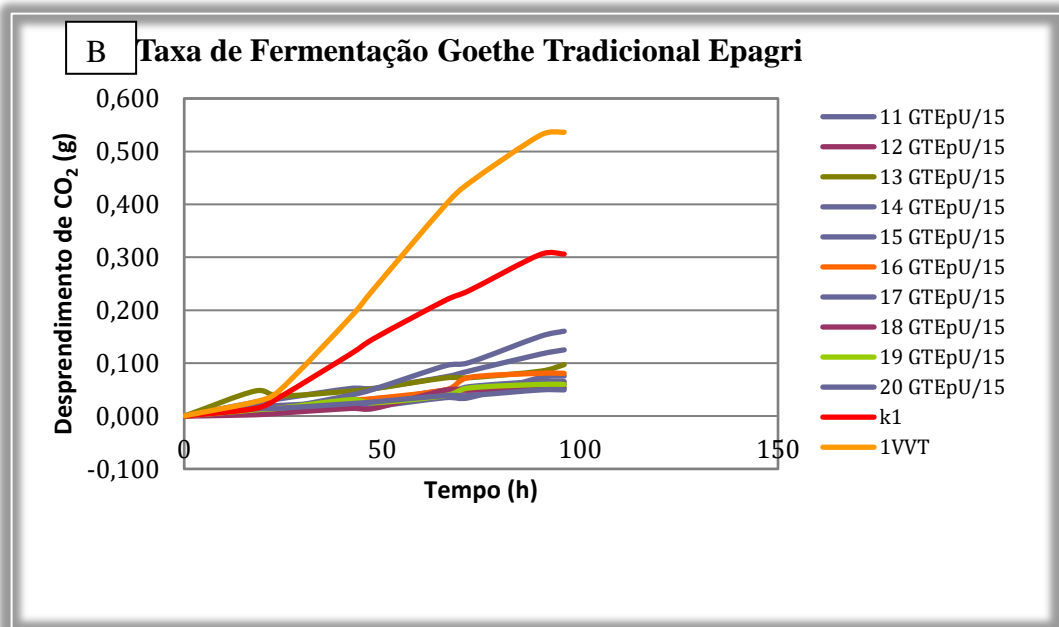
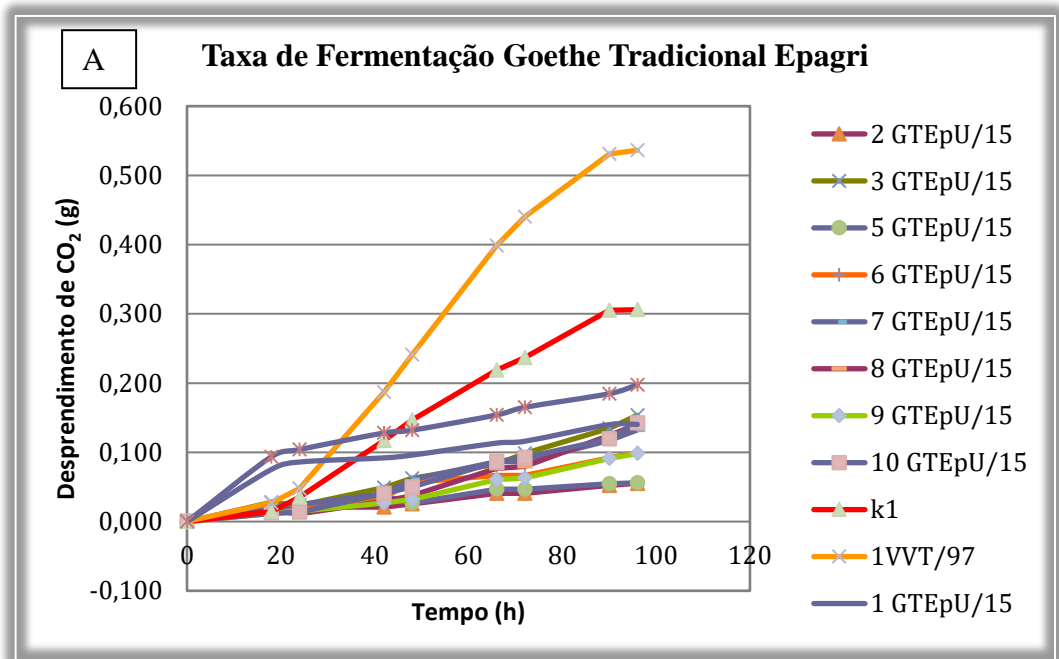
5.2 TESTE DE VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO

A fermentação do mosto da uva é um processo complexo mediado por leveduras, as quais desempenham papel fundamental (SILVA, 2004) e podem apresentar comportamento distinto no que diz respeito à velocidade de fermentação e à formação de compostos químicos (SILVA; FICAGNA, 2003). A transformação do mosto de uva representa um processo de fermentação alcoólica, tradicionalmente realizada por leveduras autóctones, sendo a composição da flora de grande valia para as características sensoriais do produto final (PRETORIUS, 2000).

A capacidade fermentativa é indispensável para a elaboração de vinho, sendo que o presente estudo baseou-se na velocidade de fermentação das linhagens-padrão K1 (comercial) e EMBRAPA 1VVT/97 (experimental). Das 49 linhagens selecionadas, nenhuma apresentou potencial fermentativo compatível ao processo de vinificação. Este resultado pode ser observado nos gráficos abaixo, onde se compara a evolução de CO₂ das linhagens isoladas frente às linhagens-padrão.

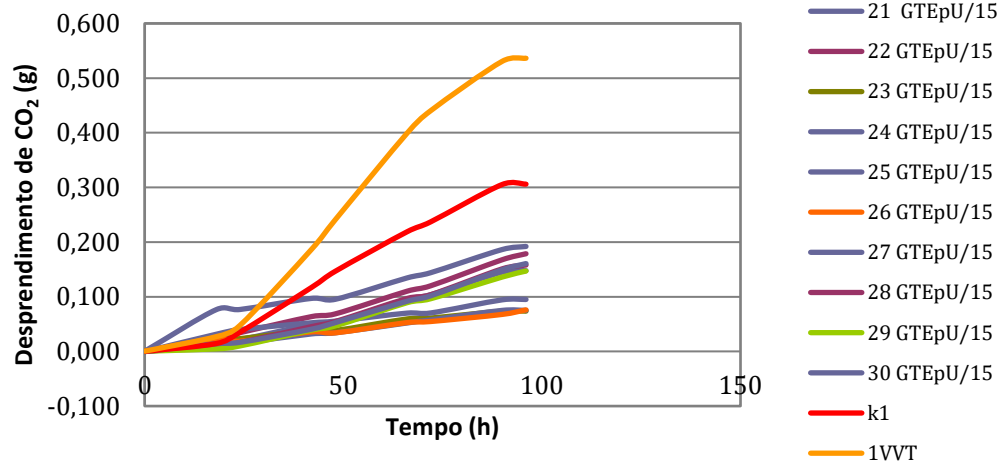
Gráfico 1 – Evolução do desprendimento de CO₂ através da capacidade fermentativa das linhagens isoladas da Uva Goethe, coletadas da propriedade Epagri de Urussanga, SC. A)

Linhas 01GTEpU a 10GTEpU e as padrão K1e 1VVT/97. B) Linhas 11GTEpU a 20GTEpU e as padrão K1 e 1VVT/97. C) Linhas 21GTEpU a 30GTEpU e as padrão K1 e 1VVT/97. D) Linhas 31GTEpU a 40GTEpU e as padrão K1 e 1VVT/97. E) Linhas 41GTEpU a 50GTEpU/15 e as padrão K1 e 1VVT/97.



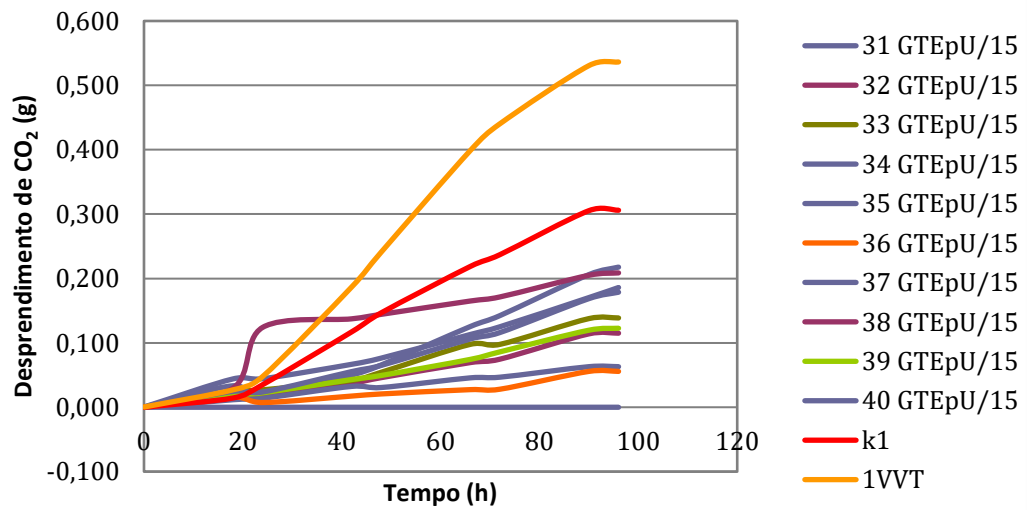
C

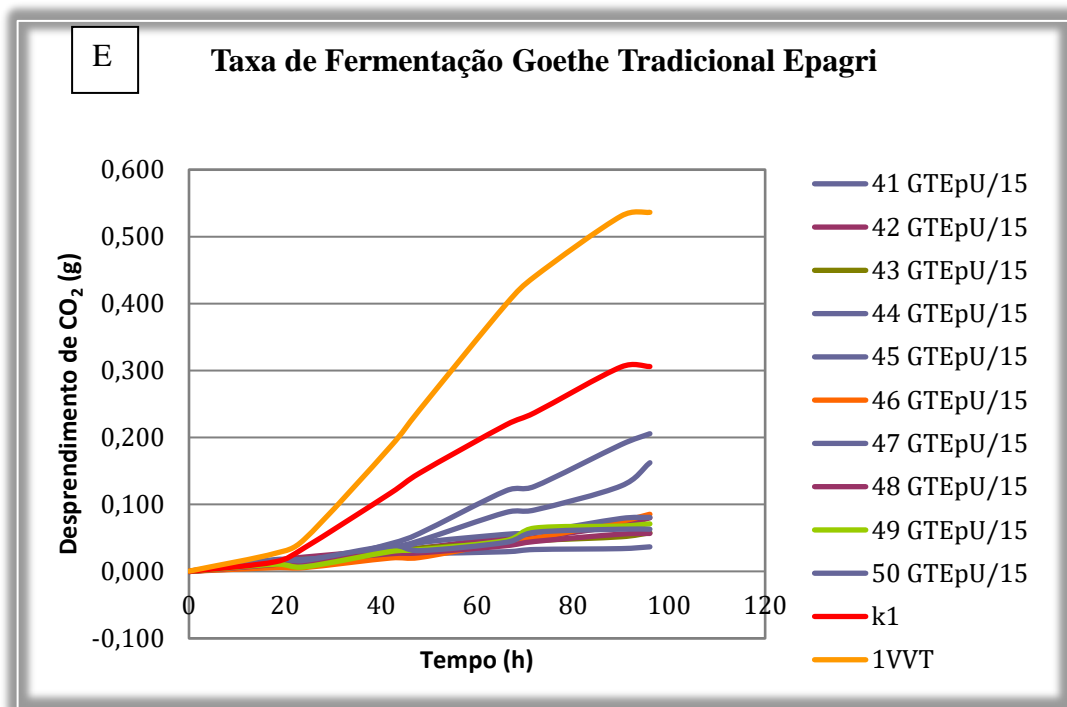
Taxa de Fermentação Goethe Tradicional Epagri



D

Taxa de Fermentação Goethe Tradicional Epagri





Fonte: Autor (2015)

De acordo com os valores alcançados pelas linhagens-padrão K1 e 1VVT/97 (gráfico 1), em aproximadamente 20 horas iniciou-se a fermentação para estas duas leveduras, comprovando que as mesmas possuem uma Fase “lag” curta, o que diminui a atividade de micro-organismos indesejáveis capazes de formar produtos secundários desagradáveis. Todas as outras linhagens testadas não apresentaram atividade fermentativa para que possam ser empregadas em processos de vinificação como agentes fermentativos dominantes.

Canossa, Wlodarczyk e Silva (2012) realizaram estudo com linhagens oriundas da região de Pinto Bandeira – RS e também não encontraram linhagens que mostrassem uma evolução de CO₂ satisfatória entre as 79 linhagens isoladas das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot. Da mesma região e da mesma época da safra Wlodarczyk *et al.* (2012) isolaram várias linhagens a partir da cultivar Ancellotta, com velocidade de fermentação similar a da linhagem padrão *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1VVT/97. Dessa forma, pode-se dizer que as cultivares exercem poder seletivo sobre os micro-organismos. Menegotto (2010) realizou um estudo com 249 linhagens isoladas da região do Vale do São Francisco-PE, de todas, apenas uma linhagem de apenas uma cultivar apresentou poder fermentativo adequado para o processo de vinificação.

Marinello (2013) realizou estudos com 46 linhagens oriundas da cultivar Moscato da região de Farroupilha-RS, destas, nenhuma apresentou adequado poder fermentativo para o processo de vinificação quando comparadas às linhagens-padrão K1 e 1VVT/97.

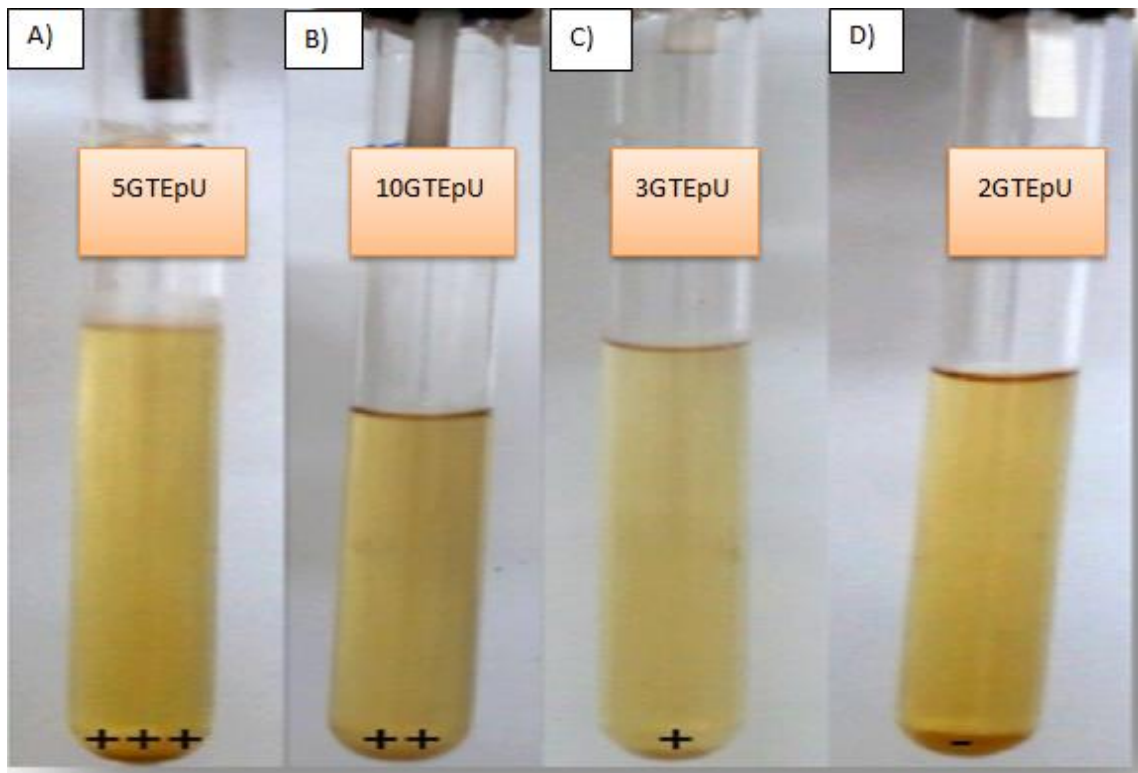
Pode-se dizer que a capacidade fermentativa depende da resposta de cada linhagem em relação a fatores de estresse aos quais as leveduras são submetidas, como a alta produção de etanol e a disponibilidade de nutrientes (WLODARCZYK, 2013). A ausência de uma linhagem selecionada com potencial fermentativo, em condições de competição com outras linhagens de leveduras vínicas, pode ocasionar o domínio de micro-organismos causadores de efeitos indesejáveis sobre o produto final.

5.3 TESTE DE PRODUÇÃO DE H₂S

A qualidade do vinho pode ser afetada pela formação de sulfetos por leveduras vínicas, sendo o H₂S (sulfeto de hidrogênio) um resultante indesejável do metabolismo das leveduras, devido ao seu odor semelhante a ovo podre. A formação de sulfeto é afetada pela composição do meio de fermentação, e em grande parte, se dá em resposta ao esgotamento de nutrientes, especialmente nitrogênio assimilável (PRETORIUS, 2000).

Das 49 leveduras isoladas, 69,38% das linhagens produziram H₂S. No presente teste, as linhagens foram subdivididas de acordo com a produção de sulfeto de hidrogênio por meio da notação “+++” indicativo de altas produções, “++” médias produções, “+” baixas produções e (-) produção nula (Figura 11).

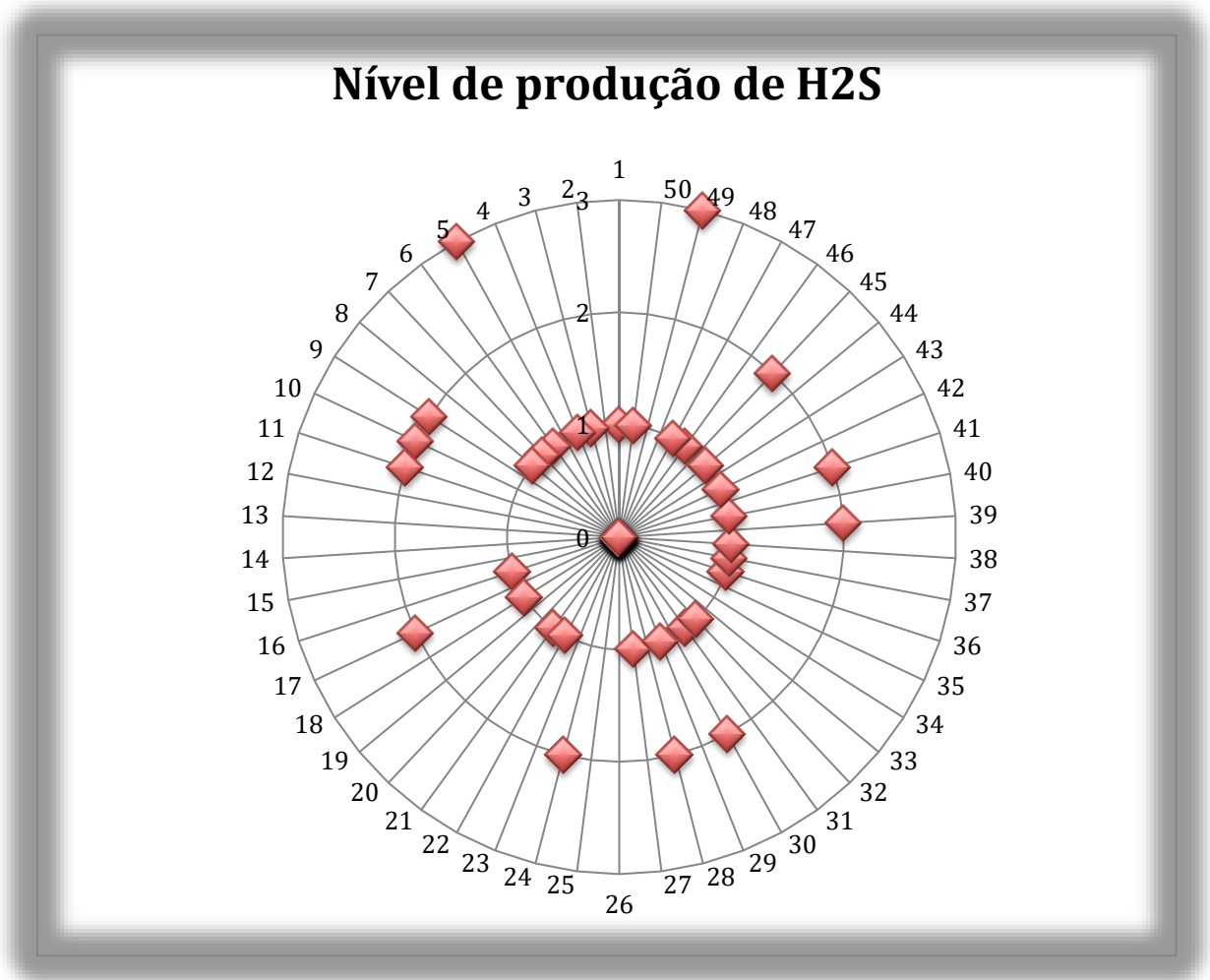
Figura 11 – Produção de H₂S após 96h de fermentação. A) Alta produção (+++). B) Média produção (++) . C) Baixa produção (+). D) Produção nula (-)



Fonte: Autor (2015)

Observou-se que entre as linhagens produtoras de H₂S, 42,86%, 22,45% e 4,08% apresentaram, respectivamente, baixo, médio e alto desprendimento de H₂S. E apenas 30,61% das linhagens não produziram o gás (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Nível de produção de H₂S pelas linhagens isoladas da cultivar Goethe Tradicional da propriedade Epagri – Urussanga, SC



Fonte: Autor (2015)

Nota: Os níveis de produção de H₂S estão indicados pela escala: (0) nula, (1) baixa produção, (2) média produção e (3) alta produção. Os pontos em vermelho indicam a intensidade da produção de H₂S pela linhagem correspondente no extremo da linha.

A quantidade de H₂S produzido pode ser afetada pela adição de um elevado nível de SO₂ ao mosto pouco antes da inoculação da levedura, pela espécie da levedura envolvida (PRETORIUS, 2000), ao tipo de tratamento fitossanitário recebido (WLODARCZYK *et al.*, 2012). O H₂S é altamente volátil e sabe-se que este pode originar compostos mais estáveis, reduzindo ainda mais a qualidade do produto final (PRETORIUS, 2000).

WLODARCZYK *et al.* (2012) pesquisaram as cultivares Ancellotta, Tannat e Cabernet Franc da região de Pinto Bandeira-RS e constataram a produção de 32,5%, 10% e 65%, respectivamente, de sulfeto de hidrogênio, já uma pesquisa feita por CANOSSA, WLODARCZYK, SILVA (2012) na mesma região com as cultivares Cabernet Sauvignon e

Merlot mostrou que 79,74% das linhagens isoladas produziam H₂S. Esta variação encontrada na mesma região pode ser devido a composição química das cultivares estudadas ou ao uso de fungicidas empregados no cultivo da videira.

5.4 TESTE DE DETECÇÃO DE FATOR KILLER E SENSIBILIDADE DAS LINHAGENS SELECIONADAS

Leveduras que apresentam característica killer excretam proteínas letais para as células de leveduras sensíveis de sua própria espécie e/ou de espécies ou gêneros distintos. A presença deste fator já foi relatada em *Saccharomyces* e em pelo menos mais oito gêneros de leveduras (BRITES, 2003).

Nenhuma linhagem isolada das bagas da cultivar Goethe Tradicional da região de Urussanga-SC apresentou comportamento killer, ou seja, nenhuma levedura provocou a morte da linhagem sensível EMBRAPA 26B, isto foi observado devido a não formação de halo de morte das linhagens testadas.

Quanto ao teste de sensibilidade, 61,2% das linhagens se mostraram sensíveis a linhagem killer K1, 73,47 % sensíveis a 91B e nenhuma mostrou-se sensível a killer 1B. E 61,2 % das linhagens são sensíveis tanto a K1 quanto a 91B. E quanto a neutralidade, 26,53% das linhagens são neutras, ou seja, não são atacadas letalmente por nenhuma das linhagens killer.

O resultado deste presente trabalho assemelha-se ao estudo realizado por CANOSSA, WLODARCZYK E SILVA (2012), no qual os autores isolaram leveduras de diferentes cultivares da região de Pinto Bandeira-RS como Cabernet Sauvignon e Tannat, destas, nenhuma linhagem produzia a toxina killer. Os resultados também assemelham-se ao estudo realizado por Silva & Dalarmi (2003), onde não foram encontradas nenhuma linhagem com produção de toxina killer e 79% das linhagens eram produtoras de H₂S. A presença e o número de linhagens killer em uma determinada região não são fatos constantes, mas dependentes de fatores ambientais, da interação entre leveduras, do meio de cultura e das condições de cultivo (SILVA, 1999b). Menegotto (2010) estudou cinco cultivares do Vale do São Francisco-PE e os resultados são os mesmos, bem como Marinello (2013) com a cultivar Moscato da região de Farroupilha, a qual também não encontrou nenhuma linhagem com a produção da toxina killer.

Em um processo fermentativo, a habilidade para produção de toxina killer pode conferir vantagens seletivas sobre linhagens competitivas sensíveis e contaminantes, no entanto, Silva (1996) salienta que as leveduras devem ser selecionadas por suas características enológicas e não por sua atividade killer. Além disso, há relatos de uma mesma linhagem de levedura

apresentando características killer, neutra e sensível, o que mostra a fragilidade do sistema killer como forma de manter o domínio no processo fermentativo em sistema não-estéril, como é o caso do vinho.

Leveduras com comportamento killer são utilizadas como recurso adicional em interações microbiológicas para inibir micro-organismos autóctones, no entanto, é necessário conhecer o perfil destas linhagens e sua capacidade de resistir ao fator killer de linhagens autóctones que são trazidas juntamente com as uvas (SILVA, 1999a).

5.5 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS PREVIAMENTE SELECIONADAS DA SÉRIE GTEpU/15

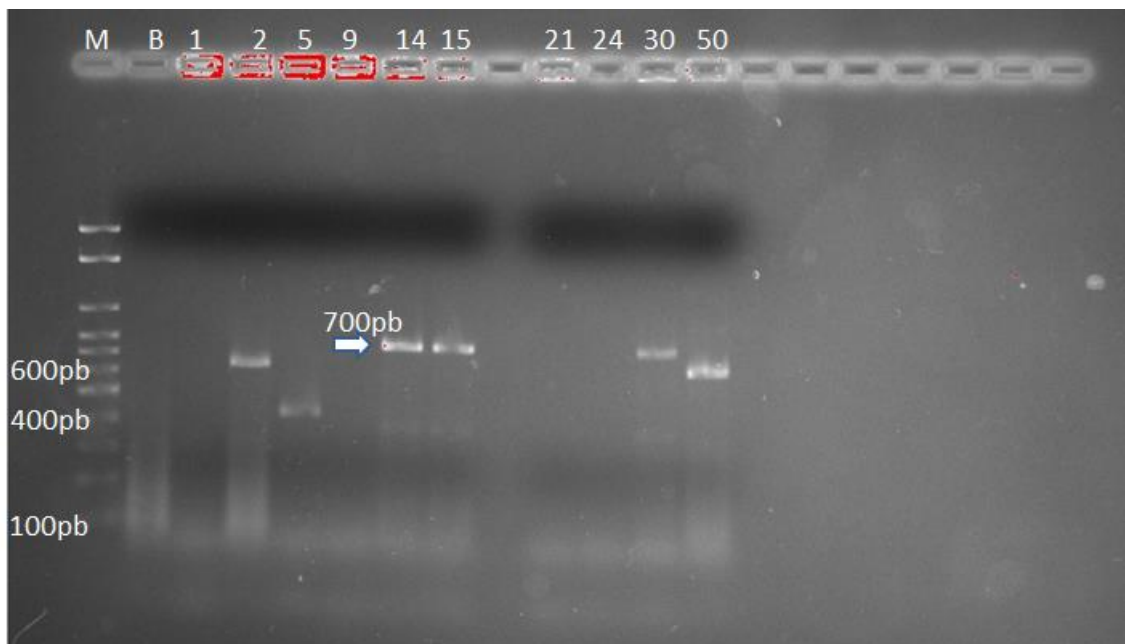
A taxonomia convencional de leveduras nem sempre alcança uma identificação correta, não somente em nível de espécie, mas também quanto ao gênero, devido a enormes variações intraespecíficas. Por este motivo, a biologia molecular está sendo cada vez mais utilizada como importante ferramenta na identificação correta, principalmente de espécies de difícil visualização (FUENTEFRÍA, 2007; OLIVEIRA, 2009). O rDNA é muito empregado em estudos taxonômicos devido à presença de regiões codificantes e não-codificantes, que evoluem em diferentes taxas, e também pelo fato dos ribossomos estarem presentes em todos os organismos, a partir de uma origem evolutiva comum. A região gênica do rDNA possui as seguintes estruturas na disposição 5'-3': a região transcrita espaçadora externa (ETS), o gene 18S, a região transcrita espaçadora interna (ITS1), o gene 5,8S, uma segunda região espaçadora interna (ITS2) e o gene 26S. Este último gene apresenta as seqüências menos conservadas, em relação aos genes 18S, 5,8S e 5S, sendo a região de escolha para estudos de filogenia de espécies e grupos taxonômicos mais relacionados. A região D1/D2 do 26S rDNA de grande parte das leveduras conhecidas encontra-se seqüenciada e observou-se que essa região é capaz de diferenciar quase todas as espécies de leveduras testadas, visando estudos de taxonomia (KURTZMAN & ROBNETT, 1998).

Para efeito de investigação, foram isoladas as seguintes leveduras da série GTEpU/15, 1GTEpU/15 (sensível a K1 e 91B e baixa produtora de H₂S), 2GTEpU/15 (neutra e não produtora de H₂S), 5GTEpU/15 (neutra e com alta produção de H₂S), 9GTEpU/15 (sensível a K1 e 91B e com média produção de H₂S), 14GTEpU/15 (sensível apenas a 91B e não produtora de H₂S), 15GTEpU/15 (sensível a K1 e 91B e não produtora de H₂S), 21GTEpU/15 (sensível apenas a 91B e baixa produtora de H₂S), 24GTEpU/15 (sensível a K1 e 91B e alta produtora de H₂S), 30GTEpU/15 (sensível apenas a 91B e média produtora de H₂S) e 50GTEpU/15

(neutra e baixa produtora de H₂S). A identificação das leveduras se baseou no perfil eletroforético de bandas em gel de agarose, os tamanhos dos fragmentos são estimados e a diferenciação das espécies efetuada por meio do método PCR-RFLP, com a aplicação das enzimas de restrição *CFOI*, *Hinf* e *HaeIII*.

Guillamón *et al.* (1998) realizaram a identificação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e resultou em um fragmento de DNA gerado, por amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2, com 880 pb (pares de bases) ou algo em torno disso. Não há outros micro-organismos isolados do vinho que gerem fragmentos com este tamanho após reação de PCR com os iniciadores ITS1 e ITS4. No estudo realizado por Agustini *et al.* (2014) foi constatado o mesmo número de pares de bases para *Saccharomyces cerevisiae*. Granchi *et al.* (2001) e Heras-Vazquez *et al.* (2003) também aplicaram PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 para a identificação de leveduras. Granchi identificou 850 pb para a espécie *Saccharomyces cerevisiae* enquanto Heras-Vazquez *et al.* obtiveram o mesmo resultado que Guillamón *et al.* (1998).

Figura 12 – Perfil eletroforético da região ITS1-5.8S-ITS2 amplificada pelos iniciadores ITS1 e ITS2



Fonte: Autor (2015)

Nota: M (marcador molecular), B (branco), 1, 2, 5, 9, 14, 15, 21, 24, 30 e 50 leveduras da série GTEpU/15

Não houve amplificação da amostra denominada “branco”, o “branco” consiste em água ultrapura, se houver contaminação das amostras de PCR, o “branco” amplificará, caso contrário, não haverá amplificação do mesmo, a não amplificação do “branco” na PCR realizada denota

uma não contaminação do produto de PCR, a levedura 2GTEpU/15 apresentou banda em aprox. 625 pb, a 5GTEpU/15 em aproximadamente 400 pb, a 14, 15, e 30 GTEpU/15 em aprox. 700 pb e a 50GTEpU/15 em aprox. 600 pb (Figura 12). Segundo Agustini *et al.* (2014) esses valores indicam mais de uma possível linhagem (Tabelas 4, 5, 6 e 7), fazendo-se necessário a utilização de RFLP para a identificação das mesmas. Já o DNA das leveduras 1, 9, 21 e 24 GTEpU/15 não amplificaram, fato que pode estar relacionado a incompatibilidade do DNA alvo com os iniciadores utilizados ou a falhas no protocolo de extração do referido DNA. Dessa forma, as mesmas serão submetidas a uma nova PCR realizada na sequência, a PCR usará iniciadores de *Candida diversa* (CANDIV3 e CANDIV4), linhagem esta em que não há compatibilidade com os iniciadores universais ITS1 e ITS2.

Tabela 4 – Tamanho, em pares de bases, dos produtos ITS-PCR para as possíveis espécies suspeitas para a identificação da linhagem 5GTEpU

ITS-PCR (pb)	Espécie
390	<i>Candida akabanensis</i>
390	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
420	<i>Issatchenkia terricola</i>
430	<i>Candida californica</i>
450	<i>Issatchenkia hanoiensis</i>
450	<i>Pichia kluyveri</i>

Fonte: Autor (2015), adaptado de Agustini *et al.* (2014)

Tabela 5 – Tamanho, em pares de bases, dos produtos de ITS-PCR para as possíveis espécies suspeitas para a identificação da linhagem 50GTEpU

ITS-PCR (pb)	Espécie
595	<i>Kwoniella heveanensis</i>
600	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>
600	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>

Fonte: Autor (2015), adaptado de Agustini *et al.* (2014)

Tabela 6 – Tamanho, em pares de bases, dos produtos de ITS-PCR para as possíveis espécies suspeitas para a identificação da linhagem 2GTepU

ITS-PCR (pb)	Espécie
620	<i>Pichia myanmaensis</i>
625	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
650	<i>Zygoascus meyeræ</i>

Fonte: Autor (2015), adaptado de Agustini *et al.* (2014)

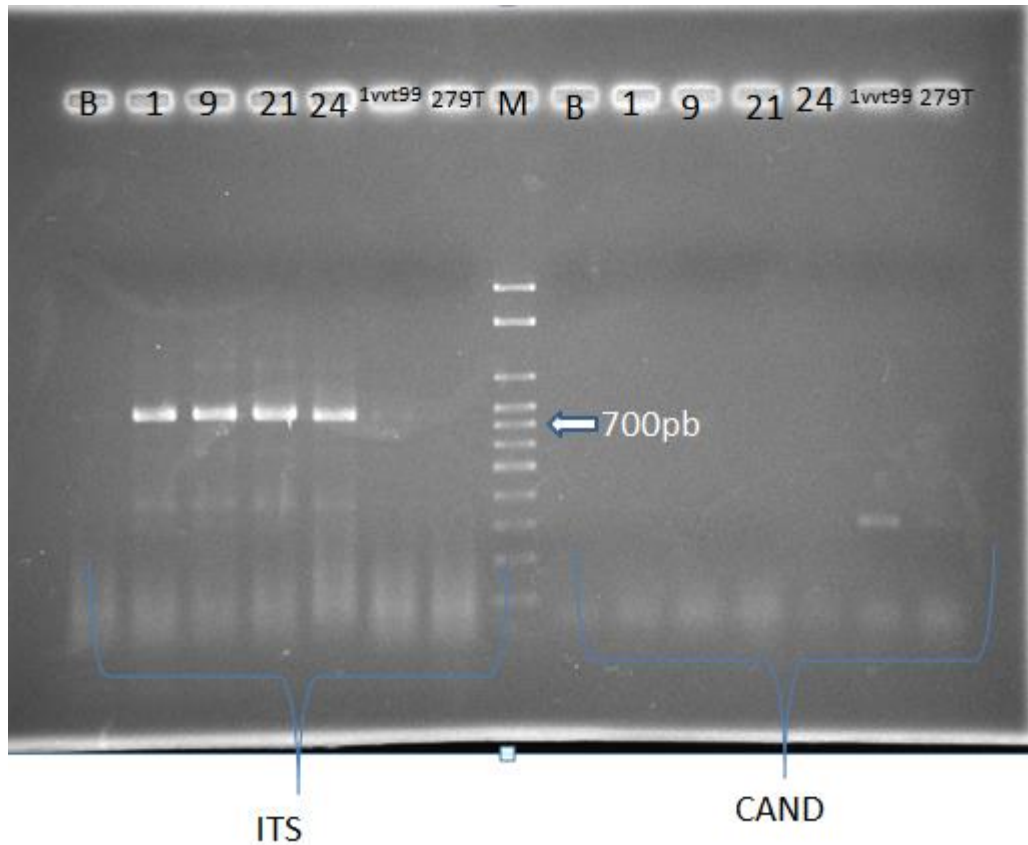
Tabela 7 – Tamanho, em pares de bases, dos produtos de ITS-PCR para as possíveis espécies suspeitas para a identificação das linhagens 14, 15 e 30GTepU

ITS-PCR (pb)	Espécie
650	<i>Zygoascus meyeræ</i>
770	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
770	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>

Fonte: Autor (2015), adaptado de Agustini *et al.* (2014)

O DNA das leveduras da série GTepU (1, 9, 21 e 24) que não obtiveram amplificação na primeira PCR foram submetidas a nova PCR utilizando além dos primers ITS1 e ITS2, primers da levedura *Candida diversa* (CANDIV3 e CANDIV4), além de dois controles-positivos (1VVT99 e 279T), as quais são leveduras da espécie *Candida diversa* (Figura 13).

Figura 13 – Perfil eletroforético das leveduras amplificadas pelos iniciadores ITS1, ITS4, CANDIV3 e CANDIV4



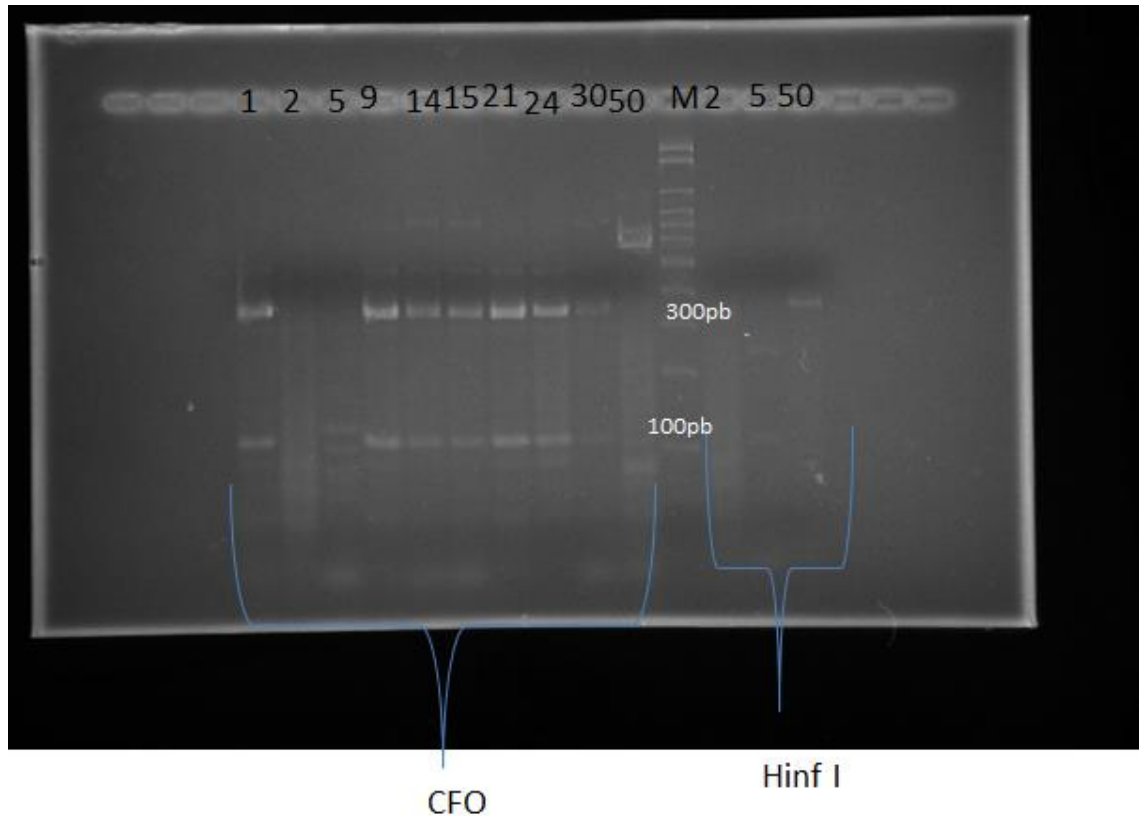
Fonte: Autor (2015)

Nota: M (marcador molecular), B (branco), 1, 9, 21, e 24 (leveduras da série GTEpU), 1VVT99 e 279T (leveduras da espécie *Candida diversa*)

O DNA das leveduras amplificaram corretamente quando da utilização dos primers ITS1 e ITS4, o que não ocorreu para os primers CANDIV3 e CANDIV4, já as leveduras-controle amplificaram corretamente com os primers CANDIV3 e CANDIV4, logo, pode-se aferir que as leveduras analisadas não se tratam de leveduras da espécie *Candida diversa*, podendo dessa forma serem analisadas por RFLP. As linhagens mostraram amplificação em aprox. 700 pb.

Em seguida, todas as linhagens foram submetidas a PCR-RFLP para análise dos fragmentos gerados pela digestão das enzimas de restrição *CFOI* e *Hinfi* (Figura 14).

Figura 14 – Perfil eletroforético dos fragmentos de restrição das linhagens 1, 2, 5, 9, 14, 15, 21, 24, 30 e 50 da série GTEpU com utilização das enzimas de restrição *CFOI* e *HinfI*



Fonte: Autor (2015)

Nota: M (marcador molecular), à esquerda do marcador (digestão com a enzima *CFOI*), à direita do marcador (digestão com a enzima *HinfI*)

A levedura 1GTEpU, utilizando as enzimas de restrição *CFOI* e *HinfI* gerou fragmentos de DNA em aproximadamente em 100 pb, 320 pb e 315 pb, o que era esperado com a clivagem pela enzima *CFOI*, de acordo com Agustini *et al.* (2014), sugerindo ser uma levedura da espécie *Hanseniaspora opuntiae*.

Em contrapartida, não houve perfil de restrição satisfatório para a levedura 2GTEpU, sendo necessário a repetição do mesmo.

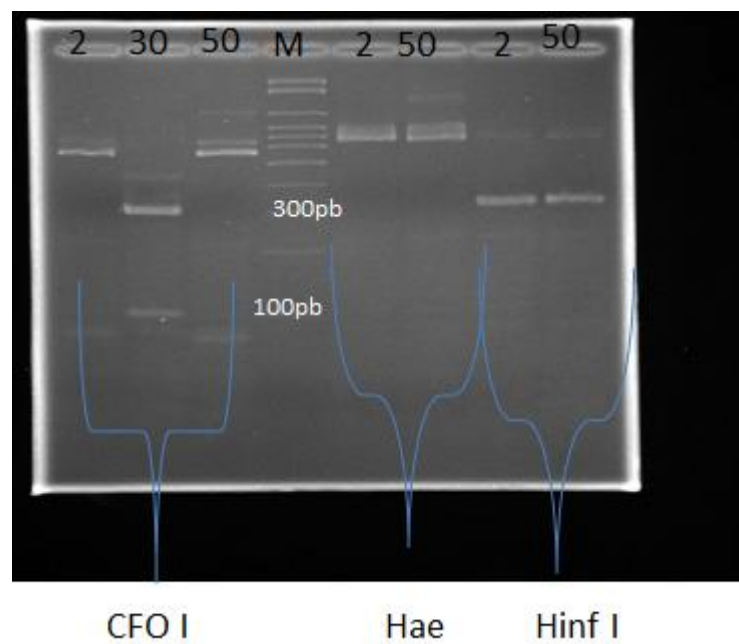
A levedura 5GTEpU mostrou fragmentos de aproximadamente 120 pb, 90 pb, 80 pb, 75 pb e 55 pb com a enzima *CFOI* e aproximadamente 220 pb, 100 pb e 100 pb para a enzima *HinfI*, o que segundo Agustini *et al.* (2014) e GRANCHI *et al.* (1999) sugerem ser uma levedura da espécie *Issatchenkia terricola*.

Já as leveduras 9, 14, 15, 21e 24GTEpU mostraram fragmentos com a enzima de restrição *CFOI* em aproximadamente 320 pb, 315 pb e 100 pb, o que de acordo com Agustini *et al.* sugere ser uma levedura da espécie *Hanseniaspora opuntiae*.

E para a levedura 30GTEpU os fragmentos aparentemente indicam uma *Hanseniaspora opuntiae*, no entanto, o produto de clivagem é insuficiente, fazendo-se necessária a repetição do procedimento. O mesmo acontece com a levedura 50GTEpU, tanto para a enzima *CFOI* como para a *HinfI*, o produto de PCR é insuficiente para conclusão, dessa forma, o procedimento será repetido.

As leveduras 2, 30 e 50GTEpU, para as quais não se obteve fragmentos de restrição satisfatórios para análise, foram submetidas a nova digestão com enzimas *CFOI* e *HinfI*, em adição à enzima *HaeIII* (Figura 15).

Figura 15 – Perfil eletroforético dos fragmentos de restrição das linhagens 2, 30 e 50GTEpU com a utilização das enzimas *CFOI*, *HinfI* e *HaeIII*



Fonte: Autor (2015)

De acordo com os fragmentos de restrição obtidos com a clivagem do DNA pela enzima *CFOI*, que ocorreu em aprox. 320 pb, 315 pb e 100 pb, sugere-se que a levedura 30 GTEpU trata-se da espécie *Hanseniaspora opuntiae*, conforme dados de Agustini *et al.* (2014). Já para as leveduras 2 e 50GTEpU os fragmentos obtidos não constam na lista de leveduras identificadas, sendo necessário ir para sequenciamento para posterior identificação das mesmas.

A existência de variabilidade intraespecífica em microorganismos é comum e pode conduzir ao insucesso na identificação de uma linhagem específica por PCR-RFLP. Estudos de identificação baseados em técnicas de PCR-RFLP relatam a observação de diferentes tamanhos de amplicons e, também, a existência de perfis de restrição distintos quando linhagens são analisadas dentro de uma mesma espécie (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; PHAM *et al.*, 2011).

Desta forma, a técnica de sequenciamento é fundamental para garantir as corretas designações às linhagens estudadas (Agustini *et al.*, 2014). Kurtzman & Robenett (1998) demonstraram que a sequência de nucleotídeos do domínio D1/D2 do gene 26S do RNA ribossomal, usadas para sequenciamento possui variação suficiente para identificar quase todas as espécies conhecidas de leveduras.

5.6 VIABILIDADE ECONÔMICA

O projeto aqui apresentado foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves-RS, e ocorreu durante o período de Janeiro a Maio de 2015.

Para efeito de pesquisa e apresentação de dados financeiros relativos ao processo de isolamento e caracterização de leveduras, ao longo de quatro meses de execução, foram considerados os seguintes fatores de custos:

- 1) Aquisição de equipamentos laboratoriais;
- 2) Aquisição de matérias e reagentes;
- 3) Remuneração de mão-de-obra qualificada para a realização do projeto;

Os custos para aquisição de equipamentos e material de laboratório utilizados para a realização do presente estudo, incluindo as etapas de isolamento e caracterização de leveduras encontram-se detalhados nas Tabelas (8, 9).

Tabela 8 – Custos relativos a aquisição de equipamentos utilizados para o isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC.

Descrição Equipamento	Custo (R\$)
Autoclave	12.000,00
Balança analítica	15.000,00
Cuba de eletroforese	1.500,00

Câmara de fluxo laminar	20.000,00
Desengaçadeira-esmagadeira	8.000,00
Destilador	3.000,00
Estufa de Secagem	15.000,00
Estufa para crescimento microbiano	33.000,00
Micropipetas (1, 5 e 10 µL)	2.340,00
pHmetro	4.800,00
Termociclador	28.680,00
Transiluminador	11.650,00
Fonte provedora de energia	1.985,00
Vortex	850,00
Total de equipamentos =	157.805,00

Fonte: Embrapa Uva e Vinho (comunicação pessoal com Bruna Carla Agustini)

Tabela 9 – Custos relativos a aquisição de materiais de laboratório utilizados para o isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC.

Descrição Material	Custo (R\$)
Alça de cromo/níquel	500,00
Alça de Drigalski	15,3
Frasco de vidro tipo penicilina (10mL) 150 unidades	879,00
Frascos Erlenmeyers	3.500,00
Microtubos tipo Eppendorf – 1.000 unidades	100,00
Papel filtro	3,00
Provetas (250 e 500mL)	1.200,00
Sacos plásticos	2,00
Tubos de ensaio (30mL)	1.400,00
Tubos de ensaio com tampa rosqueável	3.000,00
Total Material =	10.599,3

Fonte: Embrapa Uva e Vinho (comunicação pessoal Bruna Carla Agustini)

Os custos correspondentes à preparação dos meios de cultivo e demais análises utilizadas para o isolamento, caracterização, identificação e manutenção das leveduras para vinificação encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Custos relativos a aquisição de reagentes e material biológico utilizados para o isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC.

Reagentes e Material Biológico	Custos (R\$)	Quantidade utilizada	Custos (R\$)
Acetato de chumbo	1.079,86 (500g)	1g	2,16
Agar	300,00 (500g)	90g	54,00
Agarose	4.180,00 (500g)	15g	125,4
Água ultra pura	135,3 (500mL)	2000mL	541,2
Azul de bromofenol	112,00 (5g)	1g	22,4
Azul de metileno	4.911,6 (500g)	0,02g	0,20
Brometo de etídio	95,00 (10mL)	600mL	5,700
dNTPs	155,00 (100µL)	55 µL	85,25
Enzima de restrição CFOI	300,00 (200 reações)	13 reações	19,5
Enzima de restrição HaeIII	300,00 (200 reações)	2 reações	3,00
Enzima de restrição HinfI	300,00 (200 reações)	4 reações	6,00
Extrato de levedura	71,73 (500g)	30g	4,3
Extrato de levedura não comercial líquido (ELNC)	2,00 (500g)	600g	2,4
Glicerol	180,00 (1000mL)	10mL	1,8
Iniciador ITS1	40,00 (500 reações)	18 reações	1,44
Iniciador ITS2	40,00 (500 reações)	18 reações	1,44
Iniciador CANDIV3	40,00 (500 reações)	7 reações	0,56

Iniciador CANDIV4	40,00 (500 reações)	7 reações	0,56
Kit tampão 10x + MgCl ₂	500,00 (100µL)	55µL	250,00
Marcador molecular	190,00 (50 reações)	4 reações	15,2
Mosto de uva “BRS Lorena”	5,00 (500mL)	4.150mL	41,5
Sulfito de sódio	280,41 (500g)	1,0g	0,56
Taq Polimerase (Promega)	300,00 (500 reações)	2 reações	1,2
Triptona	152,62 (500g)	10g	3,1
Total =			6.883,17

Fonte: Embrapa Uva e Vinho (comunicação pessoal com Bruna Carla Agustini)

Uma equipe contendo pesquisador, estagiários e funcionários técnicos com bom conhecimento e experiência em microbiologia e técnicas de biologia molecular serão necessários para realização das diferentes etapas descritas no presente projeto. Neste contexto, um Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia, com alto grau de conhecimento em microbiologia, agregaria seu conhecimento multidisciplinarem vários campos do projeto. Este deverá assumir a coordenação durante a totalidade dos trabalhos. Um estagiário de graduação, sob a supervisão do Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia, envolvido nas diversas tarefas de rotina do laboratório. Este realizará, entre outras tarefas, plaqueamento as linhagens, preparação do inóculo, inoculação, pesagem diária dos tubos e repique das linhagens. Os profissionais mencionados acima deverão ser auxiliados por um laboratorista, o qual estará envolvido com todas as tarefas de suporte e execução dos trabalhos experimentais. Os custos de contratação desses profissionais segue conforme sua formação específica, os quais se encontram descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Recursos humanos necessários à realização dos experimentos isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC

Profissional	Tempo de serviço (4 meses)	Salário Mensal (R\$)	Salário Total (R\$)
Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia	4 meses	4.150,00	16.600,00
01 Laboratorista	4 meses	2.800	11.200,00
01 Estagiário	4 meses	400,00	1.600,00
Total =			29.400,00

Fonte: Embrapa Uva e Vinho e Sindicato dos Engenheiros do Estado do Rio Grande do Sul

Considerando os fatores de custos relacionados ao desenvolvimento do projeto, apesar dos mesmos apresentarem um investimento relativamente expressivo, apresentam boas possibilidades de retorno, tanto no sentido econômico quanto na melhoria da qualidade do produto final.

Tabela 12 – Relação de custos totais necessários à realização dos experimentos envolvendo o isolamento e caracterização de leveduras da Região de Urussanga – SC

Descrição custos	Custos (R\$)
Equipamentos	157.805,00
Material	10.599,30
Reagentes	6.883,17
Recursos humanos	29.400,00
Total =	204.687,47

Fonte: Autor (2015)

Caso tivesse ocorrido o isolamento de uma levedura com potencial fermentativo adequado ao processo de vinificação, o trabalho desenvolvido teria sido financeiramente viável e seus custos de elaboração teriam sido bem empregados.

Considerando o valor médio de venda, no mercado brasileiro, de uma garrafa de vinho branco da varietal Goethe, elaborado na região de Urussanga (Vinho Branco de Mesa Seco – Casa Del Nonno Nobile Goethe) como sendo de R\$ 26,00 (Vinícola Casa Del Nonno) seria

necessário comercializar aproximadamente 7.900 garrafas de 750 mL deste vinho para custear todo o trabalho, um volume considerado pequeno até para vinícolas de médio porte.

Conforme Silva & Silva (1984), leveduras nacionais podem possibilitar aos pequenos e médios produtores acesso à tecnologia com um significativo incremento na qualidade dos vinhos por elas elaborados, além de redução nos custos de produção decorrentes de problemas comuns na prática vinícola.

Devido ao isolamento de leveduras não aptas a fermentação, o seguinte estudo é sugerido: nova coleta e isolamento de leveduras da região em questão, porém de outras cultivares e de outras propriedades.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem apresentar as seguintes conclusões:

- Foram isoladas 49 leveduras a partir de bagas pertencentes a cultivar Goethe Tradicional cultivada na região de Urussanga, propriedade pertencente a Epagri;
- Verificou-se que nenhuma linhagem isolada mostrou comportamento fermentativo compatível com linhagens usadas como padrão de fermentação;
- Dentre as linhagens isoladas, nenhuma apresentou comportamento killer e apenas 30,61% não são produtoras de sulfeto de hidrogênio (H₂S);
- Dentre as 49 leveduras isoladas, 10 foram escolhidas para serem identificadas por PCR-RFLP, dessas, sete foram identificadas como sendo leveduras da espécie *Hanseniaspora opuntiae*, uma como sendo *Issatchenkia terricola* e duas não obtiverem resultados satisfatórios no método adotado, devendo estas serem levadas a sequenciamento;
- A metodologia adotada para o isolamento e caracterização de leveduras vínicas, salvo duas exceções, mostrou-se adequada com relação aos objetivos propostos no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

A vitivinicultura brasileira. **Ibravin**. Disponível em:

<<http://www.ibravin.org.br/brasilvitivinicola.php>>. Acesso em: 24 maio 2015.

AGNOLUCCI, M. *et al.* **Genetica and phenotypic diversity of autochthonous *Saccharomyces spp.*** Strains associates to natural fermentation of ‘Malvasia delle Lipari’. Letters in Applied Microbiology, v. 45, p. 657-662, 2007.

AGUSTINI *et al.* **Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados suplementar fundamentado em espectrometria de massa maldi-tof.** 2014. 128 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

ALCARDE, A. R. Fermentação. **Ageitec**. Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG1_105_22122006154841.html>. Acesso em: 15 jun. 2015.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHIMIDELI, W. **Biotecnologia industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.** São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda, v.3, p.12-22, 2001.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and identification.** 2 ed. New York: Cambridge University Press, 1990.

BEDRIÑANA, R. P.; SIMÓN, A. Q.; VALLES, B. S. **Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias.** Food Microbiology. v. 27, n.4, p. 503-508. 2010.

BELTRAN, G. *et al.* **Analysis of yeast population during alcoholic fermentation: A six year follow-up study.** Systematic and Applied Microbiology, v. 25, p. 287-293, 2002.

BEVAN, E. A.; MAKOVER, M. (1963) **The physiological basis of killer character in yeast.** In: Genetics Today Xth International Congress for Genetics ed. Geets, S. J. p. 53-58. Oxford: Pergamon Press.

BOWEN, S.; ZAPATA, A.V. **Geographical indications, terroir, socioeconomic and ecological sustainability: The case of tequila.** Journal of Rural Studies, v. 25, p. 108-119, 2009.

BREINIG, F.; TIPPER, D. J.; SCHMITT, M.J. **Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast k1 viral toxin.** *Cell*, v. 108, n. 3, p. 395-405, 2002.

BRITES, Anny Stella Monteiro. **Seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* potencializadas pelo fator killer, H₂S e caráter floculante.** 2003. 72f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CALLEJON, R. M. *et al.* **Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains.** *Analytica Chimica Acta*. v. 660, n.1-2, p. 68-75. 2010.

CANOSSA, S.; WLODARCZYK, S. R.; SILVA, G. A. **Características de leveduras isoladas das cultivares Cabernet Sauvignon e Merlot de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves.** In: 10º Encontro de Iniciação Científica e 6º Encontro de pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2012, Bento Gonçalves. Iniciação Científica. Bento Gonçalves: Editado por César Luis Girardi, Carlos Alberto Ely Machado, Henrique Pessoa dos Santos, Lucimara Rogéria Antonioli, Luís Fernando Revers e Marcos Botton., 2012. v. 1, p. 48-48.

CAPECE, A., *et al.* **Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation.** *International Journal of Food Microbiology*, v.144, n.1, p. 187-192, 2010.

_____; SALZANO, G.; ROMANO, P. **Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 84, p. 33-39, 2003.

Casa del nonno. Disponível em: <<http://casadelnonno.com.br/projeto/casa-del-nonno-vinho-branco/casa-del-nonno-nobile-goethe.html>>. Acesso em: 10 out. 2015.

CASAL, M.; SCHULLER, D.; PAIS, C. Métodos moleculares de identificação de leveduras do vinho. **Repositorium.** [S.I.; s.n.], 2004. Disponível em: <<https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2237/1/U7.pdf>>. Acesso em: 23 set. 15.

Centro de pesquisa agropecuária trópico semi-árido (CPATSA). **Embrapa.** Disponível em: <<http://www.cpatso.embrapa.br/>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

Centro nacional de pesquisa em uva e vinho (CNPUV). **Embrapa.** Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

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

_____; 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.; PANEQUE, P. **Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region.** *International Journal of Food Microbiology*, v.143, p.241-245, 2010.

CONN. E. E.; STUMPF. P.; **Introdução à Bioquímica.** Editora Edgard Blucher LTDA, California, 1980.

DE VERO, L.; SOLIERI, L.; GIUDICI, P. **Evolution-based strategy to generate non-genetically modified organisms *Saccharomyces cerevisiae* strains impaired in sulfate assimilation pathway.** *Letters in Applied Microbiology*. v. 53, n.5, p. 572-575. 2011.

Equipamentos para vinhos. **Enobrasil.** Disponível em: <www.enobrasil.com.br>. Acesso em: 16 ago. 2015

Establishment of a viable cell detection system for microorganisms in wine based on ethidium monoazide and quantitative PCR. **Science direct.** Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512001193>>. Acesso em: 15 set. 2015.

ESTEVE-ZARZOSO, B. et al. **Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers.** *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 49, p. 329-337, 1999.

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

FERNANDEZ-ESPINAR et al. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus ***Saccharomyces***: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 78, p. 87-97, 2000.

FLEET, G. H.. **Yeast interactions and wine flavour.** *International Journal Of Food Microbiology*, Sydney, Australia, v.8, n.1, p.11-22, 2003.

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

FUENTEFRIA, Alexandre Heneghello. **Bioprospecção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos**. 2007. 144 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento do Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GEORGOPOULOS, D. E.; LEIBOWITZ, M. J. **Nucleotide phosphotransferase, nucleotide kinase and inorganic pyrophosphatase activities of killer virions of yeast**. *Yeast*, v.3, n.2, p.117-129, 1987.

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.

GOFFEAU, A. *et al.* **Life with 6000 genes**. *Science*, v. 274, p. 563-567, 1996.

GRANCHI, L. *et al.* **Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR–RFLP analysis of the rDNA ITS region**. *Journal of Applied Microbiology*, v. 87, n.6, p. 949-956, 1999.

GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, A. C. **Documento sobre uvas e vinhos**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2009. Documentos/ Embrapa Uva e Vinho, ISSN 1516-8107, n°48.

GUILLAMÓN, J.M. *et al.* **Rapid Identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region**. *Archives of Microbiology*, v. 169, p. 387-392, 1998.

GUIMARÃES, Thais Martins. Isolamento, identificação e seleção de cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho. 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas. **Universidade Federal do Paraná**. Curitiba, 2005. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/1919>>. Acesso em: 21 jul. 2015.

HERAS-VAZQUEZ, Francisco Javier Las *et al.* Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spaces. **Fems Yeast Research**. Espanha, v. 3, p. 3-9, 2003. Disponível em: <www.fems-microbiology.org>. Acesso em: 15 out. 2015.

Indicação de Procedência. **PROGOETHE**, Associação dos Produtores da Uva e do Vinho Goethe (Brasil). Disponível em: <<http://www.progoethe.com.br/procedencia.php>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

Instituto Brasileiro do Vinho. **Ibravin**. Disponível em:

<<http://www.ibravin.org.br/cadastroviticola.php?secao=1&m2=true>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. **Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen**. Applied and Environmental Microbiology. v. 61, n.2, p. 461-467. 1995.

KOTANI, H.; SHINMYO, A.; ENATSU, T. **Killer toxin for sake yeast: properties and effects of adenosine 5'- diphosphate and calcium ion on killingaction**. Journal of Bacteriology, v.129, n. 2, p. 640-650, 1977.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3.ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. **Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences**. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, v.73, p.331-371, 1998.

LI, S.S. et al. **Yeasts species associated with wine grapes in China**. International Journal of Food Microbiology, v. 138, n.1-2, p. 85-90, 2010.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, p. 1-49. (Biotecnologia Industrial; v.3).

LINDERHOLM, A. L. *et al.* **Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae***. Applied and Environmental Microbiology. v. 74, n.5, p. 1418-1427. 2008.

MAMEDE, M. E. O; PASTORE, G. M. **Avaliação da Produção dos Compostos Majoritários da Fermentação de mosto de Uva por leveduras isoladas da 'Serra Gaúcha'**. Ciência e Tecnologia dos Alimentos, v.24, n.3, p. 453-458, 2004.

MARINELLO, Monichara. **Caracterização e Identificação Genotípica de Leveduras Provenientes da Superfície de Bagas de Uva da Cultivar Moscato da Região de Farroupilha, Rio Grande do Sul**. 2013. 85f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2013.

MARIOT, E. J. A uva Goethe símbolo da vitivinicultura da região de Urussanga, Santa Catarina. **UFSC**. Camboriú, 2003. Disponível em:

<<http://www.bu.ufsc.br/cac/uvagoethe.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2015

MARO, E. D.; ERCOLINI, D.; COPPOLA, S. **Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the catalanesca grape.** *International Journal of Food Microbiology*, v.117, v.2, p.201-210, 2007.

MARTINI, A. **Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Int. Microbiol.* v. 6, p. 207-209, 2003.

_____, C. V. B.; HORII, J.; A. A. PIZZIRANIKLEINER. Fusão de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por floculação e produção de H₂S. **Scientia Agricola.** Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 1-8, 1 jan. 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161998100012>>. Acesso em: 01 ago. 2015.

MELLO, L.M.R. Atuação do Brasil no mercado vitivinícola Mundial. **Uvibra.** Disponível em: <http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2007a2012_out.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2015

_____. Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2010. **Uvibra.** Disponível em: <<http://www.uvibra.com.br/pdf/Panorama%202010%20%20Vitivinicultura%20Brasileira.pdf>>. Acesso em: 21 abr. 2015.

MENEGOTTO, Morgana. **Isolamento e seleção de leveduras para vinificação obtidas de uvas da Região do Vale do São Francisco,** 2010. 85f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2010.

MORENO-ARRIBAS, V. M.; POLO, C. **Wine Chemistry and Biochemistry.** New York: Springer, 2008.

NASCIMENTO, Taisa Silva. Efeitos da utilização de leveduras selvagens selecionadas na fermentação industrial. 2012. 42 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Biocombustíveis. **Faculdade de Tecnologia de Araçatuba.** Araçatuba, 2012. Disponível em: <http://www.fatecaracatuba.edu.br/suporte/upload/Biblioteca/BIO_17721207170.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2015.

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

NUNES, E. O. **População de fungos e filamentos e sua relação com micotoxinas presentes na uva e no vinho de Santa Catarina.** Florianópolis, 2008. 101 f. (Tese – Doutorado em Engenharia Química)- Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

OLIVEIRA, Bruno Motta. Comportamento killer em leveduras associadas à fermentação espontânea do mosto da cana de açúcar de produtores de cachaça de alambique da BAHIA. **UEFS**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, 2009. Disponível em: www2.uefs.br/ppgbiotec/portugues/arquivos/.../bruno_motta_oliveira-dissertacao.pdf. Acesso em: 10 out. 2015.

PARAPOULLI, M. *et al.*; **Comparative proteomic analysis of alcoholic fermentation employing a new environmental strain of *Saccharomyces cerevisiae***. *Process Biotechnology*, v.45, p.1094-1102, 2010.

PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. E. S. **Study on the Fermentation Process in a Sugarcane Mil and an Optimization Proposal**. *Revista de Ciência & Tecnologia*, Piracicaba, v. 16, n. 32, p. 59-68, 20 jun. 2011.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

PFEIFFER, P.; RADLER, F. **Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2**. *Archives of Microbiology*, v.137, n.4, p.357-361, 1984.

PHAM, T. *et al.* **Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'wild' yeast contaminants**. *J I Brewing*.v. 117, n.4, p. 556-568, 2011.

POLETO, C. M.; SILVA, G. A.; POLI, J. S. **6º encontro de iniciação científica da Embrapa Uva e Vinho; 2º encontro de pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho**. 2008, Bento Gonçalves. *Repicagens sucessivas e sua influência sobre o perfil metabólico de leveduras*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; 2008. p. 50-50.

POLI, J. S. **Condições para detecção e expressão do fator killer produzido por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente. Porto Alegre, RS, 2009.

PÖTTER, G. H. **Efeito da desfolha e do armazenamento de cachos em câmara fria antes do esmagamento em uvas e vinhos Chardonnay e Cabernet Sauvignon da região da Campanha, RS**. 2009. Dissertação – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia

PRETORIUS, Isak S.. **Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking**. Institute for Wine Biotechnology, University of Stellenbosch, África do Sul, v.16, 2000, p.675-729.

QUEROL, A. *et al.* **Adaptative evolution of wine yeast.** International Journal Of Food Microbiology, Valencia, Espanha, v.86, p.3-10, 2003.

RATÓN, T.O. **Métodos moleculares de identificación de levaduras de interes biotecnológico.** Revista Iberoamericana de Micologia, v. 21, p. 15-19, 2004.

RIBÉREAU-GAYON, P., Dubourdieu, D., Done`che, B., Lonvaud, A. **Handbook of Enology.** The Microbiology of Wine and Vinifications, vol. 1, Wiley, West Sussex, England, 2000.

RIFFER, F.; *et al.* **Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast Saccharomyces cerevisiae.** Microbiology, v. 148, p.1317-1328, 2002.

ROS-CHUMILLAS, M. *et al.* Evaluation of rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. **Science direct.** Food Control, v. 18, n. 1, p. 33-39, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713505001805#>>. Acesso em: 15 set. 2015.

SANGORRÍN, M.P. *et al.* **Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four patagonian wineries.** International Journal of Food Microbiology, v.119, n.3, p.351-357, 2007.

SARTOR, S. **Caracterização química de uvas e vinhos goethe produzidos na Região de Urussanga – Santa Catarina.** Dissertação - Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

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

_____; TIPPER, D.J. **Sequence of de M28 dsRNA: Preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin.** Virology, v.213, n.2, p.341-351, 1995.

SCHNEIDER, L. **Dinâmica Locacional da Vitivinicultura: Novas Regiões do Rio Grande do Sul e Vale do São Francisco.** Piracicaba, 2006. 118 f. (Dissertação – mestrado em Ciências)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

SHERMAN, F. **Getting started with yeast.** Methods in Enzymology, v. 194, 1991.

SHI, H. et al. Establishment of a viable cell detection system for microorganisms in wine based on ethidium monoazide and quantitative PCR. **Science direct**. Food Control, v.27, n.1, p. 81-86, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512001193>>. Acesso em 15 set. 2015.

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

_____. **Comportamento de leveduras isoladas no Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves - RS com relação à atividade killer**. In: IX Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves-RS, 1999(a).

_____. *et al.* FICAGNA, E. **Influência da tecnologia vitícola e vinícola na cor dos vinhos**. IN: X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 1, 2003, Bento Gonçalves. Características fermentativas de quatro linhagens de leveduras autoctones e uma linhagem comercial. Bento Gonçalves: Embrapa, 2003. p. 213-214.

_____. **Influência da concentração de levedura sobre o vinho tinto cabernet sauvignon**. In: X Congresso brasileiro de viticultura e enologia - XI Congresso brasileiro de viticultura e enologia - II Seminário franco-brasileiro de viticultura e enologia, 1., 2005, Bento Gonçalves. Bento Gonçalves: Editado por Celito Crivellaro Guerra e Sandra de Souza Sebben, 2005a. v. 1, p. 345-345.

_____. **Qualidade em alimentos**. A importância da ciência e tecnologia de alimentos nos processos industriais. In: I Encontro regional e II Semana Acadêmica de química industrial de alimentos, 1., 2004, Concordia-SC. Importância do uso de leveduras selecionadas na elaboração de vinhos, 2004, p. 7-7.

_____. **Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification**. Brazilian Archives of Biology and Biotechnology, v. 55, n. 2, 2012.

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

_____. **Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação da cv. Cabernet Sauvignon**. XII Congresso brasileiro de viticultura e enologia, 2008^a, Bento Gonçalves. Anais. Bento Gonçalves: Embrapa, 2008a. p. 160.

_____; ALMEIDA, E. A. **Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens***. Brazilian Archives Biology and Technology, 49, p. 165-177, 2006.

_____; DALARMI, L. **Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra 2003**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2003. X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, p. 214. Dez. 2003. Resumo.

_____; GAVA, R.; SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. R. **Fungicidas empregados na Viticultura e sua Ação sobre Atividade de Leveduras Autóctones e Seleccionadas**. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos SINAFERM, 29 de julho a 01 de agosto, Curitiba - PR, 2007.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. Chinarelli. **Yeasts maintenance for freezing at -200°C**. Rbac, s. i., v. 40, n. 1, p. 73-74, 1 jan. 2008.

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

SIPI CZKI, M. *et al.* **Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery**. Antonie van Leeuwenhoek. v. 79, n.1, p. 97-105. 2001.

SWIEGERS, J. H. *et al.* **Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour**. Australian Journal of Grape and Wine Research. v. 11, n.2, p. 139-173. 2005.

The structure of *Saccharomyces cerevisiae* Met8p, a bifunctional dehydrogenase and ferrochelataze. **University of Kent Biosciences**. Disponível em: <<https://kar.kent.ac.uk/71/>>. Acesso em: 20 set. 2015.

THOMAS, D.; SURDIN-KERJAN, Y. **Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae***. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 61, n.4, p. 503-532. 1997.

TONIETTO, J. **Indicação geográfica Vale dos Vinhedos: sinal de qualidade inovador na produção de vinhos brasileiros**. In: V Simpósio Latino-Americano sobre investigação e extensão em pesquisa agropecuária. V Encontro da Sociedade Brasileira de Sistemas de Produção, Florianópolis, 2002. Florianópolis: Anais, p.1-16, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. **Microbiology - An introduction**. 10 ed. São Francisco: Pearson, 2010.

_____. **Microbiologia**. 6ª ed. Artmed, 2000.

TUFARIELLO, M. *et al.* **Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile profile of Negroamaro wines**. LWT - Food Science and Technology. v. 58, n.1, p. 35-48. 2014.

UGLIANO, M. *et al.* **Effect of Nitrogen Supplementation and *Saccharomyces* Species on Hydrogen Sulfide and Other Volatile Sulfur Compounds in Shiraz Fermentation and Wine**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 57, n.11, p. 4948-4955. 2009.

_____; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P. **Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. v. 38, n.3, p. 423-429. 2011.

VELLOSO, C. Q. **Indicação Geográfica e desenvolvimento territorial sustentável: A atuação dos atores sociais nas dinâmicas de desenvolvimento territorial a partir da ligação do produto ao território (Um estudo de caso em Urussanga, SC)**. 2008. Dissertação – Curso de Pós-graduação em Agrossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

WHITE, T.J. **PCR Protocols – A guide to methods and applications**. London: Academic Press Limited, 1990.

WICKNER, R.B. **“Killer character” of *Saccharomyces cerevisiae*: curing by growth at elevated temperature**. Journal of Bacteriology, v.117, n.3, p.1356-1357, 1974.

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. **Embrapa**. Campinas, v. 1, n. 2, p. 24-27, dez. 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/busca-de-publicacoes/-/publicacao/957231/evaluation-of-isolated-yeasts-from-grapes-of-pinto-bandeira-region-bento-goncalves-rs-in-relation-to-production-of-h2s-and-fermentation-rate>>. Acesso em: 26 ago. 2015.

_____. Caracterização de leveduras vínicas provenientes do município de Pinto Bandeira (RS) e da região metropolitana de Curitiba (PR). 2012. 135f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas. **Universidade Federal do Paraná**. Curitiba, 2013. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/30640>>. Acesso em: 23 ago. 2015.

WOODS, D. R.; BEVAN, E. A. **Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae***. J. Gen. Microbiol., v. 51, p. 115-126, 1968.

YAMAMOTO et al. **Electrophoretic karyotypes of wine yeasts**. American Journal of Enology and Viticulture, v.4, p.358-363, 1991.

ZOECKLEIN, B. W. *et al.*; **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 2001.