

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Gabriela Paiva Fioravanço**

**274430**

*Caracterização de leveduras isoladas de mosto de uvas Cabernet Franc da região de Bento  
Gonçalves, RS*

PORTO ALEGRE, março de 2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE AGRONOMIA**

**Caracterização de leveduras isoladas de mosto de uvas Cabernet Franc da região de  
Bento Gonçalves, RS**

**Gabriela Paiva Fioravanço**  
**274430**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como  
requisito para obtenção do Grau de Engenheira  
Agrônoma, Faculdade de Agronomia, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul.

Supervisor de campo do Estágio: Dr. Gildo Almeida da Silva

Orientador Acadêmico do Estágio: Professor Dr. Edson Bertolini

**COMISSÃO DE AVALIAÇÃO**

Prof. Pedro Alberto Selbach	Depto de Solos (Coordenador)
Prof. Alberto Vasconcellos Inda Júnior	Depto de Solos
Prof. Alexandre de Mello Kessler	Depto de Zootecnia
Prof. André Pich Brunes	Depto de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia
Prof. José Antônio Martinelli	Depto de Fitossanidade
Prof. Renata Pereira da Cruz	Depto de Plantas de Lavoura
Prof. Sérgio Luiz Valente Tomasini	Depto de Horticultura e Silvicultura

PORTO ALEGRE, março de 2021

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Marília, que possibilitaram minha permanência em outra cidade para a realização dos meus estudos, sendo sempre meus companheiros e me apoiando em todas as minhas decisões ao longo dessa caminhada, e que, mesmo longe, se fizeram presentes em todos os momentos da minha vida. Amo vocês incondicionalmente.

À minha irmã, Letícia, que mesmo à distância, construindo sua própria jornada, esteve sempre por perto me ajudando a superar os momentos difíceis. És a minha pessoa preferida do mundo.

À Embrapa Uva e Vinho, pela oportunidade e suporte à realização do estágio, e por disponibilizar toda estrutura necessária para que o mesmo fosse concluído.

Ao meu supervisor de estágio Dr. Gildo Almeida da Silva, pela convivência e pelos ensinamentos nestes meses transcorridos, sempre fazendo-o de forma leve e entusiasmada.

À equipe de laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho, Dra. Bruna Carla Agustini pela amizade e ensinamentos oferecidos, e à Maria Antonieta Luvison Morini por toda a paciência e suporte ao longo desses meses.

À Faculdade de Agronomia e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade e também pelos inúmeros valores que são transpassados no ambiente acadêmico.

Ao meu orientador e professor acadêmico Dr. Edson Bertolini, por todo suporte, paciência e ajuda durante o decorrer deste trabalho.

Aos meus amigos da agronomia que estiveram comigo nesses cinco anos de curso e que tornaram essa caminhada uma verdadeira alegria. Às amigas Roberta, Eduarda, Sofia e Antônia por todas as risadas e momentos bons divididos nesses anos. E um agradecimento especial à Marina Willadino, minha melhor amiga e companheira de todas as horas. Obrigada pela amizade e cumplicidade oferecidos desde o primeiro dia de aula.

Agradeço também às amigas de fora do curso que foram verdadeiros presentes de Porto Alegre, Rebeca e Bruna, por todo o suporte e alegrias divididos ao longo desses anos de amizade.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

## RESUMO

Este trabalho objetiva descrever as atividades realizadas durante o estágio curricular obrigatório do curso de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O estágio foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA), do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (CNPUV), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, no município de Bento Gonçalves, no período de janeiro a março de 2020. Efetuaram-se análises para a detecção da aptidão enológica de linhagens de leveduras para a produção de vinhos. As linhagens foram avaliadas quanto à velocidade de fermentação, produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), capacidade de produção de fator killer, e sensibilidade ou neutralidade a este fator. Verificou-se que 72,9% das leveduras mostram-se capazes de produzir H<sub>2</sub>S, enquanto 8,3% delas possuem capacidade killer, e 75% delas são sensíveis ao mesmo fator. Duas das 48 linhagens apresentaram comportamento fermentativo adequado, possuindo aptidão enológica.

**Palavra-chave:** Fermentação. Fator Killer. Sensibilidade. H<sub>2</sub>S. T84<sub>155-209</sub>.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1 - Tubos de ensaio com diluição de células em comparação com a escala de Der Walt e Yarrow (1984). .....	17
2 - Detecção da capacidade Killer e da sensibilidade ao fator Killer: retirada da levedura do tubo de ensaio (A), depósito da levedura como massa pontual sobre leveduras sensíveis tomadas como padrão. ....	19
3 - Tubos de ensaio com diferentes graus de produção de H <sub>2</sub> S, sendo A: nenhuma produção (-); B: baixa produção (+); C: média produção (++) ; D: alta produção (+++). ....	21
4 - Velocidade de fermentação das linhagens das leveduras da série T84: 155 a 164 (a); 166 a 174 (b); 176 a 186 (c); 188 a 198 (d); 202 a 209 (e), K1 e 1VVT97. ....	23
5 - Perfil killer – criação de halo de inibição - das linhagens da série T84 testadas em relação à linhagem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 26B84. ....	24
6 - Perfil killer – criação de halo de inibição - da linhagem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 186T84 à linhagem <i>Hanseniaspora opuntiae</i> 3GPEpUF17. ....	25
7 - Perfil de sensibilidade das linhagens <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 155T84 e <i>Meyerozyma guilliermondii</i> 167T84 em relação às linhagens killer <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1B84 (1) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 91B (2). ....	26
8 - Padrão de sensibilidade da linhagem 176T84 testada pelas 25 linhagens killer padrão, sendo inibida por todas elas. ....	26
9 - Gel de agarose com os produtos de PCR. ....	27
10 - Dendrograma das linhagens da série T84 <sub>155-209</sub> com relação à evolução de CO <sub>2</sub> , níveis de H <sub>2</sub> S, capacidade killer e sensibilidade ao fator killer de linhagens padrão. ....	28

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
<b>2 CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO</b>	<b>8</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>9</b>
3.1 Serra Gaúcha e Vale dos Vinhedos	9
3.2 Processo de vinificação	9
3.3 Uvas Cabernet Franc	10
3.4 Indicações Geográficas e “Terroir”	10
3.5 Leveduras	11
3.5.1 Espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
3.6 Processos fermentativos	12
3.7 Sulfeto de Hidrogênio (H <sub>2</sub> S)	13
3.8 Fator Killer e sensibilidade	14
3.9 Identificação taxonômica das leveduras por PCR	15
<b>4 ATIVIDADES REALIZADAS</b>	<b>15</b>
4.1 Preparação dos meios de cultura	15
4.2 Reativação e repicagem das leveduras	16
4.3 Linhagens padrões	16
4.4 Preparo das suspensões de células (inóculos)	17
4.5 Produção de H <sub>2</sub> S e velocidade de fermentação	17
4.6 Detecção da capacidade killer e da sensibilidade ao fator killer	18
4.7 Identificação taxonômica das leveduras por PCR	19
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>20</b>
5.1 Avaliação da produção de H <sub>2</sub> S da série T84	20
5.2 Avaliação da velocidade de fermentação da série T84	22
5.3 Avaliação da capacidade killer da série T84	24
5.4 Avaliação da sensibilidade ao fator Killer da série T84	25
5.5 Identificação taxonômica das leveduras por PCR	27
5.6 Dendograma	27
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>31</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>36</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A origem da videira no Rio Grande do Sul faz parte da história da vitivinicultura hispano-americana. Entretanto, só ganhou importância no estado após a descoberta da cultivar Isabel, que fez com que a viticultura se desenvolvesse de forma mais acentuada na região. A atividade tornou-se então socioeconomicamente expressiva, elevando o estado do Rio Grande do Sul ao patamar de principal produtor e exportador de uvas e vinhos do país (LEÃO, 2010).

O vinho, bebida derivada do processamento das uvas, é caracterizado como “o resultado da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto simples ou virgem, com um conteúdo de álcool adquirido mínimo de 7% (V/V a 20° C.)” (Ministério da Agricultura, 1988). O processo de vinificação consiste em uma sequência de etapas que vão desde a colheita da uva, até o engarrafamento do vinho. Um dos estádios mais importantes e cruciais para o processo de transformação da uva madura em vinho é a fermentação alcoólica, processo realizado por leveduras que está intrinsecamente ligado ao gênero e espécie utilizada e que, dependendo da linhagem, influencia a qualidade e promove a singularidade dos vinhos, com influência positiva na criação do “terroir”.

Diversos são os testes básicos para a determinação da aptidão enológica das leveduras, entre eles o acompanhamento da velocidade de fermentação e a produção de compostos indesejados. Além destes, se faz necessária a apuração da produção da proteína killer pelas leveduras, visto que este é um fator que permite inibir a ação de leveduras sensíveis.

Nesse contexto, quando se deseja utilizar leveduras autóctones para a produção de vinhos, é necessário isolar, identificar as espécies e caracterizar as linhagens para determinar sua aptidão enológica. Assim, o estágio obrigatório de conclusão do Curso Superior de Agronomia foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho, localizado no município de Bento Gonçalves, RS, no período de janeiro a março de 2020. Este relatório tem por objetivo descrever as atividades realizadas no estágio, que teve por finalidade a análise, identificação e caracterização do perfil enológico de 48 linhagens de leveduras da série T84<sub>155-209</sub> isoladas de mosto de uvas Cabernet Franc, no ano de 1984, no Vale dos Vinhedos, RS.

## **2 CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO**

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) teve sua criação no ano de 1973, sendo uma empresa pública vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Possui sede na cidade de Brasília, além de unidades descentralizadas, sendo 4 destas localizadas no estado do Rio Grande do Sul, nas cidades de Passo Fundo, Pelotas, Bagé e Bento Gonçalves.

A Unidade Descentralizada da Embrapa, localizada em Bento Gonçalves, denomina-se Embrapa Uva e Vinho, cuja área ocupa 100 ha. A Diretoria Executiva da Embrapa criou, em 26 de agosto de 1975, a Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual - UEPAE de Bento Gonçalves e só em 04 de março de 1985, esta UEPAE passou a Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (CNPUV). Além da sede, possui duas Estações Experimentais: a Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado (EFCT), em Vacaria (RS) e a Estação de Viticultura Tropical (EVT), em Jales (SP). Como foco principal de suas pesquisas, destacam-se a uva, o vinho, a maçã e outras fruteiras de clima temperado. O quadro técnico é composto por 166 colaboradores, dos quais 41 são pesquisadores, 29 analistas, 35 técnicos e 61 são assistentes (EMBRAPA, 2016).

O Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) trabalha com microrganismos na busca por indivíduos que apresentem características importantes para a vinificação e assim, possam ser de interesse agroindustrial. As linhas de pesquisa principais são voltadas para a seleção de microrganismos para elaboração de vinhos, o uso de microrganismos para controle biológico, estudos na área da fisiologia de microrganismos e isolamento e seleção de leveduras, relação entre microrganismos, iscas biológicas, fator killer e seus efeitos, entre outros. Ademais, realiza pesquisa com leveduras autóctones que são criteriosamente selecionadas pelo desempenho nos processos essenciais para a formação do vinho, dando a ele características peculiares e únicas, ajudando na tipificação regional de vinhos (EMBRAPA, 2020a).

O laboratório conta com uma coleção de culturas com aproximadamente 4.5 mil linhagens de leveduras autóctones, dentre estas, muitas com aplicação real e potencial para uso na agroindústria e de interesse econômico. O laboratório é capacitado a realizar operações microbiológicas básicas, como microscopia, esterilização de meio de cultura, repicagem de microrganismos, produção de microrganismos e de fermentados, preparo de inóculo para vinificação em branco, tinto e espumantes e manutenção de cultura de longa duração. Além disso, realiza a identificação de leveduras por processos clássicos e moleculares (EMBRAPA, 2020c).

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Serra Gaúcha e Vale dos Vinhedos

A primeira introdução de videiras por colonizadores portugueses no Brasil se deu no século XVI, permanecendo como cultura doméstica até o século XIX, adquirindo importância somente nas últimas décadas do mesmo século com a chegada dos imigrantes italianos à Serra Gaúcha. Dessa forma, a vitivinicultura do Rio Grande do Sul se estruturou com base em quatro polos produtores: a Serra Gaúcha, a Campanha, a Serra do Sudeste e a região Central (FIORAVANÇO, 2018).

A Serra Gaúcha é hoje a maior e mais importante região vinícola do Brasil e abrange as quatro áreas de produção enológica certificadas do país: o Vale dos Vinhedos, Pinto Bandeira, Monte Belo do Sul e a região dos Altos Montes (IBRAVIN, 2019). O Vale dos Vinhedos situa-se no nordeste do estado do Rio Grande do Sul e abrange três municípios importantes na produção de uva, vinhos e espumantes, sendo eles Bento Gonçalves, Garibaldi e Monte Belo do Sul (APROVALE, 2020).

O cenário vitivinícola gaúcho permite constatar que a atividade, mesmo décadas depois, permanece uma das mais importantes para a economia do estado, principalmente na Serra Gaúcha onde se encontra o polo de desenvolvimento dessa cadeia no Rio Grande do Sul (MATTEI & TRICHES, 2009). O estado abrange aproximadamente 60% da área vitícola nacional, sendo também o maior produtor da região sul do país, tendo colhido 667.018 t de uvas em 2019 (IBGE, 2020).

#### 3.2 Processo de vinificação

O vinho, bebida obtida a partir da fermentação alcoólica parcial ou total do mosto da uva, é classificado, de acordo com a legislação brasileira, em dois grandes grupos, sendo os finos elaborados com cultivares *Vitis vinifera*, como Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc e Merlot, e os de mesa, com cultivares *Vitis labrusca*, como Isabel e Bordô.

O vinho deve ser elaborado com uvas maduras e sadias, tomando o cuidado para que o intervalo entre a colheita e o processamento da uva seja o menor possível. O primeiro processo a ser feito após o recebimento das uvas é o desengace, buscando a separação da ráquis, que interfere negativamente na composição do mosto por favorecer o aparecimento do gosto amargo, seguido do esmagamento das bagas. Nessa fase, a película da baga é rompida liberando

o mosto que é exposto ao ar e à ação das leveduras autóctones, presentes na baga da uva, e daquelas que estão no ambiente da cantina, iniciando o processo de fermentação por transformar o açúcar do mosto em álcool e outros produtos do metabolismo microbiano. Essa fase é importante pois repercute na qualidade do vinho, visto que promove a dispersão das células de leveduras presentes na baga e aumenta a superfície de contato do mosto com as partes sólidas da uva (RIZZON, 2006).

### **3.3 Uvas Cabernet Franc**

Classificada como uva fina e, dentro desta, como casta tinta, Cabernet Franc é uma variedade originária de Bordeaux, na França, trazida para o Rio Grande do Sul por volta de 1900. Sua grande dispersão e utilização teve início marcante nos anos 70 e 80, quando se tornou a base dos vinhos finos brasileiros. É uma variedade medianamente vigorosa e bastante produtiva que se adapta muito bem às condições da Serra Gaúcha, proporcionando colheita de uvas de boa qualidade, que facilmente atingem 18°Brix a 20°Brix, em vinhedos bem conduzidos (CAMARGO et al., 2015). A utilização desta variedade produz um vinho com tipicidade, sendo consumido ainda jovem.

### **3.4 Indicações Geográficas e “Terroir”**

A denominação das Indicações Geográficas no início dos anos 1990 impulsionou o mercado brasileiro de vitivinicultura a um novo patamar, pois os diversos vinhos passaram a ser reconhecidos como produtos tradicionais ou típicos de uma certa localidade. As indicações geográficas podem ser divididas em duas categorias principais, sejam elas a Denominação de Origem (DO) ou Indicação de Procedência (IP). A DO se aplica aos vinhos oriundos de alguma região com características qualitativas, reputação ou alguma outra atribuição que torne aquele produto único da região de origem, devido ao meio geográfico, incluindo fatores naturais e humanos. A denominação IP, por sua vez, se aplica às regiões que se tornaram reconhecidas pela produção de vinhos (EMBRAPA, 2020c). Os vinhos produzidos na Serra Gaúcha são os únicos brasileiros a possuírem a IP e DO, tornando a região um polo produtor importante no cenário brasileiro (TONIETTO 2006).

O “terroir” é outro conceito importante na caracterização da singularidade dos vinhos. Originado no latim popular e derivado da palavra “territorium”, remete a uma conotação positiva em relação à vitivinicultura. O “terroir” nem sempre esteve, ao longo da história,

atrelado ao conceito de nobreza ou de qualidade. Ao longo do tempo, a palavra, então, passou a abranger aspectos naturais e humanos de toda a cadeia de elaboração de vinho (TONIETTO, 2007) e hoje, está associada às particularidades de qualidade dos vinhos elaborados em diferentes regiões geográficas, se opondo à uniformização e à padronização da bebida.

### 3.5 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares eucariotos, pertencentes ao Reino Fungi. Este Reino possui sete Phyla e as leveduras estão distribuídas no Phylum Ascomycota e Basidiomycota. O Phylum Ascomycota possui 9070 gêneros com 92.725 espécies e o Phylum Basidiomycota conta com 2294 gêneros com 50.385 espécies (ROSKOV et al., 2020).

As leveduras possuem parede celular e membrana citoplasmática lipoprotéica, a qual regula as trocas com o ambiente. Além disso, a membrana celular pode sofrer alterações externas. Uma dessas alterações diz respeito à atividade da sub-unidade  $\alpha$  da proteína killer. Esta se liga à membrana após a sub-unidade  $\beta$  ter se ligado à fração  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucana da parede celular. Se reproduzem majoritariamente de forma assexuada, por meio do brotamento ou fissão binária, mas podem se reproduzir de forma sexuada, pela formação de ascósporos. É necessário salientar que há leveduras que apresentam polimorfismo, alterando entre a forma leveduriforme e filamentosa. Estas leveduras podem apresentar pseudomicélio ou micélio verdadeiro, portanto, a diferença com base neste critério é um tanto quanto rudimentar.

Apesar de serem usadas para preparo de comidas, e já muito antigamente para preparo de pães e bebidas alcoólicas como cerveja e vinho, a domesticação das leveduras só foi estudada recentemente. As diferenças entre os aromas dos vinhos são atribuídas aos produtos secundários da fermentação, como álcoois superiores e ésteres, sendo as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* as maiores produtoras destes compostos, possuindo diferenças também entre as linhagens dentro da espécie (DA SILVA & DA SILVA, 1987). Entretanto, algumas leveduras também são responsáveis por produzirem aromas desagradáveis nos vinhos, como o H<sub>2</sub>S. Este composto, que gera odor de ovo podre, reflete em perda da qualidade do produto, visto que sua eliminação é complexa. Por isso, estas leveduras não devem ser utilizadas em processos fermentativos, mesmo que estes processos não sejam destinados à elaboração de bebidas fermentadas. Alguns dos fatores que influenciam o metabolismo do microrganismo na produção destes compostos são as variações na composição do mosto, o pH, a temperatura de fermentação e os resíduos de defensivos agrícolas (DA SILVA & DA SILVA, 1987).

As leveduras podem ser classificadas em três grupos, sendo o primeiro as leveduras dependentes de oxigênio (aeróbias); independentes de oxigênio e assim chamadas de fermentativas facultativas; e por último as leveduras obrigatoriamente fermentativas, que são mutantes deficientes respiratórios, denominadas “mutantes petite” (MERICCO et al., 2007).

### 3.5.1 Espécie *Saccharomyces cerevisiae*

Dentre as diversas espécies de leveduras, a mais comumente conhecida é a *Saccharomyces cerevisiae*, pertencente à classe Saccharomycetes, a ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae (ROSKOV et al., 2020). É utilizada em diversos processos fermentativos na indústria alimentícia e como agentes bioterapêuticos (VAN DER AA KÜHLE & JESPERSEN, 2003) e também tem sido estudada para ser utilizada como agente probiótico (VAN DER AA KÜHLE et al., 2005).

Linhagens de *S. cerevisiae* Crabtree-positivas direcionam seu metabolismo para o processo fermentativo sempre que houver altas concentrações de glicose, mesmo que as condições sejam aeróbicas (MERICCO et al., 2007). Essa estratégia de consumir açúcares mais rapidamente que outras espécies produzindo grandes concentrações de etanol, a torna mais competitiva, induz à seletividade e leva à inibição do crescimento de microrganismos, o que protege a bebida contra a deterioração por determinados microrganismos.

Costuma-se utilizar, como no caso da indústria vinícola, leveduras da linhagem *S. cerevisiae* importadas de acesso livre e fácil, o que acaba por equalizar as características dos vinhos elaborados. Essas características podem ser positivas ou negativas. A utilização de leveduras comerciais, que na sua grande maioria é killer, faz com que estas se sobressaiam às linhagens autóctones presentes na uva, padronizando o produto final. Por este motivo, deve-se empregar, entre diferentes safras, as mesmas linhagens autóctones neutras selecionadas no lugar das comerciais se for desejado a obtenção de um produto diferenciado.

## 3.6 Processos fermentativos

A fermentação alcoólica é um processo metabólico no qual o aceptor final de elétrons é um composto orgânico. Na fermentação, cada molécula de glicose produz dois mols de CO<sub>2</sub> e dois mols de etanol e quatro mols brutos de ATP ( $C_6H_{12}O_6 + 4ADP \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2 + 4ATP$ ). Esse processo é realizado majoritariamente por leveduras por meio da via de Embden-Meyerhof.

A produção do vinho começa com a prensagem e esmagamento da uva para a formação do mosto, e nesta atividade diversos microrganismos presentes no ambiente e na película das bagas das uvas acabam sendo transferidos para o mosto. É nesta fase que devem ser adicionados o SO<sub>2</sub> e a levedura selecionada. No início do processo de transformação do mosto em vinho, o ar que está presente permite o crescimento aeróbio das leveduras e ao mesmo tempo provoca a depleção de O<sub>2</sub> no meio. Após esse período, as leveduras, gradativamente, iniciam o processo fermentativo que dura aproximadamente de quatro a seis dias. Esta fase é conhecida como “fase tumultuosa”. Depois da trasfega, inicia-se a fase lenta da vinificação, caracterizada pela baixa concentração de açúcar e elevado teor de etanol.

A fermentação pode ser conduzida de forma espontânea, realizada pelas leveduras autóctones, ou induzida, inoculando no mosto leveduras enológicas previamente selecionadas. A principal atividade de leveduras é a fermentação alcoólica, importando, dessa forma, a velocidade de consumo de açúcar que a linhagem da levedura consegue alcançar. Este torna-se 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.

### **3.7 Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S)**

O H<sub>2</sub>S é uma substância frequentemente produzida pelas leveduras no processo de fermentação com ocorrência maior em algumas regiões. Este produto do metabolismo produz um aroma desagradável de ovo podre. A presença do gás no vinho é considerada um defeito no processo de vinificação. A produção deste gás está relacionada com a redução de sulfato exógeno pela enzima sulfito redutase (Anexo A) (UGLIANO et al., 2011). O nível final de H<sub>2</sub>S no vinho é o parâmetro mais importante para a aceitabilidade do produto (LINDERHOLM et al., 2008).

Esse composto é produzido e influenciado pela concentração de compostos nitrogenados, teor de compostos sulfurados, estágio de maturação da uva, práticas enológicas, taxa e temperatura de fermentação e a linhagem da levedura (NETO & MENDES-FERREIRA, 2005). A remoção desse composto do vinho leva a um aumento no custo de produção e reduz a qualidade do produto final (DA SILVA & DA SILVA, 1987), além de ser uma tarefa complexa e problemática sendo, dessa forma, importante a utilização de linhagem com capacidade de efetuar uma rápida combinação de H<sub>2</sub>S com precursores nitrogenados, ou

linhagens com deficiência da atividade da enzima sulfito redutase (WLODARCZYK et al., 2012).

### 3.8 Fator Killer e sensibilidade

A herança da capacidade killer em *S. cerevisiae* foi descoberta em 1963 (BEVAN & MAKOWER, 1963), e a base fisiológica da característica killer foi determinada por Bevan e Makower (1963). Estes autores observaram que linhagens de *S. cerevisiae* poderiam ser divididas em linhagens killer (K), sensíveis (S) e neutras (N). As células das leveduras killer matam as células das leveduras sensíveis ao produzirem uma proteína tóxica (WOODS & BEVAN, 1968; BUSSEY, 1972), as quais elas próprias são imunes (WOODS et al., 1974).

Quando células killer e células sensíveis crescem juntas no mesmo meio de cultura, uma alta proporção das células sensíveis é morta (WOODS & BEVAN, 1968). A morte das células pode ocorrer sem que haja o contato destas células, pois o agente causador da morte das células sensíveis foi o chamado Fator Killer (KF1), que é descrito como uma proteína com um espectro de ação altamente específico, que depende de pH, temperatura e das condições de aeração (WOODS & BEVAN, 1968). De modo geral, as proteínas killer são estáveis em valores de pH baixos e a baixas temperaturas (LIU et al., 2015).

As linhagens killer que produzem a toxina, são “imunes” aos seus efeitos e possuem fenótipo K+R+. As sensíveis não produzem a toxina, são sensíveis aos seus efeitos e apresentam fenótipo K-R-. As linhagens neutras além de não morrerem com a ação das células killer, por serem resistentes a esse fator, também não matam as células sensíveis, apresentando fenótipo K-R+ (BRUENN, 1980). Segundo da Silva (1996), a presença natural de leveduras neutras durante a fermentação do vinho é suficiente para desafiar a predominância das leveduras killer. A ação killer depende da proporção de células killer para as sensíveis no começo do processo fermentativo (HEARD & FLEET, 1987; PETERING et al., 1991), das condições do ambiente, e da fase de crescimento das células sensíveis (WOODS & BEVAN, 1968; BUSSEY, 1972).

Esse fenômeno, então, pode trazer benefícios à vinificação quando matam leveduras que geram odores indesejáveis, mas também pode matar aquelas linhagens que são desejáveis para o “terroir” do vinho. Dessa forma, ao se conduzir uma fermentação com levedura selecionada, deve-se optar por linhagens que sejam neutras. Assim, a microflora autóctone da uva é mantida ou, quando necessária a utilização de alguma linhagem killer, que esta não apresente, preferencialmente, a capacidade killer para leveduras não-*Saccharomyces*.

### **3.9 Identificação taxonômica das leveduras por PCR**

Em 1880, Emil Christian Hansen desenvolveu a técnica de isolamento de culturas puras, dando, à taxonomia, um grande impulso. No final do século XIX foram reportadas 200 espécies e a identidade de aproximadamente 90 delas é conhecida até hoje. Observa-se que a classificação e a identificação das leveduras tinham como base a morfologia macro e microscópica. Essa forma de classificação e de identificação não podia resultar em dados confiáveis na medida em que novos e desconhecidos microrganismos eram encontrados. Na década de 80 do século XX, a biologia molecular foi aplicada de forma extensiva (BARNETT, 2004) e é até hoje empregada.

Nos 15 anos seguintes, esse número atingiu a marca de aproximadamente 750 devido à descoberta de tecnologias de análise de DNA. Dessa forma, as ferramentas moleculares permitiram um maior conhecimento do genoma das leveduras, elucidando as diferenças entre espécies baseado majoritariamente em ferramentas como a PCR desenvolvida por Kary Mullis. Nessa técnica, o DNA ou um fragmento específico dele é milhares ou milhões de vezes reproduzido, sendo amplificado de forma bastante rápida. Em uma reação de PCR, a DNA polimerase pode ser direcionada para realizar a síntese de uma região específica do DNA molde de interesse (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2007). A técnica é relativamente fácil de ser realizada em laboratórios e consiste em adicionar em um tubo de ensaio o DNA, os primers, as bases nitrogenadas e a enzima DNA polimerase termoestável.

## **4 ATIVIDADES REALIZADAS**

### **4.1 Preparação dos meios de cultura**

Para a realização das diferentes avaliações de aptidão das leveduras em estudo foram utilizados três meios de cultura: mosto ágar (DA SILVA, 1996), utilizado para a manutenção das culturas de leveduras; mosto ágar 80:20 (M8020) (DA SILVA et al., 2011) para detecção do fator killer; e mosto sulfito (DA SILVA & DA SILVA, 1984) para o estímulo à produção de H<sub>2</sub>S.

## 4.2 Reativação e repicagem das leveduras

As linhagens foram obtidas no ano de 1984 pelo LMA em um parreiral cultivado com a variedade Cabernet Franc, localizado no Vale dos Vinhedos (S 29° 9' 42.957" e L 51° 31' 44.181). No LMA, as leveduras foram isoladas e criopreservadas, em meio líquido, em ultrafreezer a -80°C até a data de retirada das mesmas para a caracterização. A série de leveduras recebeu nomenclatura de acordo com a indicação da classificação da uva (tinta ou branca) e ano de isolamento, sendo denominadas então de série T84, e incorporadas à Coleção de Leveduras do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho.

Ao retirar os criotubos do ultrafreezer, estes foram agitados e, em ambiente estéril (cabine ou câmara de fluxo laminar), pipetaram-se 35µL da solução com as leveduras da série T84 de números 155T84 até 209T84, inoculadas individualmente em tubos de ensaio, devidamente identificados, contendo mosto ágar inclinado esterilizado. As leveduras de número 178T84, 179T84, 189T84, 190T84, 200T84 não existiam na coleção. Dessa forma, totalizaram-se 50 leveduras para o estudo.

Estas leveduras, após terem sido repicadas, foram colocadas em estufa modelo Imperial II Incubator® por 48 horas a 24°C para avaliar o crescimento celular das mesmas, sendo armazenadas, posteriormente, na sala de repicagem a 20°C. Quando necessário, era realizado o espalhamento das leveduras na superfície do meio mosto ágar dos tubos de ensaio para que a área de crescimento fosse expandida.

As leveduras ficaram em estufa de crescimento por aproximadamente 48 horas, quando foram retiradas para a avaliação do potencial de crescimento das mesmas. As leveduras de número 165T e 197T não se desenvolveram. Para estas, então, foi realizado o processo de reidratação. Assim, espalharam-se as leveduras em placas de Petri com meio Mosto Ágar, e colocou-se na estufa por 48 horas para acompanhar o crescimento. Nenhuma delas se desenvolveu, totalizando, então, 48 leveduras em estudo.

## 4.3 Linhagens padrões

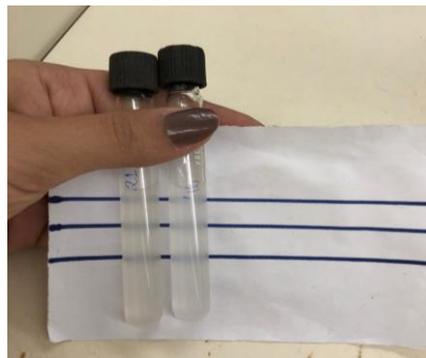
Para a realização dos testes nas leveduras da série T84<sub>155-209</sub>, diversas linhagens tomadas como padrão pelo LMA da Embrapa Uva e Vinho, foram utilizadas. Para o teste de capacidade killer, utilizaram-se oito linhagens sensíveis padrão do LMA, que serviram como tapete nas placas de Petri (Apêndice A). Para testar a sensibilidade das linhagens T84<sub>155-209</sub>, foram utilizadas 25 linhagens killer padrão do LMA (Apêndice B).

Para avaliar a capacidade fermentativa, as linhagens foram comparadas à linhagem neutra *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97, isolada de uvas tintas da região do Vale dos Vinhedos por Da Silva em 1997, pertencente à Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) da Embrapa sediada no CNPUV, e à linhagem comercial *S. cerevisiae* K1, adquirida da empresa Lallemand Inc. (Montreal, Canadá). Todos os microrganismos utilizados neste trabalho, assim como todos os outros microrganismos da coleção e toda a equipe envolvida, seja ela da Embrapa ou fora dos quadros da Embrapa, estão devidamente cadastrados no SisGen sob N° A603BA9.

#### 4.4 Preparo das suspensões de células (inóculos)

As suspensões de células foram obtidas pela diluição da levedura em um tubo de ensaio com água estéril. As leveduras foram retiradas de tubo de ensaio com meio Mosto Ágar, na quantidade de aproximadamente uma alçada, e colocadas nos tubos de ensaio em uma concentração aproximada de  $10^7$  células. Estes tubos foram agitados no vórtex. A padronização da concentração de células foi realizada seguindo a metodologia preconizada por Der Walt e Yarrow (1984) (Figura 1).

Figura 1 - Tubos de ensaio com diluição de células em comparação com a escala de papel de Der Walt e Yarrow (1984).



Fonte: Autora, 2020.

#### 4.5 Produção de H<sub>2</sub>S e velocidade de fermentação

Para a avaliação da produção de H<sub>2</sub>S foram utilizadas fitas de papel filtro (0,5 x 7,5 cm) embebidas em uma solução de 100 mL de acetato de chumbo a 3% em uma placa de Petri de 14 cm de diâmetro, esterilizada por meio de calor úmido.

A avaliação da capacidade de produção de H<sub>2</sub>S de cada levedura foi feita em tubos de ensaio com 9 mL de meio MS, em triplicata. Para a detecção do H<sub>2</sub>S formado, as fitas, contendo o acetato de chumbo, foram afixadas no topo do tubo de ensaio com tampa rosqueável, de modo que metade da fita permaneceu dentro do tubo (estéril) acima do meio já inoculado. A inoculação foi feita transferindo 1 mL de suspensão de células de cada uma das leveduras da série em estudo para o tubo de ensaio contendo 9 mL do meio mosto sulfito, em triplicata.

A avaliação de H<sub>2</sub>S é realizada pela observação da reação que ocorre entre o enxofre produzido pelas leveduras e o chumbo presente nas fitas. As fitas vão adquirindo, gradativamente, uma cor mais escura. A reação química que se dá entre o H<sub>2</sub>S e o acetato de chumbo é a seguinte:  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{s}) + \text{H}_2\text{S}(\text{g}) \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH}(\text{g}) + \text{PbS}(\text{s})$ .

A produção de H<sub>2</sub>S foi avaliada ao longo de 96 horas, sendo os tubos armazenados na estufa Lab-Line® Imperial II Incubator, a 24°C. A quantidade de H<sub>2</sub>S produzida foi classificada em quatro níveis diferentes (0, 1, 2 e 3) conforme a coloração adquirida pela fita, sendo 0 a não produção de H<sub>2</sub>S pela levedura, e os outros níveis, em ordem crescente, sendo indicados com + (fraco), ++ (mediano) e +++ (forte).

A validação da velocidade de fermentação foi feita por gravimetria, ou seja, pela pesagem dos tubos, em intervalos de 6 e 18 h, durante um período de 96 h. A pesagem foi realizada em balança analítica modelo DJ-V300A, sempre utilizando luvas descartáveis. Conforme a fermentação ocorria, ou seja, quanto mais CO<sub>2</sub> era desprendido, menores eram os valores das pesagens. Os resultados obtidos foram submetidos à comparação com as leveduras 1VVT97 e K1, ambas com alto potencial fermentativo.

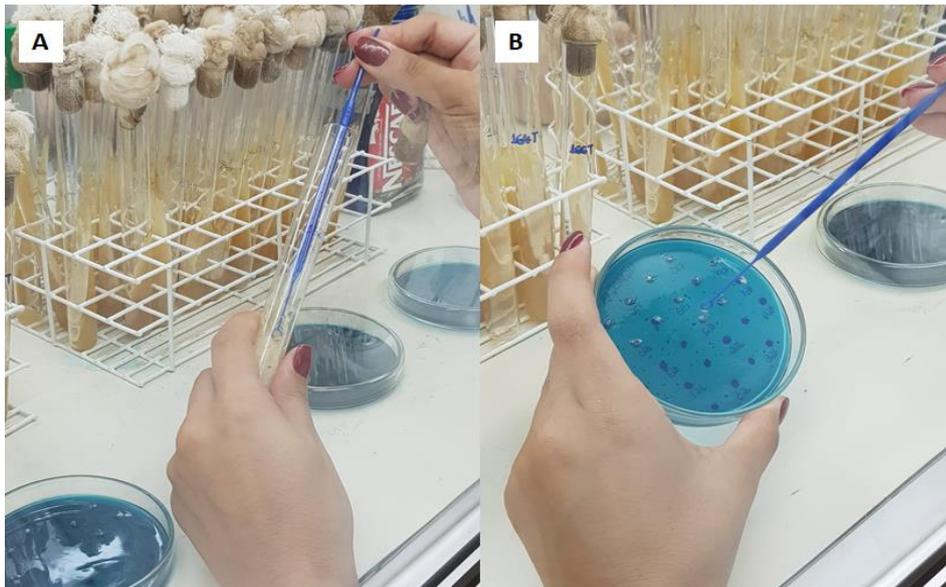
#### **4.6 Detecção da capacidade killer e da sensibilidade ao fator killer**

O teste da capacidade killer das leveduras foi realizado em placas de Petri com meio M8020 em ambiente estéril. Primeiramente, as placas foram semeadas com levedura padrão do LMA pipetando uma alíquota de 0,1 mL de inóculo, e espalhada com uma alça de Drigalski esterilizada. As leveduras de interesse foram inoculadas como pontos duplicados na placa, com auxílio de alça plástica esterilizada (Figura 2). As placas ficaram armazenadas por 48 horas em estufa a 24°C.

As leveduras plaqueadas cresceram concomitantemente com as leveduras utilizadas como killer, em massa pontual. Quando o crescimento da levedura tapete é inibido pela levedura de massa pontual, e, ao redor desta é formado um halo de inibição e uma zona de morte azul,

esta levedura passa então a ser considerada killer, por não permitir o crescimento e desenvolvimento de outras.

Figura 2 - Detecção da capacidade Killer e da sensibilidade ao fator Killer: retirada da levedura do tubo de ensaio (A), depósito da levedura como massa pontual sobre leveduras sensíveis tomadas como padrão (B).



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

No teste de sensibilidade os mesmos procedimentos do teste killer foram utilizados, entretanto, neste teste, as leveduras isoladas da série T84<sub>155-209</sub> foram plaqueadas como tapete, colocando-se, como massa pontuais sobre elas e em duplicata, as 25 leveduras killer tomadas como padrão. Foram adotados os mesmos procedimentos de transferência e incubação efetuados para o teste killer.

As leveduras que não produziram proteína killer, e também não morreram por esse fator, ou seja, deram resultado negativo para ambos os testes, foram consideradas neutras. As linhagens que morreram por ação de pelo menos uma linhagem killer padrão foram tidas como sensíveis e as que mataram pelo menos uma linhagem sensível padrão foram caracterizadas como killer.

#### 4.7 Identificação taxonômica das leveduras por PCR

A identificação taxonômica foi realizada com três linhagens de leveduras (176T, 184T e 186T), sendo que a escolha delas foi pela super sensibilidade da linhagem 176T, e pelo

comportamento killer atípico das linhagens 184T e 186T. A identificação se deu por meio da técnica de PCR, amplificando a região ITS do rDNA ITS1-5.8S-ITS2, com os iniciadores (primers) ITS1 (5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G'3) e ITS 4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por Agustini et al. (2014). Foram realizadas suspensões de células para extração do material genômico através do procedimento descrito por da Silva et al. (2012a). Para o preparo das suspensões, foi retirado do tubo de ensaio uma alçada de células e transferido para um tubo de Eppendorf de 1,5 mL contendo 300 µL de água ultra-pura estéril e homogeneizado antes de ser colocado no freezer. Após aproximadamente 30 minutos (tempo necessário para o congelamento do conteúdo), descongelou-se a suspensão, que foi agitada no vortex por mais 30 segundos. Esse procedimento foi repetido três vezes, para possibilitar e garantir o rompimento das células e extravasamento do material genômico.

O mix de amplificação foi preparado utilizando os ingredientes e concentrações descritos no Apêndice C. Todos os componentes foram colocados na quantidade indicada em três tubos de Eppendorf, antes do DNA amostral, evitando a contaminação dos mesmos. O respectivo DNA foi colocado no tubo de Eppendorf identificado na quantidade de 1 µL. Os tubos de Eppendorf foram levados em seguida para um termociclador com a programação exemplificada no Apêndice D.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 1x (10,8 g Tris; 5,5 g ácido bórico; 4,0 mL de solução de EDTA 0,5M em pH 8,0; água destilada qsp 1L). Foi utilizado 1,2 µL do corante (Loading Buffer 6x composto por azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25% e glicerol 30%) com 4,5 µL do produto de PCR. Foi utilizado um marcador de pares de bases (4,5 µL), para a comparação de tamanho dos *amplicons*. A corrida no gel, foi realizada a 90 volts por 1 hora. Para a coloração o gel foi imerso por 30 min em uma cuba contendo brometo de etídio, e fotografado em um fotodocumentador através do programa "Image Lab".

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Avaliação da produção de H<sub>2</sub>S da série T84**

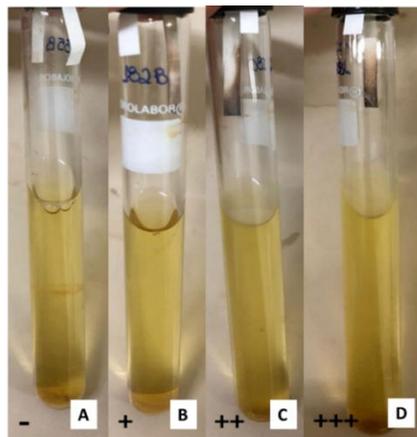
A quantidade de leveduras com produção de H<sub>2</sub>S foi elevada, totalizando 72,9%. Destas, 12,5% tiveram alta produção (+++), 35,4% média produção (++) , 25% baixa produção (+) e 27,1% não produziram H<sub>2</sub>S (Figura 3). Foram consideradas positivas, para o teste, as leveduras que formaram o gás em pelo menos 1 dos 3 tubos testados para cada levedura. As linhagens K1

e 1VVT97, utilizadas como padrão, apresentaram taxa de produção nula. Dentre as linhagens da série T84 que não apresentaram produção do gás, todas são *S. cerevisiae* (155, 156, 159, 163, 169, 171, 173, 174, 186, 192, 196, 207 e 209).

A quantidade de H<sub>2</sub>S formada está diretamente ligada à expressão ou repressão das enzimas da via de redução do sulfato, sofrendo influência também da composição química do mosto da uva, podendo ainda depender do nitrogênio prontamente assimilável (DA SILVA et al., 2012). Meios complexos estimulam a formação de H<sub>2</sub>S e a falta de vitaminas a estimulam ainda mais (ESCHENBRUCH & BONISH, 1976). A produção de H<sub>2</sub>S é um processo complexo que depende da linhagem da levedura, da concentração de aminoácido prontamente assimilável e do vigor da fermentação (UGLIANO et al., 2011).

Em experimento realizado por da Silva et al. (2012b) com leveduras isoladas de bagas de uvas da cultivar Cabernet Franc de Pinto Bandeira, foi observado uma frequência elevada de linhagens produtoras de H<sub>2</sub>S, de aproximadamente 65%. Outras cultivares apresentaram linhagens formadoras de H<sub>2</sub>S em mais baixa frequência, indicando, assim, que o substrato do qual a levedura é isolada exerce uma pressão seletiva (DA SILVA et al., 2012b). Um estudo realizado por da Silva e Dalarmi (2003), mostrou que a porcentagem de leveduras produtoras de H<sub>2</sub>S, isoladas de Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos - BG foi de 79%.

Figura 3 - Tubos de ensaio com diferentes graus de produção de H<sub>2</sub>S, sendo A: nenhuma produção (-); B: baixa produção (+); C: média produção (++); D: alta produção (+++).



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

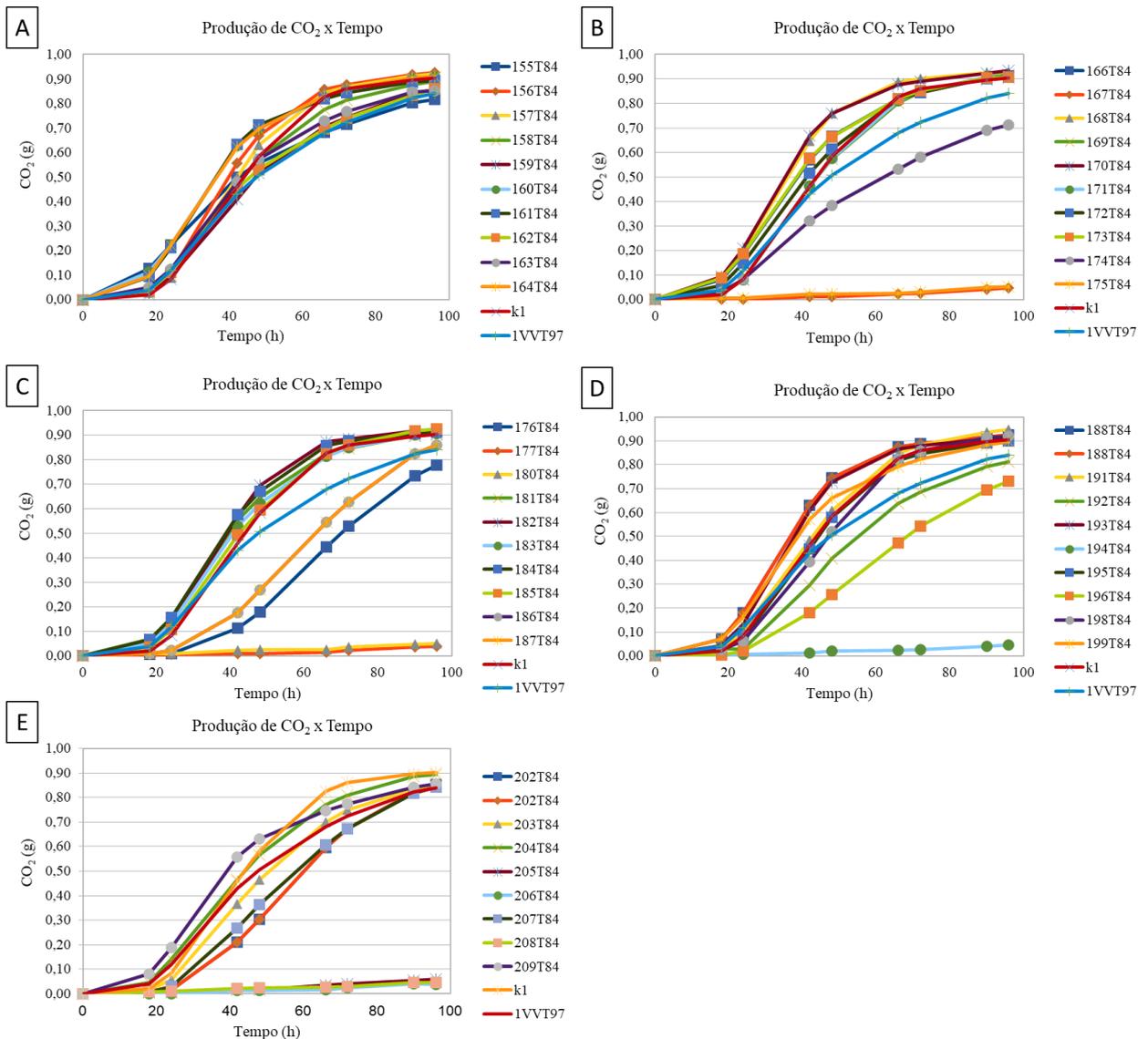
Os resultados obtidos neste teste indicam que embora a maioria das leveduras testadas sejam boas fermentadoras, não devem ser utilizadas para vinificação por apresentarem atividade extremamente baixa da enzima sulfito redutase, promovendo a alta produção de H<sub>2</sub>S.

## 5.2 Avaliação da velocidade de fermentação da série T84

Foi observado que aproximadamente 83% das linhagens da série T84<sub>155-209</sub> analisadas possuem potencial fermentativo positivo, ou seja, classificado em uma produção maior que 0,5 g de CO<sub>2</sub> desprendido em um tempo de 96 horas (Apêndice E). A alta velocidade de fermentação apresentada pela série analisada se deve pela série ser composta majoritariamente pela espécie *S. cerevisiae*. De acordo com da Silva (2004), esta espécie apresenta conversão rápida, integral e eficiente do açúcar da uva em etanol, dióxido de carbono e outros componentes, sendo este o papel principal das leveduras vínicas.

Por meio da estequiometria, sabe-se que para cada mol de CO<sub>2</sub> liberado pelas leveduras anaerobicamente, um mol de etanol é produzido. Logo, quanto maior a quantidade CO<sub>2</sub> evoluída na fermentação, maior a quantidade de etanol que a levedura produz. A velocidade de fermentação das linhagens da série T84<sub>155-209</sub>, é mostrada na Figura 4.

Figura 4 - Velocidade de fermentação das linhagens das leveduras da série T84, K1 e 1VVT97: 155 a 164 (a); 166 a 174 (b); 176 a 186 (c); 188 a 198 (d); 202 a 209 (e).



Fonte: Autora, 2020.

A levedura 191T, da espécie *S. cerevisiae*, desprende 0,947 g de CO<sub>2</sub> em 96 h, tendo sido a mais alta verificada. Entretanto, a mesma apresenta média produção de H<sub>2</sub>S, não podendo ser utilizada para vinificação. A linhagem 171T e 163T apresentaram bom potencial fermentativo, sendo também aprovadas nos demais testes. A linhagem 171T se comporta de forma semelhante à linhagem da 1VVT97 (Figura 4). A linhagem 163T (Figura 4) classificada no mesmo grupo, diferencia-se da linhagem neutra 1VVT97 por ser killer, embora para apenas linhagens de *S. cerevisiae* sensíveis. Neste caso, poderia ser também utilizada para vinificação. A utilização de uma levedura com produção de proteína killer se justifica pois, mesmo presente,

ela pode não possuir ação contra a linhagem sensível, visto que a expressão do gene depende das condições fisiológicas da linhagem sensível, do ambiente (DA SILVA et al., 2011) e de fatores bióticos.

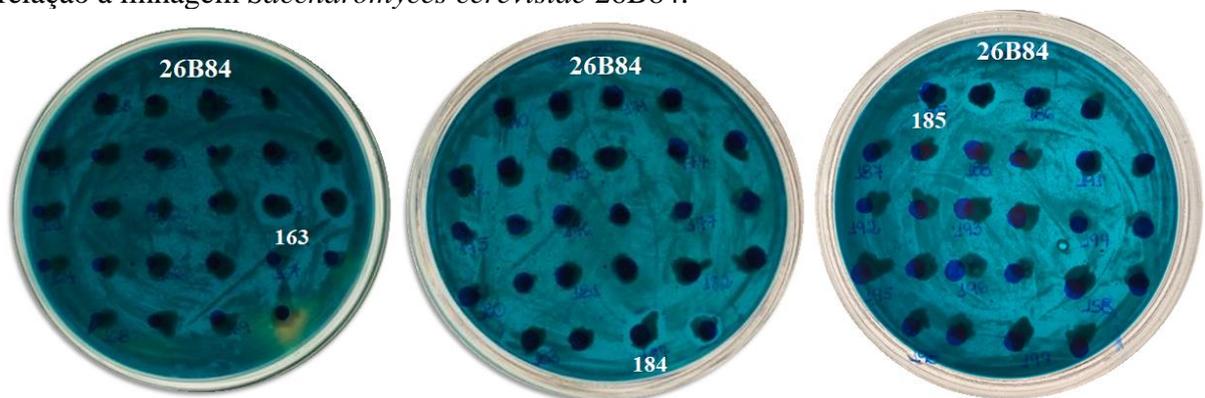
As linhagens com velocidade de fermentação abaixo do padrão para vinificação foram as da espécie *Meyerozyma guilliermondii* (167T e 175, 177T, 180T, 194T, 205T, 206T e 208T). Essa espécie não-*Saccharomyces* apesar de fermentar açúcares e assimilar muitas hexoses, dissacarídeos, polissacarídeos e ácidos orgânicos (KURTZMAN & SUZUKI, 2010), não apresentam altas taxas de conversão de glicose em etanol (Figura 4).

A velocidade de fermentação das leveduras é importante no âmbito da produção de vinhos justamente pela diversidade de microbiota presente no mosto da uva. As linhagens fermentativas selecionadas se sobrepõem às outras, trazendo uma fermentação mais rápida, uniforme e com adequado fator de conversão ( $Y_{p/s}$ ).

### 5.3 Avaliação da capacidade killer da série T84

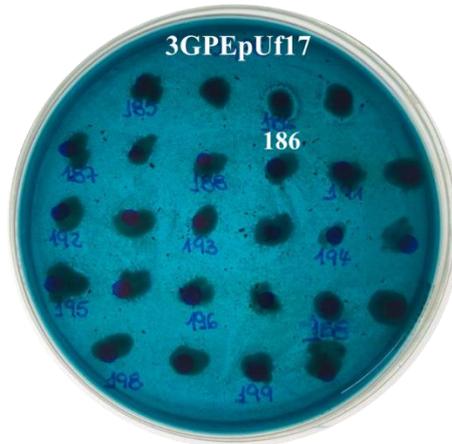
A produção da proteína killer foi observada em quatro linhagens das 48 estudadas, sendo elas a 163T84, 184T84, 185T84 e 186T84, totalizando 8,33%. Assim, estas linhagens (K+R+) foram capazes de matar as leveduras sensíveis usadas como padrão não as deixando se desenvolver, criando um halo de inibição ao redor da massa pontual. Todas as linhagens killer identificadas foram da espécie *S. cerevisiae*. As linhagens 163T84, 184T84 e 185T84 foram killer para a linhagem padrão *S. cerevisiae* 26B84 (Figura 5), enquanto que a linhagem 186T84 foi killer somente para a linhagem padrão *Hanseniaspora opuntiae* 3GPEpUF17 (Figura 6).

Figura 5 - Perfil killer – criação de halo de inibição - das linhagens da série T84 testadas em relação à linhagem *Saccharomyces cerevisiae* 26B84.



Fonte: Autora, 2020.

Figura 6 - Perfil killer – criação de halo de inibição - da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* 186T84 à linhagem *Hanseniaspora opuntiae* 3GPEpUF17.



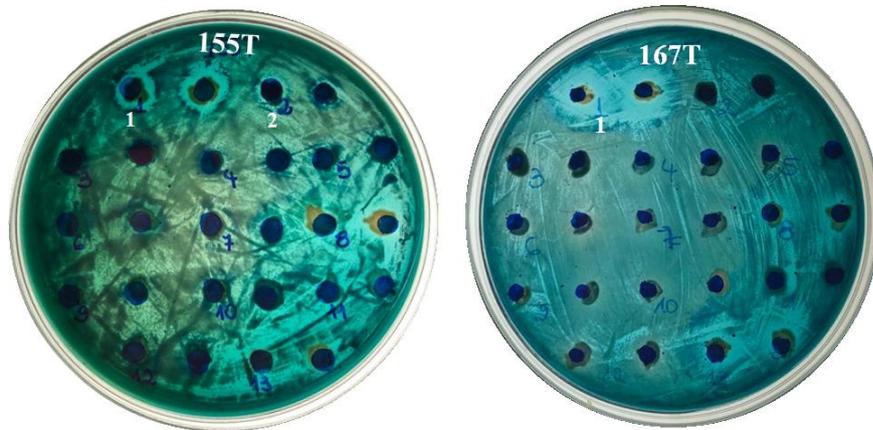
Fonte: Autora, 2020.

#### 5.4 Avaliação da sensibilidade ao fator Killer da série T84

As 48 leveduras da série T84 foram testadas quanto à sensibilidade ao fator killer em relação a 25 linhagens utilizadas como padrão. Entre estas, há linhagens representativas das espécies: *S. cerevisiae*, *Candida diversa*, *Hanseniaspora uvarum* e *H. opuntiae*. As leveduras sensíveis *S. cerevisiae* somaram 36 (Figura 7), sendo que destas, 14 foram sensíveis a linhagens *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, enquanto 22 foram sensíveis exclusivamente a linhagens padrão killer de *Saccharomyces*, sendo que nenhuma apresentou sensibilidade somente para linhagens não-*Saccharomyces*. Dentro da linhagem *M. guilliermondii*, três apresentaram sensibilidade a linhagens não-*Saccharomyces*, e duas apresentaram sensibilidade tanto para linhagens *Saccharomyces* quanto não-*Saccharomyces*. Dessa forma, das 48 linhagens testadas, 39 delas apresentaram algum tipo de sensibilidade, totalizando 81,25%.

A frequência de linhagens sensíveis observada foi bem maior quando comparada à porcentagem de linhagens killer, de 8,33%. Sete linhagens (161, 162, 171, 175, 177, 180 e 181) foram neutras, representando 14,5% do total, sendo quatro *S. cerevisiae* e três *M. guilliermondii*. As linhagens 163T84 e 185T84 foram neutras para linhagens não-*Saccharomyces* e killer para a linhagem *S. cerevisiae* 26B84.

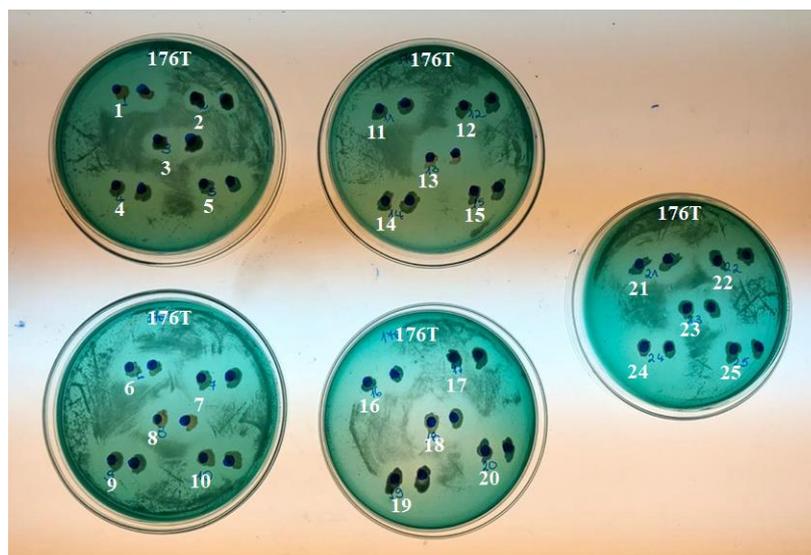
Figura 7 - Perfil de sensibilidade das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* (155T84) e *Meyerozyma guilliermondii* (167T84) em relação às linhagens killer *Saccharomyces cerevisiae* 1B84 (1) e *Saccharomyces cerevisiae* 91B (2).



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

A linhagem 176T84 foi sensível a todas as 25 linhagens killer tomadas como padrão (Figura 8), sendo considerada apta para utilização como tapete para testar a capacidade killer de outras leveduras. Dessa forma, foi incorporada à listagem de linhagens sensíveis padrão da Embrapa.

Figura 8 - Padrão de sensibilidade da linhagem 176T84 testada pelas 25 linhagens killer padrão, sendo inibida por todas elas.



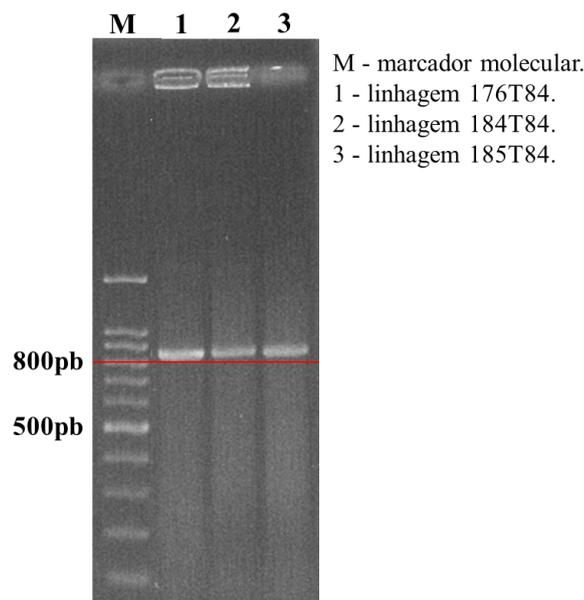
Fonte: Autora, 2020.

## 5.5 Identificação taxonômica das leveduras por PCR

As linhagens da série T84 haviam sido, previamente, identificadas por MALDI-TOFMS (AGUSTINI et al., 2014, 2018). Entretanto, após a caracterização das mesmas, três foram submetidas para identificação para confirmação por PCR devido às suas particularidades. Dessa forma, as leveduras 176T84, 184T84 e 186T84 foram submetidas a este método, visto que pela amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 é possível a diferenciação das diferentes espécies de leveduras.

Com as três leveduras testadas se obteve amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 por PCR, gerando amplicons de aproximadamente 850 pb (Figura 9). Como apenas a espécie *S. cerevisiae* possui tamanho de 850 a 880 pb, não foi necessário RFLP para distinguir as espécies, confirmando os resultados previamente obtidos por MALDI-TOFMS.

Figura 9 - Gel de agarose com os produtos de PCR.



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

## 5.6 Dendograma

Após a realização de todos os testes propostos, buscou-se realizar o agrupamento das linhagens de acordo com suas similaridades considerando todas as características avaliadas. Dessa forma, realizou-se um dendograma com as 48 linhagens da série T84, através do



As linhagens que apresentaram curvas de fermentação parecidas com a linhagem 1VVT97 padrão sem a produção de H<sub>2</sub>S foram a 163T84 e 171T84, mostrando que nem todas as leveduras presentes no mosto possuem aptidão enológica. No estudo, apenas as linhagens 171T84 e 163T84 se enquadram nesse perfil, devendo-se utilizar prioritariamente a linhagem 171T84 devido à sua neutralidade e à característica killer da linhagem 163T84.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A vitivinicultura possui grande importância econômica, social e cultural na Serra Gaúcha. Por ser pioneira na experiência brasileira em indicações geográficas, consolidando-se pela Indicação de Procedência do Vale dos Vinhos, a região se tornou um dos principais polos produtores da bebida no país. Dessa forma, torna-se importante o aperfeiçoamento do terroir através de escolhas adequadas de leveduras autóctones para vinificação, garantindo um vinho singular e característico, opondo-se a uniformização e padronização da bebida.

Dessa forma, quando houver interesse na utilização de linhagens autóctones para atribuir características únicas aos vinhos, ressalta-se a importância do isolamento, caracterização e seleção dessas leveduras para a escolha de linhagens adequadas à elaboração de vinhos. As leveduras devem apresentar fermentação adequada, não produção de H<sub>2</sub>S, e de preferência serem neutras. No estudo realizado, apenas duas das 48 linhagens se enquadram no perfil adequado para utilização na vinificação, reiterando a importância da realização destes procedimentos para a escolha da linhagem correta.

Apesar da influência de diferentes fatores na produção vinícola, as atividades realizadas durante o estágio proporcionaram a percepção da importância da escolha adequada das linhagens de leveduras visto à relação destas com a fermentação, produção de compostos químicos e relações intra e interespecíficas, que afetam diretamente a qualidade do produto final.

Ressalta-se a grande importância da pesquisa pública para a geração de conhecimento e informações para o desenvolvimento e criação de tecnologias de forma cada vez mais eficiente. Outrossim, a oportunidade de realizar o estágio em uma empresa pública de pesquisa provou-se de grande valia devido a vivência das atividades desempenhadas pelas mesmas juntamente com o convívio com diversos profissionais do ramo, na busca do desenvolvimento de informações para o aprimoramento da agricultura brasileira.

O estágio mostrou-se importante para formação acadêmica pela possibilidade de aprofundamento dos conhecimentos relacionados à procedimentos laboratoriais, além do

entendimento completo da cadeia de produção vinícola, importante ramo agroindustrial no estado, pouco abordado na faculdade. A transferência de conhecimentos possibilitada pelo estágio é significativa para o crescimento pessoal e profissional dos estudantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUSTINI, B. C.; DA SILVA, G. A.; BONFIM, T. M. B. (2018). **MALDI-TOF MS Supplementary database for species identification employing the yeast diversity encountered on southern Brazil grapes.** *Folia Microbiologica*, on line:1–9. ISSN- 1874-9356.
- AGUSTINI, B.C.; DA 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, 5645–5654. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5686-7>.
- APROVALE. Território *In: O vale*. [S. l.], 2020. Disponível em: <http://www.valedosvinhedos.com.br/vale/conteudo.php?view=67&idpai=126>. Acesso em: 23 dez. 2020.
- BARNETT, J. A. (2004). **A history of research on yeasts 8: taxonomy.** *Yeast*, 21(14):1151-1193.
- BEVAN, E. A.; MAKOWER, M. (1963). **The physiological basis of the killer character in yeast.** In Geerts, S., editor, *Proc.IIth Int. Congr. Gent. (Abstract)*, volume 1, pag 202-203. Pergamon Press, Oxford, nº203.
- BRUENN, J. A. (1980). **Virus-like particles of yeast.** *Am. Rev. Microbiol.* 34: 49 – 68.
- BUSSEY H. (1972). **Efects of yeast killer factor on sensitive cells.** *Nat New Biol* 235: 73 - 75.
- CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S. (2015). **Capítulo 2: Cultivares de videira para processamento.** *In: SILVEIRA, S. V.; HOFFMANN, A.; GARRIDO, L. R.* Produção integrada de uva para processamento: Implantação do vinhedo, cultivares e manejo da planta. Brasília, DF: Embrapa. Vol. 3. p. 25 - 40. ISBN 978-85-7035-476-1.
- CARVALHO, F.H.; RECCO-PIMENTEL, S.M. (Eds.), **A célula**, Manole, São Paulo (2007), pp. 62 - 66.
- DA 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, 112–121. <https://doi.org/10.1007/s002530050791>.
- DA SILVA, G. A. (2004). **Importância do uso de leveduras selecionadas na elaboração de vinhos.** In do Contestado, U., editor, *Anais I Encontro Regional e II Semana Acadêmica de*

Química Industrial de Alimentos, page 7, Concórdia (SC). Universidade do Contestado, Universidade do Contestado.

DA SILVA, G. A (2020). **Hierarchical cluster analysis on a set of dissimilarities among environmental yeast strains**. Laboratory of Applied Microbiology – Embrapa Grape and Wine.

DA SILVA, G. A.; WLODARCZYK, S. R.; DE SOUZA, R. C. (2012a). Avaliação de Leveduras Isoladas na Região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) com relação à Produção de H<sub>2</sub>S e Velocidade de Fermentação. II Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, SIMBBTEC 2012. Londrina, PR.

DA SILVA, G. A.; DALARMI, L. (2003). Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra de 2003. In Zanus, M. C., Laureano, O., de Melo, G. W. B., and 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.

DA SILVA, G. A.; POLI, J. S.; POLETTO, C. M.; SCHAKER, P. D. C.; SILVA, P. V. (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.

DA SILVA, G. A., WLODARCZYK, S. R.; DE SOUZA, R. C. (2012b). Avaliação de leveduras isoladas na região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) com relação o à produção de H<sub>2</sub>S e velocidade de fermentação. editor, II Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia - SIMBBTEC 2012, Londrina.

DA SILVA, M. A. A. A.; DA SILVA, G. A. (1984). Determinação qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio por leveduras vínicas. In **Síntese: Tecnologias Geradas pelo sistema EMBRAPA**, p. 243. EMBRAPA- DDT, Brasília.

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

EMBRAPA (2016). História – Disponível em <https://www.embrapa.br/uva-evinho/historia>. Acesso em: 3 de fevereiro de 2020. Technical report, Embrapa, Bento Gonçalves, RS.

EMBRAPA. (2020a) A Unidade: História. In: **Embrapa Uva e Vinho**. [S. l.]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/historia>. Acesso em: 3 fev. 2020.

EMBRAPA. (2020b) A Unidade: Sede Embrapa Uva e Vinho. Laboratório de Microbiologia. In: **Embrapa Uva e Vinho**. [S. l.]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/sede/laboratorio-de-microbiologia>. Acesso em: 3 fev. 2020.

EMBRAPA. (2020c). Indicações Geográficas de Vinhos do Brasil. Disponível em: <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/indicacoes-geograficas-de-vinhos-do-brasil>. Acesso em: 20 fev. 2020.

ESCHENBRUCH, R.; BONISH, P. (1976). **Production of sulfite and sulphide by low – and high – sulfite forming wine yeast.** Archives of Microbiology, 107:299-302.

FIORAVANÇO, J. C. (2018). Evolução da participação dos cultivares lançados pela Embrapa na viticultura do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Associação Brasileira de Enologia, ano 10, n. 10, p. 18-26.

GALILI, T. (2015). **Dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering.** Bioinformatics Advance Access.

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. Disponível em: [www.ibravin.org.br](http://www.ibravin.org.br). Acesso em: 20 fev. 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola - lavoura permanente, 2018.** Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/brochier/pesquisa/15/11863>. Acesso em: 22 fev. 2020.

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. (2010). Phylogenetic analysis of Ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, 51:2–14.

LEÃO, P. C. S. (2010). **Breve histórico da vitivinicultura e a sua evolução na região semiárida brasileira.** Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife. Vol. 7, p. 81-85. 2010.

LINDERHOLM, A. L.; FINDLETON, C. L.; KUMAR, G.; HONG, Y.; BISSON, L. F. (2008). **Identification of Genes Affecting Hydrogen Sulfide Formation in Saccharomyces cerevisiae.** Appl Environ Microbiol, Califórnia, v. 74, n. 5, p. 1418 – 1427. DOI 10.1128/AEM.01758-07.

LIU, G. -L.; CHI, Z.; WANG, G -Y.; WANG, Z. -P.; LI, Y.; CHI, Z. -M. (2015). **Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their application.** Crit Ver Biotechnol, 35(2):222-234.

MATTEI, L.; TRICHES, V. (2009). **Análise da Competitividade da Cadeia Vitivinícola do Rio Grande do Sul através do Ambiente Institucional.** Análise Econômica, Porto Alegre, ano 27, n. 52, p. 161 – 183.

MERICO, A.; SULO, P.; COMPAGNO, C. (2007). **Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the Saccharomyces complex.** The FEBS Journal, Milan, Italy, n. 274, p. 976 - 989. DOI 10.1111/j.1742-4658.2007.05645.

Ministério da Agricultura, M. A. (1988). Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988: **Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho**. UVIBRA - União Brasileira de Vitivinicultura. Disponível em: [http://www.uvibra.com.br/legislacao\\_portaria229.htm](http://www.uvibra.com.br/legislacao_portaria229.htm). Acesso em: 23 dez. 2020.

NETO, L.; MENDES-FERREIRA, A. A. (2005). **Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, SP, p. 275 – 278. DOI 10.1590/S0101-20612005000200016.

PETERING J. E.; SYMONS M. R., LANGRIDGE P., HENSCHKE P. A. (1991). **Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked Saccharomyces wine yeast strain**. Appl Environ Microbiol 57: 3232 – 3236.

RIZZON, L. A. (2006). **Recebimento da uva** In: MENEGUZZO, J.; MANFROI, L.; RIZZON, L. A.; Sistema de Produção de Vinho Tinto. Sistemas de Produção, 12. Embrapa Uva e Vinho. ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica.

ROSKOV, Y.; OWER, G.; ORRELL, T.; NICOLSON, D.; BAILLY, N.; P.M.; K. T. B.; R.E. D.; DECOCK W.; N. E.; PENEV L. (eds.) (2020). Digital resource at [www.catalogueoflife.org](http://www.catalogueoflife.org). Species 2000: Naturalis, Leiden, t. N. (2020). Species 2000 & its catalogue of life. In Digital resource at [www.catalogueoflife.org](http://www.catalogueoflife.org). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858. Naturalis, Disponível em: <https://www.catalogueoflife.org/data/metadata> Acesso em: 07/01/2021.

TONIETTO, J. (2006). **Experiências de desenvolvimento de certificações: vinhos da indicação de procedência Vale dos Vinhedos**. In: LAGES, V.; LAGARES, L.; BRAGA, C. L. (Org.). Valorização de produtos com diferencial de qualidade e identidade: indicações geográficas e certificações para competitividade nos negócios. 2. ed. Brasília, DF: SEBRAE. p. 155-176.

TONIETTO, J. (2007). **Afinal, o que é terroir?** Embrapa Uva e Vinho. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/h;le/doc/542312>. Acesso em: 30 jan. 2020.

UGLIANO, M.; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P.A. (2011). **Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.38, p. 423-429.

VAN DER AA KÜHLE, A.; SKOVGAARD, K.; JESPERSEN, L. (2005). **In vitro screening of probiotic properties of Saccharomyces cerevisiae var. boulardii and food-borne Saccharomyces cerevisiae strains**. International journal of food microbiology, 101(1):29–39.

VAN DER AA KÜHLE, A.; JESPERSEN, L. (2003). **The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene.** Syst Appl Microbiol, 26(4):564–571.

WALT, V.; YARROW, D. (1984). **Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts.** In VAN RIJ, N. K., editor, *The yeasts a taxonomic study*, chapter II, pag 45-104. Elsevier, P.O. Box 2011, Amsterdam, The Netherlands, third edition.

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

WOODS, D. R.; BEVAN, E. A. (1968). **Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*.** The Journal of General Microbiology, 51(1):115 – 126.

WOODS, D. R.; ROSS, I. W.; HENDRY, D. A. (1974). **A new killer factor produced by a Killer/Sensitive yeast strain.** The Journal of General Microbiology, 81, p 285 – 289.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - Linhagens de leveduras sensíveis padrões do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho.

<b>Número</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nomenclatura</b>
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26B84
2	<i>Candida californica</i>	40MCF14
3	<i>Issatchenkia terrícola</i>	21MCF14
4	<i>Hanseniaspora uvarum uvarum</i>	50MCF15
5	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	46TASL15
6	<i>P. fermentans</i>	1GTRU15
7	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	3GPEpUf17
8	<i>Candida californica</i>	7MCBS17

Fonte: Autora, 2020.

APÊNDICE B - Linhagens de leveduras killer padrões do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Uva e Vinho.

<b>Número</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nomenclatura</b>
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1B
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91B
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K1
4	<i>Candida diversa</i>	10MBR2F14
5	<i>Candida diversa</i>	27MBR2F14
6	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	28MCF14
7	<i>Candida diversa</i>	29MCF14
8	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	33MCF14
9	<i>Candida diversa</i>	51MCF14
10	<i>Candida diversa</i>	52MCF14
11	<i>Candida diversa</i>	30MPB12
12	<i>Candida diversa</i>	12MPB12
13	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	13GTRU15
14	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	7GTGU15
15	<i>Candida diversa</i>	44TASL15
16	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	37GPEpU15
17	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	34GPEpU16
18	<i>Candida diversa</i>	2GCEpU16
19	<i>Candida diversa</i>	8GCEpU16
20	<i>Candida diversa</i>	36GCEpU16
21	<i>Candida diversa</i>	40GCEpU16
22	<i>Candida diversa</i>	41GCEpU16
23	<i>Candida diversa</i>	19GTEpU16
24	<i>Candida diversa</i>	28GTEpU16

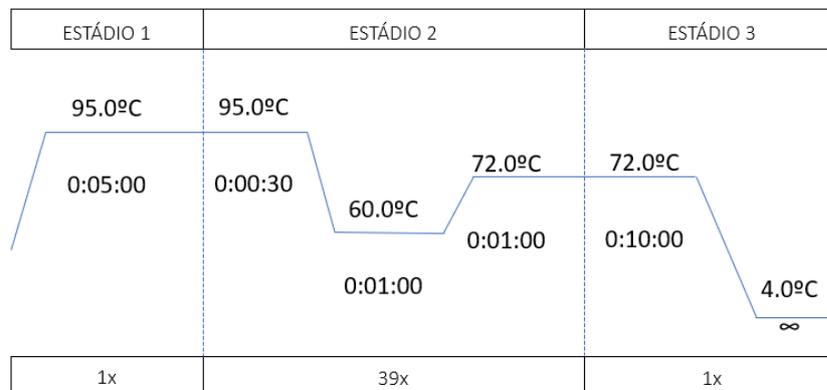
Fonte: Autora, 2020.

Apêndice C – Componentes necessários para a realização da técnica de PCR.

Reagentes	Volume
Água ultra-pura	13,95 µL
Tampão <i>Taq</i> DNA Polimerase 10x	2,50 µL
Cloreto de Magnésio 50mM	0,75 µL
Nucleotídeos trifosfatados 1mM	4,50 µL
Oligonucleotídeos iniciadores F 20pmol/µL	1,0 µL
Oligonucleotídeos iniciadores R 20pmol/µL	1,0 µL
<i>Taq</i> DNA polimerase 5U/ µL	0,3 µL
DNA amostral	1,0 µL

Fonte: Autora, 2020.

Apêndice D - Programação no termociclador para a realização da PCR.



Fonte: Autora, 2020.

Apêndice E - Resumo da produção final de CO<sub>2</sub> após 96 horas de avaliação e nível de produção de H<sub>2</sub>S das linhagens da série T84<sub>155-209</sub>.

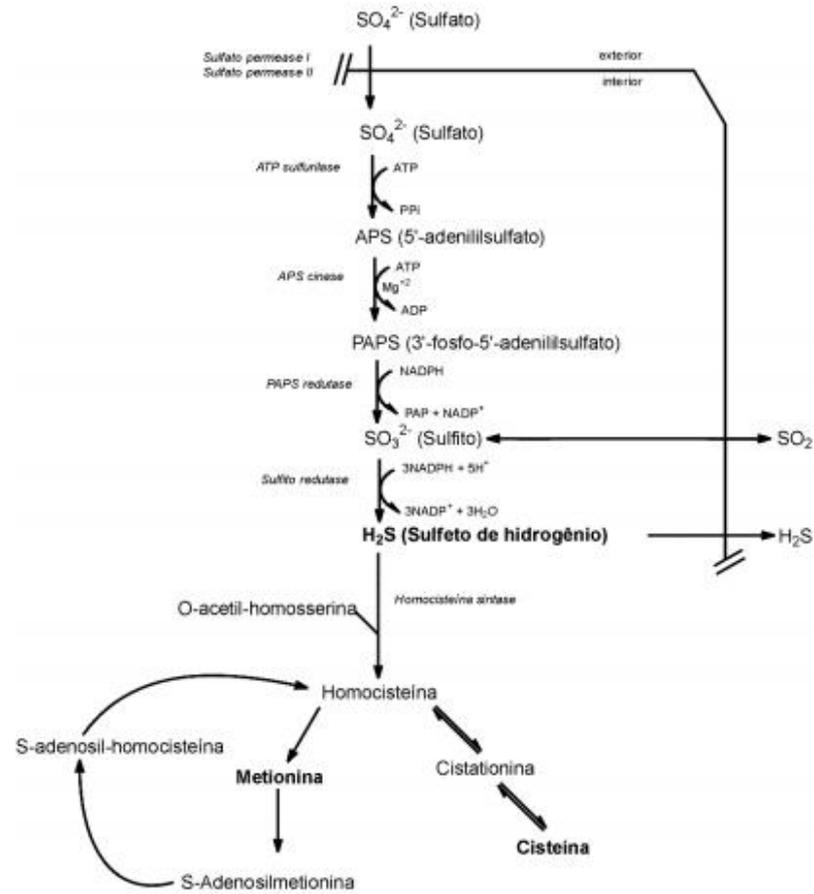
(continua)

Linhagem	H <sub>2</sub> S	CO <sub>2</sub>	Espécie
155	-	0,817	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
156	-	0,927	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
157	++	0,920	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
158	++	0,890	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
159	-	0,857	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
160	+	0,907	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

161	++	0,893	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
162	++	0,860	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
163	-	0,853	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
164	+	0,910	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
166	+	0,913	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
167	+++	0,047	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
168	+	0,930	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
169	-	0,917	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
170	+	0,933	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
171	-	0,910	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
172	+	0,910	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
173	-	0,907	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
174	-	0,713	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
175	+++	0,053	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
176	++	0,777	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
177	+++	0,040	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
180	+++	0,050	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
181	++	0,903	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
182	++	0,923	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
183	+	0,907	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
184	+	0,913	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
185	++	0,927	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
186	-	0,860	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
187	+	0,860	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
188	++	0,923	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
191	++	0,947	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
192	-	0,813	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
193	++	0,917	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
194	++	0,047	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
195	+	0,900	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
196	-	0,730	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
198	+++	0,920	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
199	++	0,897	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
201	+	0,897	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
202	++	0,853	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
203	+	0,843	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
204	++	0,893	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
205	+++	0,060	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
206	++	0,037	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
207	-	0,843	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
208	++	0,047	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
209	-	0,857	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Fonte: Autora, 2021.

## ANEXOS

ANEXO A - Via de redução do sulfato em *Saccharomyces cerevisiae*.

Fonte: NETO & MENDES-FERREIRA (2005).