

Repercussões enológicas no uso de espécies não-*Saccharomyces*

Diogo Mason Torres

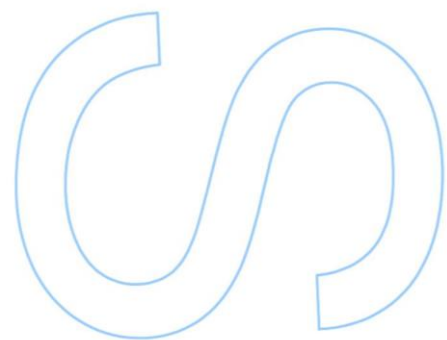
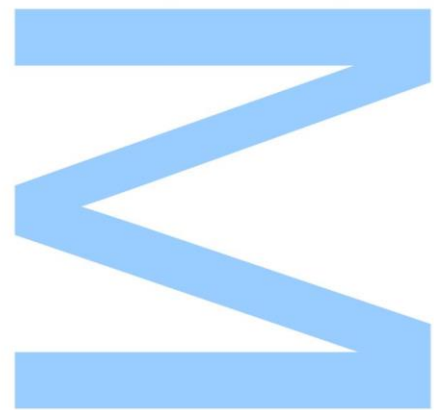
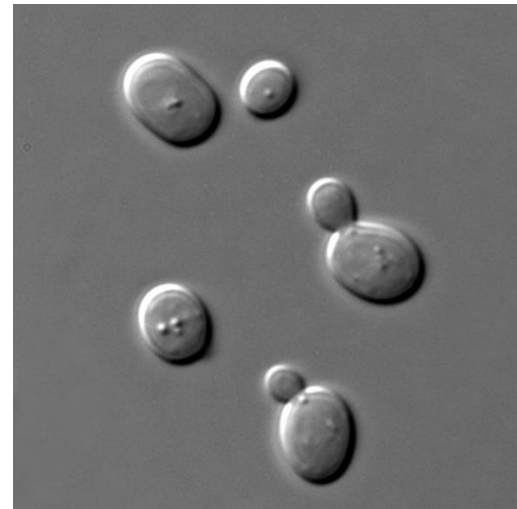
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território

2020

Orientador

Jorge Lacerda Queiróz, Professor, FCUP

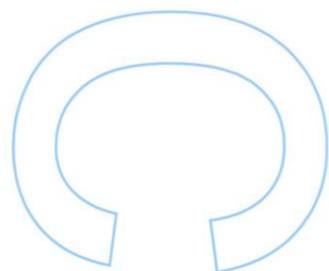
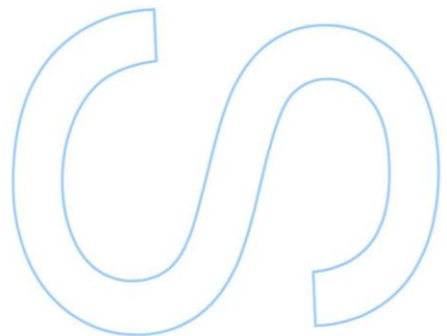
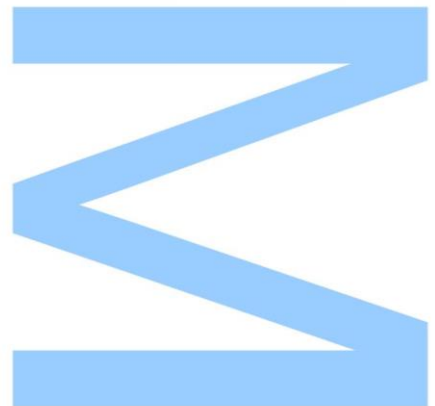




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



A. Resumo

O termo “espécies não-*Saccharomyces*” advém da identificação e agrupamento de espécies fermentativas que geralmente são associadas a alterações sensoriais deteriorantes no vinho, tendo por isso suscitado aos enólogos, a preocupação de como preservar a estabilidade do mosto, garantir a qualidade do vinho e prevenir contaminações destas espécies através de recursos biotecnológicos.

Atualmente sabe-se que destas espécies não se prevê apenas repercussões negativas. Após várias investigações científicas, ficou provado que espécies deste grupo podem realmente ter um papel importante e decisivo na produção vínica, embora apresentem geralmente um metabolismo fermentativo baixo. A modelação da acidez e do grau alcoólico, a produção de ésteres e outros compostos aromáticos, e a capacidade em assumir um papel de controlador biológico, fazem parte de algumas interações interessantes que estas espécies podem ter na fermentação.

Ainda mais interessante é o uso de inoculações (mistas ou sequenciais) com *S. cerevisiae*, que permite o realce de repercussões positivas e a controlo das negativas que podem ser expostas ao vinho, com a adição de que as fermentações são finalizadas, geralmente, por *S. cerevisiae*.

Por fim, foi dado destaque a dez espécies não-*Saccharomyces* que, consoante a literatura, representam maior potencial biotecnológico no setor vínico. As espécies são: *Aureobasidium pullulans*, *Candida stellata*, género *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulasporea delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Zygosaccharomyces rouxii*.

Apesar de toda a literatura já publicada, serão necessárias mais investigações e ensaios práticos sobre o uso destas espécies. A identificação e a manipulação de estirpes poderão assegurar que, no futuro, o investimento que hoje apresenta um risco considerável seja mais seguro e fiável a todos os produtores de vinho espalhados no globo.

Palavras chave: Enologia, Inovação, Leveduras, Espécies não-*Saccharomyces*, Fermentação.

B. Abstract

The term “non-*Saccharomyces*” comes from the identification and grouping of fermentative species that are normally associated with deteriorating sensory changes in wine, which has therefore raised concerns among winemakers on how to preserve the stability of the must, guarantee the quality of the wine and prevent contamination of these species through biotechnological resources.

Currently, it is known that these species are not only expected to have negative repercussions. After several scientific investigations, it has been proven that species in this group can really play an important and decisive role in wine production, although they generally have a low fermentative metabolism. The modeling of acidity and alcohol content, the production of esters and other aromatic compounds, and the ability to assume the role of biological controller, are part of some interesting interactions that these species can have in fermentation.

What makes it even more interesting is that the use of inoculations (mixed or sequential) with *S. cerevisiae*, helps to highlight the positive repercussions and to control the negative ones that will be exposed in the wine. Inoculations with *S. cerevisiae* in this case, will make it possible to finish fermentation.

Finally, it was highlighted ten non-*Saccharomyces* species that, according to the literature, represent greater potential in the wine sector. The species are: *Aureobasidium pullulans*, *Candida stellata*, genus *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulasporea delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*.

Despite all the literature already published, further research and practical tests on the use of these species are needed. The identification and manipulation of strains could ensure that in the future, the investment which today presents a considerable risk, will be safer and more reliable for all wine producers around the globe.

Keywords: Oenology, Innovation, Yeasts, non-*Saccharomyces* species, Fermentation.

Índice

A. Resumo.....	3
B. Abstract.....	4
I. Lista de abreviaturas	6
II. Índice de tabelas e figuras.....	7
1. Introdução	7
2. Taxonomia e ecologia das leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	10
3. Importância das leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	12
4. Metabolismo de espécies não- <i>Saccharomyces</i>	14
4.1. Importância do oxigénio	17
4.2. Produção de etanol e glicerol	18
4.3. Produção de álcoois superiores	19
4.4. Produção de ésteres	19
4.5. Modulação da acidez no vinho	20
5. Espécies não- <i>Saccharomyces</i> e as suas repercussões enológicas	23
5.1. <i>Aureobasidium pullulans</i>	23
5.2. <i>Candida stellata</i>	24
5.3. <i>Hanseniaspora/Kloeckera</i> (género)	26
5.4. <i>Lachancea thermotolerans</i>	27
5.5. <i>Metschnikowia pulcherrima</i> (<i>Candida pulcherrima</i>)	29
5.6. <i>Saccharomycodes ludwigii</i>	30
5.7. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	32
5.8. <i>Torulaspota delbrueckii</i>	34
5.9. <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	35
5.10. <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	36
6. Conclusão	38
7. Referências bibliográficas	40

I. Lista de abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato;

COV – Compostos orgânicos voláteis;

CO₂ – Dióxido de carbono

CFU – Unidades formadoras de colónias;

DAP – Fosfato diamónio;

DMDC – Dimetil dicarbonato;

H/K – *Hanseniaspora/Kloeckera*;

H₂S – Sulfeto de hidrogénio;

NS – Não-*Saccharomyces*;

LAB – Bactérias lácteas;

SC – *Saccharomyces cerevisiae*;

SO₂ – Dióxido de enxofre.

II. Índice de tabelas e figuras

Tabela 1 - Espécies de leveduras associadas a uva e ao vinho. Tabela adaptada em Bison *et al.*, 2017 – página 8.

Tabela 2 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *A. pullulans*, referindo as repercussões correspondentes – página 23.

Tabela 3 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *C. stellata*, referindo as repercussões correspondentes – página 25.

Tabela 4 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de espécies do grupo *Hanseniaspora/Kloeckera*, referindo as repercussões correspondentes – página 26.

Tabela 5 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *L. thermotolerans*, referindo as repercussões correspondentes – página 28.

Tabela 6 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *M. pulcherrima*, referindo as repercussões correspondentes – página 29.

Tabela 7 – Métodos alternativos para combater contaminações de *S. ludwigii* – página 31.

Tabela 8 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *S. ludwigii*, referindo as repercussões correspondentes – página 31.

Tabela 9 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *S. pombe*, referindo as repercussões correspondentes – página 32.

Tabela 10 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *T. delbrueckii*, referindo as repercussões correspondentes – página 34.

Tabela 11 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *W. anomalus*, referindo as repercussões correspondentes – página 35.

Tabela 12 – Métodos alternativos para combater contaminações de *Z. rouxii* – página 37.

Tabela 13 – Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *W. anomalus*, referindo as repercussões correspondentes – página 37.

Figura 1 - Metabolismo fermentativo da glucose pelas leveduras. Figura adaptada em Waldir, 2018. – página 15.

Figura 2 - Diagrama simples dos processos de vinificação para vinhos brancos, rosés e tintos. – página 22.

1. Introdução

Até 1856 pensava-se que a fermentação era um processo meramente químico. Louis Pasteur através de um trabalho com sumo de beterraba, onde o objetivo era perceber o porquê de este ficar azedo com o passar do tempo, percebeu que este fenómeno estava a ser conduzido por um ser vivo – a levedura. Esta experiência fez com que o cientista especulasse que a deterioração do vinho em vinagre estivesse relacionada com o fenómeno estudado no sumo de beterraba (Feinstein, 2008). Em resultado desta descoberta, a ciência e a tecnologia alimentar evoluíram sensacionalmente, refletindo-se hoje nos vários sectores industriais ligados a este ramo da ciência. Sendo a produção vitivinícola um deles e um dos mais antigos, com mais de 7000 anos de história. A primeira fermentação, por exemplo, foi provavelmente o resultado de uma mera coincidência quando, espontaneamente, leveduras fermentaram uvas danificadas dentro dos vasos onde os caçadores-coletores misturavam as suas colheitas (Chambers & Pretorius, 2010).

O vinho é o produto final da atividade fermentativa de leveduras e bactérias no mosto de uva. Sendo a vinificação um processo não estéril, o microbioma presente numa fermentação vínica pode variar significativamente, tanto que, cerca de quarenta géneros e cem espécies diferentes de leveduras já foram isoladas a partir de uvas ou vinho (König *et al.*, 2017; Fleet, 2008). A fermentação e redução de açúcares no mosto de uva é realizado, em grande parte, por leveduras do género *Saccharomyces*, principalmente por *S. cerevisiae*. A espontânea fermentação do mosto, envolve complexas sucessões de crescimentos e mortes de diferentes leveduras (Fleet *et al.*, 1993; Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006) e, estas mesmas, influenciam as propriedades organoléticas do vinho. Ou seja, a fermentação vínica natural é uma fermentação onde não há apenas uma espécie de leveduras presente (Fleet, 1990).

Apesar de *Saccharomyces* ser geralmente dominante na fermentação, estas leveduras não são normalmente encontradas entre as leveduras epífitas presentes na superfície do bago da uva, onde espécies dos géneros como *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* e *Hansenula* são consideradas dominantes (Jackson, 2000). Estes géneros, entre outros, são conhecidos no meio da vinicultura como espécies não-*Saccharomyces* (NS). No passado, leveduras NS eram consideradas pouco significantes para a fermentação, e também, indesejadas no processo de vinificação, porque havia uma grande probabilidade de provocarem a deterioração do vinho (Comitini *et al.*, 2017), como por exemplo, levando à formação de compostos indesejados, tal como aminas biogénicas que levantam questões de saúde bastante severas (Bison *et al.*, 2017). No presente, o papel das leveduras NS foi reavaliado e é reconhecido que estirpes cuidadosamente selecionadas, conseguem influenciar positivamente a vinificação, melhorando as propriedades organoléticas do vinho

e constituindo, provavelmente, a tendência mais empolgante na microbiologia moderna associada à enologia (Comitini *et al.*, 2017; Fleet, 2008; Jolly *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2016).

Com base na investigação realizada até hoje sobre o tema, seguidamente serão apresentadas algumas das leveduras não-*Saccharomyces* presentes na tabela 1. Em estudo estão as leveduras: *Aureobasidium pullulans*; *Candida stellata*; género *Hanseniaspora/Kloeckera*; *Lachancea thermotolerans*; *Metschnikowia pulcherrima*; *Saccharomycodes ludwigii*; *Schizosaccharomyces pombe*; *Torulaspota delbrueckii*; *Wickerhamomyces anomalus*; *Zygosaccharomyces rouxii*. A modelação biológica da acidez (acidificação e desacidificação), a produção de ésteres, terpenos e vários metabolitos, e também a capacidade em exercer funções biocontroladoras, representam algumas das capacidades destas leveduras em fornecer algum tipo de repercussão enológica no vinho (Vilela 2019; Morata *et al.* 2018; Loira *et al.* 2018; Ramírez *et al.* 2018; Ivit *et al.* 2018; Padilla *et al.* 2018; Martin *et al.* 2018; Morata *et al.* 2019; García *et al.* 2018; Bozoudi *et al.* 2018).

Tabela 1. Algumas espécies de leveduras associadas à uva, ao mosto e ao vinho^a. Tabela adaptada em Bison *et al.*, 2017.

Nome da espécie ^b	Sinónimo	Habitat ^d
<i>Aureobasidium pullulans</i>		U
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	V
<i>Bulleromyces albus</i>		U
<i>Candida albicans</i>		U
<i>A. apicola</i>		U
<i>C. azyma</i>		U
<i>C. boidinni</i>		U
<i>C. bombi</i>		U
<i>C. cidri</i>		U
<i>C. fermanti</i>		U
<i>C. hellenica</i>		U
<i>C. intermedia</i>		U
<i>C. matapsilosis</i>		U
<i>C. oleophila</i>		U
<i>C. parapsilosis</i>		U
<i>C. pomicola</i>		U
<i>C. sake</i>		U
<i>C. stellata</i>		U, M, V
<i>Citeromyces matritensis</i>	<i>Candida globosa</i>	U
<i>Cryptococcus laurentii</i>		U
<i>C. magnus</i>		U
<i>Curvibasidium pallidicorallinum</i>		U
<i>Cystobasidium minuta</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>	U
<i>C. slooffiae</i>	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	U
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>	U, M
<i>Filobasidium oeirense</i>	<i>Cryptococcus oeirensis</i>	U
<i>F. wieringae</i>	<i>C. wieringae</i>	U
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>		U, M, V
<i>H. guilliermondii</i>	<i>Kloeckera apis</i>	U, M

(continua na página seguinte)

Tabela 1. (continuação)

Nome da espécie ^b	Sinónimo	Habitat ^d
<i>H. opuntiae</i>		U
<i>H. osmophila</i>	<i>Kloeckera corticis</i>	U
<i>H. thailandica</i>		U
<i>H. uvarum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	U, M
<i>H. valbyensis</i>	<i>Kloeckera japonica</i>	U, M
<i>H. vineae</i>	<i>Kloeckera africana</i>	U, M, V
<i>Hyphopichia burtonii</i>	<i>Pichia burtonii</i>	U
<i>Kabatiella microsticta</i>	<i>Aureobasidium mictostictum</i>	U
<i>Kazachstania unispora</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i> ; <i>S. delbrueckii</i>	U
<i>Kluyveromyces hubeinsis</i>		U, M
<i>K. lactis</i>		U, M
<i>Lachancea kluyveri</i>	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	U
<i>L. thermotolerans</i>	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	U, M
<i>Lipomyces lipofer</i>		U
<i>L. tetrasporus</i>		U
<i>Metschnikowia andauensis</i>		U
<i>M. chrysoperlae</i>		U
<i>M. fructicola</i>		U
<i>M. pulcherrima</i>	<i>Candida pulcherrima</i>	U, M
<i>M. vitícola</i>	<i>C. kofuensis</i>	U
<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>Pichia caribbica</i> , <i>Candida fermentati</i>	U
<i>M. guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i> ; <i>Pichia guilliermondii</i>	U, M, V
<i>Millerozyma farinosa</i>	<i>Saccharomyces farinosa</i> ; <i>Zygosaccharomyces farinosus</i> ; <i>Pichia farinosa</i>	U
<i>Naganishia albida</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>	U
<i>N. bhutanensis</i>	<i>C. bhutanensis</i>	U
<i>N. globosa</i>	<i>C. saitoi</i>	U
<i>Nakazawaea ishiwadae</i>	<i>Candida ishiwadae</i>	U
<i>Papiliotrema flavescens</i>	<i>Cryptococcus flavescens</i>	U
<i>P. fuscus</i>	<i>Auriculibuller fuscus</i>	U
<i>P. nemorosus</i>	<i>Cryptococcus nemorosus</i>	U
<i>P. terrestris</i>	<i>Cryptococcus terrestris</i>	U
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Candida lambica</i>	U, M, V
<i>P. kluyveri</i>	<i>Hansenula kluyveri</i>	U, M
<i>P. kudriavzevii</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	U, M
<i>P. manshurica</i>		V
<i>P. membranifaciens</i>	<i>Saccharomyces membranifaciens</i> ; <i>Debaryomyces membranifaciens</i>	V
<i>P. occidentalis</i>	<i>Candida sorbose</i> ; <i>Issatchenkia occidentalis</i>	U, M
<i>Rhodospiridium babjevae</i>		U
<i>R. kratochvilovae</i>	<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	U
<i>R. toruloides</i>	<i>R. glutinis</i>	U
<i>Rhodotorula bacarum</i>		U
<i>R. fujisanensis</i>	<i>Candida fujisanensis</i>	U
<i>R. mucilaginosa</i>	<i>Torulopsis mucilaginosa</i>	U
<i>R. nothofagi</i>		U
<i>Saccharomyces bayanus</i>		U, M, V
<i>S. cerevisiae</i>		U, M, V
<i>S. pastorianus</i>		U, M, V
<i>S. uvarum</i>		U, M, V
<i>Saccharmycodes ludwigii</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	U, M, V
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>		U
<i>S. pombe</i>		U, M, V

(continua na página seguinte)

Tabela 1. (continuação)

Nome da espécie ^b	Sinónimo	Habitat ^d
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>		U
<i>S. pararoseus</i>	<i>Sporobolomyces japonica</i>	U
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>		U
<i>S. longiusculus</i>		U
<i>S. nylandii</i>		U
<i>S. roseus</i>		U
<i>S. oryzicola</i>		U
<i>Starmerella bacillaris</i>	<i>Candida stellata</i> ^c , <i>C. zemplinina</i>	U, M
<i>S. bombicola</i>	<i>C. bombicola</i>	U
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Candida colliculosa</i> , <i>Zygosaccharomyces globiformis</i>	U, M
<i>Tremella globispora</i>		U
<i>Vishniacozyma foliicola</i>	<i>Cryptococcus foliicola</i>	U
<i>V. canescens</i>	<i>C. canescens</i>	U
<i>V. tephrensis</i>	<i>C. tephrensis</i>	U
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Hansenula anomala</i> , <i>Pichia anomala</i>	U, M
<i>Yarrowia lipolytica</i>		U
<i>Zygoascus hellenicus</i>		U
<i>Z. meyeræ</i>		U
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		U, M, V
<i>Zygotulaspota florentina</i>	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	U

^a Descrito como tal em: Boulton *et al.* (1996), Renouf *et al.* (2007), Jolly *et al.* (2013), Byrsch-Herzberg & Seidel (2015), Drożdż *et al.* (2014), Setati *et al.* (2015), Boynton & Greig (2016), Garofalo *et al.* (2016), Jara *et al.* (2016), Rossouw & Bauer (2016), Villalba *et al.* (2016).

^b Nome atualmente aceite tal como listado em MycoBank: <http://www.mycobank.org/>. Acedido a 15/07/2020.

^c Muitas estirpes de *C. zemplinina* foram identificadas erroneamente como *C. stellata* na literatura, resultando num equívoco (Csoma & Sipiczki, 2008). *C. zemplinina* agora é classificado como *S. bacillaris*, mas na antiga literatura foi identificado como *C. stellata*.

^d Habitat abreviado na tabela em com as letras: U, M e V. Sendo “U” para uva, “M” para mosto e “V” para vinho.

2. Taxonomia e ecologia das leveduras não-*Saccharomyces*

As leveduras são microrganismos eucarióticos que podem ser encontradas em vários habitats como por exemplo: no solo, no ar, na água e também à superfície de plantas e frutos. O crescimento destes organismos requer, nutritivamente, um meio rico em açúcares fermentáveis (glucose, frutose, sucrose, maltose e maltotriose), aminoácidos, vitaminas, minerais e, por vezes, oxigénio (Mercado *et al.*, 2007; Clavijo *et al.*, 2010). As leveduras podem ser distinguidas microscopicamente pela sua forma (p.e. oval, elipsoidal e redonda) e através de testes microbiológicos e bioquímicos – fermentação de açúcares e assimilação de aminoácidos. A produção e a tolerância ao etanol, ácidos orgânicos e dióxido de enxofre (SO₂) também são parâmetros cruciais que permitem a distinção entre espécies. Estes microrganismos conseguem tolerar ambientes ácidos (pH≤3,5) (Barnett *et al.* 1990).

Devido à evolução da indústria alimentar e de bebidas foi concebida uma divisão classificatória originando dois grupos – *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. As leveduras do género *Saccharomyces* são as mais estudadas sendo a *S. cerevisiae* a espécie mais conhecida. Estirpes de *S. cerevisiae* são utilizadas frequentemente na fermentação do vinho e da cerveja devido à sua excelente capacidade fermentativa, ao seu rápido crescimento e a sua adaptação facilmente conseguida. Esta espécie consegue tolerar concentrações de SO₂ que leveduras NS não conseguem. É de salientar que, por vezes, são encontradas estirpes de *S. cerevisiae* selvagens que podem não corresponder a estes parâmetros (Escalante, 2018).

“Espécies NS” é um termo informal usado entre microbiologistas na indústria do vinho que inclui várias espécies de leveduras e fungos (Jolly, *et al.* 2013). A taxonomia atual reconhece 149, géneros compreendendo cerca de 1500 espécies de leveduras que tanto podem ser ascomicetes como basidiomicetes (Kurtzman *et al.*, 2011a). Estas leveduras encontradas vastamente espalhadas pela natureza, tendem a formar comunidades em habitats muito específicos (Starmer & Lachance, 2011). O ambiente da vinificação (habitat), a superfície do bago da uva, a superfície dos equipamentos da adega e a uva em si, podem ser considerados nichos especializados onde estas leveduras, relacionadas com o vinho, formam comunidades (Polsinelli *et al.*, 1996; Goddard & Anfang, 2010; Gayevskiy & Goddard, 2012). A ecologia do bago da uva pode ser bastante variável e previne o tipo de presença microbiana conforme, as fontes de leveduras e outros microrganismos (ar, solo, plantas e animais podem ser vetores de transporte), o grau de colonização influenciado pelo grau de amadurecimento do bago, condições climáticas (chuva e temperatura) e a aplicação de agroquímicos (Davenport, 1974; Rosini *et al.*, 1982; Mortimer & Polsinelli, 1999; Van der Westhuizen *et al.*, 2000; Sabate *et al.*, 2002). O crescimento e aparecimento das leveduras à superfície do bago da uva “verde”, ou não amadurecida, também é afetado pelas limitações nutritivas que acabam por melhorar quando esta amadurece, é esmagada, ou até mesmo quando sofre processos de podridão, observando-se um valor entre 10-10³ cfu/g de leveduras em uvas “verdes”, 10⁴-10⁶ cfu/g em uvas maduras e mais de 10⁶ cfu/g quando a uva se encontra esmagada e com vestígios de podridão (Fleet, 2003). A podridão normalmente encontrada nas vinhas é causada por *Botrytis cinerea*. Esta espécie é especialmente conhecida por originar a “podridão nobre”, usada na produção de vinhos como o Tokay, Aszú e Sauternes. A podridão do bago da uva permite o crescimento e proliferação de várias espécies NS, como por exemplo, a *K. apiculata*, *C. stellata*, *M. pulcherrima*, *Hanseniaspora* spp., *Brettanomyces* spp., *Zygosaccharomyces* spp. (Bisiach *et al.*, 1986; Guerzoni & Marchetti, 1987; Blancard *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2002; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). Então, possíveis contaminações de espécies NS num mosto poderão ser potenciadas pelo uso, durante a

vinificação, de bagos de uvas danificados pela podridão (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

Devido ao contacto inevitável com o mosto da uva, as superfícies da adega permitem o albergue de leveduras, isto dependendo do tipo de práticas higiénicas seguidas na adega. Apesar do mosto da uva ser um ambiente nutritivamente apto ao crescimento de leveduras, a presença de SO₂, pH baixo e pressão osmótica elevada podem degenerar as condições que outrora seriam ideais (Martini *et al.*, 1980, 1996; Rosini *et al.*, 1982; Sharf & Margalith, 1983; Monteil *et al.*, 1987; Gao & Fleet, 1988; Regueiro *et al.*, 1993; Boulton *et al.*, 1996; Epifanio *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 1999; Pretorius *et al.*, 1999; Jawich *et al.*, 2005; Hierro *et al.*, 2006).

Durante o esmagamento da uva, as leveduras NS no bago, nos equipamentos e no ambiente da adega transitam para o mosto (Bisson & Kunkee, 1991; Boulton *et al.*, 1996; Török *et al.*, 1996; Mortimer & Polsinelli, 1999; Fleet, 2003). No entanto, é previsto menor quantidade de comunidades de leveduras nas superfícies da adega do que no bago da uva, já que *S. cerevisiae* é a levedura predominante em superfícies encontradas na adega (Peynaud & Domercq, 1959; Rosini, 1984; Lonvaud-Funel, 1996). As práticas higiénicas usadas na maior parte das adegas modernas tendem a minimizar de forma eficaz, a contaminação do mosto pela flora residente (Pretorius, 2000). De forma a controlar contaminações cruzadas, as leveduras encontradas no mosto após o esmagamento deverão ser as mesmas encontradas inicialmente no bago da uva (Rementeria *et al.*, 2003).

3. Importância das leveduras não-*Saccharomyces*

A influência que as leveduras NS irão ter no aroma e sabor do vinho, dependerá da quantidade de metabolitos formados que por sua vez, reflete o grau de atividade em que estas leveduras se encontram no momento (Jolly *et al.*, 2013). A sobrevivência e o crescimento serão determinados através do tipo de condições ambientais presentes no mosto, que podem ser: pressão osmótica elevada; mistura equimolar entre glucose e frutose; a presença de SO₂; temperatura não-ótima para crescimento; aumento da concentração de etanol e condições anaeróbicas; e o decréscimo da disponibilidade de nutrientes (Bisson & Kunkee, 1991; Longo *et al.*, 1991). A clarificação do mosto da uva branca – centrifugação, tratamento enzimático e arrefecimento do mosto – também pode promover a redução da população inicial de leveduras (Fleet, 1990; Lonvaud-Funel, 1996; Pretorius, 2000). Investigações recentes desacreditam a suposição que afirmava que espécies NS, após o início da fermentação, acabariam por desaparecer devido ao aumento da concentração de etanol e adição de SO₂ (Fleet *et al.*, 1984; Heard & Fleet, 1985; Fleet, 1990, 2003; Querol *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1991; Todd, 1995; Gafner *et al.*, 1996; Granchi

et al., 1998; Zohre & Erten, 2002; Jolly *et al.*, 2003c; Combina *et al.*, 2005; Renault *et al.*, 2009). Essas mesmas investigações, acreditam que a sobrevivência inesperada de leveduras NS se deve à evolução positiva na higiene das adegas modernas que conseqüentemente, leva a uma redução no uso de sulfitos, explicando assim uma taxa de sobrevivência maior por parte destas leveduras. Similarmente, o uso de técnicas laboratoriais modernas levam a uma maior facilidade na deteção e identificação das espécies.

A fermentação alcoólica é um dos processos fundamentais na produção de vinho e é conduzido por leveduras. O modelo de gestão da população microbiana no mosto dita dois tipos de fermentação diferentes: a fermentação por espécies indígenas e a fermentação por inóculo. Na fermentação por espécies autóctones, não há uma adição de culturas puras de qualquer espécie microbiana, sendo a fermentação vínica realizada pelo microbioma presente nas vinhas e pelo microbioma presente nas superfícies da adega (König *et al.*, 2017). Em contraste a esta prática, a fermentação por inóculo permite a escolha da estirpe comercial, frequentemente *S. cerevisiae*, e a adição da mesma ao mosto. A escolha da estirpe será feita com base nas propriedades que são desejadas no vinho, como por exemplo, o aroma, e com base nas condições específicas que a vinificação requer, por exemplo, temperatura ambiente na adega (Capece *et al.*, 2010). Como tal, a escolha irá permitir um melhor controlo da fermentação e a homogeneidade da mesma.

Durante a fermentação, geralmente é verificada a rápida dominância do inóculo de *S. cerevisiae* no mosto sobre espécies NS. Por esta apresentar capacidade de tolerar condições de stress que surgiram durante a fermentação como por exemplo, a resistência à adição de sulfitos durante o processo, e também ao aumento da concentração de etanol, algo que muitas outras leveduras não conseguem suportar, esta características conferem assim vantagens no seu uso (Matallana *et al.*, 2017). Estas características explicam a dominância conseqüente de *S. cerevisiae* durante a fermentação e justificam a sua popularidade quando usada como inóculo no mosto de uva. Para certificar que a fermentação é conduzida pela levedura inoculada, métodos de análise molecular, como a comparação de perfis de DNA cromossómico (Guillamón *et al.*, 1996; Versavaud *et al.*, 1995) e a análise de restrição de DNA mitocondrial (mtDNA) (Versavaud *et al.*, 1995) podem ser úteis.

Combina *et al.* (2005), descrevem através do resultado de fermentações espontâneas com três mostos “Malbecs” diferentes (A, B e C), as sucessões sequenciais das leveduras nos mostos ao fim de 30 dias. No início, espécies como a *K. apiculata* (56%(A), 53%(B) 36%(C)), *M. pulcherrima* (19%(A), 11%(B) 4%(C)), *C. stellata* (12%(A), 5%(B) 12%(C)), *Z. rouxii* (8%(A), sem valor registado para (B) e (C)), entre outras são encontradas no mosto em quantidades variadas. Ao fim de quatro dias, o decréscimo das

leveduras anteriormente mencionadas é significativo tal que, ao fim de doze dias já não há valores percentuais indicados. Em contraste, a sucessão de *S. cerevisiae* é evidentemente positiva com o passar dos dias. Nos dois primeiros dias não chega atingir os 10%, mas no quarto dia já atinge os 60%, exceto no mosto A (14%). A partir do décimo segundo dia, a levedura *S. cerevisiae* atinge os 100% com dominância absoluta nos três mostos.

Apesar da presença firme no início da fermentação, o número de colónias da maioria das espécies NS vai diminuído durante os primeiros dias da fermentação (Fleet *et al.*, 1984; Henick-Kling *et al.*, 1998; Combina *et al.*, 2005). Este comportamento deve-se a uma combinação de efeitos inibitórios provocados pela deficiência em oxigênio, a presença de SO₂, pH baixo, pelo aumento da concentração de etanol no mosto e pelo tamanho ou dominância do inóculo de *S. cerevisiae*. Isto é alusivo ao baixo metabolismo fermentativo encontrado em leveduras NS (Heard & Fleet, 1988; Granchi *et al.*, 1998; Combina *et al.*, 2005). No entanto, há espécies de leveduras NS que conseguem permanecer durante a fermentação, por vezes até ao fim, porque apresentam uma maior tolerância ao etanol (Pina *et al.*, 2004; Combina *et al.*, 2005). As características da espécie terão de ser sempre as mais adequadas às condições a que estão expostas. Os fatores de crescimento são diferentes de espécie para espécie, estirpes referentes à mesma espécie podem ter comportamentos e cinéticas de crescimento bastante diferentes (Jolly *et al.*, 2013). A adição de fosfato diamónio (DAP) ao mosto, valores de pH e de temperatura mais elevados conseguem melhorar a capacidade fermentativa de leveduras NS (Jolly *et al.*, 2003).

Em remate ao comportamento e influência que as leveduras NS possam ter na fermentação do mosto, é de relevância mencionar que o metabolismo destas leveduras podem influenciar o crescimento e a atividade de bactérias vínicas. Na fase inicial da fermentação do vinho tinto, espécies NS podem esgotar os nutrientes essenciais que, combinados com os metabolitos tóxicos formados, conseguem inibir o crescimento de bactérias ácido-lácticas necessárias para a segunda fermentação, a fermentação maloláctica (Costello *et al.*, 2003; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

4. Metabolismo de espécies não-*Saccharomyces*

Tanto espécies NS como espécies *Saccharomyces* partilham os mesmos caminhos no principal metabolismo do carbono, ou seja, os dois grupos metabolizam a glicose através da glicólise. No entanto, os mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo respiro-fermentativo podem diferir entre eles (Flores *et al.*, 2000). A glicólise opera indistintamente sob condições aeróbicas e anaeróbicas e, através dela, a glicose é metabolizada a piruvato sob várias reações bioquímicas (Figura 1).

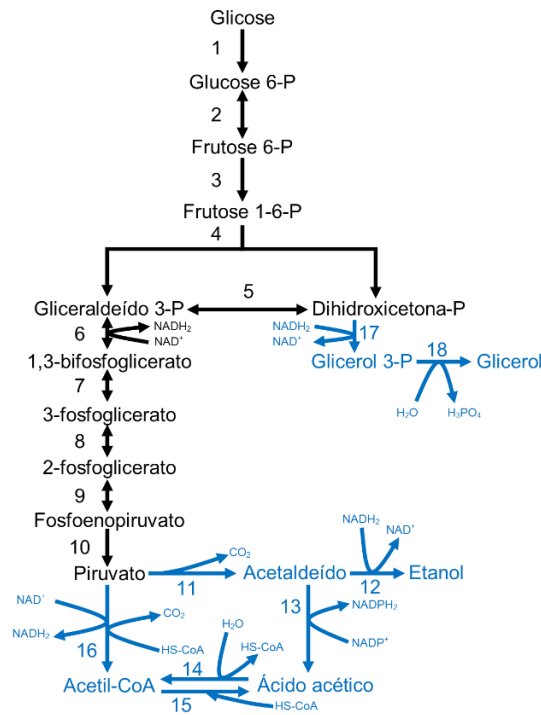


Figura 1 - Metabolismo fermentativo da glicose pelas leveduras: Glicólise (linhas pretas) e produção de etanol e glicerol (linhas azuis). Enzimas: 1, hexoquinase; 2, fosfoglicose isomerase; 3, fosfofrutoquinase; 4, frutose 1,6-bifosfato aldase; 5, triose-fosfato isomerase; 6, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 7, fosfoglicerato quinase; 8, fosfoglicerato mutase; 9, enolase; 10, piruvato quinase; 11, piruvato descarboxilase; 12, álcool desidrogenase; 13, aldeído desidrogenase; 14, acetil-CoA hidrolase; 15, acetil-CoA sintase; 16, piruvato desidrogenase; 17, glicerol 3-P desidrogenase; 18, glicerol 3-fosfatase. Figura adaptada em Waldir, 2018.

Em condições anaeróbicas ou onde a presença de oxigénio é limitada, o piruvato é convertido a acetaldeído, posteriormente a etanol e como resultado, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) são geradas. Quando há uma condição estritamente aeróbica, a produção de energia é maior porque a glicose é completamente oxidada, resultando em trinta e seis moléculas de ATP produzidas por cada molécula de glicose. O baixo rendimento energético obtido pelas leveduras em condições anaeróbicas obriga a célula a aumentar o consumo de glicose de forma a obter uma maior quantidade de energia (ATP). Como consequência, o etanol acumulado durante a fermentação irá desempenhar um efeito inibitório, ficando a atividade fermentativa das leveduras comprometida (Puligundla *et al.*, 2011). Além do etanol, o glicerol também é produzido em condições anaeróbicas contribuindo para o equilíbrio redox dentro da célula. A produção de glicerol aumenta, como resposta ao stress osmótico, em fermentações onde os mostos têm uma gravidade-específica alta (Prior *et al.*, 1997). O ácido acético é o principal ácido orgânico produzido por leveduras durante a fermentação da glicose, e é responsável pela acidificação e descida do pH do meio. Numa visão tecnológica, o etanol é o produto intermédio da fermentação mais importante e a capacidade de produção das leveduras é um parâmetro importante que irá determinar se a levedura em questão é de interesse (Waldir, 2018).

No século dezanove, Gay Lussac propõe uma relação estequiométrica que explica a produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae*. Esta relação sugere que a partir de duas moléculas de glucose ($C_6H_{12}O_6$) são produzidas duas moléculas de etanol (C_2H_5OH) e duas moléculas de dióxido de carbono (CO_2), onde existe uma relação de 0,511g etanol/g glucose. Na prática, além do etanol e do CO_2 , também há produção de biomassa, glicerol e outros compostos minoritários (Waldir, 2018). Numa escala industrial, um valor correspondente a 0,45g etanol/g de glucose é mais aceitável (Boudarel, 1984). No caso das espécies NS são esperados valores menores. Em relação ao glicerol, no caso de *S. cerevisiae*, a produção deste corresponde aproximadamente a apenas 3% do açúcar utilizado. Os compostos minoritários são, álcoois superiores, ésteres, aldeídos, ácidos orgânicos, entre outros (Waldir, 2018).

O flavour é o conjunto de sensações criadas por certas moléculas que induzem efeitos no sabor, aroma e tato. O flavour primário encontrado no vinho provém da uva, enquanto que o flavour secundário provém dos ésteres produzidos pelas leveduras durante a fermentação (Nykänen, 1986; Lambrechts & Pretorius, 2000). Muitos dos compostos que conferem aroma, estão presentes nas uvas sob a forma de precursores glicosilados (Todd, 1995; Pretorius, 2003). Estes compostos podem ser hidrolisados pela enzima β -glucosidase, originando compostos voláteis livres que podem melhorar o aroma e o sabor do vinho. No entanto, esta enzima não é codificada por *S. cerevisiae* (Ubeda-Iranzo *et al.*, 1998; Van Rensburg *et al.*, 2005). Em contraste, várias leveduras NS pertencentes aos géneros *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Pichia* e *Kloeckera*, possuem vários graus de atividade da enzima β -glucosidase, que podem desempenhar um papel na libertação de compostos voláteis dos precursores não voláteis (Rosi *et al.*, 1994; Todd, 1995; Spagna *et al.*, 2002; Fernández-González *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2004; Hernández-Orte *et al.*, 2008). Cordero Otero *et al.* (2003), através da cofermentação de um mosto Chardonnay usando *Debaryomyces pseudopolymorphus* e *S. cerevisiae*, obtiveram um aumento na concentração dos seguintes terpenos: citronenol, nerol e geraniol no vinho. Garcia *et al.* (2002), através da cofermentação de um mosto Moscatel usando *Debaryomyces vanriji* e *S. cerevisiae*, conseguiram produzir vinho onde se notou um aumento na concentração de certos terpinóis. Da mesma forma, Sadoudi *et al.* (2012) demonstram com culturas mistas de *C. zemplinina/S. cerevisiae* e *T. delbrueckii/S. cerevisiae* num mosto de Sauvignon Blanc, que os vinhos provenientes das fermentações com cultura mista apresentaram concentrações de terpinóis mais elevadas, do que aquelas obtidas a partir de fermentações onde só foi usada *S. cerevisiae*.

Outra estratégia que permite aumentar a libertação de compostos voláteis é a adição exógena de preparados enzimáticas que possam atuar sob os precursores não-voláteis que se encontram no mosto (Jolly *et al.*, 2013). A atividade enzimática de β -

glucosidase no mosto pode ser afetada pela concentração de açúcares e álcoois, pelo pH e/ou pela temperatura, sendo que estes fatores têm de ser tomados em consideração antes de adicionar a enzima ao mosto (Mateo & Stefano, 1997). Yanai & Sato (1999), usaram numa fermentação de um mosto com uvas Moscatel, uma β -glucosidase (intracelular) proveniente de *Debaryomyces hansenii*, que mostrou resistência na presença de glucose e etanol, resultando num aumento de monoterpenos no vinho. De forma semelhante, β -glucosidases intracelulares sintetizadas por *Hanseniaspora* sp. e *Pichia anomala*, demonstraram eficácia no aumento da concentração dos compostos voláteis após serem adicionadas a mosto de uva Traminette e ao vinho Traminette (Swangkeaw *et al.*, 2011). O uso da β -glucosidase proveniente da *Sporidiobolus paraseus*, mostrou aumento na libertação de terpenos voláteis em vinho branco e tinto (Baffi *et al.*, 2011). Da levedura *Issatchenkia terricola* foi extraída a enzima β -glucosidase, que se mostrou capaz de aumentar a quantidade de monoterpenos livres e norisoprenóides em vinho branco da casta Moscatel (Gonzalez-Pombo *et al.*, 2011) A concentração de terpenos voláteis em vinhos das castas Airén, Riesling e Moscatel, também aumentaram após a adição de um extrato enzimático proveniente da *Debaryomyces pseudopolymorphus* (Arevalo-Villena *et al.*, 2007)

4.1. Importância do oxigénio

Apesar das leveduras terem capacidade de sintetizar os açúcares por via da fermentação na ausência de oxigénio, o processo fermentativo não está restringido apenas a esta condição. Algumas leveduras, como a *S. cerevisiae* fermentam na presença de oxigénio, mesmo quando a concentração de glucose é suficientemente elevada no meio. O uso da fermentação por parte das leveduras, na presença de oxigénio e concentrações elevadas de glucose é referido como efeito de Crabtree ou repressão do metabolismo respiratório pela glicólise (Crabtree, 1929). A espécie *S. cerevisiae* e as espécies dos géneros *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Brettanomyces*, entre outros, demonstram este mecanismo sendo denotadas como Crabtree positivas (Deken, 1965).

Embora o oxigénio seja um elemento fulcral durante a glicólise, pois serve como o aceitador final dos eletrões sob condições aeróbicas, a levedura *S. cerevisiae* apenas fermenta devido ao efeito de Crabtree sendo o oxigénio essencial na manutenção e na viabilidade da célula, ou seja, permite a síntese de componentes estruturais (ácidos gordos e esteróis) da membrana citoplasmática que funcionarão como proteção ao acréscimo de etanol, que atua como solvente no meio (Puligundla *et al.*, 2011; Buttke *et al.*, 1980; Gibson, 2011). A otimização da taxa de oxigénio fornecida ao mosto é crucial para garantir um melhor rendimento na produção de etanol. Esta ferramenta também permite o controlo da

produção de glicerol no mosto, estando relacionados de uma forma inversamente proporcional (Waldir, 2018). É crucial o arejamento do mosto quando estão a ser usadas espécies NS porque a maior parte das leveduras deste grupo são incapazes de ter metabolismo fermentativo sob condições anaeróbias (Visser *et al.*, 1990). A presença de oxigénio provoca a transformação dos fenóis, reduzindo a adstringência do vinho. Portanto, o arejamento ao controlar o metabolismo fermentativo de espécies NS, irá permitir melhor qualidade dos vinhos (Waldir, 2018).

4.2. Produção de etanol e glicerol

O etanol é o principal produto da fermentação alcoólica, e como atualmente há uma maior procura no mercado por vinhos com menor grau alcoólico, os enólogos estão a moldar estratégias que permitam produzir vinho com menores quantidades de etanol presentes (Kutyna *et al.*, 2010). No meio dessas estratégias, surge a aplicação de espécies NS na fermentação que se tem se provado eficiente (Ciani & Ferraro, 1996; Ferraro *et al.*, 2000; Soden *et al.*, 2000; Ciani *et al.*, 2006; Comitini *et al.*, 2011; Magyar & Toth, 2011; Di Maio *et al.* 2012; Sadoudi *et al.*, 2012). Outra alternativa que permite reduzir a concentração de etanol no vinho é a exploração de leveduras que preferencialmente metabolizem os açúcares por respiração em vez da fermentação (Gonzales *et al.*, 2013). Erten & Campbell (2001), obtiveram vinhos com um conteúdo de 3% v/v de etanol, sob condições aeróbicas, após a fermentação do mosto ser conduzida por *Williopsis saturnus* e por *Pichia subpelliculosa*. Na mesma investigação, a qualidade dos vinhos obtidos foi avaliada e aprovada.

A seguir ao etanol, o glicerol é o metabolito, produzido durante a fermentação alcoólica, com maior importância. O glicerol é importante na regulação do potencial redox na célula (Scanes *et al.*, 1998; Prior *et al.*, 2000). Enologicamente, o glicerol confere suavidade (paladar) ao vinho podendo também promover doçura e complexidade no mesmo. O limite de deteção de glicerol no vinho é de 5,2 g/L dependendo da viscosidade (Noble & Bursick, 1984). É de realçar que a variedade da uva e o estilo do vinho determinam até que ponto, o glicerol irá influenciar as propriedades anteriormente mencionadas (Ciani & Maccarelli, 1998). A produção de glicerol, dependendo da espécie em questão, é por vezes influenciada positivamente pela presença de SO₂, por temperaturas altas durante a incubação e concentrações elevadas dos açúcares presentes (Fleet, 2007). Nieuwoudt *et al.* (2002), concluem que apesar de as concentrações de glicerol encontradas em vinhos do tipo Chardonnay, Sauvignon Blanc e Chenin Blanc, serem elevadas em relação a outros vinhos, a qualidade do vinho não está inteiramente relacionada com a concentração de glicerol. No entanto, a qualidade de outros vinhos pode

ser beneficiada por valores mais elevados de glicerol. *L. thermotolerans* e *C. zemplinina*, entre outras espécies NS, conseguem produzir concentrações elevadas de glicerol durante a fermentação (Ciani & Ferraro, 1998; Soden *et al.*, 2000; Comitini *et al.*, 2011). Lamentavelmente, o aumento da produção de glicerol está normalmente relacionado com o aumento da produção de ácido acético, o que pode degradar a qualidade do vinho (Prior *et al.*, 2000).

4.3. Produção de álcoois superiores

O n-propanol, o isobutanol, o álcool amílico e o álcool amílico-ativo são álcoois superiores produzidos em diferentes quantidades por diferentes leveduras NS (Romano *et al.*, 1992; Lambrechts & Pretorius, 2000). Concentrações elevadas de álcoois superiores no vinho podem trazer características organolépticas indesejáveis no vinho, portanto, na vinificação é necessário manter um balanço harmónico destes compostos podendo assim, conferir complexidade ao vinho (Romano *et al.*, 1992; Romano & Suzzi, 1993b; Vidrih & Hribar, 1999). Normalmente, espécies NS produzem valores mais reduzidos destes álcoois do que *S. cerevisiae*, mas é de notar que há variabilidade entre estirpes (Romano *et al.*, 1992, 1993; Zironi *et al.*, 1993).

Os álcoois superiores são produzidos no citosol e depois exportados para o exterior da célula onde se irão acumular. Estes álcoois resultam da descarboxilação de cetoácidos (resultantes do metabolismo da glucose ou do catabolismo de aminoácidos), que por sua vez levam à formação dos respetivos aldeídos, e quando reduzidos, originam os respetivos álcoois superiores (Ehrlich, 1906; Webb *et al.*, 1963). Os fatores que aumentam o metabolismo de açúcares e aminoácidos, também irão promover a síntese de álcoois superiores. Esses fatores incluem a concentração de aminoácidos, a temperatura e a composição do mosto (Waldir, 2018).

4.4. Produção de ésteres

Os ésteres são os compostos presentes no vinho que mais podem influenciar, positivamente, as características sensoriais do mesmo, tendo sido já identificados mais de 160 ésteres diferentes (Jackson, 2000). A qualidade de vinhos de mesa, ou seja, vinhos consumidos pouco após a produção, pode ser afetada de forma positiva por estes compostos (Lambrechts & Pretorius, 2000; Sumbly *et al.*, 2010). Os ésteres são formados pela ação de enzimas específicas, que catalisam a reação entre um álcool e um ácido gordo volátil (Nordstrom, 1965). De um ponto de vista sensorial, os acetatos (ésteres) são os compostos mais importantes em bebidas fermentadas, onde estão incluídos o acetato

de etilo, acetato de butilo, acetato de propilo, acetato de fenil-etil, acetato de amilo, entre outros. No vinho, o acetato de etilo é o éster em maior abundância, sendo largamente responsável pelo carácter sensorial do vinho associado ao aroma a acetona quando se encontra em concentrações excessivas. Investigações científicas admitem que espécies NS conseguem promover a esterificação de vários álcoois (etanol, álcool amílico e álcool fenílico) transformando-os nos respetivos ésteres (Rojas *et al.*, 2002).

Espécies NS podem ser divididas em dois grupos: leveduras neutras – produzindo pouco ou nenhum composto aromatizante; e leveduras produtoras de aromas – tanto desejáveis como, por vezes, indesejáveis (Van Zyl *et al.*, 1963). Estão incluídas nas leveduras capazes de produzir aromas, *P. anomala* (*Hansenula anomala*) e *K. apiculata*. *M. pulcherrima* (*Candida pulcherrima*) também é conhecida por ser uma produtora de ésteres em grandes quantidades (Bisson & Kunkee, 1991; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004). A acumulação de ésteres na matriz do vinho é determinada pelo equilíbrio entre as enzimas sintetizadoras de ésteres da levedura e as esterases (responsáveis pela rutura, e às vezes pela formação de ligações ésteres) (Swiegers & Pretorius, 2005). Embora seja conhecido que esterases extracelulares ocorrem em *S. cerevisiae*, não se sabe se acontece o mesmo com as espécies NS (Ubeda-Iranzo *et al.*, 1998).

4.5. Modulação da acidez no vinho

A seguir aos açúcares, os ácidos orgânicos são os compostos em maior abundância no mosto da uva. Os ácidos orgânicos são responsáveis pelo sabor ácido no vinho e também são influentes na estabilidade, cor e pH do vinho. A qualidade e a quantidade dos ácidos orgânicos em junção com os açúcares, têm um efeito decisivo na qualidade do vinho na boca (Liu *et al.*, 2007). A composição e concentração dos ácidos no mosto e no vinho, são influenciadas pela casta da uva, pela composição do solo e pelas condições climáticas (Cosme *et al.*, 2016). Os ácidos predominantes na uva são o tartárico e o málico, que em conjunto representam mais de 90% da acidez presente na uva, em proporções desde 1:1 até 1:3 de tartárico para málico (Lamikanra *et al.*, 1995). Num pH típico do vinho ($\approx 3,4$), o ácido tartárico ($pK_a \approx 2,98$) será três vezes mais ácido que o ácido málico ($pK_a \approx 3,46$) (Ford *et al.*, 2012).

No paladar, o ácido málico é descrito como um sabor metálico e por vezes relacionado com o sabor de maçãs verdes, enquanto que o ácido tartárico é descrito à semelhança da acidez encontrada nos citrinos. Além destes dois ácidos, também são encontrados nos vinhos o ácido láctico, cítrico e succínico que apresentam sensações azedas, frescas e amargas, respetivamente (Boulton *et al.*, 1996). O ácido cítrico pode ser bastante útil como por exemplo, o ácido apresenta atividade antimicrobiana contra bolores

e bactérias, e também ajuda a prevenir o apodrecimento ou escurecimento do vinho (Sharma, 2000). O ácido acético pode impactar negativamente a qualidade do vinho. Quando encontrado em concentrações superiores a 0,8-0,9 g/L, confere um aroma avinagrado ao vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). O ácido acético pode estar presente no mosto devido à presença de *Hansenula* spp. e *Brettanomyces* spp., fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *A. tenuis*, *Penicillium* spp., entre outros) e bactérias (bactérias lácteas (LAB) autóctones e bactérias acéticas). Inevitavelmente, o ácido acético é formado em quantidades reduzidas como produto intermédio do metabolismo fermentativo da *S. cerevisiae*, caso sejam encontrados quantidades mais elevadas após a fermentação, será possível ter acontecido uma contaminação por parte de leveduras (*Candida krusei*, *Pichia anomala*, *Saccharomycodes ludwiggi*, entre outras) (Vilela-Moura *et al.*, 2011). O ácido succínico é o ácido produzido pelas leveduras em maiores quantidades durante a fermentação e desempenha um papel importante na acidez (Coulter *et al.*, 2004). O ácido láctico é produzido durante a fermentação maloláctica por LAB, por vezes também pode ser sintetizado por leveduras embora em quantidades menores (Vilela, 2019).

A modelação da acidez no mosto ou no vinho, é definida por dois processos biológicos: acidificação e desacidificação. A desacidificação do vinho com LAB é o método tradicional que permite remover excesso de acidez. No entanto, da acidez total do vinho a desacidificação biológica só afeta o ácido málico, não tendo assim qualquer influência no ácido tartárico (Dicks *et al.*, 1995). A fermentação maloláctica sendo influenciada pela temperatura, pH, concentração de álcoois e SO₂, e por metabolitos produzidos por leveduras, pode comprometer a desacidificação por parte das LAB comuns (Lerm *et al.*, 2010; Alexandre *et al.*, 2004). Em alternativa, *Lactobacillus plantarum* pode ser usada para desacidificar o vinho, porque apresenta resistência às condições de stress criadas durante a fermentação alcoólica e porque também produz vários metabolitos secundários importantes para o sabor, aroma e cor do vinho (Matthews *et al.*, 2004; Brizuela *et al.*, 2019). Algumas estirpes de *L. plantarum* podem produzir maiores concentrações de ácido láctico, contribuindo para acidificação de vinho com baixa acidez (Berbegal *et al.*, 2017a).

As propriedades fermentativas de espécies NS têm sido investigadas, e foi observado que certas espécies apresentam características prosperantes em torno da modelação da acidez no vinho (Vilela, 2019). *L. thermotolerans*, *S. pombe*, *C. stellata*, *T. delbrueckii*, *Z. florentinus*, *P. kudriavzevii* e *C. zemplinina* são algumas das espécies NS que apresentam propriedades enológicas muito interessantes quando usadas para modelação da acidez. Quando usadas em monocultura ou em cultura mista com *S. cerevisiae*, estas leveduras conseguem modular a acidez do vinho e produzir compostos interessantes (polissacarídeos, glicerol e composto voláteis) (Lafon-Lafoucade *et al.*, 1981; Mills *et al.*, 2002; Kapsopoulou *et al.*, 2005; Morata *et al.*, 2007; Vilela-Moura *et al.*, 2008;

Belly *et al.*, 2008; Mónaco *et al.*, 2014; Lencioni *et al.*, 2016; García *et al.*, 2018). Em zonas afetadas pelos efeitos do aquecimento global, onde os vinhos tendem a ser menos ácidos devido ao amadurecimento precoce da uva, espécies NS podem ser usadas para a acidificação (Vilela, 2019). A desacidificação é importante na produção de vinhos inseridos em mercados onde o consumidor prefere um vinho menos ácido (Hopfer & Heymann, 2014), ou em regiões que tendencialmente produzem vinhos com excesso de acidez como em certos anos a Região Demarcada dos Vinhos Verdes.

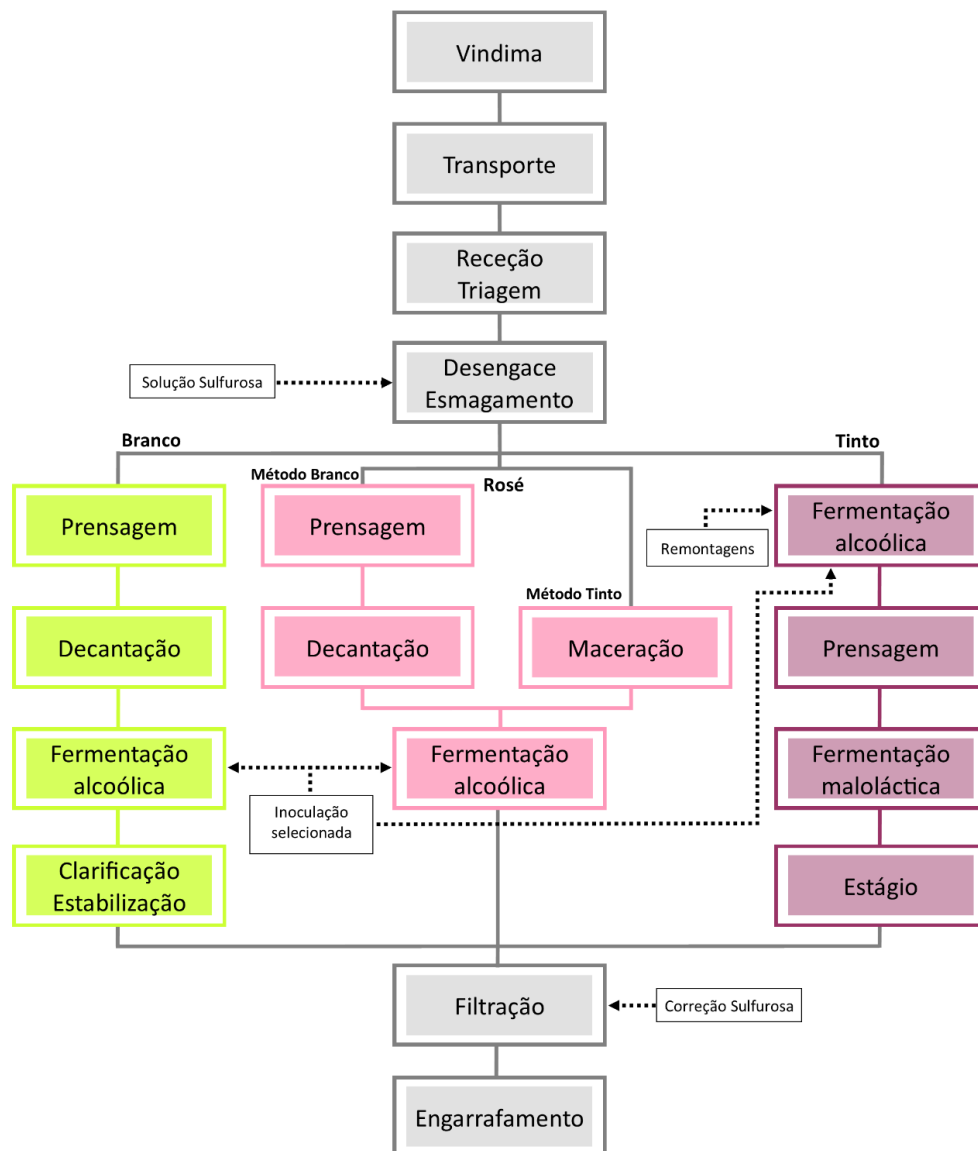


Figura 2 - Diagrama simples dos processos de vinificação para vinhos brancos, rosés e tintos. Embora não seja usual e apenas observado em casos especiais, os vinhos brancos e rosés podem participar numa fase de estágio.

5. Espécies não-*Saccharomyces* e as suas repercussões enológicas

5.1. *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans (*A. pullulans*) é um fungo semelhante a uma levedura (fungos dematiáceos), encontrada ubiquamente na natureza, inclusive nas vinhas (Gostincar *et al.*, 2014). Com mais de 60 anos em investigações e literatura sobre este fungo, sabe-se que este produz uma larga escala de produtos naturais usados em aplicações biotecnológicas e ambientais (Bozoudi & Tsaltas, 2018).

Dado que *A. pullulans* se encontra nos bagos de uva durante todas as etapas de amadurecimento e em outros tecidos da vinha, saudáveis ou não, a contagem e identificação desta espécie torna-se importante para o processo (Barata *et al.*, 2012; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004). Renouf *et al.* (2005), observaram em várias regiões de Bordeaux que esta espécie não era detetada na altura da vindima. A quantidade de colónias foi decrescendo a partir da altura da fase “pintor” até deixar de ser detetável. O contrário foi observado em Itália, Espanha, Canada, Austrália e África do Sul apresentando números elevados (Subden *et al.*, 2003; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Francesca *et al.*, 2010; Clavijo *et al.*, 2010; Setati *et al.*, 2015). No Brasil, França, Nova Zelândia, Grécia e Eslovénia, foram isolados poucos exemplares da espécie (Raspor *et al.*, 2006; Nisiotou & Nychas, 2007; Baffi *et al.*, 2011; Gayevskiy & Goddard, 2012; David *et al.*, 2014).

A diversidade de *A. pullulans* isolados de vários tecidos, era muito maior do que quando comparada com a escala regional. Em vinhas tratadas com fungicidas, foi observado um diferente tipo de colonização, havendo uma maior variação genética entre os isolados. Posteriormente, os autores propuseram que a variedade genética encontrada poderia ser explicada pela evolução da espécie em torno das diferentes condições e pressões ambientais, tendo sido comparado com populações da espécie em vinhas diferentes (Rathnayake *et al.*, 2018).

Tabela 2. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *A. pullulans*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Capacidade biocontroladora	Eficaz competição por nutrientes e espaço e produção de compostos orgânicos voláteis (COV).	Bencheqroun <i>et al.</i> , 2007; Mari <i>et al.</i> , 2012; Di Francesco <i>et al.</i> , 2015 (continua na página seguinte)

Tabela 2. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Atividade enzimática	Com atividade biocontroladora (microbicida e fungicida): quitinase e glucanase; Com aplicação na clarificação do vinho branco: pectinases, glucanases, xilanases e proteases; Com aplicação na libertação de precursores aromáticos frutados e florais: β -glicosidase; Aplicação na redução dos níveis de álcool do vinho: glicose oxidase; Aplicação na redução de carbamato de etilo (uretano): urease.	McCormack <i>et al.</i> , 1994; Ippolito <i>et al.</i> , 2000; Van Oort <i>et al.</i> , 2002; Prakitchaiwattana <i>et al.</i> , 2004; Leite <i>et al.</i> , 2007; Chi <i>et al.</i> , 2007, 2009; Manitchotpsit <i>et al.</i> , 2009, 2011; Leathers <i>et al.</i> , 2013; Rich; <i>et al.</i> , 2013
Aplicação do pululano	Polissacarídeo capaz de estabilizar o mosto, reter a cor e capacidade antioxidante nos vinhos tintos.	Bozoudi & Tsaltas, 2018
Aplicação do PMA	Biopoliéster que pode ser aplicado na uva como revestimento, prevenindo assim perdas de massa.	Chi <i>et al.</i> , 2008
Substrato nutritivo	Libertação de aminoácidos e ácidos nucleicos devido à elevada atividade proteolítica, que podem ser consumidos por outras espécies fermentativas.	Mina & Tsaltas, 2017; Fugelsang & Edwards, 2007

5.2. *Candida stellata*

A levedura *Candida stellata* (*C. stellata*) tem uma história taxonómica caracterizada por várias mudanças. Inicialmente dois tipos de *Candida* foram isolados de um mosto constituído por uvas muito maduras e uvas passas, na Alemanha (García *et al.*, 2018). Um tipo tinha células alongadas e foi denominado como *S. bacillaris*, o outro tipo apresentava células com forma esférica, sendo denominadas como *S. stellatus*. Mais tarde, as duas espécies foram inseridas no género *Torulopsis*. Noutra investigação em Itália, foi isolado de uvas uma espécie que ficou designada por *B. italicus*. Por fim, os taxa foram unificados numa só espécie, *C. stellata*. A estirpe originalmente designada como *S. stellatus* passou a ser designada por CBS 157. A estirpe normalmente usada na investigação de propriedades enológicas, DBVPG 3827, foi reclassificada como *S. bombicola* (Sipiczki &

Ciani, 2005). Devido a estas trocas taxonómicas e dificuldades na identificação, muitas investigações sobre *C. stellata* são na verdade sobre *C. zemplinina* (Csoma & Sipiczki, 2008). *C. stellata* é frequentemente encontrada em uvas maduras e em mostos onde há uma grande concentração de açúcares (Minarki & Hanikova, 1982; Rosini *et al.*, 1982; Divol & Lonvaud-Funel, 2005; Hierro *et al.*, 2006). Uvas que sofreram “podridão nobre” apresentam uma grande presença de *C. zemplinina*, justificada pela capacidade desta levedura tolerar concentrações de ácido acético elevadas, que *C. stellata* não é capaz de suportar.

Tem sido observado que *C. stellata* metaboliza em maiores quantidades a frutose do que a glucose, o que é denominado como carácter frutofílico (Magyar & Tóth, 2011). Foi observado com a estirpe CBS 2649 que a glucose só é metabolizada quando a frutose é totalmente consumida (Soden *et al.*, 2000).

Tabela 3. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *C. stellata*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Metabolismo fermentativo	Produção pouco consistente de etanol quando comparado com SC; Produção de glicerol entre 9-14 g/L (maior que SC).	Noble & Bursick, 1984; Ciani & Ferraro, 1996; Ciani <i>et al.</i> , 1998; Ferraro <i>et al.</i> , 2000; Magyar & Tóth, 2011; Milanovic <i>et al.</i> , 2012; Gobbi <i>et al.</i> , 2014; García <i>et al.</i> , 2017.
Atividade enzimática	Com aplicação na extração do vinho durante a prensagem e filtração e na extração de pigmentos e compostos voláteis da película da uva: pectinases, celulasas e hemiceluloses; Com aplicação na clarificação do vinho branco: proteases (sendo que 38% das estirpes de <i>C. stellata</i> apresentam esta atividade); Com aplicação na libertação de precursores aromáticos frutados e florais: β -glicosidase.	Canal-Llaubères, 1993; Strauss <i>et al.</i> , 2001; Romero-Cascales <i>et al.</i> , 2008; Fernández <i>et al.</i> , 2000; Strauss <i>et al.</i> , 2001; Cordero-Bueso <i>et al.</i> , 2013; García <i>et al.</i> , 2017.
Qualidade e estabilidade do vinho	Capaz de produzir concentrações elevadas de acetaldeídos, acetoína e ácido succínico.	Ciani <i>et al.</i> , 1998

(continua na página seguinte)

Tabela 3. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Uso em cofermentações	Aumento da concentração de glicerol, melhoria da acidez total e redução da concentração de ácido acético no vinho, aprimoramento de compostos aromáticos desejados (ésteres e tióis), redução do conteúdo final de etanol, a libertação vasta de polissacarídeos promovem a melhoria da complexidade e qualidade do vinho; Inoculações sequenciais com SC, resultam numa maior libertação de aromas florais e frutados como também na libertação de manoproteínas. Em inoculações mistas, também pode ser observado um aumento da libertação de polissacarídeos dando mais “corpo” ao vinho.	Suzuki <i>et al.</i> , 1999; Vidal <i>et al.</i> , 2004; Andorrà <i>et al.</i> , 2010, 2012; Comitini <i>et al.</i> , 2011; Giovani <i>et al.</i> , 2012; Sadoudi <i>et al.</i> , 2012; Domizio <i>et al.</i> , 2014; García <i>et al.</i> , 2017; García <i>et al.</i> (2017a)

5.3. *Hanseniaspora/Kloeckera* (género)

As principais leveduras NS associadas à uva pertencem a um grupo apiculado, nomeadamente ao género *Hanseniaspora* e à sua forma assexuada anamórfica *Kloeckera* (Rosini *et al.*, 1982; Loureiro *et al.*, 2012). O grupo *Hanseniaspora/Kloeckera* (H/K) é atualmente composto por dez espécies encontradas no bago da uva (Renouf *et al.*, 2007; Di Maro *et al.*, 2007; Varela & Borneman, 2017). Também podem ser encontradas nas superfícies da adega (Strauss *et al.*, 2001).

Leveduras H/K podem afetar diretamente a fermentação, produzindo sabores, ou indiretamente afetando o crescimento e o metabolismo de *S. cerevisiae* (Martin *et al.*, 2018). No presente, acredita-se que este grupo possa ser um dos mais influentes na qualidade sensorial do vinho.

Tabela 4. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de espécies do grupo *Hanseniaspora/Kloeckera*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Metabolismo fermentativo	Espécies deste grupo caracterizam-se por ter um metabolismo fermentativo menor do que o de SC. No entanto, <i>H. vineae</i> pode produzir 10% v/v de etanol.	Molina <i>et al.</i> , 2007

(continua na página seguinte)

Tabela 4. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Atividade enzimática	A atividade de β -glucosidase da <i>H. uvarum</i> é 6,6 vezes mais elevada do que a encontrada em SC, promovendo a formação de terpenos livres;	Hu <i>et al.</i> , 2018; Mendes <i>et al.</i> , 2001
Qualidade e estabilidade do vinho	Vinhos fermentados em barrica com culturas mistas de <i>H. vineae</i> /SC, baixam significativamente a concentração de amins biogénicas e de acidez volátil, enquanto aumentam a concentração de glicerol e extrato seco.	Medina <i>et al.</i> , 2013
Uso em cofermentações	Devido ao metabolismo fermentativo associado, várias espécies H/K não conseguem permanecer até ao fim da fermentação, embora <i>H. vineae</i> e <i>H. uvarum</i> mostrem resistência ao etanol, inoculações mistas com um rácio de 1:2 de <i>H. uvarum</i> e SC, respetivamente, permitem que a espécie NS consiga influenciar a fermentação dando mais “corpo” e complexidade aromática ao vinho; Inoculações sequenciais de <i>H. vineae</i> e SC promovem a libertação de aromas frutados no vinho, através da produção de ésteres (acetato de etilo e 2-feniletacetato); Cofermentações de <i>H. opuntiae</i> /SC promovem o aumento da concentração de álcoois superiores e fenilacetaldéido no mosto (atributos florais e doces); Fermentações com um rácio de 90:10 (H/K:SC), demonstra uma produção de β -fenil-etil nove vezes maiores que monoculturas de SC, no entanto esta dominância afeta a taxa fermentativa com o possível aparecimento de aromas a verniz;	Pina <i>et al.</i> , 2004; Díaz-Montaña & Ramírez Córdova, 2009; Viana <i>et al.</i> , 2009; 2011; Medina <i>et al.</i> , 2013; Lleixa <i>et al.</i> , 2016; Tristezza <i>et al.</i> , 2016; Martín, 2016; Luan <i>et al.</i> , 2018; Hu <i>et al.</i> , 2018;

5.4. *Lachancea thermotolerans*

A *Lachancea thermotolerans* (*L. thermotolerans*) no passado era designada como *Kluyveromyces thermotolerans*, mas após análises de sequências genómicas a espécie foi atribuída ao género *Lachancea* (Kurtzman, 2003). Esta levedura ubíqua é normalmente encontrada nas uvas, mas também no solo, insetos e plantas, estando extensivamente distribuída pelo globo (Ganter, 2006; Hranilovic *et al.*, 2017). Morfologicamente indistinguível de *S. cerevisiae*, esta levedura é capaz de fermentar glucose e sacarose,

mas fracamente galactose (Schnierda *et al.*, 2014). Também demonstra, embora variável, capacidade de fermentar maltose e rafinose (Lachance & Kurtzman, 2011b).

Tabela 5. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *L. thermotolerans*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Metabolismo fermentativo	Excelente produtora de glicerol; A produção de glicerol em cofermentações ou em monocultura são muito idênticas.	Kapsopoulou <i>et al.</i> , 2007; Comitini <i>et al.</i> , 2011; Gobbi <i>et al.</i> , 2013
Atividade enzimática	Produz β -D-glucosidase, liases carbono-enxofre e outras enzimas envolvidas na libertação de compostos aromáticos.	Rosi <i>et al.</i> , 1994; Zott <i>et al.</i> , 2011
Qualidade e estabilidade do vinho	Fermentações mistas ou sequenciais com <i>L. thermotolerans</i> e SC, quando o pH é reduzido para 3,5-3,7, promovem melhores níveis moleculares de SO ₂ (baixo conteúdo de sulfitos), fazendo com que a fermentação e o processo de envelhecimento sejam mais seguros para a saúde humana; Capaz de reduzir a acidez volátil que combinado com glicerol traz suavidade no paladar do vinho; Capaz de reduzir os níveis de acetaldeído durante a fermentação; Produção de acetato de etilo moderada (40-60 mg/L).	Ciani <i>et al.</i> , 1998; Suárez <i>et al.</i> , 2007; Kapsopoulou <i>et al.</i> , 2007; Vilela-Moura <i>et al.</i> , 2008; Ciani & Comitini, 2011; Comitini <i>et al.</i> , 2011; Gobbi <i>et al.</i> , 2013; Balikci <i>et al.</i> , 2016; Morata <i>et al.</i> , 2018
Modelação da acidez	Estirpes selecionadas conseguem produzir concentrações de ácido láctico entre 1-16,8 g/L, o que influencia significativamente o pH do vinho; Esta produção elevada de ácido láctico pode inibir as LAB de desempenharem a fermentação maloláctica; Melhores taxas de acidificação são obtidas em fermentações sequencias, por exemplo no rácio de 7:3 cfu/mL de <i>L. thermotolerans</i> e SC, respetivamente; A acidez irá persistir após a fermentação e durante o envelhecimento do vinho porque este ácido apresenta uma boa estabilidade; Útil obtenção de vinhos mais “frescos” em regiões quentes; Embora a acidez ajude a proteger a cor do vinho com a formação de vitisinas (A e B), esta levedura não é uma boa promotora para esse fim.	Mora <i>et al.</i> , 1990; Morata <i>et al.</i> , 2003, 2005, 2006, 2007; 2018; Lerm <i>et al.</i> , 2010; Comitini <i>et al.</i> , 2011; Suárez-Lepe <i>et al.</i> , 2012; Gobbi <i>et al.</i> , 2013; Jolly <i>et al.</i> , 2014; Benito <i>et al.</i> , 2015; Escott <i>et al.</i> , 2016; Del Fresno <i>et al.</i> , 2017; Escott <i>et al.</i> , 2018

(continua na página seguinte)

Tabela 5. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Uso em cofermentações	Aconselhado uso em cofermentações com SC, pois apresenta um metabolismo moderado produzindo cerca de 9% v/v de etanol; Produção de lactato de etilo (aroma a manteiga) menor em cofermentações com SC do que com <i>S. pombe</i> .	Ciani <i>et al.</i> , 2006; Comitini <i>et al.</i> , 2011; Del Fresno <i>et al.</i> , 2017; Escott <i>et al.</i> , 2018
Vinificações especiais	<i>L. thermotolerans</i> pode ser interessante na produção de vinhos doces (melhor balanço entre a doçura e acidez); Pode estabilizar a acidez e melhorar o perfil sensorial de vinhos base para espumantes.	Morata <i>et al.</i> , 2018

5.5. *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*)

Metschnikowia pulcherrima (*M. pulcherrima*) é uma levedura ubíqua encontrada em uvas e noutros frutos, em plantas e na seiva de árvores. Esta levedura é indistinguível de *S. cerevisiae* ao microscópio (Morata *et al.*, 2019).

Tabela 6. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *M. pulcherrima*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Atividade enzimática	Capaz de expressar a pectinase, a protease, a glucanase, a β -glicosidade e a β -liase; A estirpe <i>M. pulcherrima</i> L1781 expressa α -arabinofuranosidase, resultando no aprimoramento de aromas frutados.	Gunata <i>et al.</i> , 1985, 1988; Ganga & Martínez, 2004; Zott <i>et al.</i> , 2011; Ganga <i>et al.</i> , 2014; Barbosa <i>et al.</i> , 2018; Jolly <i>et al.</i> , 2019
Qualidade e estabilidade do vinho	Algumas estirpes são capazes de diminuir a formação de sulfureto de hidrogénio (H_2S), impedindo a libertação de aromas desagradáveis; Produção de acetoína (aroma a manteiga); Quando usada em monocultura, pode originar concentrações elevadas de acetato de etilo; Demonstra baixa adsorção de antocianinas nas paredes celulares quando comparada com SC.	Caridi <i>et al.</i> , 2015; Varela <i>et al.</i> , 2016; Barbosa <i>et al.</i> , 2018

(continua na página seguinte)

Tabela 6. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Capacidade biocontroladora	Produz pulcherrimine, um pigmento vermelho que apresenta atividade fungicida eficaz em espécies deteriorantes e sem efeito em SC.	Sipiczki, 2006; Csutak <i>et al.</i> , 2013; Oro <i>et al.</i> , 2014; Kántor <i>et al.</i> , 2015; Morata <i>et al.</i> , 2019
Substrato nutritivo	Devido à elevada atividade proteolítica, os aminoácidos podem ser usados por outras espécies fermentativas.	Romano <i>et al.</i> , 2006
Uso em cofermentações	Aconselhado uso em cofermentações com SC ou <i>S. pombe</i> , pois apresenta um metabolismo baixo produzindo cerca de 4-7% v/v de etanol, mostrando sinais de declínio após poucos dias do começo da fermentação; Quando usada em inoculações mistas com SC, pode promover uma produção elevada de ésteres e de álcoois superiores que permitam melhorar a complexidade aromática do vinho; Quando usada em inoculações mistas com <i>S. uvarum</i> , permite a redução de acetato de etilo favorecendo a formação de álcool fenílico (aroma floral); Em inoculações sequenciais com SC permite a redução do conteúdo final de etanol no vinho;	Combina <i>et al.</i> , 2005; Comitini <i>et al.</i> , 2011; Sadoudi <i>et al.</i> , 2012; Quirós <i>et al.</i> , 2014; Morales <i>et al.</i> , 2015; Varela <i>et al.</i> , 2016; Wang <i>et al.</i> , 2016; Escott <i>et al.</i> , 2018; Barbosa <i>et al.</i> , 2018; Jolly <i>et al.</i> , 2019; Prior <i>et al.</i> , 2019

5.6. *Saccharomyces ludwigii*

Conhecida como o “pesadelo do enólogo”, *Saccharomyces ludwigii* (*S. ludwigii*), é frequentemente associada a contaminações no vinho. É uma levedura difícil de erradicar, devido à elevada tolerância a SO₂. Comumente, *S. ludwigii* é isolada a partir de fermentações lentas, ou até mesmo estagnadas, e também é encontrada em vinhos já armazenados (Malfeito-Ferreira *et al.*, 1997; Granchi *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2008; Dominizio *et al.*, 2011). Esta levedura também já foi encontrada em rolhas mal desinfetadas (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

A concentração necessária de SO₂ para aniquilar esta levedura pode ser bastante elevada, pode-se tornar desvantajoso o uso deste método de erradicação devido aos potenciais problemas de saúde humana envolvidos (Vally *et al.*, 2009; Santo *et al.*, 2012). Grandes quantidades de SO₂ também podem provocar odores e sabores indesejados no

vinho (Stratford *et al.*, 1987; Delfini *et al.*, 2002). São necessários então, outros métodos de desinfecção que permitam o controlo desta espécie.

Tabela 7. Métodos alternativos para combater contaminações de *S. ludwigii*.

Método alternativo para combater contaminações de <i>S. ludwigii</i>	Referência bibliográfica
O dimetil dicarbonato (DMDC) não produz aromas desagradáveis no vinho como o SO ₂ , mas pode afetar SC, sendo aconselhado a inoculação da levedura 12 horas após o tratamento.	Divol <i>et al.</i> , 2005; Costa <i>et al.</i> , 2008
Quitosano é um polissacarídeo derivado de crustáceos.	Roller & Covill, 1999
Toxinas produzidas por espécies como a <i>P. anomala</i> WC65, a <i>C. pyralidae</i> , a <i>K. phaffii</i> , a <i>M. pulcherrima</i> e a <i>P. membranifaciens</i> , são capazes de provocar danos em <i>S. ludwigii</i> .	Palpacelli <i>et al.</i> , 1991; Lopes & Sangorrín, 2010; Comitini <i>et al.</i> , 2011; Santos <i>et al.</i> , 2013; Mehlomakulu <i>et al.</i> , 2014; Oro <i>et al.</i> , 2014; Berbegal <i>et al.</i> , 2017b
Tratamentos físicos como os campos elétricos pulsados e a radiação gama , permitem a inativação do contaminante sem comprometer a qualidade e segurança do vinho e também da saúde humana.	Youssef <i>et al.</i> , 2002; Beveridge <i>et al.</i> , 2003; Puértolas <i>et al.</i> , 2009; González-Arenzana <i>et al.</i> , 2015; Guerrero & Cantos-Villar, 2015

Tabela 8. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *S. ludwigii*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Atividade enzimática	Elevada atividade de β -glucanase permite a formação de polissacarídeos que permitirá a melhoria do “corpo”, da doçura, da “redondeza”, diminuição da adstringência e proteção de compostos fenólicos contra oxidação de vinhos tinto.	Lubbers <i>et al.</i> , 1993; Vidal <i>et al.</i> , 2004; Guadalupe <i>et al.</i> , 2007; Charlier <i>et al.</i> , 2007; Palomero <i>et al.</i> , 2009; Rodrigues <i>et al.</i> , 2012; Iriti & Varoni, 2014; Giovanni <i>et al.</i> , 2012
Qualidade e estabilidade do vinho	Normalmente produz quantidades elevadas de acetato de etilo e de ácido acético; Pode causar decréscimo do conteúdo de antocianinas, embora não afete a estabilidade de piranantocianinas (vitisinas e vinilfenol) nos vinhos envelhecidos em borras.	Morata <i>et al.</i> , 2006; Palomero <i>et al.</i> , 2009; Domizio <i>et al.</i> , 2011

(continua na página seguinte)

Tabela 8. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Uso em cofermentações	Permite o controlo da libertação de compostos indesejados, aumentando a libertação de ésteres que promovam uma melhor complexidade aromática; A estirpe <i>S. ludwigii</i> Sd64 em inoculações mistas com SC permite a redução de etanol final do vinho.	Domizio <i>et al.</i> , 2011

Como demonstrado, *S. ludwigii* pode trazer benefícios enológicos, por isso a escolha da estirpe deve ser estudada de forma a permitir um melhor compatibilidade com o vinho que o produtor pretende obter. (Vejarano, 2018).

5.7. *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*) foi descoberta em 1983 por Lindner (Kurtzman *et al.*, 2010). Estirpes desta levedura foram descobertas em mostos de uvas, em melaços e em chá de kombucha, ou seja, meios com conteúdo elevado em açúcares (Teoh *et al.*, 2004; Kurtzman *et al.*, 2010). Esta levedura é capaz de usar glucose, sacarose, rafinose, maltose e glicerol, como fontes de carbono (Petersen & Russel, 2016).

Tabela 9. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *S. pombe*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Metabolismo fermentativo	Capaz de atingir concentrações de etanol bastante significativas (10-15% v/v); Baixa taxa de crescimento, podendo demorar 30 dias a finalizar a fermentação.	Redzepovic <i>et al.</i> , 2003; Suárez-Lepe <i>et al.</i> , 2012; Loira <i>et al.</i> , 2018
Atividade enzimática	Embora os resultados observados na literatura sejam contraditórios, a atividade de β -glicosidase pode ser cerca de 10 vezes maior do que o encontrado em algumas estirpes de SC, promovendo assim uma elevada formação de polissacarídeos (diminuição do tempo de envelhecimento).	Frankel <i>et al.</i> , 1993; Salmon <i>et al.</i> , 2002; Morata <i>et al.</i> , 2003; Mazauric <i>et al.</i> , 2005, 2006; Palomero <i>et al.</i> 2009

(continua na página seguinte)

Tabela 9. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Qualidade e estabilidade do vinho	Produz concentrações elevadas de H ₂ S (aroma a ovos podres); Capaz de promover um aumento elevado da acidez volátil no vinho; Alguns autores não descrevem nenhum “off-flavour” em particular, embora exista um perda de aromas com carácter frutado (desaconselhado em vinificações de vinho branco); Certas estirpes podem promover uma coloração mais estável em vinhos tintos, devido à elevada formação de vitisina A; Durante o envelhecimento em borras, a libertação de compostos da parede celular de <i>S. pombe</i> provoca um efeito protetor à oxidação das antocianinas, preservando a cor do vinho; É capaz de controlar a formação de aminas biogénicas, ácido glucónico e carbamato de etilo.	Loira <i>et al.</i> , 2018; Redzepovic <i>et al.</i> , 2003; Peinado <i>et al.</i> , 2004; Uthurry <i>et al.</i> , 2006; Palomero <i>et al.</i> , 2009; Morata <i>et al.</i> , 2012, 2016; Benito <i>et al.</i> , 2015; Khoo <i>et al.</i> , 2017; Loira <i>et al.</i> , 2018
Modelação da acidez	A sua capacidade em transformar ácido málico em etanol e CO ₂ traduz-se na desacidificação de um dado mosto; A degradação do ácido málico pode variar entre 75% e 100%, dependendo da estirpe.	Benito <i>et al.</i> , 2012; Suárez-Lepe <i>et al.</i> , 2012
Uso em cofermentações	Técnicas de imobilização (esferas de alginato) são usadas para reduzir efeitos negativos, como níveis elevados de ácido acético, ou seja, quando o nível de ácido málico pretendido é alcançado, a levedura é removida e a fermentação é finalizada por SC; Cofermentações com SC podem promover uma acidez equilibrada do vinho;	Yokotsuka <i>et al.</i> , 1993; Kim <i>et al.</i> , 2008; Comitini <i>et al.</i> , 2011
Vinificações especiais	Devido a elevada capacidade em formar polissacarídeos, torna-se numa aplicação bastante interessante na produção de espumantes, conferindo melhores sensações de boca, perfis aromáticos mais persistentes e de qualidade, e também um efeito protetor na cor do vinho.	Kulkarni <i>et al.</i> , 2015; Loira <i>et al.</i> , 2013

5.8. *Torulaspora delbrueckii*

De todas as leveduras NS, *Torulaspora delbrueckii* (*T. delbrueckii*) é provavelmente a levedura mais adequada à vinificação, tendo sido a primeira espécie NS a ser aceite a nível industrial para participar na fermentação vínica (Ramírez & Velásquez, 2018, Benito, 2018). São leveduras normalmente encontradas em habitats selvagens e antropológicos (Kurtzman, 2011c).

Tabela 10. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *T. delbrueckii*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Metabolismo fermentativo	Capacidade fermentativa muito semelhante a SC.	Benito, 2018
Qualidade e estabilidade do vinho	É capaz de diminuir a produção de ácido acético em mostos com elevadas concentrações de açúcares; Pode promover o aumento da concentração de lactonas (aroma doce) e de éster etílico, que levará ao decréscimo da intensidade do aroma frutado (fresco) contrastando com o aumento da complexidade aromática a fruta seca e doce; Não é recomendável o uso desta espécie em fermentações de vinhos de mesa novos (branco ou rosé), mas sim em fermentações de vinho tintos previstos a terem bastante “corpo”.	Comitini <i>et al.</i> , 2011; Azzolini <i>et al.</i> , 2012; Sadoudi <i>et al.</i> , 2012; Velásquez <i>et al.</i> , 2015; Ramírez <i>et al.</i> , 2016; Ramírez & Velásquez, 2018
Uso em cofermentações	Normalmente é observado uma dominância de SC devido a <i>T. delbrueckii</i> ser mais sensível ao etanol, mas a dominância desta última espécie pode ser obtida através da proporção; Inoculações mistas com SC podem promover o aumento da formação de ésteres (acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato, entre outros), se for garantida a dominância de <i>T. delbrueckii</i> ; A dominância pode ser garantida através da inoculação de estirpes “killer” de <i>T. delbrueckii</i> em quantidades aproximadas de 10^7 CFU/mL, sendo que a quantidade inoculada de SC deve ser menor que 10^5 CFU/mL;	Visser <i>et al.</i> , 1990; Herraiz <i>et al.</i> , 1990; Hanl <i>et al.</i> , 2005; (Comitini <i>et al.</i> , 2011; Sadoudi <i>et al.</i> , 2012; González-Royo <i>et al.</i> , 2014; Velásquez <i>et al.</i> , 2015, 2016; Ramírez <i>et al.</i> , 2016; Renault <i>et al.</i> , 2016; Ramírez & Velásquez, 2018

(continua na página seguinte)

Tabela 10. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Vinificações especiais	Em espumantes, quando inoculada com SC poderá permitir a obtenção de vinhos base com características diferentes e de melhor qualidade, embora seja sensível à elevada pressão de CO ₂ formada na segunda fermentação.	González-Royo <i>et al.</i> , 2014; Velázquez <i>et al.</i> , 2018

Visto que esta levedura não é tão boa fermentadora como a *S. cerevisiae*, mais investigações deverão ser feitas com o objetivo de obter estirpes geneticamente melhoradas e úteis para a vinificação (Ramírez & Velásquez, 2018).

5.9. *Wickerhamomyces anomalus*

Wickerhamomyces anomalus (*W. anomalus*), antes conhecida como *P. anomala*, *H. anomala*, *C. pelliculosa*, foi atribuída ao género *Wickerhamomyces* baseada numa análise filogenética de sequências genómicas (Kurtzman, 2011). Na vinificação, esta levedura é encontrada à superfície das uvas, no mosto, no vinho e nas superfícies da adega de todo o mundo (Walker, 2011).

Tabela 11. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *W. anomalus*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Metabolismo fermentativo	Algumas estirpes conseguem tolerar concentrações até 12,5% v/v de etanol, podendo assim persistir até ao fim da fermentação.	Renouf <i>et al.</i> , 2007; G.M. Walker, 2011; C. Díaz <i>et al.</i> , 2013; A. Sabel <i>et al.</i> , 2014
Qualidade e estabilidade do vinho	Capaz de produzir grandes concentrações de acetato de etilo (>150 mg/L); No entanto é capaz de promover a formação de ésteres que traduzam aromas frutados e outros compostos voláteis tem impactos positivos no aroma do vinho, como por exemplo, acetato de amilo e acetato de fenil-etil.	Viana <i>et al.</i> , 2008; Domizio <i>et al.</i> , 2011; Izquierdo Cañas <i>et al.</i> , 2014

(continua na página seguinte)

Tabela 11. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Atividade enzimática	Capaz de produzir glicosidades (β -D-glucosidase, α -L-arabinofuranosidase, β -D-xilosidase e α -L-ramnosidase) envolvidas na libertação de compostos aromáticos; A estirpe <i>W. anomalus</i> AS1 produz a exo- β -1,3-glucanase que é capaz de aumentar a concentração de compostos bioativos sensoriais; Com aplicação na clarificação: protease aspártica.	Rosi <i>et al.</i> , 1994; Charoenchai <i>et al.</i> , 1997; Manzanares <i>et al.</i> , 1999, 2000; Van Rensburg & Pretorius, 2000; Gil <i>et al.</i> , 2005; Mateo <i>et al.</i> , 2011; Sabel <i>et al.</i> , 2014; Schwentke <i>et al.</i> 2014; Lopez <i>et al.</i> , 2015; Padilla <i>et al.</i> , 2016; Schlender <i>et al.</i> , 2017
Capacidade biocontroladora	Algumas estirpes são capazes de produzir a toxina Pikt, que é combate contaminações de leveduras deteriorantes (género <i>Brettanomyces</i>) provocando danos irreversíveis. No entanto pode ter efeitos negativos em SC.	Comitini <i>et al.</i> , 2004; Sangorrín <i>et al.</i> , 2008; Oro <i>et al.</i> , 2016; Csutak <i>et al.</i> , 2017; Fernández de Ullivarri <i>et al.</i> , 2018
Uso em cofermentações	Embora consiga suprimir o crescimento de outras espécies NS, o mesmo não se observa na presença de SC; Cofermentações com SC podem permitir melhor controlo do microbioma de um mosto, melhorar características aromáticas e controlar a produção de etanol, glicerol e acidez; Certas estirpes em cofermentação com SC permitem melhor controlo da formação de acetato de etilo.	Rojas <i>et al.</i> , 2003; Kurita, 2008; Domizio <i>et al.</i> , 2011; Andorrà <i>et al.</i> 2012; Gobbi <i>et al.</i> , 2013; Canonico <i>et al.</i> , 2016; Padilla <i>et al.</i> , 2016; Bagheri <i>et al.</i> , 2017

Mais investigações deverão ser feitas para obter estirpes de *W. anomalus* mais fiáveis para uso enológico (Padilla *et al.*, 2018).

5.10. *Zygosaccharomyces rouxii*

Zygosaccharomyces rouxii (*Z. rouxii*) é considerada uma levedura deteriorante devido à sua capacidade de crescer em condições adversas: concentração de açúcares elevada, pH baixo (<2,2), concentrações altas de preservantes usados (SO₂), presença de ácidos orgânicos e níveis de oxigénio baixos (Romano & Suzzi, 1993; Steels *et al.*, 1999;

Martorell *et al.*, 2007; Gordon & Wolfe, 2008; Xiang *et al.*, 2018). Da dificuldade em erradicar e prevenir que esta levedura leve a uma potencial deterioração do vinho, advém a necessidade de usar métodos alternativos que possibilitem o controlo de *Z. rouxii*.

Tabela 12. Métodos alternativos para combater contaminações de *Z. rouxii*.

Método alternativo para combater contaminações de <i>Z. rouxii</i>	Referência bibliográfica
O ácido peracético aplicado nas superfícies da adega previnem contaminações cruzadas.	Frisón <i>et al.</i> , 2014
O péptido lactoferrina B , a toxina PMKT produzida por <i>P. membranifaciens</i> e as toxinas K1, K2, K28 e Klus , produzidas por SC, podem surtir efeito em <i>Z. rouxii</i> , prevenindo o uso de metabissulfito no vinho.	Escott <i>et al.</i> , 2018
A enzima β-glucanase apenas provoca uma inibição parcial.	Escott <i>et al.</i> , 2017
Tratamentos físicos como ultrassons com aquecimento e descargas por barreira dielétrica , permitem a inativação irreversível do contaminante sem comprometer a qualidade e segurança do vinho e também da saúde humana.	Kirimli & Kunduhoglu, 2016; Xiang <i>et al.</i> , 2018

Esta levedura consome preferencialmente frutose em vez de glucose, demonstrando carácter frutofílico como já observado anteriormente em *C. stellata* (subcapítulo 5.2) (Leandro *et al.*, 2011). Apesar de ainda haver pouca literatura acerca do potencial de *Z. rouxii* na vinificação, sabe-se que esta levedura apresenta algumas características metabólicas interessantes para a produção de vinhos.

Tabela 13. Aplicações e interesses biotecnológicos no uso de *W. anomalus*, referindo as repercussões correspondentes.

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Qualidade e estabilidade do vinho	Devido ao forte carácter frutofílico, é capaz de finalizar fermentações estagnadas onde existam concentrações de frutose elevadas; Certas leveduras do género <i>Zygosaccharomyces</i> podem aumentar a produção de álcoois superiores e reduzir o conteúdo de acetoína, podendo contribuir para o perfil aromático do vinho; Potencia uma produção elevada de ácido acético; <i>Z. fermenti</i> produz níveis reduzidos de H ₂ S; <i>Z. bailii</i> consegue degradar o ácido málico.	Romano & Suzzi, 1993; Romano & Suzzi, 1993b; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Jolly <i>et al.</i> , 2014

(continua na página seguinte)

Tabela 13. (continuação)

Aplicação/Interesse biotecnológico	Repercussões enológicas	Referência bibliográfica
Qualidade e estabilidade do vinho	Devido ao forte carácter frutofílico, é capaz de finalizar fermentações estagnadas onde existam concentrações de frutose elevadas; Certas leveduras do género <i>Zygosaccharomyces</i> podem aumentar a produção de álcoois superiores e reduzir o conteúdo de acetoína, podendo contribuir para o perfil aromático do vinho; Potencia uma produção elevada de ácido acético; <i>Z. fermenti</i> produz níveis reduzidos de H ₂ S; <i>Z. bailii</i> consegue degradar o ácido málico.	Romano & Suzzi, 1993; Romano & Suzzi, 1993b; Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003; Jolly <i>et al.</i> , 2014
Vinificações especiais	Na produção de vinho doce, a ausência de controlo do crescimento de leveduras <i>Zygosaccharomyces</i> pode provocar uma refermentação, aumentando a turbidez do vinho e a produção de CO ₂ .	Alonso <i>et al.</i> , 2015
Uso em cofermentações	Inoculações mistas com SC podem prevenir a produção de metabólitos indesejáveis e promover a formação de polissacarídeos, melhorando o “corpo” do vinho.	Dominizio <i>et al.</i> , 2011

6. Conclusão

Durante muito tempo a fermentação alcoólica foi entregue inteiramente à levedura *S. cerevisiae*. Identificaram-se e eliminaram-se dos mostos, espécies que não pertenciam ao género *Saccharomyces*, por se verificar que estas podiam apresentar um risco para o controlo de qualidade e investimento na produção de vinho. Várias investigações científicas ao provar que estas espécies NS apresentavam comportamentos deteriorantes, também provaram que as mesmas podem trazer benefícios para a produção de diferentes vinhos.

Previamente, nesta revisão bibliográfica foram descritos parâmetros que determinam este grupo de leveduras como possíveis ferramentas importantes na enologia atual. Os principais parâmetros são a modelação de acidez, a modelação do teor alcoólico e a qualidade do perfil aromático do vinho, pois são aqueles que podem ter maior impacto na comercialização dos vinhos.

Foi descrito que *S. pombe* e *L. thermotolerans* são as leveduras mais eficazes na modelação da acidez. Estas leveduras podem ser usadas em países quentes, onde nos

processos de vinificação são detetados níveis de açúcares elevados, promovendo assim frescura e acidez ao vinho.

C. stellata e *M. pulcherrima* mostram-se eficazes na modelação do grau alcoólico do vinho. Esta característica pode ser tomada em conta, nos mercados que requerem de vinhos com menos álcool. Nos vinhos tintos o glicerol é um elemento substancial, por isso destacam-se *L. thermotolerans*, *C. stellata* e *W. anomalus* como bons produtores deste álcool, conferindo assim mais “corpo” ao vinho.

O aperfeiçoamento do perfil aromático nos vinhos pode ser importante para aceitabilidade do vinho pelo cliente e, pode ser adquirido com o uso de maior parte das leveduras descritas no capítulo 5. No entanto, *S. pombe*, *M. pulcherrima* e *Z. rouxii*, podem produzir aromas nefastos, quando não há controlo do crescimento das populações no mosto.

A produção elevada de enzimas de *C. stellata*, *A. pullulans*, *Hanseniaspora/Kloeckera* (género) e *S. ludwigii*, criam reações positivas no mosto, conferindo qualidades únicas ao vinho, como a libertação de polissacarídeos. Algumas leveduras como *A. pullulans* e *M. pulcherrima* podem demonstrar comportamento de controladores biológicos, produzindo compostos microbicidas.

Algumas destas leveduras apresentam defeitos para uso na vinificação. *S. ludwigii* e *Z. rouxii* são extremamente difíceis de controlar, o que pode resultar em fermentações contaminadas. A produção de ácido acético é indesejável e foi descrito que *S. pombe* é uma produtora notável deste ácido.

Estas leveduras também podem desempenhar um papel fundamental na segunda fermentação, nomeadamente a *T. delbrueckii*, o que demonstrou ser bastante útil na vinificação de espumantes.

A literatura indicou muitas vezes, que o uso de inoculações mistas ou sequenciais preveniam certas repercussões negativas no uso de leveduras NS, como também podia potenciar os aspetos mais positivos garantindo a progressão e finalização da fermentação por parte de *S. cerevisiae*.

Hoje, o investimento em espécies NS para uso na vinificação pode apresentar algum risco, sendo que, poucos vinhos no mercado ainda resultam desta ferramenta biotecnológica, confirmando assim o estigma ainda presente no setor. No entanto, é necessária mais investigação que possibilite a identificação, escolha e manipulação de estirpes mais compatíveis com o estilo de vinho a ser feito e com a região onde este mesmo é produzido.

7. Referências bibliográficas

- Alexandre, H.; Costello, P.J.; Remize, F.; Guzzo, J.; Guilloux-Benatier, M. *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: Current knowledge and perspectives. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 93, 141–154.
- Alonso, A.; Belda, I.; Santos, A.; Navascués, E.; Marquina, D. Advances in the Control of the Spoilage Caused by *Zygosaccharomyces* Species on Sweet Wines and Concentrated Grape Musts. *Food Control* 2015, 51, 129–134.
- Andorrà, I.; Berradre, M.; Mas, A.; Esteve-Zarzoso, B.; Guillamón, J.M. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT-Food Sci. Technol.* 2012, 49, 8–13.
- Andorrà, I.; Berradre, M.; Rozès, N.; Mas, A.; Guillamón, J.M.; Esteve-Zarzoso, B. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, 231, 215–224.
- Arevalo-Villena M, Ubeda Iranzo J & Briones Perez A. Enhancement of aroma in white wines using a beta-glucosidase preparation from *Debaryomyces pseudopolymorphus* (A-77). *Food Biotechnol.* 2007, 21: 181–194.
- Azzolini, M.; Fedrizzi, B.; Tosi, E.; Finato, F.; Vagnoli, P.; Scrinzi, C.; Zapparoli, G. Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *Eur. Food Res. Technol.* 2012, 235, 303–313.
- Baffi, M.A.; dos Santos Bezerra, C.; Arévalo-Villena, M.; Briones-Pérez, A.I.; Gomes, E.; Da Silva, R. Isolation and Molecular Identification of Wine Yeasts from a Brazilian Vineyard. *Ann. Microbiol.* 2011, 61, 75–78.
- Bagheri, B.; Bauer, F.F.; Setati, M.E. The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 13.
- Balikci, E.K.; Tanguler, H.; Jolly, N.P.; Erten, H. Influence of *Lachancea thermotolerans* on cv. Emir wine fermentation. *Yeast* 2016, 33, 313–321.
- Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. The Microbial Ecology of Wine Grape Berries. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 153, 243–259.
- Barbe, J.C.; De Revel, G.; Joyeux, A.; Bertrand, A.; Lonvaud-Funel, A. Role of botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 90, 34–42.
- Barbosa, C.; Lage, P.; Esteves, M.; Chambel, L.; Mendes-Faia, A.; Mendes-Ferreira, A.; Barbosa, C.; Lage, P.; Esteves, M.; Chambel, L.; et al. Molecular and phenotypic characterization of *Metschnikowia pulcherrima* strains from Douro wine region. *Fermentation* 2018, 4, 8.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1990
- Beckner Whitener, M.E.; Stanstrup, J.; Panzeri, V.; Carlin, S.; Divol, B.; Du Toit, M.; Vrhovsek, U. Untangling the wine metabolome by combining untargeted SPME–GCxGC–TOF–MS and sensory analysis to profile Sauvignon blanc co-fermented with seven different yeasts. *Metabolomics* 2016, 12, 53.
- Bely, M.; Stoeckle, P.; Masneuf Pomarède, I.; Dubourdieu, D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* *Saccharomyces cerevisiae* culture on high sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 122, 312–320.
- Bencheqroun, S.K.; Bajji, M.; Massart, S.; Labhilili, M.; El Jaafari, S.; Jijakli, M.H. In Vitro and In Situ Study of Postharvest Apple Blue Mold Biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the Involvement of Competition for Nutrients. *Postharvest Biol. Technol.* 2007, 46, 128–135.
- Benito, Á.; Calderón, F.; Palomero, F.; Benito, S. Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules* 2015, 20, 9510–9523.
- Benito, S. The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102, 3081–3094.

- Benito, S.; Palomero, F.; Morata, A.; Calderón, F.; Suárez-Lepe, J.A. New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2012, 47, 2101–2108.
- Berbegal, C.; Garofalo, C.; Russo, P.; Pati, S.; Capozzi, V.; Spano, G. Use of autochthonous yeasts and bacteria in order to control *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Fermentation* 2017a, 3, 65.
- Berbegal, C.; Spano, G.; Tristezza, M.; Grieco, F.; Capozzi, V. Microbial Resources and Innovation in the Wine Production Sector. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2017b, 38, 156–166.
- Beveridge, J.R.; Wall, K.; MacGregor, S.J.; Anderson, J.G.; Rowan, N.J. Pulsed electric field inactivation of spoilage microorganisms in alcoholic beverages. In *Proceedings of the 14th IEEE International Pulsed Power Conference, Dallas, TX, USA, 15–18 June 2003*; pp. 1138–1143.
- Biely, P.; Heinrichová, K.; Kru, M. Induction and Inducers of the Pectolytic System in *Aureobasidium pullulans*. *Curr. Microbiol.* 1996, 33, 6–10.
- Bisiach, M., Minervini, G., & Zerbetto, F. (1986). Possible integrated control of grapevine sour rot. *Vitis*, 25, 118-128.
- Bisson LF & Kunkee RE. Microbial interactions during wine production. *Mixed Cultures in Biotechnology* (Zeikus JG & Johnson EA, eds) 1991, pp. 39–68. McGraw-Hill, Inc., New York, NY
- Bisson L.B.; Joseph L.C.M.; Domizio; König, H., Unden, G., & Fröhlich, J. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine; 2017 66-69.
- Blancard, D., Gravote, E., Jailloux, F., Fermaud, M., 1999. Etiologie de la pourriture acide de la vigne dans le Sud-ouest de la France. *Proceedings of the OILB Meeting Working Group “Integrated Control in Viticulture”, Sub-Group Fungal and Bacterial Diseases, 1– 4 March, Florence, Italy*, 51– 54.
- Boudarel MJ. Contribution à l'étude de la fermentation alcoolique à partir de jus de Betteraves avec *Saccharomyces cerevisiae* [Thèse de Doctorat]. Université de Dijon, Francia; 1984
- Boulton, R.B.; Singleton, V.L.; Bisson, L.F.; Kunkee, R.E. *Principles and Practices of Winemaking*; Chapman and Hall: New York, NY, USA, 1996; pp. 102–181.
- Boynton, P.; Greig, D. Fungal diversity and ecosystem function data from wine fermentation vats and microcosms. 2016
- Bozoudi, D.; Tsaltas, D. The Multiple and Versatile Roles of *Aureobasidium pullulans* in the Vitivinicultural Sector. *Fermentation* 2018, 4, 85.
- Bizuela, N.; Tymczyszyn, E.E.; Semorile, L.C.; La Hens, D.V.; Delfederico, L.; Hollmann, A.; Bravo-Ferrada, B. *Lactobacillus plantarum* as a malolactic starter culture in winemaking: A new (old) player? *Electron. J. Biotechnol.* 2019, 38, 10–18.
- Buttke TM, Jones SD, Bloch K. Effect of sterol side chains on growth and membrane fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology.* 1980;144(1):124-130
- Canal-Llaubères, R.-M. Enzymes in winemaking. In *Wine Microbiology and Biotechnology*; Fleet, G.H., Ed.; Harwood Academic Publishers: Chur, Switzerland, 1993; pp. 477–506.
- Canonico, L.; Agarbatu, A.; Comitini, F.; Ciani, M. *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiol.* 2016, 56, 45–51.
- Capece A, Romaniello R, Siesto G, et al. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *Int J Food Microbiol.* 2010;144(1):187-192.
- Caridi, A.; Sidari, R.; Kraková, L.; Kuchta, T.; Pangallo, D. Assessment of color adsorption by yeast using Grape Skin Agar and impact on red wine color. *OENO One* 2015, 49, 195–203.
- Chambers PJ, Pretorius IS. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Rep.* 2010;11(12):914-920.
- Chalier, P.; Angot, B.; Delteil, D.; Doco, T.; Gunata, Z. Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem.* 2007, 100, 22–30.

- Charoenchai, C.; Fleet, G.H.; Henschke, P.A.; Todd, B.E.N. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 1997, 3, 2–8.
- Chi, Z.; Ma, C.; Wang, P.; Li, H.F. Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Alkaline Protease Production by the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour. Technol.* 2007, 98, 534–538.
- Chi, Z.; Wang, F.; Chi, Z.; Yue, L.; Liu, G.; Zhang, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a Biotechnologically Important Yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 82, 793–804.
- Chi, Z.; Yan, K.; Gao, L.; Li, J.; Wang, X.; Wang, L. Diversity of Marine Yeasts with High Protein Content and Evaluation of Their Nutritive Compositions. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 2008, 88, 1347–1352.
- Ciani M & Maccarelli F. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with winemaking. *World J Microbiol Biotechnol* 14, 1998: 199–203.
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I & Domizio P. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* 10, 2010: 123–333.
- Ciani, M.; Beco, L.; Comitini, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 108, 239–245.
- Ciani, M.; Ferraro, L. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 85, 247–254.
- Ciani, M.; Ferraro, L. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 128–132.
- Ciani, M.; Ferraro, L.; Fatichenti, F. Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 27, 698–703.
- Ciani, M.; Maccarelli, F. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with winemaking. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 14, 199–203.
- Clavijo, A.; Calderón, I.L.; Paneque, P. Diversity of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Yeasts in Three Red Grape Varieties Cultured in the Serrania de Ronda (Spain) Vine-Growing Region. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 143, 241–245.
- Clemente-Jimenez JF, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ & Rodríguez-Vico F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol.* 2004, 21: 149–155.
- Combina, M.; Elía, A.; Mercado, L.; Catania, C.; Ganga, A.; Martinez, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 99, 237–243.
- Comitini, F.; De, J.I.; Pepe, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004, 238, 235–240.
- Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 2011, 28, 873–882.
- Comitini, F.; Capece, A.; Ciani, M.; Romano, P. New insights on the use of wine yeasts, *Current Opinion in Food Science*, Volume 13, 2017, Pages 44-49,
- Cordero Otero, R.R.; Ubeda Iranzo, J.F.; Briones-Perez, A.I.; Potgieter, N.; Villena, M.A.; Pretorius, I.S.; van Rensburg, P. Characterization of the β -glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol. Saf.* 2003, 68, 2564–2569.
- Cordero-Bueso, G.; Esteve-Zarzoso, B.; Cabellos, J.M.; Gil-Díaz, M.; Arroyo, T. Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* 2013, 236, 193–207.
- Cosme, F.; Gonçalves, B.; Inês, A.; Jordão, A.M.; Vilela, A. Grape and wine metabolites: Biotechnological approaches to improve wine quality. In *Grape and Wine Biotechnology*; Morata, A., Loira, I., Eds.; InTechOpen: London, UK. 2016, 187–214.

- Costa, A.; Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol.* 2008, 25, 422–427.
- Costello PJ, Henschke PA & Markides AJ. Standardised methodology for testing malolactic bacteria and wine yeast compatibility. *Aust J Grape Wine Res*, 2003. 9: 127–137.
- Coulter, A.D.; Godden, P.W.; Pretorius, I.S. Succinic acid-how is it formed, what is its effect on titratable acidity, and what factors influence its concentration in wine? *Wine Ind. J.* 2004, 19, 16–24.
- Crabtree, H G. “Observations on the carbohydrate metabolism of tumours.” *The Biochemical journal* vol. 23,3 (1929): 536-45.
- Csoma, H.; Sipiczki, M. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Res.* 2008, 8, 328–336.
- Csutak, O.; Vassu, T.; Corbu, V.; Cirpici, I.; Ionescu, R. Killer activity of *Pichia anomala* CMGB 88. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2017, 7, 2085–2089.
- Csutak, O.; Vassu, T.; Sarbu, I.; Stoica, I.; Cornea, P. Antagonistic activity of three newly isolated yeast strains from the surface of fruits. *Food Technol. Biotechnol.* 2013, 51, 70–77.
- Davenport, R. R.. “Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard.” *Vitis: Journal of Grapevine Research* 13 (2017): 123.
- De Deken, R H. “The Crabtree effect: a regulatory system in yeast.” *Journal of general microbiology* vol. 44,2 (1966): 149-56.
- David, V.; Terrat, S.; Herzine, K.; Claisse, O.; Rousseaux, S.; Tourdot-Maréchal, R.; Masneuf-Pomarede, I.; Ranjard, L.; Alexandre, H. High-Throughput Sequencing of Amplicons for Monitoring Yeast Biodiversity in Must and during Alcoholic Fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 41, 811–821.
- Del Fresno, J.M.; Morata, A.; Loira, I.; Bañuelos, M.A.; Escott, C.; Benito, S.; González Chamorro, C.; Suárez-Lepe, J.A. Use of non-*Saccharomyces* in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. *Eur. Food Res. Technol.* 2017, 243, 2175–2185.
- Delfini, C.; Gaia, P.; Schellino, R.; Strano, M.; Pagliara, A.; Ambró, S. Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5605–5611.
- Di Francesco, A.; Roberti, R.; Martini, C.; Baraldi, E.; Mari, M. Activities of *Aureobasidium pullulans* Cell Filtrates against *Monilinia Laxa* of Peaches. *Microbiol. Res.* 2015, 181, 61–67.
- Di Maio S, Genna G, Gandolfo V, Amore G, Ciaccio M & Oliva D (2012) Presence of *Candida zemplinina* in Sicilian musts and selection of a strain for wine mixed fermentations. *S Afr J Enol Vitic* 33: 80–87.
- Di Maro, E.; Ercolini, D.; Coppola, S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanésca grape. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 117, 201–210.
- Díaz, C.; Molina, A.M.; Nähring, J.; Fischer, R. Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae. *BioMed Res. Int.* 2013, 2013, 540465.
- Díaz-Montañó, D.M.; de Jesús Ramírez Córdova, J. The Fermentative and Aromatic Ability of *Kloeckera* and *Hanseniaspora* Yeasts. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*; Satyanarayana, T., Kunze, G., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2009; 281–305.
- Dicks, L.M.T.; Dellaglio, F.; Collins, M.D. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995, 45, 395–397.
- Divol, B.; Lonvaud-Funel, A. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 99, 85–93.
- Divol, B.; Strehaiano, P.; Lonvaud-Funel, A. Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiol.* 2005, 22, 169–178.
- Domizio, P.; Liu, Y.; Bisson, L.F.; Barile, D. Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol.* 2014, 43, 5–15.
- Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Comitini, F.; Gobbi, M.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be

used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 147, 170–180.

- Drozd, Agnieszka & Erfurt, Karol & Bielas, Rafał & Chrobok, Anna. Chemo-enzymatic Baeyer-Villiger oxidation in the presence of *Candida Antarctica* lipase B and ionic liquids. *New J. Chem.* 2014 39. 10.1039
- Ehrlich F. Über eine Methode zur spaltung racemischer aminosäuren mittels Hefe. *Biochemische Zeitschrift.* 1906; 1:8
- Epifanio SI, Gutierrez AR, Santamaria MP & Lopez R. The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am J Enol Vitic*, 1999 50: 219–224.
- Erten H & Campbell I. The production of low-alcohol wines by aerobic yeasts. *J Inst Brew*, 2001 107: 207–215.
- Escott, C.; Del Fresno, J.M.; Loira, I.; Morata, A.; Tesfaye, W.; del Carmen González, M.; Suárez-Lepe, J.A. Formation of polymeric pigments in red wines through sequential fermentation of flavanol-enriched musts with non-*Saccharomyces* yeasts. *Food Chem.* 2018, 239, 975–983.
- Escott, C.; Loira, I.; Morata, A.; Bañuelos, M.; Suárez-Lepe, J. Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy. In *Yeast-Industrial Applications*; Morata, A., Loira, I., Eds.; InTech: Rijeka, Croatia, 2017; pp. 89–116.
- Escott, C.; Morata, A.; Loira, I.; Tesfaye, W.; Suarez-Lepe, J.A. Characterization of polymeric pigments and pyranoanthocyanins formed in microfermentations of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 2016, 121, 1346–1356.
- Feinstein S.; Louis Pasteur: Father Of Microbiology (Inventors Who Changed the World. 2008
- Fernández de Ullivarri, M.; Mendoza, L.M.; Raya, R.R. Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. *Biol. Control* 2018, 121, 223–228.
- Fernández, M.; Úbeda, J.F.; Briones, A.I. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 59, 29–36.
- Fernández-Gonzalez M, Di Stefano R & Briones A. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiol*, 2003. 20: 35–41.
- Ferraro, L.; Fatichenti, F.; Ciani, M. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 2000, 35, 1125–1129.
- Fleet G.H. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 86, Issues 1–2, 2003, 11-22, ISSN 0168-1605,
- Fleet GH (1990) Which yeast species really conducts the fermentation? *Proc 7th Aust. Wine Ind. Tech. Conf*, 13–17 August 1989, Adelaide, Australia (Williams PJ, Davidson DM & Lee TH, eds), pp. 153–156. Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, SA, Australia.
- Fleet GH, Lafon-Lafourcade S & Ribereau-Gayon P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux Wines. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48: 1034–1038.
- Fleet GH. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 2008; 8(7):979-995.
- Fleet, G.H. Wine. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*; Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2007; 863–890.
- Flores CL, Rodríguez C, Petit T, Gancedo C. Carbohydrate and energy yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews.* 2000; 24:507-529.
- Ford, C.M. The Biochemistry of Organic Acids in the Grape. In *The Biochemistry of the Grape Berry*; e-Book, Gerós, H., Chaves, M., Delrot, S., Eds.; Bentham Science Publishers: Sharjah, UAE, 2012; 67–88. ISBN 978-1-60805-360-5.
- Francesca, N.; Chiurazzi, M.; Romano, R.; Aponte, M.; Settanni, L.; Moschetti, G. Indigenous Yeast Communities in the Environment of “Rovello Bianco” Grape Variety and Their Use in Commercial White Wine Fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 26, 337–351.

- Frankel, E.N.; German, J.B.; Kinsella, J.; Parks, E.; Kanner, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993, 341, 454–457.
- Frisón, L.N.; Chiericatti, C.A.; Aringoli, E.E.; Basílico, J.C.; Basílico, M.Z. Effect of Different Sanitizers against *Zygosaccharomyces Rouxii*. *J. Food Sci. Technol.* 2014, 52, 4619–4624.
- Fugelsang, K.C.; Edwards, C.G. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*; Springer Science & Business Media: Berlin, Germany, 2007.
- Gafner J, Hoffmann P, Schutz M & Iselin F (1996) Changes of the yeast microflora in the vineyard and during the fermentation. *Proc 11th Int Oenol Symp, Sopron, Hungary, 3–5 June 1996* (Lemperle E, Trogus H & Figlestahler P, eds), 42–54. Springer-Verlag, Berlin.
- Ganga, M.A.; Carriles, P.; Raynal, C.; Heras, J.M.; Ortiz-Julien, A.; Dumont, A. Vincular la Metschnikowia pulcherrima y la Saccharomyces cerevisiae Para una Máxima Revelación del Aroma en Vinos Blancos. Available online: <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2014/10/Flavia-Lee-el-documento.pdf> (accessed on 30 June 2020).
- Ganga, M.A.; Martínez, C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 96, 76–83.
- Ganter, P.F. Yeast and invertebrate associations. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*; Rosa, C.A., Gabor, P., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2006; pp. 303–370.
- Gao C & Fleet GH. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J Appl Bacteriol.* 1988, 65: 405–409.
- Garcia A, Carcel C, Dulau L, Samson A, Aguera E, Agosin E & Gunata Z. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a Muscat wine. *J Food Sci.* 2002, 67: 1138–1143.
- García, M.; Apolinar-Valiente, R.; Williams, P.; Esteve-Zarzoso, B.; Arroyo, T.; Crespo, J.; Doco, T. Polysaccharides and oligosaccharides produced on Malvar wines elaborated with *Torulaspota delbrueckii* CLI 918 and *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 native yeasts from D.O. “Vinos de Madrid”. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 6656–6664.
- García, M.; Arroyo, T.; Crespo, J.; Cabellos, J.M.; Esteve-Zarzoso, B. Use of native non-*Saccharomyces* strain: A. new strategy in D.O. “Vinos de Madrid” (Spain) wines elaboration. *Eur. J. Food Sci. Technol.* 2017a, 5, 1–31.
- García, M.; Esteve-Zarzoso, B.; Cabellos, J.M.; Arroyo, T. Advances in the Study of *Candida stellata*. *Fermentation* 2018, 4, 74.
- Garofalo, C., Russo, P., Beneduce, L., Massa, S., Spano, G., & Capozzi, V. (2016). Non-*Saccharomyces* biodiversity in wine and the ‘microbial terroir’: a survey on Nero di Troia wine from the Apulian region, Italy. *Annals of Microbiology*, 66(1), 143–150.
- Gayevskiy, V.; Goddard, M.R. Geographic Delineations of Yeast Communities and Populations Associated with Vines and Wines in New Zealand. *ISME J.* 2012, 6, 1281.
- Gibson BR. 125th anniversary review: Improvement of higher gravity brewery fermentation via wort enrichment and supplementation. *Journal of the Institute of Brewing.* 2011;117(3):268-284.
- Gil, J.V.; Manzanares, P.; Genovés, S.; Vallés, S.; González-Candelas, L. Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 103, 57–68.
- Giovani, G.; Rosi, I.; Bertuccioli, M. Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 160, 113–118.
- Gobbi, M.; Comitini, F.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 2013, 33, 271–281.
- Gobbi, M.; De Vero, L.; Solieri, L.; Comitini, F.; Oro, L.; Giudici, P.; Ciani, M. Fermentative aptitude of non-*Saccharomyces* wine yeast for reduction in the ethanol content in wine. *Eur. Food Res. Technol.* 2014, 239, 41–48.

- Goddard MR & Anfang N. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human aided global dispersal in oak barrels. *Environ Microbiol.* 2010, 12: 63–73.
- Gonzalez R, Quiros M & Morales P. Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends Food Sci Technol.* 2013, 29: 55–61.
- González-Arenzana, L.; Portua, J.; López, R.; López, N.; Santamaría, P.; Garde-Cerdán, T.; López-Alfaro, I. Inactivation of wine-associated microbiota by continuous pulsed electric field treatments. *Innov. Food Sci. Emerg.* 2015, 29, 187–192.
- Gonzalez-Pombo P, Farina L, Carrau F, Batista-Viera F & Brena BM. A novel extracellular beta-glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochem.* 2011, 46: 385–389.
- González-Royo, E.; Pascual, O.; Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Esteve-Zarzoso, B.; Mas, A.; Canals, J.M.; Zamora, F. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 2014, 240, 999–1012.
- Gordon, J.L.; Wolfe, K.H. Recent Allopolyploid Origin of *Zygosaccharomyces Rouxii* Strain ATCC 42981. *Yeast* 2008, 25, 449–456.
- Gostincar, C.; Ohm, R.A.; Kogej, T.; Sonjak, S.; Turk, M.; Zajc, J.; Zalar, P.; Grube, M.; Sun, H.; Han, J.; et al. Genome Sequencing of Four *Aureobasidium pullulans* Varieties: Biotechnological Potential, Stress Tolerance, and Description of New Species. *BMC Genom.* 2014, 15, 549.
- Granchi L, Ganucci D, Messini A, Rosellini D & Vicenzini M. Dynamics of yeast populations during the early stages of natural fermentations for the production of Brunello de Montalcino wines. *Food Technol Biotechnol*, 1998, 36:313–318.
- Granchi, L.; Ganucci, D.; Messini, A.; Vincenzini, M. Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera cortices* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res.* 2002, 2, 403–407.
- Guadalupe, Z.; Palacios, A.; Ayestarán, B. Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *J. Agric. Food Chem* 2007, 55, 4854–4862.
- Guerra E, Sordi G, Mannazzu I, Clementi F & Fatichenti F. Occurrence of wine yeasts on grapes subjected to different pesticide treatments. *Ital J Food Sci.* 1999, 11: 221–230.
- Guerrero, R.F.; Cantos-Villar, E. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A. parameter review. *Trends Food Sci. Technol.* 2015, 42, 27–43.
- Guerzoni, E, and R Marchetti. “Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers.” *Applied and environmental microbiology* vol. 53,3 (1987): 571-6.
- Guillamón JM, Cano J, Ramón D, Guarro J. Molecular differentiation of *Keratinomyces* (*Trichophyton*) species. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1996;69(3):223-227. doi:10.1007/BF00399610
- Gunata, Y.Z.; Bayonove, C.L.; Baumes, R.L.; Cordonnier, R.E. The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr. A* 1985, 331, 83–90.
- Gunata, Z.; Bitteur, S.; Brillouet, J.-M.; Bayonove, C.; Cordonnier, R. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* 1988, 184, 139–149.
- Heard GM & Fleet GH. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl Environ Microbiol.* 1985, 50: 727–728.
- Heard GM & Fleet GH. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J Appl Bacteriol.* 1988, 65: 23–28.
- Henick-Kling T, Edinger W, Daniel P & Monk P. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J Appl Microbiol.* 1998, 84: 865–876.
- Hernández-Orte, Purificación & Bely, Marina & Cacho, Juan & Ferreira, Vicente. (2008). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by

different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 12. 150 - 160. 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00055.x.

- Herraiz, G.; Reglero, M.; Herraiz, P.; Alvarez, M.; Cabezudo, M. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulphur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 1990, 41, 313–318.

- Hierro, N.; González, Á.; Mas, A.; Guillamón, J.M. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: Effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res.* 2006, 6, 102–111.

- Hopfer, H.; Heymann, H. Judging wine quality: Do we need experts, consumers or trained panelists? *Food Qual. Prefer.* 2014, 32, 221–233.

- Hranilovic, A.; Bely, M.; Masneuf-Pomarede, I.; Jiranek, V.; Albertin, W. The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PLoS ONE* 2017, 12, e0184652.

- Hu, K.; Jin, G.-J.; Xu, Y.-H.; Tao, Y.-S. Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* 2018, 108, 119–127.

- Iembo, T.; Da-Silva, R.; Pagnocca, F.C.; Gomes, E. Production, Characterization and Properties of Beta-Glucosidase and Beta-Xylosidase from a Strain of *Aureobasidium* Sp. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 2002, 38, 639–643.

- Ippolito, A.; El Ghaouth, A.; Wilson, C.L.; Wisniewski, M. Control of Postharvest Decay of Apple Fruit by *Aureobasidium pullulans* and Induction of Defense Responses. *Postharvest Biol. Technol.* 2000, 19, 265–272.

- Ivit, N.N.; Kemp, B. The Impact of Non-*Saccharomyces* Yeast on Traditional Method Sparkling Wine. *Fermentation* 2018, 4, 73.

- J.J. Mateo, R. Di Stefano, Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts, *Food Microbiology*, Volume 14, Issue 6, 1997, Pages 583-591, ISSN 0740-0020,

- Jackson RS (2000) *Wine Science – Principles, Practice, Perception*. Academic Press, San Diego, CA.

- Jawich D, Hilan C, Saliba R, Lteif R & Strehaiano P. Effects of some pesticides on two yeast strains: *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia pulcherrima*. *J Int Sci Vigne Vin.* 2005, 39: 67–74.

- Jolly N. Die voorkoms van apikulate giste in druiwe- en mosmonsters in die Robertson area. *Wynboer Tegnies Mei.* 2006, 68–70.

- Jolly N.P.; Augustyn, O.P.H.; Pretorius I.S. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *S Afr J Enol Vitic.* 2003, 24: 63–69.

- Jolly, N.P.; Augustyn, O.P.H.; Pretorius, I.S. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Oenol. Vitic.* 2006, 27. 15-38. 10.21548/27-1-1475.

- Jolly, N.P.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 2014, 14, 215–237.

- Kántor, A.; Hutková, J.; Petrová, J.; Hleba, L.; Káčániová, M. Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2015, 5, 282–285.

- Kapsopoulou, K.; Kapaklis, A.; Spyropoulos, H. Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 21, 1599–1602.

- Kapsopoulou, K.; Mourtzini, A.; Anthoulas, M.; Nerantzis, E. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 23, 735–739.

- Khoo, H.E.; Azlan, A.; Tang, S.T.; Lim, S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.* 2017, 61, 1361779.
- Kim, D.-H.; Hong, Y.-A.; Park, H.-D. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnol. Lett.* 2008, 30, 1633–1638.
- Kirimli, S.; Kunduhoglu, B. Inactivation of *Zygosaccharomyces Rouxii* Using Ultrasound at Different Temperatures, PH and Water Activity Conditions. *Ital. J. Food Sci.* 2016, 28, 64–72
- König, H.; Uden, G.; Froehlich, J. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. 2017, 10.1007/978-3-319-60021-5
- Kulkarni, P.; Loira, I.; Morata, A.; Tesfaye, W.; González, M.C.; Suárez-Lepe, J.A. Use of non-*Saccharomyces* yeast strains coupled with ultrasound treatment as a novel technique to accelerate ageing on lees of red wines and its repercussion in sensorial parameters. *LWT-Food Sci. Technol.* 2015, 64, 1255–1262.
- Kurita, O. Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 104, 1051–1058.
- Kurtzman, C.P. Fell, W.F.; Boekhout, T. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th edn. 2011b. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygotorulaspota*. *FEMS Yeast Res.* 2003, 4, 233–245.
- Kurtzman, C.P. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011a, 99, 13–23.
- Kurtzman, C.P. *Torulaspota lindner* (1904). In *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5th ed.; Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Eds.; Elsevier: London, UK, 2011c; Volume 2, pp. 867–874.
- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*; Elsevier: London, UK, 2010.
- Kutyna DR, Varela C, Henschke PA, Chambers PJ; Stanley GA. Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends Food Sci Technol.* 2010, 21: 293–302.
- Lachance, M.-A.; Kurtzman, C.P. Chapter 41—*Lachancea* Kurtzman. In *The Yeasts*, 5th ed.; Elsevier: New York, NY, USA, 2011; 511–519.
- Lafon-Lafourcade, S.; Lucmaret, V.; Joyeaux, A.; Ribereau-Gayon, P. Utilisation de levains mixtes dans l'élaboration des vins de pourriture noble en vue de réduire l'acidité volatile. *Comptes Rendues de L'Académie d'Agriculture.* 1981, 67, 616–622.
- Lambrechts MG & Pretorius IS. Yeast and its importance to wine aroma – a review. *S Afr J Enol Vitic.* 2000, 21: 97–129.
- Lamikanra, O.; Inyang, I.; Leong, S. Distribution and effect of grape maturity on organic acid content of red Muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 3026–3028.
- Leandro, M.J.; Sychrová, H.; Prista, C.; Loureiro-Dias, M.C. The Osmotolerant Fructophilic Yeast *Zygosaccharomyces Rouxii* Employs Two Plasma-Membrane Fructose Uptake Systems Belonging to a New Family of Yeast Sugar Transporters. *Microbiology.* 2011, 157, 601–608.
- Leathers, T.D.; Rich, J.O.; Anderson, A.M.; Manitchotpsit, P. Lipase Production by Diverse Phylogenetic Clades of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett.* 2013, 35, 1701–1706.
- Leite, R.S.; Bocchini, D.A.; Martins Eda, S.; Silva, D.; Gomes, E.; Da Silva, R. Production of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes from *Aureobasidium Pulluans* on Solid State Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007, 137–140, 281–288.
- Leite, R.S.R.; Alves-Prado, H.F.; Cabral, H.; Pagnocca, F.C.; Gomes, E.; Da-Silva, R. Production and Characteristics Comparison of Crude β -Glucosidases Produced by Microorganisms *Thermoascus Aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in Agricultural Wastes. *Enzym. Microb. Technol.* 2008, 43, 391–395.

- Lencioni, L.; Romani, C.; Gobbi, M.; Comitini, F.; Ciani, M.; Domizio, P. Controlled mixed fermentation at winery scale using *Zygorhynchus florentina* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 234, 36–44.
- Lerm, E.; Engelbrecht, L.; du Toit, M. Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2010, 31, 186–212.
- Liu, H.F.; Wu, B.H.; Fan, P.G.; Xu, H.Y.; Li, S.H. Inheritance of sugars and acids in berries of grape (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica* 2007, 153, 99–107.
- Lleixa, J.; Martín, V.; Portillo, C.; Carrau, F.; Beltran, G.; Mas, A. Comparison of the performances of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 338.
- Loira, I.; Morata, A.; Comuzzo, P.; Callejo, M.J.; González, C.; Calderón, F.; Suárez-Lepe, J.A. Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspota delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Res. Int.* 2015, 76, 325–333.
- Loira, I.; Morata, A.; Palomero, F.; González, C.; Suárez-Lepe, J.A. *Schizosaccharomyces pombe*: A Promising Biotechnology for Modulating Wine Composition. *Fermentation* 2018, 4, 70.
- Loira, I.; Vejarano, R.; Morata, A.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Laureano, O.; González, M.C.; Suárez-Lepe, J.A. Effect of *Saccharomyces* strains on the quality of red wines aged on lees. *Food Chem.* 2013, 139, 1044–1051.
- Longo E, Cansado J, Agrelo D & Villa TG. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *Am J Enol Vitic.* 1991, 42: 141–144.
- Lonvaud-Funel A. Microorganisms of winemaking *Cerevisia*: Belgian J Brewing Biotechnol. 1996, 21: 55–58.
- Lopes, C.A.; Sangorrín, M.P. Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Rev. Argent. Microbiol.* 2010, 42, 298–306.
- López, S.; Mateo, J.J.; Maicas, S. Characterisation of *Hanseniaspora* isolates with potential aromaenhancing properties in muscat wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2014, 35, 292–303.
- Loureiro, V.; Ferreira, M.M.; Monteiro, S.; Ferreira, R.B. The Microbial Community of Grape Berry. In *The Biochemistry of the Grape Berry*; Gerós, H., Chaves, M., Delrot, S., Eds.; Bentham Science Publishers: Soest, The Netherlands, 2012, 241–268.
- Loureiro, V.; Malfeito-Ferreira, M. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 86, 23–50.
- Luan, Y.; Zhang, B.-Q.; Duan, C.-Q.; Yan, G.-L. Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. *LWT-Food Sci. Technol.* 2018, 92, 177–186.
- Magyar I & Toth T. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 2011, 28: 94–100.
- Malfeito-Ferreira, M.; Tareco, M.; Loureiro, V. Fatty acid profiling: A feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, 38, 143–155.
- Manachini, P.L.; Parini, C.; Fortina, M.G. Pectic Enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Enzym. Microb. Technol.* 1988, 10, 682–685.
- Manitchotpisit, P.; Leathers, T.D.; Peterson, S.W.; Kurtzman, C.P.; Li, X.L.; Eveleigh, D.E.; Lotrakul, P.; Prasongsuk, S.; Dunlap, C.A.; Vermillion, K.E.; et al. Multilocus Phylogenetic Analyses, Pullulan Production and Xylanase Activity of Tropical Isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Mycol. Res.* 2009, 113 Pt 10, 1107–1120.
- Manzanares, P.; Ramón, D.; Querol, A. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of β -D-xylosidase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 46, 105–112.
- Manzanares, P.; Rojas, V.; Genovés, S.; Vallés, S. A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2000, 35, 95–103.
- Mari, M.; Martini, C.; Spadoni, A.; Rouissi, W.; Bertolini, P. Biocontrol of Apple Postharvest Decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol. Technol.* 2012, 73, 56–62.

- Martín, V. *Hanseniaspora vineae*: Caracterización y su uso en la Vinificación. Ph.D. Thesis, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay, 2016.
- Martín, V.; Boido, E.; Giorello, F.; Mas, A.; Dellacassa, E.; Carrau, F. Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains. *Yeast* 2016, 33, 323–328.
- Martín, V.; Giorello, F.; Fariña, L.; Minteguiaga, M.; Salzman, V.; Boido, E.; Aguilar, P.S.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Mas, A.; et al. De novo synthesis of benzenoid compounds by the yeast *Hanseniaspora vineae* increases the flavor diversity of wines. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 4574–4583.
- Martín, V.; Valera, M.J.; Medina, K.; Boido, E.; Carrau, F. Oenological Impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* Yeast Genus on Wines-A Review. *Fermentation*. 2018, 4, 76.
- Martini A, Ciani M & Scorzetti G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am J EnolVitic.* 1996, 47: 435–440.
- Martini A, Frederici F & Rosini G. A new approach to the study of yeast ecology of natural substances. *Can J Microbiol.* 1980, 26: 856–859.
- Martorell, P.; Stratford, M.; Steels, H.; Fernández-Espinar, M.; Querol, A. Physiological Characterization of Spoilage Strains of *Zygosaccharomyces Bailii* and *Zygosaccharomyces Rouxii* Isolated from High Sugar Environments. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 114, 234–242.
- Matallana, E. and Aranda, A. (2017), Biotechnological impact of stress response on wine yeast. *Lett Appl Microbiol*, 64: 103-110. doi:10.1111/lam.12677
- Mateo, J.J.; Peris, L.; Ibañez, C.; Maicas, S. Characterization of glycolytic activities from non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Bobal musts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 38, 347–354.
- Mateo, J.J.; Di Stefano R. Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. *Food Microbiology*. 1997, Volume 14, Issue 6; 583-591.
- Matthews, A.; Grimaldi, A.; Walker, M.; Bartowsky, E.; Grbin, P.; Jiranek, V. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 5715–5731.
- Mazauric, J.-P.; Salmon, J.-M. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 5647–5653.
- McCormack PJ, Wildman HG, Jeffries P. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(3):927-931.
- Medina, K.; Boido, E.; Fariña, L.; Gioia, O.; Gomez, M.E.; Barquet, M.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Carrau, F. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.* 2013, 141, 2513–2521.
- Mehlomakulu, N.N.; Setati, M.E.; Divol, B. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 188, 83–91.
- Mendes Ferreira, A.; Climaco, M.C.; Mendes Faia, A. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components—A preliminary study. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 91, 67–71.
- Mercado L, Dalcero A, Masuelli R, Combina M. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution of fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*. 2007; 24: 403-412
- Mestre Furlani, M.V.; Maturano, Y.P.; Combina, M.; Mercado, L.A.; Toro, M.E.; Vazquez, F. Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: A strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Res.* 2017, 17.
- Milanovic, V.; Ciani, M.; Oro, L.; Comitini, F. *Starmerella bombicola* influences the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* at pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase level during mixed wine fermentation. *Microb. Cell Fact.* 2012, 3, 11–18.
- Mills, D.A.; Johannsen, E.A.; Cocolin, L. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 4884–4893.

- Mina, M.; Tsaltas, D. Contribution of Yeast in Wine Aroma and Flavour. In *Yeast-Industrial Applications*; InTech: Rijeka, Croatia, 2017.
- Minarik, E.; Hanikova, A. Die heffeflora konzentrierter traubenermoste und deren einfluss auf die stabilitat der weine. *Wein-Wissen* 1982, 3, 187–192.
- Molina, A.M.; Swiegers, J.H.; Varela, C.; Pretorius, I.S.; Agosin, E. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 77, 675–687.
- Mónaco, S.; Barda, N.; Rubio, N.; Caballero, A. Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *J. Appl. Microbiol.* 2014, 117, 451–464.
- Monteil H, Blazy-Maugen F & Michel G. Influence of pesticides on the growth of yeasts from grapes and wine. *SciAliments*, 1987; 6: 349–360.
- Mora, J.; Barbas, J.I.; Mulet, A. Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 1990, 41, 156–159.
- Morales, P.; Rojas, V.; Quirós, M.; Gonzalez, R. The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 99, 3993–4003.
- Morata, A.; Benito, S.; Loira, I.; Palomero, F.; González, M.C.; Suárez-Lepe, J.A. Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during the fermentation of red must. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 159, 47–53.
- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M.C.; Calderón, F.; Suárez, J.A. Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 106, 123–129.
- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M.C.; Colomo, B.; Suárez, J.A. Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *Eur. Food Res. Technol.* 2005, 220, 341–346.
- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M.C.; Colomo, B.; Suárez, J.A. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6475–6481.
- Morata, A.; González, C.; Suárez-Lepe, J.A. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 116, 144–152.
- Morata, A.; Loira, I.; Escott, C.; del Fresno, J.M.; Bañuelos, M.A.; Suárez-Lepe, J.A. Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology. *Fermentation* 2019, 5, 63.
- Morata, A.; Loira, I.; Suárez-Lepe, J.A. Influence of yeasts in wine colour. In *Grape and Wine Biotechnology*; Morata, A., Loira, I., Eds.; InTech: London, UK, 2016; pp. 288–289.
- Morata, A.; Loira, I.; Tesfaye, W.; Bañuelos, M.A.; González, C.; Suárez Lepe, J.A. *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology. *Fermentation* 2018, 4, 53.
- Morata, A.; Loira, I.; Vejarano, R.; González, C.; Callejo, M.J.; Suárez-Lepe, J.A. Emerging preservation technologies in grapes for winemaking. *Trends Food Sci. Technol.* 2017, 67, 36–43.
- Mortimer R & Polsinelli M. On the origins of wine yeast. *Res Microbiol.* 1999; 150: 199–204.
- Nieuwoudt HH, Prior BA, Pretorius IS & Bauer FF. Glycerol in South African table wines: an assessment of its relationship to wine quality. *S Afr J Enol Vitec.* 2002; 23: 22–30.
- Nisiotou, A.A.; Nychas, G.-J.E. Yeast Populations Residing on Healthy or Botrytis-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 2765–2768.
- Noble, A.C.; Bursick, G.F. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1984, 35, 110–112.
- Nordstrom K. Possible control of volatile ester formation in brewing. In: *Proc. Eur. Brew. Conv.* 10th, Stockholm. 1965. pp. 195-208
- Nykänen L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am J Enol Vitic.* 1986; 37: 84–96.

- Oro, L.; Ciani, M.; Bizzaro, D.; Comitini, F. Evaluation of damage induced by Kwkt and Pikt zymocins against *Brettanomyces/Dekkera* spoilage yeast, as compared to sulphur dioxide. *J. Appl. Microbiol.* 2016, 121, 207–214.
- Oro, L.; Ciani, M.; Comitini, F. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 2014, 116, 1209–1217.
- Padilla, B.; Gil, J.V.; Manzanares, P. Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. *Fermentation* 2018, 4, 68.
- Padilla, B.; Gil, J.V.; Manzanares, P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 411.
- Palomero, F.; Morata, A.; Benito, S.; Calderón, F.; Suárez-Lepe, J.A. New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. *Food Chem.* 2009, 112, 432–441.
- Palpacelli, V.; Ciani, M.; Rosini, G. Activity of different ‘killer’ yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991, 84, 75–78.
- Peinado, R.A.; Mauricio, J.C.; Medina, M.; Moreno, J.J. Effect of *Schizosaccharomyces pombe* on aromatic compounds in dry sherry wines containing high levels of gluconic acid. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4529–4534.
- Petersen, J.; Russell, P. Growth and the environment of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, 3, 210–226.
- Peynaud E & Domercq S. A review of microbiological problems in winemaking in France. *Am J Enol Vitic.* 1959; 10: 69–77.
- Phylloplane-Inhabiting Yeasts and Yeastlike Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60, 927–931.
- Pina, C.; Santos, C.; Couto, J.A.; Hogg, T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - Influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* 2004, 21, 439–447.
- Polsinelli M, Romano P, Suzzi G & Mortimer R. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. *Lett Appl Microbiol.* 1996; 22: 1–5.
- Prakitchaiwattana, C.J.; Fleet, G.H.; Heard, G.M. Application and Evaluation of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis to Analyse the Yeast Ecology of Wine Grapes. *FEMS Yeast Res.* 2004, 4, 865–877.
- Pretorius IS. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 2000; 16: 675–729.
- Pretorius IS. The genetic analysis and tailoring of wine yeasts. *Topics in Current Genetics*, Vol. 2 (De Winde JH, ed.). 2003, 99–141. Springer-Verlag, Berlin.
- Pretorius IS, Van der Westhuizen TJ & Augustyn OPH. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S Afr J EnolVitic.* 1999; 20: 61–74.
- Prior BA, Hohmann S. Glycerol production and osmoregulation. In: Zimmermann FK, Entian KD, editors. *Yeast sugar metabolism*. Lancaster: Technomic Publishing; 1997. pp. 313-337
- Prior BA, Toh TH, Jolly N, Baccari CL & Mortimer RK. Impact of yeast breeding for elevated glycerol production on fermentation activity and metabolite formation in Chardonnay. *S Afr J Enol Vitic.* 2000; 21: 92–99.
- Prior, K.J.; Bauer, F.F.; Divol, B. The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine. *Food Microbiol.* 2019, 79, 75–84.
- López, N.; Condón, S.; Raso, J.; Álvarez, I. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 130, 49–55.
- Puligundla P, Smogrovicova D, Obulam VSR, Ko S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: A research update. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 2011; 38:1133-1144.
- Punnapayak, H. Alpha-Amylase Activity during Pullulan Production and Alpha-Amylase Gene Analyses of *Aureobasidium pullulans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 38, 1211–1218.

- Querol A, Jimenez M & Huerta T. Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape harvests in the region of Alicante (Spain). *J Food Sci.* 1990 55: 1603–1606.
- Quirós, M.; Rojas, V.; Gonzalez, R.; Morales, P. Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 181, 85–91.
- Ramírez, M.; Velázquez, R. The Yeast *Torulaspora delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. *Fermentation* 2018, 4, 94.
- Ramírez, M.; Velázquez, R.; Maqueda, M.; López-Piñeiro, A.; Ribas, J.C. A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Front Microbiol.* 2015, 6, 983.
- Ramírez, M.; Velázquez, R.; Maqueda, M.; Zamora, E.; López-Piñeiro, A.; Hernández, L.M. Influence of the dominance of must fermentation by *Torulaspora delbrueckii* on the malolactic fermentation and organoleptic quality of red table wine. *Int. J. Food Microbiol.* 2016, 238, 311–319.
- Raspor, P.; Milek, D.M.; Polanc, J.; Možina, S.S.; Čadež, N. Yeasts Isolated from Three Varieties of Grapes Cultivated in Different Locations of the Dolenjska Vine-Growing Region, Slovenia. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 109, 97–102.
- Rathnayake, R.; Savocchia, S.; Schmidtke, L.M.; Steel, C.C. Characterisation of *Aureobasidium pullulans* Isolates from *Vitis vinifera* and Potential Biocontrol Activity for the Management of Bitter Rot of Grapes. *Eur. J. Plant Pathol.* 2018, 151, 593–611.
- Redzepovic, S.; Orlic, S.; Majdak, A.; Kozina, B.; Volschenk, H.; Viljoen-Bloom, M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 83, 49–61.
- Regueiro LA, Costas CL & Rubio JEL (1993) Influence of viticultural and enological practices on the development of yeast populations during winemaking. *Am J Enol Vitic* 44:405–408.
- Rementería A, Rodríguez JA, Cadaval A, Amenabar R, Muguruza JR, Hernando FL & Sevilla MJ. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). *Int J Food Microbiol* 2003; 86: 201–207.
- Renault P, Miot-Sertier C, Marullo P, Hernandez-Orte Lagarrigue L, Lonvaud-Funel A & Bely M. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: potential applications in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 2009; 134: 201–210.
- Renault, P.; Coulon, J.; Moine, V.; Thibon, C.; Bely, M. Enhanced 3-sulfanylhexan-1-ol production in sequential mixed fermentation with *Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* reveals a situation of synergistic interaction between two industrial strains. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 293.
- Renouf, V.; Claisse, O.; Lonvaud-Funel, A. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 75, 149–164.
- Renouf, V.; Claisse, O.; Lonvaud-Funel, A. Understanding the Microbial Ecosystem on the Grape Berry Surface through Numeration and Identification of Yeast and Bacteria. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2005, 11, 316–327.
- Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B & Lonvaud A. The Microbiology of Wine and Vinifications. *Handbook of Enology*, 2006. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Ribereau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Alcohols, and other volatile compounds. The chemistry of wine stabilization and treatments. In *Handbook of Enology*, 2nd ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, UK, 2006; Volume 2, pp. 51–64.
- Rich, J.O.; Leathers, T.D.; Anderson, A.M.; Bischoff, K.M.; Manitchotpisit, P. Laccases from *Aureobasidium pullulans*. *Enzym. Microb. Technol.* 2013, 53, 33–37.
- Rodrigues, A.; Ricardo-Da-Silva, J.M.; Lucas, C.; Laureano, O. Effect of commercial mannoproteins on wine colour and tannins stability. *Food Chem.* 2012, 131, 907–914.
- Rodríguez ME, Lopes CA, Broock M, Valles S, Ramon D & Caballero AC (2004) Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J Appl Microbiol* 2004; 96: 84–95.

- Rojas V, Gil JV, Manzanares P, Gavara R, Piñaga F, Flors A. Measurement of alcohol acetyltransferase and ester hydrolase activities in yeast extracts. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;30(2):224-230.
- Rojas, V.; Gil, J.V.; Piñaga, F.; Manzanares, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 86, 181–188.
- Roller, S.; Covill, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 47, 67–77.
- Romano, P.; Capece, A.; Jespersen, L. Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In *Yeasts in Food and Beverages*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany. 2006; 13–53.
- Romano, P.; Suzzi, G., Comi, G., Zironi R. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *The Journal of Applied Bacteriology*. 1992; 73:126-130
- Romano, P.; Suzzi, G., Zironi, R., Comi, G. Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59: 1838–1841.
- Romano, P.; Suzzi, G. Higher Alcohol and Acetoin Production by *Zygosaccharomyces* Wine Yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 1993b, 75, 541–545.
- Romero-Cascales, I.; Fernández-Fernández, J.I.; Ros-García, J.M.; López-Roca, J.M.; Gómez-Plaza, E. Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2008, 43, 1295–1305.
- Rosi, I.; Vinella, M.; Domizio, P. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* 1994, 77, 519–527.
- Rosini G. Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *J Gen Appl Microbiol* 1984; 30: 249–256.
- Rosini, G.; Federici, F.; Martini, A. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microb. Ecol.* 1982, 8, 83–89.
- Rossouw D, Bauer FF. Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food Microbiol.* 2016; 55:32-46.
- Sabaté, J. et al. "Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA." *Microbiological research* 157 4 (2002): 267-74 .
- Sabel, A.; Martens, S.; Petri, A.; König, H.; Claus, H. *Wickerhamomyces anomalus* AS1: A new strain with potential to improve wine aroma. *Ann. Microbiol.* 2014, 64, 483–491.
- Sadoudi, M.; Tourdot-Maréchal, R.; Rousseaux, S.; Steyer, D.; Gallardo-Chacón, J.J.; Ballester, J.; Vichi, S.; Guérin-Schneider, R.; Caixach, J.; Alexandre, H. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol.* 2012, 32, 243–253.
- Salmon, J.M.; Fornairon-Bonnefond, C.; Mazauric, J.P. Interactions between Wine Lees and Polyphenols: Influence on Oxygen Consumption Capacity during Simulation of Wine Aging. *J. Food Sci.* 2002, 67, 1604–1609.
- Sangorrín, M.P.; Lopes, C.A.; Jofré, V.; Querol, A.; Caballero, A.C. Spoilage yeasts from Patagonian cellars: Characterization and potential biocontrol based on killer interactions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 24, 945–953.
- Santos, A.; Alonso, A.; Belda, I.; Marquina, D. Cell cycle arrest and apoptosis, two alternative mechanisms for PMKT2 killer activity. *Fungal Genet. Biol.* 2013, 50, 44–54.
- Santos, M.C.; Nunes, C.; Saraiva, J.A.; Coimbra, M.A. Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* 2012, 234, 1–12.
- Scanes KT, Hohmann S & Prior BA. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *S Afr J Enol Vitic* 1998 19: 15–21.

- Schlandler, M.; Distler, U.; Tenzer, S.; Thines, E.; Claus, H. Purification and properties of yeast proteases secreted by *Wickerhamomyces anomalus* 227 and *Metschnikovia pulcherrima* 446 during growth in a white grape juice. *Fermentation* 2017, 3, 2.
- Schnierda, T.; Bauer, F.F.; Divol, B.; van Rensburg, E.; Görgens, J.F. Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014, 58, 478–485.
- Schwentke, J.; Sabel, A.; Petri, A.; König, H.; Claus, H. The yeast *Wickerhamomyces anomalus* AS1 secretes a multifunctional exo- β -1,3-glucanase with implications for winemaking. *Yeast* 2014, 31, 349–359.
- Setati, M.E.; Jacobson, D.; Bauer, F.F. Sequence-Based Analysis of the *Vitis vinifera* L. Cv Cabernet Sauvignon Grape Must Mycobiome in Three South African Vineyards Employing Distinct Agronomic Systems. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 1358.
- Sharf R & Margalith P. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *Eur J Appl Microbiol/Biotechnol*, 1983; 17: 311–313.
- Sharma, R.K. Citric Acid. In *Natural Food Antimicrobial Systems*; Naidu, A.S., Ed.; CRC Press LLC: New York, NY, USA, 2000.
- Śipiczki, M. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 6716–6724.
- Šipiczki, M.; Ciani, M.; Csoma, H. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* DBVPG 3827. *Folia Microbiol. (Praha)* 2005, 50, 494–498.
- Smotrova, N.G.; Kremenchutskii, G.N. Isolation from the Environment of Strains of Microorganisms with Glucose Oxidase Activity. *Mikrobiol. Zh.* 2002, 64, 28–34.
- Soden, A.; Francis, I.L.; Oakey, H.; Henschke, P.A. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2000, 6, 21–30.
- Spagna G, Barbagallo RN, Palmeri R, Restuccia C & Giudici P. Properties of endogenous b-glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme Microb Technol*, 2002; 31: 1036–1041.
- Starmer WT & Lachance MA. Yeast ecology. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Vol. 1, 5th edn (Kurtzman CP, Fell JW & Boekhout T, eds), 2011; 65–83. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Steels, H.; James, S.A.; Roberts, I.N.; Stratford, M. *Zygosaccharomyces Lentus*: A Significant New Osmophilic, Preservative-Resistant Spoilage Yeast, Capable of Growth at Low Temperature. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87, 520–527.
- Stratford, M.; Morgan, P.; Rose, A.H. Sulphur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomycodes ludwigii*. *J. Gen. Microbiol.* 1987, 133, 2173–2179.
- Strauss, M.L.A.; Jolly, N.P.; Lambrechts, M.G.; Rensburg, P. Van Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 91, 182–190.
- Suárez, R.; Suárez-Lepe, J.A.; Morata, A.; Calderón, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem.* 2007, 102, 10–21.
- Suárez-Lepe, J.A.; Morata, A. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends Food Sci. Technol.* 2012, 23, 39–50.
- Suárez-Lepe, J.A.; Palomero, F.; Benito, S.; Calderón, F.; Morata, A. Oenological versatility of *Schizosaccharomyces* spp. *Eur. Food Res. Technol.* 2012, 235, 375–383.
- Subden, R.E.; Husnik, J.I.; Van Twest, R.; Van Der Merwe, G.; Van Vuuren, H.J.J. Autochthonous Microbial Population in a Niagara Peninsula Icewine Must. *Food Res. Int.* 2003, 36, 747–751.
- Sumby KM, Grbin PR & Jiranek V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chem*, 2010; 121: 1–16.

- Suzuki, M.; Suh, S.O.; Sugita, T.; Nakase, T.A. phylogenetic study on galactose-containing *Candida* species based on 18S ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1999, 45, 229–238.
- Swangkeaw J, Vichitphan S, Butzke CE & Vichitphan K. Characterization of beta-glucosidases from *Hanseniaspora* sp and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011; 27: 423–430.
- Swiegers JH & Pretorius IS. Yeast modulation of wine flavour. *Adv Appl Microbiol*, 2005; 57: 131–175.
- Török T, Mortimer RK, Romano P, Suzzi G & Polsinelli M. Quest for wine yeasts – an old story revisited. *J Indust Microbiol*, 1996; 17: 303–313.
- Teoh, A.L.; Heard, G.; Cox, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 95, 119–126.
- Todd B. Enhancing the sensory properties of wine using b-glycosidase activity of wine microorganisms. *Aust Grape grower Winemaker*, 1995; 382: 22–23.
- Tristezza, M.; Tufariello, M.; Capozzi, V.; Spano, G.; Mita, G.; Grieco, F. The oenological potential of *Hanseniaspora uvarum* in simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1–14.
- Ubeda-Iranzo JF, Briones-Perez AI & Izquierdo-Canas PM. Study of the oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. *Food Microbiol*, 1998; 15: 399–406.
- Uthurry, C.A.; Suárez-Lepe, J.A.; Lombardero, J.; García Del Hierro, J.R. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chem.* 2006, 94, 262–270.
- Van der Westhuizen, T.J., O.P.H. Augustyn, W. Khan, & I.S. Pretorius. "Seasonal Variation of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Vineyards of the Western Cape in South Africa." *South African Journal of Enology and Viticulture [Online]*, 21.1, 2000: 10-16. Web. 8 Jan. 2021
- Van Oort, M.; Canal-Llaubères, R.-M.; Law, B.A. Enzymes in Wine Production. In *Enzymes in Food Technology*; Sheffield Academic Press: Sheffield, UK, 2002; pp. 76–90.
- Van Rensburg, P.; Pretorius, I.S. Enzymes in winemaking: Harnessing natural catalysts for efficient biotransformations—A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2000, 21, 52–73.
- Van Zyl JA, De Vries MJ & Zeeman AS; The microbiology of South African winemaking III. The effect of different yeasts on the composition of fermented musts. *S Afr J Agric Sci*, 1963; 6: 165–179.
- Varela, C.; Borneman, A.R. Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast* 2017, 34, 111–128.
- Varela, C.; Sengler, F.; Solomon, M.; Curtin, C. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* 2016, 209, 57–64.
- Vejarano, R.; Morata, A.; Loira, I.; González, M.C.; Suárez-Lepe, J.A. Theoretical considerations about usage of metabolic inhibitors as possible alternative to reduce alcohol content of wines from hot areas. *Eur FoodRes. Technol.* 2013, 237, 281–290.
- Velázquez, R.; Zamora, E.; Álvarez, M.L.; Álvarez, M.L.; Ramírez, M. Using mixed inocula of new killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of traditional sparkling-wine. *Food Microbiol.* 2016, 59, 150–160.
- Velázquez, R.; Zamora, E.; Alvarez, M.L.; Hernández, L.M.; Ramírez, M. Effects of new *Torulasporea delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 1222.
- Velázquez, R.; Zamora, E.; Álvarez, M.L.; Ramírez, M. Using *Torulasporea delbrueckii* killer yeasts in the elaboration of base wine and traditional sparkling. *Int. J. Food Microbiol.* 2018, in press.
- Versavaud A, Courcoux P, Roulland C, Dulau L, Hallet JN. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(10):3521-3529. doi:10.1128/AEM.61.10.3521-3529.1995

- Viana, F.; Belloch, C.; Vallés, S.; Manzanares, P. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 151, 235–240.
- Viana, F.; Gil, J.V.; Genoves, S.; Valles, S.; Manzanares, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol.* 2008, 25, 778–785.
- Viana, F.; Gil, J.V.; Vallés, S.; Manzanares, P. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 135, 68–74.
- Vidal, S.; Francis, L.; Williams, P.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chem.* 2004, 85, 519–525.
- Vidrih R, Hribar J. Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chemistry.* 1999; 67: 287-294
- Villalba ML, Susana Sáez J, Del Monaco S, Lopes CA, Sangorrín MP. TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *Int J Food Microbiol.* 2016 217:94-100.
- Vilela, A. Use of Non-conventional Yeasts for Modulating Wine Acidity. *Fermentation* 2019, 5, 27.
- Vilela-Moura, A.; Schuller, D.; Mendes-Faia, A.; Côte-Real, M. Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 80, 881–890.
- Vilela-Moura, A.; Schuller, D.; Mendes-Faia, A.; Silva, R.F.; Chaves, S.R.; Sousa, M.J.; Côte-Real, M. The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: Reduction of volatile acidity of grape musts and wines—Minireview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 89, 271–280.
- Visser W, Scheffers WA, Batenburg-Van Der Vegte WH, Van Dijken JP. Oxygen requirements of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology.* 1990;56(12):3785-3792
- Volschenk, H.; van Vuuren, H.J.J.; Viljoen-Bloom, M. Malic acid in wine: Origin, function and metabolism during vinification. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2006, 27, 123–136.
- Waldir Desiderio Estela Escalante. Perspectives and Uses of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Fermented Beverages, *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*, Rosa Lidia Solís-Oviedo and Ángel de la Cruz Pech-Canul, IntechOpen (December 3rd 2018).
- Walker, G.M. *Pichia anomala*: Cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 2011, 99, 25–34.
- Wang, C.; Mas, A.; Esteve-Zarzoso, B. The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 502.
- Webb AD, Ingraha JL. Fusel oil. *Advances in Applied Microbiology.* 1963; 5:317-353
- Xiang, Q.; Liu, X.; Li, J.; Liu, S.; Zhang, H.; Bai, Y. Effects of Dielectric Barrier Discharge Plasma on the Inactivation of *Zygosaccharomyces Rouxii* and Quality of Apple Juice. *Food Chem.* 2018, 254, 201–207.
- Yanai T & Sato M. Isolation and properties of b-glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. *Am J Enol Vitic.* 1999; 50: 231–235.
- Yokotsuka, K.; Otaki, A.; Naitoh, A.; Tanaka, H. Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of a high-acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 1993, 44, 371–377.
- Youssef, B.M.; Asker, A.A.; El-Samahy, S.K.; Swailam, H.M. Combined effect of steaming and gamma irradiation on the quality of mango pulp stored at refrigerated temperature. *Food Res. Int.* 2002, 35, 1–13.

- Zironi R, Romano P, Suzzi G, Battistutta F & Comi G. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 1993; 15: 235–238.
- Zohre DE & Erten H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochem*, 2002; 38: 319–324.
- Zott, K.; Thibon, C.; Bely, M.; Lonvaud-Funel, A.; Dubourdieu, D.; Masneuf-Pomarede, I. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 151, 210–215.