



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO RIOGRANDE DO SUL – *Campus* BENTO
GONÇALVES CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

SHEILA CANOSSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE
UVAS DA CULTIVAR GOETHE PRODUZIDAS NO MUNICÍPIO DE MONTE BELO
DO SUL-RS**

Orientador: Prof. MSc André
Mezzomo

Bento Gonçalves, Março 2023.

SHEILA CANOSSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE
UVAS DA CULTIVAR GOETHE PRODUZIDAS NO MUNICÍPIO DE MONTE BELO
DO SUL-RS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – *Campus* Bento Gonçalves como pré-requisito para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. MSc André Mezzomo

Bento Gonçalves, Março de 2023.

SHEILA CANOSSA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE
UVAS DA CULTIVAR GOETHE PRODUZIDAS NO MUNICÍPIO DE MONTE BELO
DO SUL-RS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – *Campus* Bento Gonçalves como pré-requisito para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof. MSc^a André Mezzomo

BANCA EXAMINADORA

Aprovado em:

Prof. MSc. André Mezzomo (Orientador)

Prof.^a Dr.^a Luciana Pereira Bernd

Prof. Dr. Evandro Ficagna

Bento Gonçalves, Março de 2023.

“NINGUÉM CAMINHA SEM APRENDER A CAMINHAR, SEM APRENDER A
FAZER O CAMINHO CAMINHANDO, REFAZENDO E RETOCANDO O SONHO
PELO QUAL SE PÔS A CAMINHAR”

Paulo Freire.

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo imensamente a Deus, pela vida, pela oportunidade do aprender e do ensinar. Por todo dia me dar forças para buscar o conhecimento e assim evoluir profissionalmente e espiritualmente.

Agradeço imensamente aos meus pais, Adelar Canossa e Denilze Canossa, pela vida, pelo apoio, pelo amor, carinho e abraço. Pela mão amiga de todas as horas. VOCÊS SÃO MEU BEM MAIS PRECIOSO, MEUS MELHORES AMIGOS. AMO VOCÊS.

À minha Vovó Tezouro, Leda Canossa, por me abençoar todos os dias, por me escutar, me apoiar e acreditar no meu potencial. Te amo infinitamente.

A banca Prof^a. Luciana Bernd e Prof Evandro Ficagna pelas considerações e por contribuir neste trabalho. Também por todo conhecimento dividido ao longo da graduação. Muito obrigada.

Ao meu orientador Professor MSc. André Mezzomo por me direcionar, pela paciência, amizade, comprometimento. Te admiro como pessoa e profissional.

À Paula Miotto pela amizade, pelo carinho e pelas inúmeras ajudas.

À Embrapa Uva e Vinho por ceder o espaço e colaborar com este trabalho.

Ao Pesquisador Dr Fábio Rossi Cavalcanti, pelo apoio, por ceder o espaço para conclusão deste trabalho. Meu Muito Obrigada.

E por fim, mas não menos importante, ao IFRS pela oportunidade de ensino.

RESUMO

A transformação do mosto de uva em vinho envolve uma série de ações combinadas de diferentes gêneros e espécies de microrganismos. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* domina a fase intermediária e a fase final da fermentação alcoólica. De modo geral, as leveduras enológicas podem ser caracterizadas pela capacidade fermentativa, produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio) e seu comportamento killer. Neste estudo foram avaliadas a capacidade fermentativa, formação de H₂S, fator killer e sensibilidade ao fator killer de 38 leveduras provenientes das cultivares Goethe oriundas Monte Belo do Sul- RS. A capacidade fermentativa foi avaliada juntamente com a formação de H₂S, inoculando as leveduras em meio mosto sulfito. Os testes ao fator killer e sensibilidade ao fator killer foram avaliados através do meio mosto (80:20). As linhagens com nula produção de H₂S foram identificadas por amplificação da região ITS1- 5.S- ITS2 por PCR e por PCR-RFLP. Das Linhagens isoladas, 21 apresentaram capacidade fermentativa adequada quando comparadas com as linhagens de referência POP e Y904. Verificou-se que 44,8 % das linhagens isoladas mostraram-se metabolicamente capazes de biossintetizar H₂S. Somente 7,9 % apresentaram comportamento killer e apenas 15,7 % mostraram sensibilidade à proteína killer. Os resultados apresentados sugerem ter relação com a safra, clima e cultivares utilizadas no isolamento.

Palavras chave: Leveduras, Sulfeto Hidrogênio, killer.

Abstract

The transformation of grape must into wine involves a series of combined actions of different genera and species of microorganisms. The species *Saccharomyces cerevisiae* dominates the intermediate and final stages of alcoholic fermentation. In general, oenological yeasts can be characterized by their fermentative capacity, production of H₂S (hydrogen sulfide) and their killer behavior. In this study, the fermentative capacity, H₂S formation, killer factor, and sensitivity to the killer factor of 38 yeasts from Goethe cultivars from Monte Belo do Sul-RS were evaluated. The fermentative capacity was evaluated together with the formation of H₂S, inoculating the yeasts in sulphite wort. Killer factor tests and killer factor sensitivity were evaluated using wort medium (80:20). Strains with zero H₂S production were identified by amplification of the ITS1-5.S-ITS2 region by PCR and by PCR-RFLP. Of the strains isolated, 21 showed adequate fermentative capacity when compared with the POP and Y904 reference strains. It was found that 44.8% of the isolated strains were metabolically capable of biosynthesizing H₂S. Only 7.9% showed killer behavior and only 15.7% showed sensitivity to the killer protein. The results presented suggest a relationship with the harvest, climate and cultivars used in isolation.

Keywords: Yeasts; Hydrogen sulfide; Killer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE UVAS DA CULTIVAR GOETHE PRODUZIDAS NO MUNICÍPIO DE MONTE BELO DO SUL – RS	11
3.1.1 INTRODUÇÃO.....	11
3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1.2.1 Coleta das Uvas	13
3.1.2.2 Teste da capacidade fermentativa.....	13
3.1.2.3 Acompanhamento da produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	13
3.1.2.4 Detecção de fator Killer e sensibilidade ao fator killer	14
3.1.2.5 Identificação taxonômica de linhagens fermentescíveis e linhagens Killer por PCR-RFLP.....	14
3.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1.3.1 Teste de velocidade de fermentação	15
3.1.3.2 Produção de H ₂ S	18
3.1.3.3 Detecção proteína Killer	20
3.1.3.4 Sensibilidade e neutralidade ao fator killer	21
3.1.3.5 Identificações das linhagens por PCR-RFLP	23
3.1.4 CONCLUSÃO.....	26
3.1.5 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	27

1 INTRODUÇÃO

No século XVII iniciou o cultivo das primeiras videiras no Estado do Rio Grande do Sul. Uvas da espécie de *Vitis labrusca* ou *Vitis bourquina* foram inseridas inicialmente na viticultura brasileira, usadas na elaboração de vinhos de mesa. Entretanto somente em meados do século XX as primeiras cultivares de *Vitis vinifera* foram inseridas na viticultura brasileira para elaboração de vinhos finos e espumante (CAMARGO, 2009).

Robert Koch em 1879 desenvolveu a técnica de isolamento de culturas puras e demonstrou ser possível isolar linhagens com base em seu comportamento fermentativo e nas características de seus produtos. A partir disso, ficou claro que as fermentações alcólicas realizadas espontaneamente são resultado da ação combinada de diversas espécies de leveduras. Embora haja interações, as linhagens pertencentes à espécie de *Saccharomyces cerevisiae*, são as principais responsáveis pelas transformações dos açúcares em etanol (CATALUÑA, 1984).

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

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

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi isolar leveduras de bagas de uva da cultivar Goethe pertencente ao gênero *Vitis Labrusca* oriundas do município de Monte Belo do Sul/RS. A capacidade fermentativa, produção de H₂S e capacidade de floculação foram avaliadas inicialmente por gravimetria e interação do meio com a fita de acetato de chumbo. Posteriormente as linhagens não produtoras de H₂S foram avaliadas quanto sua atividade killer ou sensível e caracterizadas por biologia molecular da região ITS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar leveduras autóctones da cultivar Goethe do município de Monte Belo do Sul-RS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento das linhagens da cultivar Goethe de Monte Belo do Sul;
- Avaliar capacidade fermentativa e a produção de H₂S das linhagens isoladas;
- Determinar sensibilidade ao fator Killer com potencial enológico;
- Realizar a identificação genotípica das regiões ITS1-5.8S-ITS2 com os iniciadores ITS1 e ITS4 de leveduras que não produzirem H₂S.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROVENIENTES DE UVAS DA CULTIVAR GOETHE PRODUZIDAS NO MUNICÍPIO DE MONTE BELO DO SUL – RS

3.1.1 INTRODUÇÃO

As uvas são os frutos da videira pertencentes ao gênero *Vitis*, cujas inflorescências são denominadas cachos de uva (NAVARRE, 1997). A uva é constituída por casca ou película (6-12%), semente (2-5%) e polpa (85-92%). A película da uva contém uma camada cerosa denominada pruína cuja sua função é proteger a baga contra efeitos do calor e umidade e evitar a penetração de microrganismos causadores de doenças no interior da baga (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Sabemos que a polpa da uva é rica em açúcares, entretanto as leveduras encontram-se na pruína que envolve o exterior da película é nela que extrai os nutrientes necessários para sua perpetuação. As leveduras são fungos que habitam sob a película da uva e influenciam nos sabores e aromas dos vinhos (Silva et al. 1999 a). Ao esmagar a uva a polpa fica exposta e todo complexo microbiano presente na baga que, dependem da cultivar, solo e características climáticas, se dissolvem no meio permitindo assim seu desenvolvimento (Grainger & Tattersall, 2007). Contudo sem um rigoroso controle fermentativo dificilmente o vinho atingirá a qualidade desejada pelo consumidor. Na indústria de bebidas alcoólicas o controle, a prevenção e remoção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) é de suma importância. A formação deste gás pode degradar os produtos elaborados, acarretando perdas econômicas por conferir aromas sulfurados semelhante ao de ovo podre. A produção ou não de H₂S durante a fermentação alcoólica depende de vários fatores (SPIROPOULOS & BISSON, 2000), entre eles, a composição química do meio, a linhagem, a temperatura empregada durante o processo fermentativo, a concentração de compostos nitrogenados, o teor de compostos sulfurados, o estado de maturação da uva, resíduos de agrotóxicos, deficiência de alguns compostos orgânicos, pH e as práticas enológicas adotadas. A sulfitação é uma técnica enológica que consiste na adição de anidrido sulfuroso (SO₂) ao mosto com intuito de eliminar leveduras que possam conferir características organolépticas desagradáveis. As linhagens mais afetadas neste processo são as não-*Saccharomyces* por serem mais sensíveis a ação do SO₂ (GIOVANINNI E MANFROI, 2009).

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* por serem tolerantes ao etanol e ao SO₂ dominam o estágio intermediário e o final da fermentação. É muito comum no início do processo fermentativo, serem encontradas linhagens como *Pichia*, *Candida* e *Hanseniaspora* (COCOLIN et al., 2004). No ambiente das cantinas foram encontradas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera* e *Pichia* (SANGORÍN et al., 2007). Embora estas leveduras participem apenas do início da fermentação, elas produzem compostos de aroma que têm grande contribuição para a qualidade sensorial do vinho. Por isso, o estudo das propriedades metabólicas e fisiológicas das leveduras não-*Saccharomyces* pode ser importante para a indústria de vinhos (MAMEDE & PASTORE, 2004). A espécie *Kloeckera apiculata* por exemplo, possui capacidade de produzir altas concentrações de compostos voláteis como: álcoois superiores, ésteres e ácidos (GRANCHI et al., 2002).

Em 1963 Makower & Bevan observaram que determinadas linhagens, quando crescidas juntas, podiam apresentar dois comportamentos distintos. Uma linhagem poderia matar outra ou as duas poderiam conviver no mesmo ambiente sem apresentar inibição. A linhagem que mostrava capacidade de matar uma outra linhagem foi denominada de killer. A linhagem que morria por ação da linhagem killer foi chamada de sensível e a terceira linhagem que não apresentava capacidade de matar e nem de morrer foi designada como neutra. Somers & Bevan (1969) descobriram que o fator killer era controlado por dois tipos de determinantes genéticos citoplasmáticos. A produção da toxina killer, de natureza glicoprotéica, depende, portanto dos segmentos de RNA de cadeia dupla, situados no citoplasma da célula, estes segmentos são os plasmídeos M-dsRNA e L-dsRNA, sendo o primeiro o responsável pela produção da toxina killer e resistência à mesma. O segundo responde por sua própria replicação e a do MdsRNA. Portanto, para que a levedura seja portadora da toxina killer deve conter os dois tipos de ds-RNA. Caso estiver presente apenas a forma de L-A dsRNA a levedura apresentará sensibilidade ao fator killer (SILVA, 2003).

A biologia molecular possui técnicas para determinação taxonômica de leveduras que inclui a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR: Polymerase Chain Reaction). PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de segmento específico de DNA na presença de DNA polimerase. Cada ciclo de PCR envolve três etapas: Desnaturação, pareamento e extensão.

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi isolar leveduras a partir de bagas de uva da cultivar Goethe pertencente ao gênero *Vitis Labrusca* oriundas do município de Monte Belo do Sul/ RS. A capacidade fermentativa, produção de H₂S e capacidade de floculação foram avaliadas inicialmente por gravimetria e interação do meio com a fita de acetato de chumbo.

Posteriormente as linhagens não produtoras de H₂S foram avaliadas quanto sua atividade killer ou sensível e caracterizadas por biologia molecular da região ITS.

3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.2.1 Coleta das Uvas

O isolamento das leveduras foi efetuado em bagas de uvas coletadas na safra de 2020. Foram utilizados cachos de uvas da cultivar pertencentes à espécie *Vitis labrusca* Goethe oriundas de vinhedos da região de Monte Belo do Sul- Rio Grande do Sul. O isolamento das linhagens foi realizado por diluição em série, seguida por plaqueamento em meio sólido mosto ágar (SILVA, 1996). O meio sólido conteve por 100 mL, 1 g de extrato de levedura (Bacto TM Yeast Extract) 2 g de ágar (Bacto TM Ágar) e 25 mL de mosto de uva. As placas foram incubadas em estufa a 24 °C por 72 horas. As 38 linhagens isoladas da variedade de Goethe, receberam os códigos IM20, respectivamente, com a numeração de 1 a 38. Os procedimentos para o isolamento das leveduras seguiu metodologia descrita por Silva & Silva (1987). É importante salientar que todos os meios utilizados no presente trabalho foram esterilizados em autoclave vertical por 30 minutos a 121 °C.

3.1.2.2 Teste da capacidade fermentativa

Para acompanhar a curva de fermentação de cada linhagem isolada, avaliou-se a formação de CO₂ por gravimetria (CIANI & FATICHENTI 2001) em intervalos de 24 horas por 96 h (4 dias). Linhagens POP e Y904 foram utilizadas como padrão fermentativo.

3.1.2.3 Acompanhamento da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

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

3.1.2.4 Detecção de fator Killer e sensibilidade ao fator killer

O teste de detecção ao fator killer juntamente com o de sensibilidade ao fator killer foram determinados de acordo com da Silva (1996). Foi empregado o meio Lorena 80/20 na proporção de 80 mL de mosto da cultivar Lorena e 20 ml de extrato de levedura. A técnica de detecção do fator killer consiste em transferir com o auxílio da alça de cromo/níquel, massas pontuais em duplicata de células em estudo sob o meio sólido. Antes de aplicar as massas pontuais das linhagens, foram transferidos 100 mL de uma suspensão de células com 10^7 cél.mL⁻¹ da linhagem sensível UCD522, para placa de Petri, contendo o meio sólido. As células foram uniformemente espalhadas com o auxílio da alça de Drigalski.

O teste de sensibilidade ao fator killer foi realizado da seguinte forma: em cada placa foram semeadas 100 µL da suspensão de células contendo 10^7 cél.mL⁻¹ de cada linhagem isolada. As células foram uniformemente espalhadas na placa de Petri com o auxílio da alça de Drigalski. Posteriormente, foram aplicadas massas pontuais da linhagem killer comercial em triplicata. As placas foram mantidas em estufa 24 °C por 48 a 72 horas.

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

A extração do DNA das linhagens foi realizada a partir do congelamento e descongelamento das suspensões conforme descrito por Silva et al. (2012). Foram utilizados os primers o ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (AGUSTINI et al., 2014). O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1,5 %, corado com uma solução de 0,5 µg.mL⁻¹ de brometo de etídeo durante 20 minutos e fotodocumentado por meio de fotodocumentador Biorad Molecular Imager Gel DCOTM, empregando o software Image lab™ Software (USA) (Biorad - USA). O programa utilizado foi o seguinte: um ciclo de desnaturação de 95 °C por cinco minutos; 40 ciclos de 95 °C por trinta segundos; 60 °C por um minuto; 72 °C por um minuto e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

A identificação das linhagens foi realizada pela técnica de RFLP. As enzimas endonucleases utilizadas foram: CfoI (Sigma) (5' CC↓GCG 3') e Hae III (Sigma) (5' GC↓CTNA 3').

As reações com as enzimas citadas acima foram realizadas conforme instruções do fabricante. A detecção dos amplicons gerados com a ação das endonucleases se deu por eletroforese em gel de agarose 3 % em solução tampão TBE1x. O volume final da reação foi de 10 µl, esse volume foi posteriormente homogeneizado com 3 µl do tampão de corrida e aplicado no gel.

3.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.3.1 *Teste de velocidade de fermentação*

Pasteur em 1866 demonstrou que as leveduras eram responsáveis pela transformação de açúcares em etanol. Segundo da Silva et al. (2005), a evolução de CO₂, medida por gravimetria, se assemelha às fases do crescimento celular em batelada, ou seja, Fases lag, exponencial, desaceleração e estacionária. A fase lag é responsável pela intensa multiplicação celular e adaptação ao meio (PIRT, 1985). Finalizada a adaptação no meio, inicia-se a fase exponencial, caracterizada pelo grande desprendimento de dióxido de carbono (CO₂), aumento de temperatura do mosto, redução da densidade e aumento na produção de álcool. Nesta fase, se observa, como já dito, um movimento intenso da massa líquida. A esta fase se dá o nome de tumultuosa. A fase de desaceleração e estacionária são caracterizadas pela redução expressiva da velocidade liberação CO₂.

Sabe-se que o papel primário das leveduras vínicas é catalisar de forma rápida, completa e eficiente conversão do açúcar da uva, em especial as hexoses, em etanol, dióxido de carbono e outros componentes, como ésteres ácidos voláteis e glicerol, considerados de grande importância como metabolitos indutores de *flavour* (BAUER & PRETERIUS, 2000).

As linhagens da cultivar Goethe 1 GM/20, 6 GM/20, 7 GM/20, 8 GM/20, 11 GM/20, 13 GM/20, 15 GM/20, 17 GM/20, 18 GM/20, 21 GM/20, 30 GM/20 e 38 GM/20 apresentaram alto potencial fermentativo, conforme demonstrados na Figura 1. Resultado é visível quando comparado com a evolução exponencial de CO₂ que apresentaram as linhagens referência de *Saccharomyces cerevisiae* POP e Y904 (Figura 2). As linhagens 3 GM/20, 4 GM/20, 19 GM/20, 26 GM/20, 33 GM/20 e 34 GM/20 apresentaram médio potencial fermentativo, seguido das linhagens 2 GM/20, 5 GM/20, 9 GM/20, 14 GM/20, 16 GM/20, 27 GM/20 com baixo poder fermentativo.

Processos metabólicos essenciais vinculados ao crescimento celular, requerem biossíntese de energia, a qual está, em geral, correlacionada diretamente à produção de CO₂ (THORNTON, 1991).

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

As leveduras não-*Saccharomyces* crescem bem durante estágios iniciais da fermentação, quando a concentração de etanol ainda é baixa, sendo substituídas posteriormente por *Saccharomyces* tolerantes ao etanol e a elevadas concentrações de açúcares. No presente estudo diversas linhagens apresentaram alto potencial fermentativo. O isolamento de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* parece ter relação com a cultivar. Wlodarczyk et al. (2012), isolando leveduras das cultivares Cabernet Franc, Ancellotta e Tannat da região de Pinto Bandeira- RS, encontraram 16 linhagens todas oriundas da cultivar Ancellotta, com potencial fermentativo para elaboração de vinhos, ou seja, alta velocidade de fermentação, com características neutras, em relação ao fator Killer e nula produção de sulfeto de hidrogênio. Outro estudo realizado por Bonet et al. (2015) mostrou que na cultivar Goethe nenhuma linhagem isolada apresentou capacidade fermentativa adequada. Outro estudo encontrou apenas três linhagens fermentáveis na cultivar Moscato Tradicional da região de Farroupilha-RS (CANOSSA et al. 2015).

Estudo realizado por Kraková et al. (2011), a fim de investigar a diversidade genética das leveduras presentes no mosto durante a fermentação, na Eslovenia, mostrou que linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram encontradas somente durante a fermentação alcoólica, onde, na fase inicial do processo, as linhagens que predominavam foram as não-*Saccharomyces*. A baixa incidência de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* antes da fermentação dever-se pela baixa concentração de células no meio. Segundo Barata et al. (2012), a proporção existente entre os microrganismos que habitam a baga da uva depende do estágio de maturação e da disponibilidade de nutrientes.

FIGURA 1. EVOLUÇÃO DE CO₂ DAS LINHAGENS DA CULTIVAR GOETHE, COMPARADO COM AS LINHAGENS PADRÃO POP E Y904

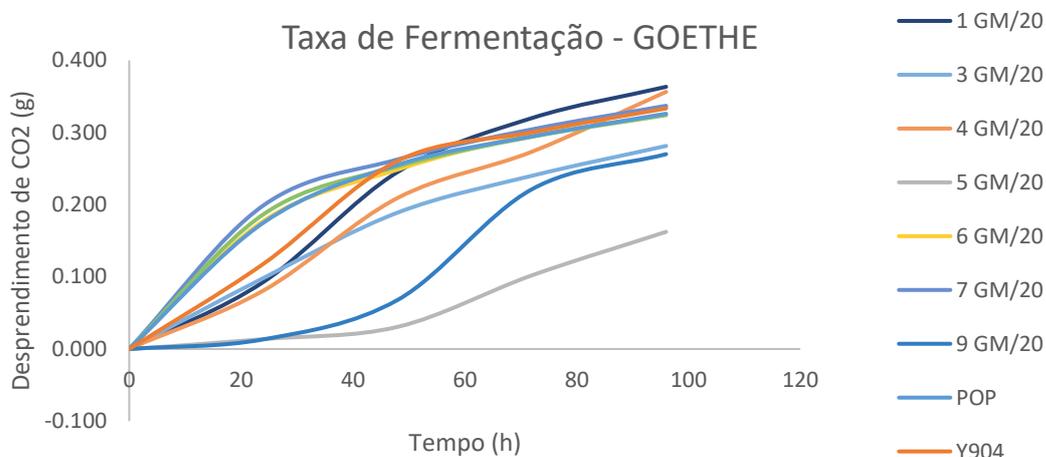
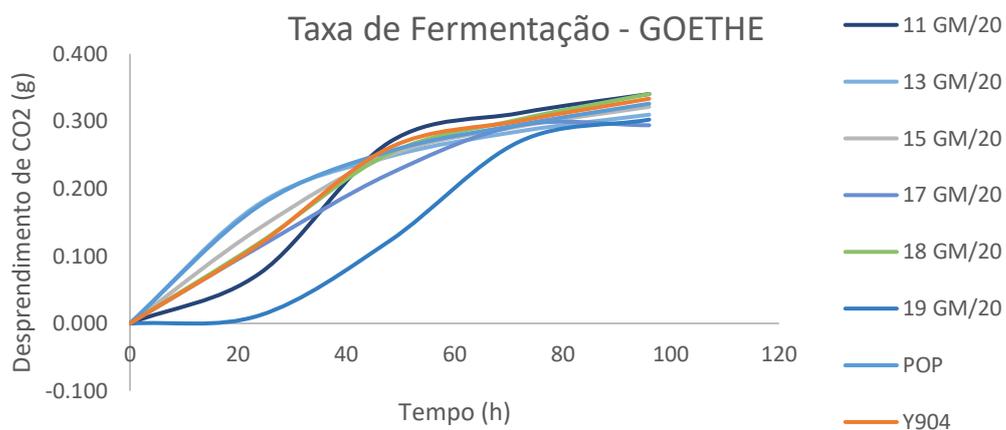


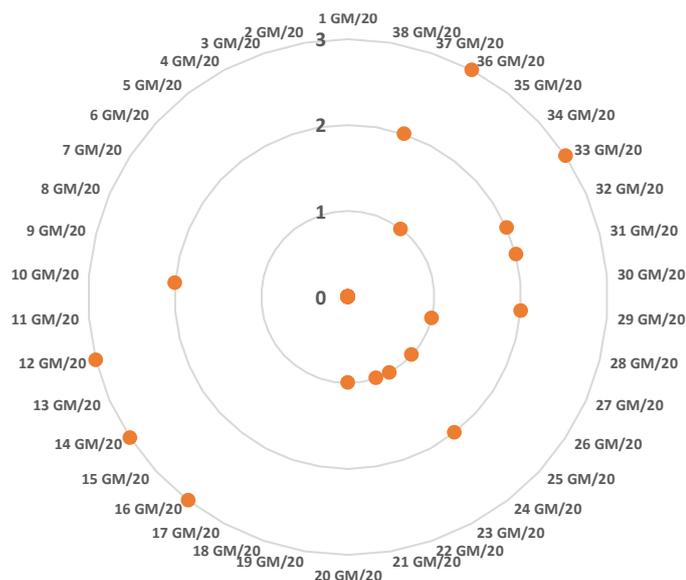
FIGURA 2. EVOLUÇÃO DE CO₂ DAS LINHAGENS DA CULTIVAR GOETHE, COMPARANDO COM AS LINHAGENS PADRÃO POP E Y904



3.1.3.2 Produção de H₂S

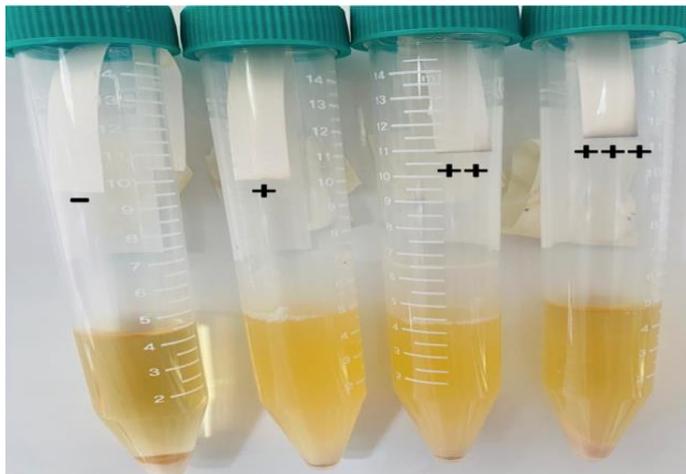
Considerando todas as leveduras aqui estudadas, o que fez um total de 38 linhagens isoladas observou-se que 15,7 %; 15,7 % e 13,1 %, das linhagens apresentaram respectivamente, baixo, médio e alto desprendimento de H₂S (figura 3).

FIGURA 3. NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE H₂S DAS LINHAGENS DA CULTIVAR GOETHE



As linhagens foram subdividas de acordo com a produção de H₂S pela notação “+++” indicando linhagens com alta produção, “++” com produção média e “+” linhagens com produção baixa (Figura 4). No total 36,8 % apresentaram-se capazes de produzir H₂S.

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



O sulfeto de hidrogênio é metabolizado pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, e sua ocorrência em vinhos está associada a um defeito organoléptico que remete a ovo podre, comumente conhecido como aroma reduzido (EISENMAN, 2013). Entretanto se forem adicionados ao mosto suplementos nutricionais, como exemplos ativantes de fermentação, pode ocorrer a formação de 3- mercaptohexano-1-ol (3MH) e acetato de 3- mercaptohexil (3MHA), responsáveis pelo aroma frutado e decréscimo na concentração de H₂S (WINTER et al., 2011).

O sulfeto de hidrogênio apresenta um limiar de percepção baixo (0,9 a 1,5 ppb) (LABORATORIES, 2001) sendo a principal causa de perdas da qualidade aromática dos vinhos (HUANG et al., 2014).

A remoção do H₂S do vinho é complexa e problemática, pois é necessária a aeração do vinho, e conseqüentemente a perda de compostos voláteis importantes, causando também possíveis oxidações.

O uso de fungicidas no cultivo da videira pode ser uma fonte de precursores ou de indutores seletivos para a formação do H₂S. Estes produtos podem conter resíduos de enxofre elementar, o qual é diretamente reduzido a H₂S (JIRANECK; LANGRIDGE HENSCHKE,1995).

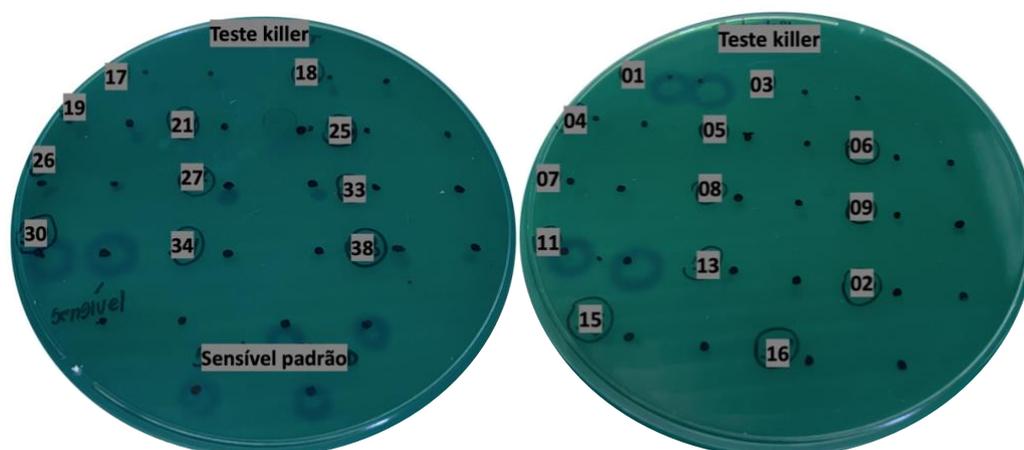
Resultado semelhante ao de Wlodarczyk et al. (2012) onde 35,8 % das 120 linhagens isoladas da região de Pinto Bandeira- RS provenientes de cultivares tintas, apresentaram despreendimento de sulfeto de hidrogênio. Outro estudo realizado em Pinto Bandeira na safra de 2012, onde foram selecionadas 79 linhagens de duas cultivares tintas e 46,84 % apresentaram capacidade de biossintetizar H₂S (CANOSSA et al., 2012). Silva & Dalarmi (2003) isolaram 100 leveduras a partir da cultivar Cabernet Sauvignon no Vale dos Vinhedos sendo 79 linhagens

produtoras de H₂S. Outro estudo com a cultivar Goethe da região de Urussanga-SC mostrou que 70 % dos isolados apresentou desprendimento de gás sulfídrico (BONET et al., 2015). Estudo realizado por CANOSSA et al. (2015) em isolados da cultivar Moscato Tradicional mostrou que 76 % das linhagens isoladas mostraram-se metabolicamente capazes de biossintetizar H₂S. Frente aos estudos pode-se concluir que a capacidade de produzir sulfeto de hidrogênio pode estar atrelado diretamente a cultivar, região ou tratamentos sanitários necessários para as diferentes cultivares.

3.1.3.3 Detecção proteína Killer

Das 38 linhagens isoladas da cultivar Goethe oriundas de Monte Belo do Sul –RS apenas 3 linhagens apresentaram comportamento Killer (7,89 %) apresentando halo de morte em torno da linhagem sensível UCD 522 (Figura 5). Estudo realizado por Silva (1996) no município de Bento Gonçalves- RS, demonstrou que 24,7 % dos microrganismos isolados apresentaram fenótipo killer.

FIGURA 5. HALO DE MORTE PROVOCADO POR ALGUMAS DAS LEVEDURAS ISOLADAS NA LINHAGEM EMBRAPA 522USS



As linhagens que apresentaram comportamento killer foram 1 GM/20, 11 GM/20 e 30GM/20. De acordo com Sangorrín et al. (2001) foi observado que 42 % das linhagens isoladas de mosto em fermentação das variedades Malbec e Merlot apresentaram fenótipo Killer. Na região de Pinto Bandeira- RS 6,33 % das linhagens apresentaram comportamento Killer (CANOSSA, et al., 2012). Outro estudo realizado na região Norte da Patagônia, mostrou que 35 % das linhagens isoladas apresentaram atividade killer (SANGORRÍN et al., 2007). É

importante selecionar leveduras neutras, ou seja, com fenótipo K^-R^+ , em processos não estéreis onde possam contribuir, com sua atividade metabólica, para aumentar a qualidade ou mesmo imprimir características regionais ao produto elaborado (SILVA 1996; ORTIZ et al.2013). Silva (1996) ressalta ainda que as leveduras devem ser selecionadas por suas características enológicas e não por sua atividade “killer”.

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

3.1.3.4 Sensibilidade e neutralidade ao fator killer

No município de Monte Belo do Sul, na safra de 2020 apenas 15,7 % das linhagens isoladas apresentaram sensibilidade a proteína killer e 28,9 % das linhagens apresentaram-se neutras (Tabela 1). Na figura 6, podemos verificar o halo de morte presente nas linhagens com fenótipo K^-R^- , conhecido como sensível.

FIGURA 6. HALLO DE MORTE PRESENTE NAS LINHAGENS SENSÍVEIS AO FATOR KILLER

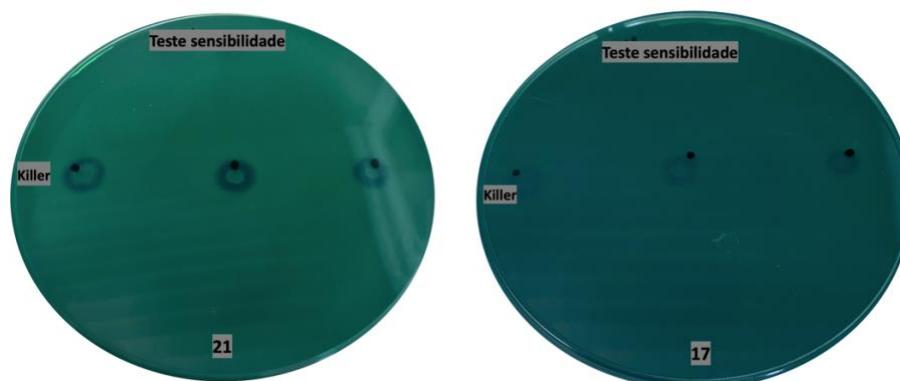


TABELA 1. PANORAMA GERAL DAS LINHAGENS KILLER, NEUTRA, SENSÍVELE PRODUTORAS DE H₂S ISOLADAS

Fenótipo	Leveduras	Total	Total em porcentagem(%)
Sensível	4GM/20, 15GM/20, 17GM/20, 18GM/20, 19 GM/20, 21GM/20,	6	15,7
Killer	1GM/20, 11GM/20, 30GM/20	3	7,9
Neutro	2GM/20, 3GM/20, 9GM/20, 5GM/20, 6GM/20, 7GM/20, 8GM/20, 13GM/20, 26GM/20, 27GM/20, 34GM/20, 38GM/20	12	31,6
Produtoras H₂S	10GM/20, 12GM/20, 14GM/20, 16GM/20, 20GM/20, 22GM/20, 23GM/20, 24GM/20, 25 GM/20, 28GM/20, 29GM/20, 31GM/20, 32GM/20, 33GM/20, 35GM/20, 36GM/20, 37GM/20	17	44,8
Total		38	100%

FONTE: Autor (2023)

A atividade killer depende da interação entre a população microbiana existente na microflora da uva, bem como aos fatores ambientais típico da região de origem das leveduras. As leveduras sensíveis à toxina killer dependem de alguns fatores, tais como, o tipo da toxina que as linhagens killer produzem, a linhagem de leveduras expostas à toxina, bem como a fase de crescimento da mesma e o estado da cultura (BARTUNEK et al., 2001). De acordo com Bonet et al. (2015) com a mesma cultivar na região de Urussanga-SC, mostrou que 76 % das linhagens isoladas apresentaram sensibilidade ao fator killer. Já na Patagônia-Argentina, 40m% das leveduras isoladas apresentaram sensibilidade ao fator Killer e apenas 25,% apresentaram-se neutras (SANGORRÍN et al., 2007). No ano de 2012, nenhuma das 79 linhagens isoladas de Pinto Bandeira apresentaram sensibilidade ao fator killer (CANOSSA et al., 2012). De acordo com Canossa et al. (2012) a frequência de linhagens killer, sensível e neutra depende do ambiente de onde foram isoladas e especialmente das linhagens de referência empregadas.

3.1.3.5 Identificações das linhagens por PCR-RFLP

De acordo com Beltran et al. (2002) as linhagens predominantes na superfície da uva da cultivar Garnatxa foram as espécies *Candida stellata* e *Hanseniaspora uvarum*. No ano de 1996, os mesmos autores encontraram apenas a espécie *Hanseniaspora uvarum* e em 1999 apenas *Saccharomyces cerevisiae*. Bonet et al. (2015) ao isolar leveduras da baga de uva da cultivar Goethe de Urussanga-SC não obteve leveduras aptas para fermentação de vinhos. Com base nestes relatos podemos concluir que predominância da espécie de leveduras encontradas na superfície da baga esta estritamente relacionado com a safra, condições climáticas ou emprego de diferentes agentes fitossanitários, já que as condições climáticas mudam de um ano para outro.

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

LINHA: MARCADOR(M), BRANCO(B), 1GM/20, 2GM/20, 3GM/20, 4GM/20, 5GM/20, 6GM/20, 7GM/20, 8GM/20, 9GM/20, 11GM/20, 13GM/20, 15GM/20, 17GM/20, 18GM/20, 19GM/20, 21GM/20, 26GM/20, 27GM/20, 30GM/20, 34GM/20, 38GM/20, MARCADOR

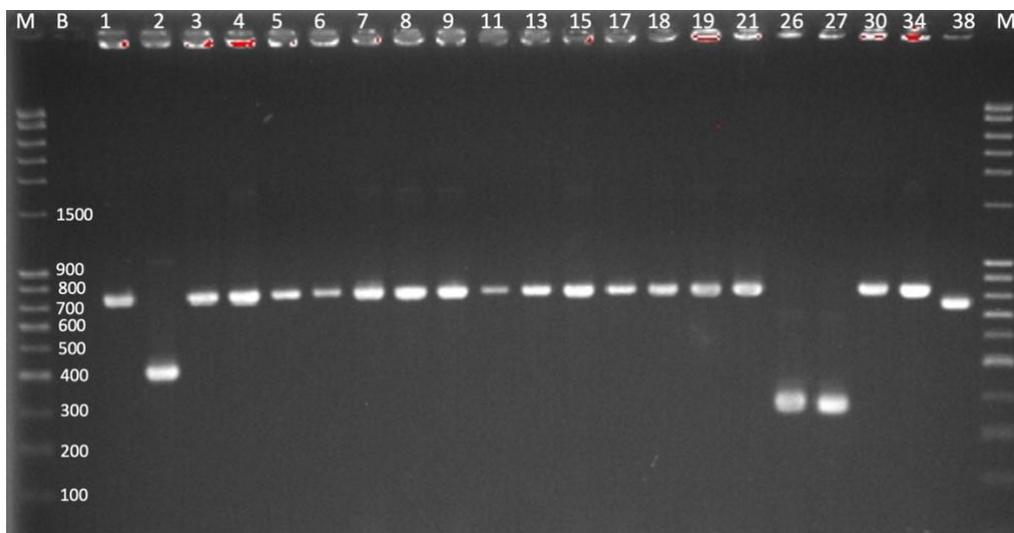


TABELA 2. PERFIL DAS LINHAGENS ISOLADAS DA VARIEDADE GOETHE POR PCR DA REGIÃO ITS

Linhagens	IT1-ITS4	Hae III	CfoI	Identificação
1GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2GM/20	450 pb	450	200, 170, 100	<i>C. zemplinina</i>
3GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
6GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
7GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
8GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
9GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
11GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
13GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
15GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
17GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
18GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
19GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
21GM/20	850 pb	300, 250,175,120	360,380	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
26GM/20	390 pb	300,80	360,380	<i>M. Pulcherima</i>
27GM/20	390 pb	300,80	290,120	<i>M. Pulcherima</i>
30GM/20	850 pb	300, 230,160, 110	100, 350,350	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
34GM/20	770 pb	770	350,350, 100	<i>H.uvarum</i>
38GM/20	770 pb	300, 230,160	350,350, 100	<i>Picchia Guilemondi</i>

FONTE: Autor (2015)

Grande quantidade de leveduras da espécie de *Saccharomyces cerevisiae* foram isoladas a partir da cultivar Goethe na safra de 2020, como mostra a tabela 2, todas apresentaram fragmento em 800-880 pares de base. A quantidade de 800-880 pares de base do amplicon obtido é característica da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (GUILLAMÓN et al., 1998). Fato também confirmado em estudo por Agustini et al. (2014). Foram isoladas também linhagens pertencentes a espécie de *C. zemplinina*, *M. Pulcherima*, *Picchia Guilemondi* e *Hanseniaspora uvarum*. Hierro et al. (2006) isolaram principalmente linhagens das espécies de *Hanseniaspora uvarum* e *Candida diversa* do mosto de uvas brancas.

Para a diferenciação destas espécies foi utilizada a técnica de PCR-RFLP com as enzimas de restrição CfoI, Hae II (figuras 5 e 6). Linhagens isoladas da cultivar Campbell, na Coreia, mostrou que a espécie representativa foi *Hanseniaspora uvarum* (Hong & Park, 2013). Canossa et al. (2015) obteve linhagens diversificadas em uvas brancas da região de Farroupilha, dentre elas *Candida diversa*, *Hanseniaspora uvarum*, *Starmerella bacillaris* e *Saccharomyces cerevisiae*.

FIGURA 8. PERFIS DOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO HAE III

LINHA: MARCADOR(M), 1GM/20, 2GM/20, 3GM/20, 4GM/20, 5GM/20, 6GM/20, 7GM/20, 8GM/20, 9GM/20, 11GM/20, 13GM/20, 17GM/20, 18GM/20, 19GM/20, 21GM/20, 26GM/20, 15GM/20.

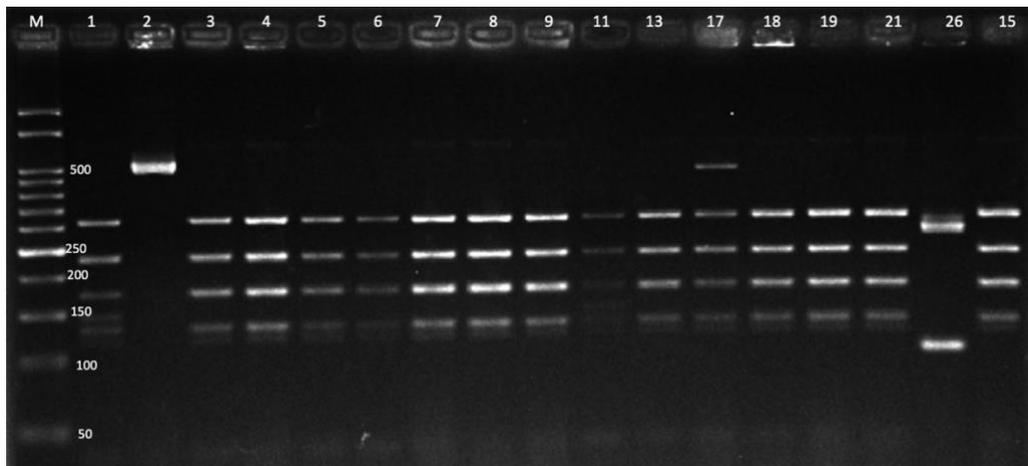
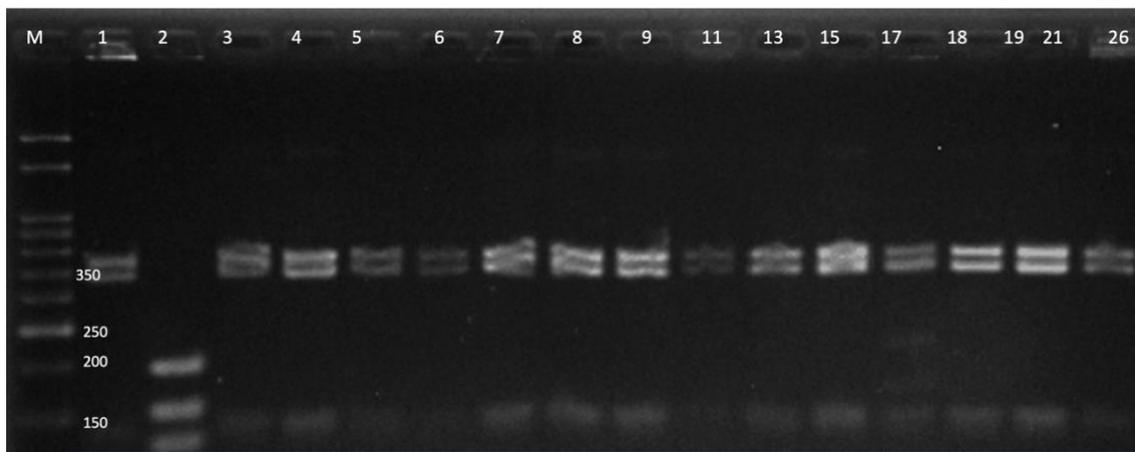


FIGURA 9. PERFIS DOS FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO CFOI

LINHA: MARCADOR(M), 1GM/20, 2GM/20, 3GM/20, 4GM/20, 5GM/20, 6GM/20, 7GM/20, 8GM/20, 9GM/20, 11GM/20, 13GM/20, 15GM/20, 17GM/20, 18GM/20, 19GM/20, 21GM/20, 26GM/20



3.1.4 CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos neste estudo, podemos identificar uma grande quantidade de linhagens aptas para fermentação de vinhos com boa capacidade de floculação. Foram selecionadas diversas leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando que a safra está diretamente relacionada com a espécie de levedura presente na baga de uva.

3.1.5 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AGUSTINI, B. C., SILVA, L. P., BLOCH, C., BONFIM, T. M. B., DA SILVA, G. A. (2014). Evaluation of maldi-tof mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(12):5645–5654.

AMORIN, L. P. et al. (1998). Aplicação de leveduras secas regionais em microvinificações controladas. In: *Anais do IV Simpósio de Viticultura do Alentejo*. v.2. Évora (Portugal), p 47-55.

BARATA, A., MALFEITO-FERREIRA, M., AND LOUREIRO, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol*, 153(3):243–259.

BAUER, F. F. PRETORIUS, I. S. (2000). Yeasts stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine. - a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21:27–51.

BONET, J. et al. Caracterização de leveduras isoladas de bagas de uva Goethe da região de Urussanga (SC) para a elaboração de vinhos. XV Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves (2015).

CAMARGO, U. A. (2009). Variedades de uva. In GUERRA, C. C., MANDELLI, F., TONIETTO, J., ZANUS, M. C., CAMARGO, U. A., editors, *Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos*. number 48 in Documentos, chapter 2, pages 17–30. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Embrapa Uva e Vinho., Bento Gonçalves - RS.

CANOSSA, S. Variabilidade genética de *saccharomyces cerevisiae* detectada por RAPD e caracterização de leveduras isoladas de cultivares de uvas brancas da região de Farroupilha – RS. Dissertação de mestrado UFRGS.

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

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

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

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

FLEET, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res*, 8(7):979–995.

- GRANCHI, L., GANUCCI, D., MESSINI, A., VINCENZINI, M. (2002). Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *kloeckera cortices* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res*, 2(3):403–407
- GRAINGER, K., & TATTERSALL, H. (2007). *Wine Production: Vine To Bottle*. (K. Grainger & H. Tattersall, Eds.), *Wine Production: Vine To Bottle*. Oxford, UK: K. Grainger & H. Tattersall 2005.
- HUANG, C., RONCORONI, M., GARDNER, R. C. (2014). MET2 affects production of hydrogen sulfide during wine fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(16):7125–7135.
- JIRANEK, V., LANGRIDGE, P., HENSCHKE, P. A. (1995). Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl Environ Microbiol*, 61(2):461–467.
- KRAKOVÁ, L. et al. (2012). Yeast diversity investigation of wine-related samples from two different Slovakian wine-producing areas through a multistep procedure. *Food Science and Technology*, v. 46, p. 406-411.
- GIOVANINI, Eduardo; MANFROI, Vitor. *Viticultura e Enologia: elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros*. 1 ed. Bento Gonçalves: IFRS, 2009.
- MAKOWER, M., BEVAN, E. A. (1963). The inheritance of a killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In Geerts, S., editor, *Genetics today*. Xith International Congress of Genetics., volume 1, page 202. Pergamon Press, Oxford.
- MAMEDE, O. M. E., PASTORE, G. M. (2004). Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da “serra gaúcha” (RS). *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 24(3):453–458
- NAVARRÉ, C. (1997). *Enologia: Técnica de Produção do Vinho*. p. 308. Publicações Europa-América. LDA.
- PIRT, S. J. (1985). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. 0-632-01455-5. Blackwell Scientific, Oxford, Osney Mead, Oxford, OX2 0EL, 2nd edition.
- RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D., DONÈCHE, B., LONVAUD, A. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*, volume 1. John Wiley & Sons Ltda, West Sussex PO19 8SQ, England, 2 edition.

- SANGORRÍN, M. P., GARCÍA, V., LOPES, C. A., SÁEZ, J. S., MARTÍNEZ, C., GANGA, M. A. (2013). Molecular and physiological comparison of spoilage wine yeasts. *J Appl Microbiol*, 114(4):1066–1074.
- SILVA, G. A. (1996). The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46(2):112–121.
- SILVA, G. A. (1999a). Comportamento de leveduras isoladas no Vale dos Vinhedos em Bento Gonçalves, RS, com relação à atividade killer. In Tonietto, J. and Guerra, C. C., editors, *Anais*.
- SILVA, G. A. (1999b). Evidência de uma linhagem de levedura com característica killer, neutra e sensível. In Tonietto, J. and Guerra, C. C., editors, *Anais do IX Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, page 169, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.
- SILVA, G. A. D., SILVA, M. A. A. A. D. (1984). Determinação qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio por leveduras vínicas. In Síntese: *Tecnologias Geradas pelo sistema EMBRAPA*. EMBRAPA-DDT, Brasília.
- SILVA, G. A., ALMEIDA, E. A. (2006). Production of yellow-green fluorescent pigment by *Pseudomonas fluorescens*. *Brazilian Archives Biology and Technology*, 49(3):411–419.
- SILVA, G. A., BERNARDI, T. L., SCHAKER, P. D. C., MENEGOTTO, M., VALENTE, P. (2012). Rapid yeast DNA extraction by boiling and freezethawing without using chemical reagents and DNA purification. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 55(2):319–327.
- SILVA, G. A., DALARMI, L. (2003). Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra de 2003. In Zanús, M. C., Laureano, O., de Melo, G. W. B., de Souza Seben, S., editors, *Anais do X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, page 214, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.
- SILVA, G. A., DALARMI, L. (2003). Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra de 2003. In Zanús, M. C., Laureano, O., de Melo, G. W. B., de Souza Seben, S., editors, *Anais do X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, page 214, Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.
- SILVA, G. A., GAVA, R., SÔNEGO, O. R., RESSURREIÇÃO GARRIDO, L. (2007). Fungicidas empregados na viticultura e sua ação sobre atividade de leveduras autóctones e selecionada. *VI SINAFERM e XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*.
- SILVA, G. A., GURAK, P. D., DS CASTRO, H. M., FARIAS, D. (2005). Influência da concentração de levedura sobre o vinho tinto Cabernet Sauvignon. In Guerra, C. C., de Souza Seben, S., editors, *Anais do X Congresso Latino- Americano de Viticultura e Enologia/XI Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia/II Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura e Enologia/*, page 345, Bento Gonçalves-RS. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.
- SILVA, G. A., GURAK, P. D., DS CASTRO, H. M., FARIAS, D. (2005). Influência da concentração de levedura sobre o vinho tinto Cabernet Sauvignon. In Guerra, C. C., de Souza Seben, S., editors, *Anais do X Congresso Latino- Americano de Viticultura e Enologia/XI*

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

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

SILVA, G. A., POLI, J. S., POLETTO, C. M., SCHAKER, P. D. C., VALENTE, P. (2011). Production of functional killer protein in batch cultures upon a shift from aerobic to anaerobic conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(3):601–612.

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

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

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

THORNTON, R. J. (1991). Wine yeast research in New Zealand and Australia. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4):327–345.

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

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