

Leveduras isoladas de uvas *Vitis vinifera* L. cultivadas na região equatorial brasileira

Yeasts isolated from *Vitis vinifera* L. grapes cultivated in Brazilian Equatorial region

RIALA6/1526

Mariana Oliveira ASSIS¹, Maria Eugênia de Oliveira MAMEDE^{1*}, Aláise Gil GUIMARÃES¹, Luíze Sales SANTOS², Carlos Augusto ROSA³

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Ondina, Salvador, BA, Brasil, CEP: 40170-115. Tel.: (71) 3283-6916.

E-mail: mmamede@ufba.br

²Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA

³Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

Recebido: 31.07.2012 – Aceito para publicação: 22.11.2012

RESUMO

O Vale do Submédio São Francisco, localizado nos estados da Bahia e Pernambuco, é uma das regiões mais promissoras na produção de vinho no Brasil. É ainda desconhecida a possibilidade dessa região em produzir vinhos por fermentação espontânea e gerar produto com características típicas regionais. Neste estudo foram isoladas e identificadas as leveduras da superfície de uvas *Vitis vinifera* L. frescas, cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco, Brasil. Os isolados foram identificados pelas características morfofisiológicas, habilidade de crescimento em meio de cultura ágar L-lisina e identificação bioquímica, baseando-se em testes fisiológicos (habilidade de fermentação da glicose, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, osmotolerância e termotolerância). Sessenta isolados de leveduras foram obtidos no meio ágar extrato de malte-extrato de levedura (YM); e todos foram pertencentes ao grupo não-*Saccharomyces*. Por meio de testes fisiológicos, 20 dos 60 isolados não foram agrupados em nenhum gênero. 40 dessas leveduras foram sugestivamente identificadas como pertencentes ao gênero *Hanseniaspora* spp. Dessas 40 amostras, 17 receberam sugestiva identificação como pertencentes à espécie *Hanseniaspora guilliermondii*. Em conclusão, a microbiota da casca das uvas cultivadas nessa região é predominada por leveduras não *Saccharomyces*, especificamente *Hanseniaspora* spp.

Palavras-chave. identificação bioquímica, *Vitis vinifera* L., leveduras, *Hanseniaspora*, vale do submédio São Francisco.

ABSTRACT

The São Francisco Submid Valley is located in Bahia and Pernambuco states, and it is one of most promising regions for wine production in Brazil. It is still unknown the capability of this region in producing wine by spontaneous fermentation, and generating a product with typical regional characteristics. This study aimed at isolating and identifying the yeasts contaminating the peel of grapes *Vitis vinifera* L. cultivated in the Valley of the São Francisco Submid, Brazil. The isolates were identified based on morpho-physiological characteristics, growth ability in culture medium L-lysine agar, and biochemical identification by means of physiological tests (glucose fermentation ability, assimilation of carbon and nitrogen sources, osmotolerance and thermotolerance). Sixty yeasts isolates were detected on yeast extract-malt extract (YM) agar, and all of them belonged to non-*Saccharomyces* group. Physiological tests showed that 20 of 60 isolates did not grouped into any genera; and 40 isolates were suggestively identified as belonging to *Hanseniaspora* spp. Of 40 isolates, 17 were suggestively classified into *Hanseniaspora guilliermondii* species. The microbiota found on the grapes peel, grown in this region, is predominantly non-*Saccharomyces* yeasts, specifically *Hanseniaspora* spp.

Keywords. biochemistry identification, *Vitis vinifera* L., yeasts, *Hanseniaspora*, São Francisco submid valley.

INTRODUÇÃO

O Vale do Submédio São Francisco está localizado entre 9° e 10° de latitude sul e é a região produtora de vinho mais próxima da linha do equador em todo o mundo. Atualmente, há nessa região uma área equivalente a 700 hectares de parreiras com cultivares que dão origem a aproximadamente 7 milhões de litros de vinho por ano, sendo 80 e 20% destinado à produção de vinho tinto e branco, respectivamente¹.

Fleet² relata em sua revisão que há concorrência internacional no mercado do vinho; demandas dos consumidores por novos estilos de vinhos; preocupações crescentes sobre os impactos ambientais da produção de vinho e o que isto contribui para a busca de novos desafios para a inovação na tecnologia de produção de vinho.

A fermentação espontânea do vinho é um processo complexo que dá origem a diferentes compostos que definem a qualidade do produto. O processo de fermentação pode ser conduzido por leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, sendo que o papel de diferentes linhagens de *Saccharomyces* na fermentação tem sido muito estudado³. Pesquisas têm sido realizadas no sentido de explorar o potencial das leveduras não-*Saccharomyces* na sua contribuição na formação do aroma e sabor do vinho, podendo dar origem a um produto diferenciado e com características específicas regionais⁴⁻⁵. Ganga e Martinez⁶, estudando a biodiversidade de leveduras indígenas na produção de vinho, identificaram leveduras não-*Saccharomyces* no processo de fermentação, verificando que estas apresentaram potencial para serem utilizadas em processos industriais de produção de vinhos.

Estudos demonstram que as leveduras apiculadas a exemplo da *Hanseniaspora uvarum* e sua forma anamórfica, *Kloeckera apiculata*, bem como a *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Kluyveromyces* são predominantes nas superfícies de uvas⁷.

A técnica convencional de identificação morfológica e bioquímica/fisiológica, quando realizada adequadamente, pode ser uma ferramenta útil e de alto grau de confiança. Essas análises podem ser empregadas para se chegar à conclusão em nível de gênero pelo agrupamento das leveduras⁸.

A produção de uvas fora das tradicionais zonas temperadas merece estudo, pois pode se mostrar com potencial para produção de vinhos típicos regionais e abrir oportunidades de desenvolvimento social,

econômico e tecnológico. Diante do exposto, nosso objetivo foi isolar e identificar leveduras, em nível de gênero, predominantes em uvas frescas cultivadas na região do Vale do Submédio São Francisco (BA/PE), visando à possibilidade da utilização destas em processos biotecnológicos e produção de vinho.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Alimentos do Departamento de Análises Bromatológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia – UFBA em parceria com o Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As amostras de uvas utilizadas foram de cultivares de uvas brancas e tintas das variedades *Vitis vinifera* L., cultivadas nos municípios de Casa Nova (Bahia), localizado a 380 metros de altitude, latitude Sul 09°05'00" e longitude 40°37'00"; Lagoa Grande (Pernambuco), a 361 metros de altitude, 8°59'47" de latitude Sul e longitude 40°16'18" e Santa Maria da Boa Vista (Pernambuco), localizado a 371 de altitude, latitude Sul 8°47'58" e longitude 39°49'39", compreendendo um raio de 200 km de distância entre os locais de coleta. As uvas tintas utilizadas foram: *Cabernet sauvignon* (18,8°Brix), *Syrah* (18,6°Brix), *Egiodolla* (19,6°Brix), *Tempranillo* (21,2°Brix) e *Mouvedre* (17,6°Brix), e as variedades brancas foram *Chenin Blanc* (20°Brix), *Petit verdot* (21°Brix) e *Itália* (17°Brix), totalizando 8 amostras.

Aproximadamente 2 kg de uva de cada cultivar foram coletados diretamente do vinhedo e armazenados em embalagens assépticas e transportadas em caixas térmicas à baixa temperatura. O período entre a coleta de amostra e as análises foi inferior a 24 horas.

De cada variedade foram retiradas 25g e adicionadas em 225 mL de água destilada estéril. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em *stomacher* Mc 1204 (Digital blender ITR) a 200 rpm por 2 min. Foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e semeada com auxílio da alça de Drigalski em placas de Petri, em duplicata, contendo ágar extrato de malte-extrato de levedura (YM) (1% de glicose (Vetec); 2% de ágar bacteriológico (Acumedia); 0,5% de peptona (Acumedia); 0,3% de extrato de malte (Acumedia) e 0,3% de extrato de levedura (Acumedia), suplementadas com cloranfenicol (Himedia), na concentração 100 mg/L.

As placas foram incubadas invertidas em estufa BOD (Alfakit) à temperatura de 28 °C por 48 h. Uma em cada oito colônias de leveduras representativas de cada amostra foram selecionadas ao acaso⁹.

As colônias puras foram repicadas para tubos contendo ágar YM inclinado com adição de glicerina estéril (Vetec) e mantidas sob refrigeração (4 °C) por 30 dias, com repiques a cada 15 dias, para posterior identificação⁸.

Um total de 60 isolados de leveduras foi submetido à identificação de acordo com Kurtzman et al.⁸. Para discriminação rápida entre isolados *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, foi verificada a habilidade do crescimento em meio de cultura seletivo ágar L-Lisina (1,17% de *Yeast Carbon Base*-YCB (Difco), 2% de ágar (Acumedia) com adição de 0,056% de lisina (Merk) e 0,001% de cloranfenicol (Himedia)). Para a identificação fisiológica, os isolados foram reativados em ágar YM por 24 h a 25 °C e, em seguida, realizada a suspensão celular em tubo contendo 5 mL de água destilada estéril. A concentração foi estimada baseando-se no cartão de Wickerham, no nível 3+ de densidade celular forte, equivalente a 10⁶ UFC/mL⁹.

Os testes fisiológicos foram realizados com base na metodologia descrita por Yarrow¹⁰, seguindo as chaves taxonômicas de Kurtzman et al.⁸, utilizando como critério a assimilação de fontes de carbono e nitrogênio em condições de aerobiose; resistência/sensibilidade ao antifúngico ciclohexamida a 0,01%; osmotolerância utilizando 50% de glicose, 10% de NaCl; termotolerância em temperatura de 37 °C e 40 °C e habilidade em fermentar a glicose. As suspensões de leveduras foram inoculadas em placas de Petri contendo os meios de ágar YNB/ e ágar YCB/ (sem fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente) como controle negativo. As avaliações referentes à assimilação de compostos como fontes de carbono e nitrogênio foram realizadas por um período máximo de 21 dias⁹.

A análise morfológica e o tipo de reprodução das leveduras isoladas, agrupadas por meio de testes fisiológicos, foi realizada a partir de culturas com crescimento de 48 a 72 h em placas de ágar YM e pela técnica de preparação a fresco entre lâmina e lamínula, sendo ambos observados em microscópio óptico (1.000 x)⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 60 leveduras isoladas apresentaram habilidade de desenvolvimento em meio ágar L-lisina, sendo assim identificadas como não-*Saccharomyces*.

Segundo Fleet³, o meio de cultura L-lisina empregado para o desenvolvimento de leveduras de origem enológica pode discriminá-las de forma rápida entre não *Saccharomyces* e *Saccharomyces*, pois esse meio não permite o crescimento de *Saccharomyces* devido à inabilidade desta em utilizar esse aminoácido como única fonte de nitrogênio.

Os isolados foram submetidos à identificação fisiológica, de forma a agrupá-los com base nas respostas dos testes bioquímicos^{8,10} (Tabela 1). Dos 60 isolados classificados como não-*Saccharomyces*, 40 foram agrupados como pertencente ao gênero *Hanseniaspora* (dos isolados 1 ao 40).

Desse grupo de 40 leveduras, 17 (as de números 24 a 40 da Tabela 1) responderam de forma similar para a assimilação de compostos de carbono (glicose, celobiose, D-gluconato), nitrogênio (meio com lisina), em meio ausente de aminoácidos, à temperatura de 37 °C, em meio contendo ciclohexamida a 0,01% (resistência ao antifúngico nessa concentração). De acordo com a chave taxonômica utilizada, essas leveduras foram classificadas como espécie sugestiva de *Hanseniaspora guilliermondii* (anamorfo *Kloeckera apis*). Kurtzman et al.⁸ constataram que *Hanseniaspora guilliermondii* se desenvolve à temperatura de 37 °C, diferenciando-se das demais leveduras. Embora as leveduras de números de 1 a 23 tenham crescido a 37 °C, característica esta do gênero *Hanseniaspora*, estas não responderam de forma similar aos demais testes fisiológicos citados acima, impossibilitando o seu agrupamento em um grupo específico quanto à espécie.

Estudos similares para identificação de leveduras por meio de testes bioquímicos/fisiológicos foram realizados por vários pesquisadores. Moreira et al.¹¹, ao avaliarem as características fisiológicas da *H. guilliermondii* e da *H. uvarum* por meio de testes bioquímicos, revelaram que *H. guilliermondii* se desenvolveu à temperatura de 37 °C e em meio de cultivo contendo 0,01% de cicloheximida. Barata et al.¹² isolaram leveduras de uvas da cultivar Trincadeira preta e, por meio de testes fisiológicos de termotolerância, diferenciaram as leveduras *Hanseniaspora guilliermondii* da *H. uvarum* pelo seu crescimento em temperatura de 37 °C.

Li et al.¹³ identificaram leveduras do gênero *Hanseniaspora* em uvas *Cabernet sauvignon* em fermentação espontânea de vinho, na China, e verificaram que estas permaneceram até o final da fermentação. Os autores consideraram esse resultado importante e

Tabela 1. Características fisiológicas das leveduras isoladas do “Vale Submédio São Francisco”

| Total de <i>Hanseniaspora</i> agrupada | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Testes fisiológicos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Galactose | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Sorbose | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Maltose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Sucrose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cellobiose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Trehalose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lactose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Melibiose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rafinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Melzitose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inulina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Amido solúvel | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Ribose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Ramnose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Etnol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glicerol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Eritritol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ribitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Galactitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Manitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Glucitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| DL-Lactato | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Succinato | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Citrato | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| M-Inositol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -</ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Legenda: (+) Assimilou compostos de carbono e nitrogênio; Cresceu a 37 e/ou 40 °C; Fermentou glicose

Legenda: (-) Não assimilou compostos de carbono e nitrogênio; Não cresceu a 37 e/ou 40°C; Não fermentou glicose

sugeriram maiores estudos sobre o papel dessas leveduras na qualidade do vinho.

Quanto à avaliação morfológica, as 40 leveduras agrupadas como *Hanseniaspora* apresentaram morfologia apiculada e reprodução assexuada por brotamento bipolar e estão de acordo com aqueles encontrados por Fleet³, que verificou que as leveduras apiculadas são predominantes nas superfícies de uvas maduras, em especial as do gênero *Hanseniaspora* (anamorfa de *Kloeckera*).

Segundo Bisson et al.⁵, a forma anamorfa da levedura (*Kloeckera*) é predominante em regiões de clima frio. Em 1998, Yarrow¹⁰ observou que a predominância dos gêneros *Kloeckera* e *Hanseniaspora* está diretamente relacionada com a região e a altitude onde se localizam os vinhedos e concluiu que em regiões de altas altitudes há um maior predomínio de *Kloeckera* e em baixas altitudes de *Hanseniaspora*. *Kloeckera apiculata* foi identificada em uvas da cultivar *Chardonnay*, proveniente da região da Serra Gaúcha (RS-Brasil)¹⁴, região que apresenta clima mais frio que o Vale do Submédio São Francisco. Os municípios localizados no Vale do Submédio São Francisco apresentam média altitude, 361 a 380 metros acima do nível do mar, portanto, devido às condições edofo-climáticas da região, houve uma predominância de leveduras do gênero *Hanseniaspora* nas uvas estudadas. Moreira et al.¹⁵ verificaram que leveduras do gênero *Hanseniaspora* podem contribuir muito para a qualidade do vinho, pois produzem concentrações desejáveis de esteres e ácidos graxos em fermentação espontânea. Esses autores sugerem que as *Hanseniaspora* podem produzir vinhos com características diferenciadas quando combinadas com *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa forma, a predominância de *Hanseniaspora* nos cultivares do Vale do Submédio São Francisco pode contribuir para a produção de um vinho com características peculiares da região.

As 20 leveduras que não foram identificadas em gênero pelos testes fisiológicos poderão ser submetidas a técnicas moleculares como ampliação dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA.

CONCLUSÃO

A predominância de leveduras *Hanseniaspora* spp em uvas frescas cultivadas no Vale do Submédio São Francisco pode ter importante significado para a indústria vinícola local, na possibilidade de utilização durante a fermentação espontânea do vinho. Entretanto, estudos complementares de identificação molecular devem ser realizados para explorar a utilização de leveduras desse

gênero, assim como o estudo da contribuição dessas leveduras para o sabor e aroma do vinho.

AGRADECIMENTOS

Às vinícolas Miolo, Rio Sol e Botticelli. Ao programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – PGALI. À FAPESB, pelo apoio financeiro. Ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Silva PC, Correia RC, Soares JM. Histórico e importância socioeconômica. In: Soares JM, Souza PC. A vitivinicultura no semiárido brasileiro. Brasília (DF)/Petrópolis (PE): Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Semiárido; 2009. p.19-34.
2. Fleet GH. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast*. 2008;8(7):979-95.
3. Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*. 2003;86(1-2):11-22.
4. Pretorius IS, Westhuizen Vaan-der JJ, Augustyn OPH. Yeasts biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S Afr J Enol Vitic*. 1999;20(2):61-74.
5. Bisson LF, Waterhouse AL, Ebeler SEM, Walker A, Lapsley JT. The present and future of the international wine industry. *Nature*. 2002;418(6898):696-9.
6. Ganga MA, Martinez C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. *Int J Food Microbiol*. 2004;96(1):76-83.
7. Fleet GH, Heard GM. Yeast-growth during fermentation. In: Fleet GH. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers; 1993. p. 27-54.
8. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout J. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 5. ed. EUA: Elsevier Academic Press; 2011. 1873p.
9. Prado GMM, Castro MMS. Usinas de açúcar e álcool: estudos de leveduras e dos fatores que afetam a fermentação. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello; 1995.
10. Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. 4. ed. Amsterdã: Elsevier Science BV; 1998. p.75-107.
11. Moreira N, Mendes F, Hogg T, Vasconcelos I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int J Food Microbiol*. 2005;103(3):285-94.
12. Barata A, Gonzalez S, Malfeito-Ferreira M, Querol A, Loureiro V. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Res*. 2008;8(7):1008-17.
13. Li SS, Cheng C, Li Z, Chen JY, Yan B, Han BZ, et al. Yeast species associated with wine grapes in China. *Int J Food Microbiol*. 2010;138(1-2):85-90.
14. Mamede MEO, Pastore GM. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da "Serra Gaúcha" (RS). *Cienc Tecnol Aliment*. 2004;24(3):453-8.
15. Moreira N, Pina C, Mendes F, Couto JA, Hogg T, Vasconcelos I. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*. 2011;22:662-7.