

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: CARACTERIZAÇÃO DO
GÊNERO, DOMESTICAÇÃO E IMPORTÂNCIA NA COMPOSIÇÃO DE VINHOS**

JULIANA DE FREITAS TEIXEIRA

BELO HORIZONTE

2015

JULIANA DE FREITAS TEIXEIRA

**A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: CARACTERIZAÇÃO DO
GÊNERO, DOMESTICAÇÃO E IMPORTÂNCIA NA COMPOSIÇÃO DE VINHOS**

Monografia apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Especialista em Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Dra. Raquel Miranda Cadete

BELO HORIZONTE

2015

Dedico este trabalho a meus pais Milton e Elaine, que são a razão, o apoio e o amor, sempre.

“Mas, quando vier o que é perfeito, então o que é imperfeito desaparecerá. Quando eu era criança, falava como criança, sentia como criança e pensava como criança. Agora que sou adulto, parei de agir como criança. O que agora vemos é como uma imagem imperfeita num espelho embaçado, mas depois veremos face a face. Agora o meu conhecimento é imperfeito, mas depois conhecerei perfeitamente, assim como sou conhecido por Deus. Portanto, agora existem estas três coisas: a fé, a esperança e o amor. Porém a maior delas é o amor.”

1 Coríntios 13:10-13

RESUMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal micro-organismo utilizado em processos industriais de fermentação alcoólica. A aplicação de linhagens de *S. cerevisiae* na produção de bebidas e alimentos fermentados acompanha a história do desenvolvimento cultural, tecnológico e científico da humanidade. Durante a fermentação do vinho, *S. cerevisiae* é responsável pela síntese de compostos aromáticos, como ésteres voláteis, ácidos orgânicos, alcoóis superiores, compostos carbonílicos e sulfurados, que determinam a constituição e as características organolépticas primordiais desta bebida e aderem complexidade às composições finais de sabor e aroma. Perfis aromáticos diversificados são originados a partir de métodos de produção específicos, sendo formados principalmente, pela transformação química do mosto da uva durante a fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*. O presente trabalho elucida características do gênero *Saccharomyces* bem como a ecologia de representantes desse gênero; discorre acerca do processo de domesticação de *S. cerevisiae* e das principais aplicações industriais de tal espécie; destaca a produção e os principais compostos aromáticos encontrados no vinho, e a influência de linhagens de *S. cerevisiae* em sua formação.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*, aroma, bebidas fermentadas, domesticação, vinho.

ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the main microorganism used in industrial alcoholic fermentation processes. The application of *S. cerevisiae* strains in the production of beverages and fermented foods accompanies the history of the development of the culture, technology and science of humanity. During the fermentation of wine, *S. cerevisiae* is responsible for the synthesis of aromatic compounds, such as volatile esters, organic acids, higher alcohols, carbonyl compounds and sulfur compounds, which determine the constitution and the primary organoleptic characteristics of this beverage, adding complexity to its final composition of flavor and aroma. Several aromatic profiles are sourced from specific production methods, being mainly originated due to chemical transformation of the grape must during alcoholic fermentation by *S. cerevisiae*. The present work elucidates the characteristics of the genus *Saccharomyces* as well as the ecology of its representatives; discusses about the domestication process of *S. cerevisiae* and the main industrial applications of this species; highlight the production and the major aromatic compounds found in wine, and the influence of *S. cerevisiae* strains in their generation.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, aroma, fermented beverages, domestication, wine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produtos gerais do metabolismo energético em leveduras Crabtree-positivas e Crabtree-negativas	14
Figura 2. Clado do complexo <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	15
Figura 3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , células individuais e como população.....	22
Figura 4. Comparação genômica de linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	24
Figura 5. Diagrama exibindo o tamanho relativo e cor da uva a intervalos de 10 dias após floração e principais eventos de desenvolvimento	30
Figura 6. Representação de alguns dos principais determinantes químicos de aromas e qualidade do vinho presentes na uva	31
Figura 7. Principais etapas na produção de vinho branco e vinho tinto	34
Figura 8. Representação esquemática da síntese dos principais grupos de aromas durante a fermentação por leveduras vínicas	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos aromáticos comumente encontrados no vinho.....	38
Tabela 2. Compostos derivados do enxofre, incluindo tióis, comumente encontrados no vinho.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVO	10
2.1	Objetivo geral.....	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	METODOLOGIA	11
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
4.1	O gênero <i>Saccharomyces</i> : caracterização, taxonomia e ecologia.....	12
4.2	Processo de domesticação e aplicações industriais e biotecnológicas de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em bebidas e alimentos fermentados	19
4.3	Vinho: caracterização e produção	28
4.4	Compostos aromáticos produzidos por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : influência na composição de vinhos	35
5	CONCLUSÃO	40
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, integrante do complexo *Saccharomyces sensu stricto*, é o principal micro-organismo utilizado na atualidade nos processos de fermentação alcoólica industriais de alimentos e bebidas (KURTZMAN, 2011; SICARD & LEGRAS, 2011; BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). Esta elegibilidade é justificada por um desenvolvimento evolucionário que resultou na adaptação de *S. cerevisiae* a diversos fatores de pressão seletiva, permitindo a esta levedura a ocupação de um lugar de importância histórica única, tanto econômica quanto cultural, e cunhando a denominação de organismo domesticado para essa espécie (LEGRAS *et al.*, 2007; SICARD & LEGRAS, 2011; LITI, 2015). O início da relação direta de *S. cerevisiae* com a humanidade se deu por meio de fermentações espontâneas, sendo que os registros mais antigos de relatos sobre o processo fermentativo datam de 7000 a.C na região da Ásia menor, Cáucaso e Mesopotâmia (PRETORIUS, 2000; SICARD & LEGRAS, 2011; STEENSELS & VERSTREPEN, 2014).

Apesar da utilização histórica de linhagens de *S. cerevisiae* na produção de bebidas e alimentos fermentados, apenas recentemente foram elucidadas características em relação à ecologia da espécie e sua localização em ambientes naturais, como a associação com cascas de determinadas árvores (carvalhos) e solo adjacente (JHONSON *et al.*, 2004; SAMPAIO & GONÇALVES, 2008; LITI *et al.*, 2009; LIBKIND *et al.*, 2011; HYMA & FAY, 2013; BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). Quanto à aplicação em processos tecnológicos, os conhecimentos científicos na área avançam desde a primeira observação microscópica de leveduras por Antonie van Leeuwenhoek em 1680 e nos estudos de Louis Pasteur que evidenciou conclusivamente, em 1858, o papel catalisador primário de leveduras na fermentação do vinho (PRETORIUS, 2000; LITI, 2015). Posteriormente nas décadas iniciais do século XX, o papel de *S. cerevisiae* na pesquisa foi fundamentado, e esta levedura passou a ser utilizada como organismo eucariótico modelo, uma vez constatadas a segurança na manipulação desse micro-organismo, bem como o rápido crescimento, fácil armazenamento e prática manipulação genética (CHAMBERS & PRETORIUS, 2010). De fato, a partir de um projeto colaborativo envolvendo 600 pesquisadores, *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucarioto a ter o genoma completo sequenciado (GOFFEAU *et al.*, 1996).

Um dos processos mais remotos e complexos da fermentação alcoólica é a produção do vinho. Tradicionalmente, o processo fermentativo para a obtenção dessa bebida inicia de maneira espontânea com a presença e crescimento de diversas espécies de leveduras e bactérias. Porém, invariavelmente, os estágios finais são dominados por linhagens de *S.*

cerevisiae em razão da alta seletividade do ambiente, no qual são encontradas elevadas concentrações de etanol e açúcares (HEARD & FLEET, 1985; PRETORIUS, 2000; MERICO *et al.*, 2007; DASHKO *et al.*, 2014; STEENSELS & VERSTREPEN, 2014). Adicionalmente, a importância de atuação da levedura durante a fermentação do vinho não se resume somente à produção de etanol, conferindo o teor alcoólico, mas também à modulação química e organoléptica do vinho a partir do metabolismo microbiano (FLEET, 2003; FRANCIS & NEWTON, 2005; STYGER; PRIOR & BAUER, 2011; CORDENTE *et al.*, 2012). Durante a utilização de nutrientes presentes no mosto da uva, compostos químicos aromáticos (ésteres etílicos, ésteres de acetato, alcoóis superiores, ácidos graxos voláteis, compostos carbonílicos) com características aromáticas e de sabor específicos são sintetizados como metabólitos secundários pela microbiota presente (CORDENTE *et al.*, 2012; MOURET *et al.*, 2014; NEDOVIĆ *et al.*, 2015).

Em consequência da atuação predominante de *S. cerevisiae* na fermentação, os avanços no campo de análises de produção de aromas por leveduras no vinho são voltados para esta espécie (HAZELWOOD *et al.*, 2008; SAERENS *et al.*, 2010; SUMBY *et al.*, 2010; CORDENTE *et al.*, 2012). A formação de aromas desejáveis no decorrer do processo de produção do vinho tornou-se um traço fenotípico desejável em linhagens domesticadas industriais (HYMA *et al.*, 2011). Perfis diversificados de aromas conferidos por inóculos de linhagens específicas podem ser identificados no produto final por profissionais treinados na produção do vinho, mas também pelos consumidores (KING *et al.*, 2010). Atualmente, o vinho é sinônimo, ao redor do mundo, do convívio social, entretenimento e arte, sendo produzidos mais de 26 bilhões de litros anualmente dessa bebida que desempenha um importante papel econômico. Devido à sofisticação e a demanda do mercado moderno de vinhos por produtos cada vez mais aprimorados em aroma e sabor, o desenvolvimento de técnicas e pesquisas no aprofundamento descritivo e melhoramento destas características e seus processos formadores são amplamente objetivados (PRETORIUS, 2000). Nesse contexto, o presente estudo faz um relato acerca dos compostos aromáticos produzidos por *S. cerevisiae* durante a fermentação alcoólica do mosto de uva, matéria-prima utilizada para a produção de vinhos, e o papel desempenhando por esses aromas na composição organoléptica desta bebida de elevado valor agregado e apreciada mundialmente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Revisar a produção literária existente com o intuito de caracterizar a produção de compostos aromáticos durante o processo de fermentação alcoólica do mosto de uva pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e sua importância na composição de vinhos.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever aspectos inerentes ao gênero *Saccharomyces* visando à caracterização geral das espécies que o compõem, elucidando a classificação taxonômica e a ecologia do gênero.
- Dissertar acerca do processo de domesticação de *S. cerevisiae* e as consequências desse processo em relação ao desenvolvimento biotecnológico e industrial que levaram à otimização da espécie na produção de bebidas e alimentos fermentados.
- Discorrer acerca da produção de vinhos e as classificações dessa bebida.
- Explanar em relação à produção de compostos aromáticos por *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação do mosto de uva, e a influência causada por esses compostos na constituição e características organolépticas do vinho.

3 METODOLOGIA

Esta monografia é descritiva, e utilizou como metodologia de composição o acesso à literatura corrente nas bases: Pubmed/NCBI, plataforma CAPES, Scielo, Science Direct, Elsevier e Scopus, durante os meses de outubro a dezembro de 2015. Palavras chave aplicadas na pesquisa: gênero *Saccharomyces*; *Saccharomyces*; *Saccharomyces cerevisiae*; yeast; fermented beverages; domestication; fermentation process; alcoholic fermentation; metabolism; Crabtree effect; hybridization; wine; aroma; wine flavor; wine production; wine fermentation; grape; berry ripening; volatile compounds.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 O gênero *Saccharomyces*: caracterização, taxonomia e ecologia

Leveduras do gênero *Saccharomyces*, descrito inicialmente por Reess em 1870, são classificadas como fungos ascomicetos pertencentes à ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae (KURTZMAN, 2011). São micro-organismos teleomorfos, sendo que em sua forma reprodutiva assexuada observa-se brotamento multilateral com a célula assumindo formatos diversificados tais como globoso, elipsoide ou cilíndrico, podendo haver formação de pseudohifas. O estado sexuado pode ser haplóide ou poliplóide, e a conjugação pode ocorrer entre linhagens sexuais complementares ou, mais comumente, células diplóides se fundem formando ascas, que contém usualmente quatro ascósporos globosos ou ovais e de parede lisa (VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, 2011). As leveduras deste gênero comumente apresentam fermentação vigorosa, não produzem compostos amiloides, não utilizam nitrato como fonte de nitrogênio (VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, 2011) e utilizam glicose como fonte preferencial de carbono e energia.

Em *Saccharomyces cerevisiae* (espécie tipo do gênero) os níveis de glicose controlam padrões metabólicos celulares, como a mudança de respiração para fermentação quando há alta disponibilidade do açúcar no meio, mesmo com a presença de oxigênio, resultando em produção de etanol, que confere vantagem competitiva em compensação ao rendimento máximo de ATP (adenosina trifosfato), muito maior na respiração (DE DEKEN, 1966; OTTERSTEDT *et al.*, 2004; MERICO *et al.*, 2007). Essa estratégia é utilizada por leveduras que consomem açúcares mais rapidamente do que outras espécies ou micro-organismos, produzindo elevadas concentrações de etanol o qual, por sua vez, atua como inibidor do crescimento microbiano, especialmente de bactérias. As leveduras que adotam tal estratégia fazem uso, então, das demais fontes de carbono presentes no meio, estabelecendo uma dominância competitiva no nicho em questão (DASHKO *et al.*, 2014). No momento em que a concentração extracelular de glicose excede aproximadamente 0,8 mM, *S. cerevisiae* assume um metabolismo respiro-fermentativo, produzindo etanol em condições aeróbicas (DE DEKEN, 1966; VERDUYN *et al.*, 1984). Este fenômeno é denominado efeito Crabtree *long-term*, e ocorre quando a taxa de diluição (ou seja, a captação de glicose) em culturas quimiostáticas em meio com disponibilidade limitada de glicose ultrapassa o limiar de $0,30 \text{ h}^{-1}$. Acima desse valor, a produção de acetato e piruvato passa a ocorrer, e esta é acompanhada de taxas desproporcionais no consumo de oxigênio e produção de gás carbônico, além da queda do rendimento celular (produção de biomassa) e acúmulo de etanol (POSTMA *et al.*,

1989; HAGMAN & PIŠKUR, 2015). No ambiente natural, baixas taxas de crescimento celular possuem um efeito negativo devido à competição com outras espécies de leveduras e bactérias. Porém, um fluxo glicolítico aumentado (desencadeado por uma captação de glicose mais elevada e rápida conversão da mesma a piruvato e produtos da fermentação) pode compensar o efeito Crabtree, no qual a biomassa diminui, pois a maior parte do açúcar estará sendo utilizada na produção de etanol que desempenha um papel de controle e diminuição da proliferação dos micro-organismos competitivos, balanceando as taxas de crescimento (Figura 1) (DASHKO *et al.*, 2014). Por outro lado, o efeito Crabtree *short-term* é desencadeado quando colônias com disponibilidade limitada de açúcar recebem de forma repentina um pulso de açúcar em excesso e necessitam, dessa forma, adaptar subitamente o metabolismo (DASHKO *et al.*, 2014; HAGMAN; SÄLL & PIŠKUR, 2014; HAGMAN & PIŠKUR, 2015). Considera-se que altos níveis de glicose resultam em uma elevada taxa glicolítica que ultrapassa a capacidade de reação da enzima piruvato desidrogenase, responsável por oxidar o piruvato em acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico, e gás carbônico, o que direciona então à produção de piruvato descarboxilase (enzima que catalisa a conversão de piruvato em acetaldeído) e consequentemente a produção de etanol (OTTERSTEDT *et al.*, 2004). O efeito Crabtree não ocorre apenas em *S. cerevisiae*, mas também em outras leveduras do gênero, como *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. uvarum* e *S. eubayanus* (HANGMAN & PIŠKUR, 2015), sendo estas leveduras denominadas, portanto, de Crabtree-positivas (SICARD & LEGRAS, 2011; DASHKO *et al.*, 2014; HANGMAN & PIŠKUR, 2015).

De acordo com Vaughan-Martin & Martini (2011) as espécies inclusas no gênero *Saccharomyces* são: *S. arboricolus*; *S. bayanus* (*S. bayanus* var. *bayanus* e *S. bayanus* var. *uvarum*); *S. cariocanus*; *S. cerevisiae*; *S. kudriavzevii*; *S. mikatae*; *S. paradoxus* e *S. pastorianus*. Estudos iniciais acerca da hibridização genética do gênero revelaram seis espécies reprodutíveis, apresentando diferentes combinações em vista da facilidade de cruzamento entre as mesmas. Observou-se que cruzamentos interespecíficos geravam híbridos estéreis que produziam ascósporos inviáveis, enquanto interações intraespecíficas resultavam em híbridos com alta reprodutibilidade com segregação normal e controle de marcadores auxotróficos. Esses resultados permitiram considerar que o complexo *Saccharomyces* (Figura 2) formou-se em decorrência de tais interações (NAUMOV *et al.*, 2000).

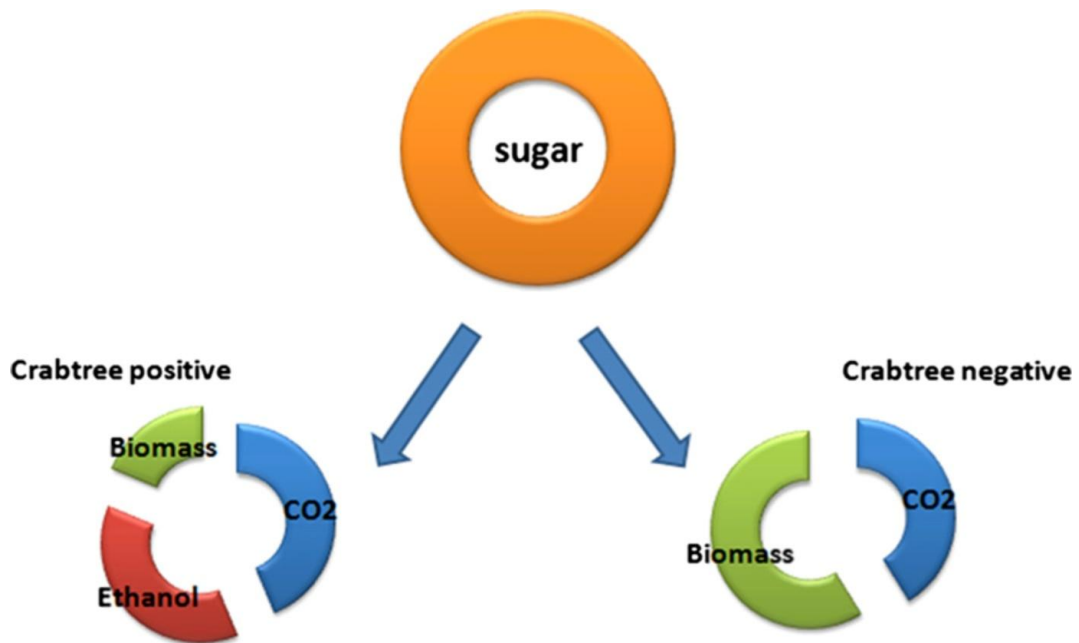


Figura 1. Produtos gerais do metabolismo energético em leveduras Crabtree-positivas e Crabtree-negativas. O efeito Crabtree resulta em uma diminuição da produção de biomassa devido ao direcionamento do metabolismo do organismo à conversão de açúcar em etanol, Nesse caso, uma quantidade maior de glicose tem de ser consumida para se alcançar o mesmo rendimento celular que leveduras Crabtree-negativas. Devido ao fato de somente uma parte do açúcar ser utilizada na produção de energia e biomassa, uma diminuição na taxa de crescimento em leveduras Crabtree-positivas pode ocorrer, e estas serem facilmente sobrepujadas por leveduras Crabtree-negativas e outros micro-organismos. Entretanto, o etanol produzido pelas leveduras Crabtree positivas serve como ferramenta para desacelerar e controlar a proliferação dos micro-organismos competitivos (DASHKO *et al.*, 2014).

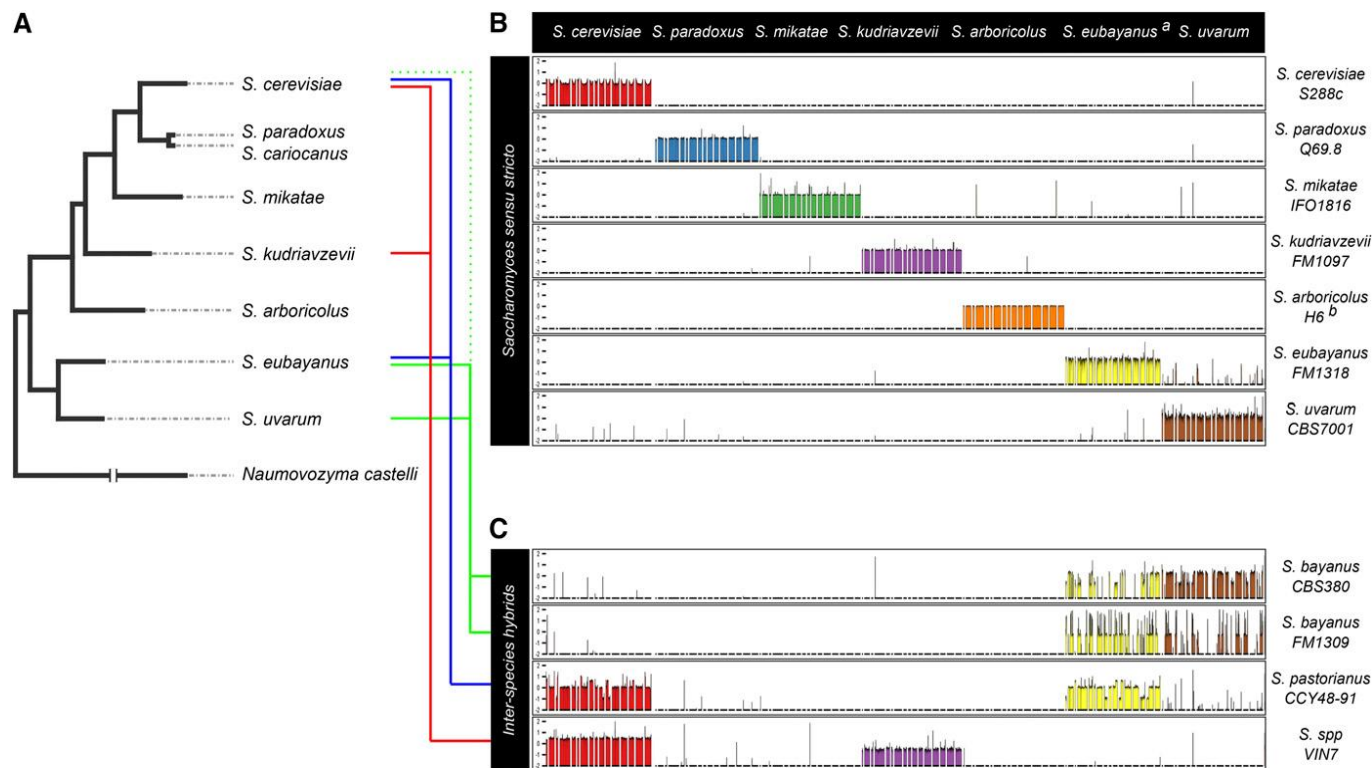


Figura 2. Clado do complexo *Saccharomyces sensu stricto*. (A) Representação esquemática da estrutura filogenética do complexo *Saccharomyces sensu stricto* e seus membros, com a espécie *Naumovozyma castelli* como grupo externo. (B) Representação genômica do clado, na qual dados de leitura de seqüências curtas obtidas a partir de linhagens individuais (indicadas à esquerda no gráfico) foram alinhados a uma seqüência de referência comum, disposta de forma ordenada, para cada uma das espécies do complexo *Saccharomyces* (listadas no topo e à direita do gráfico). (C) Representação genômica de híbridos interespecíficos do complexo *Saccharomyces*: *S. bayanus*, *S. pastorianus* e Vin7 (híbrido entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*) (BORNEMAN & PRETORIUS, 2015).

Os membros do complexo *Saccharomyces sensu stricto* são espécies de importância industrial e laboratorial, estando relacionadas à produção de bebidas alcoólicas e panificação (SICARD & LEGRAS, 2011). Tais leveduras são encontradas em ambientes geográficos delimitados e específicos, são facilmente reproduzidas em laboratório e apresentam tempo de geração curto e genoma de pequena extensão, características que definem um modelo adequado para estudos evolucionários e genômicos (SICARD & LEGRAS, 2011; BORNEMAN & PRETORIUS, 2015).

Análises posteriores do gênero propuseram duas novas espécies, *Saccharomyces uvarum*, espécie criotolerante fermentadora de vinho (NGUYEN & GAILLARDIN, 2005) e *Saccharomyces eubayanus*, assim denominada devido à similaridade genética em relação a *S. bayanus*, desconsiderando-se, então, a classificação anterior de *S. bayanus* por variedades (LIBKIND *et al.*, 2011). Além disso, por meio de análise genômica sequencial, sugeriu-se que *S. bayanus* seria um híbrido complexo entre *S. eubayanus*, *S. uvarum* e *S. cerevisiae*, restrito a ambientes fermentadores, possuindo contribuição genômica equivalente vinda de *S. eubayanus* e *S. uvarum*, porém menor em relação à *S. cerevisiae* (70–80 kb). A principal consequência fenotípica dessa hibridização é observada pela habilidade de *S. bayanus* metabolizar maltose e maltotriose, fenótipo ausente em *S. uvarum* (LIBKIND *et al.*, 2011; BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). Já *S. pastorianus* foi revelado como híbrido de *S. cerevisiae* e *S. eubayanus* por meio de análise genômica sequencial (LIBKIND *et al.*, 2011).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são amplamente dispersas, sendo encontradas desde ambientes industriais a nichos geográficos bem delimitados (BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). Apesar de sua importância no desenvolvimento tecnológico de processos fermentativos e como modelo em estudos científicos, pouco se sabe acerca de sua história natural, ecologia, processos genômicos e evolução, fatores essenciais para a compreensão da biologia destes micro-organismos. Entretanto, nas últimas décadas, pesquisas nessas áreas têm experimentado um crescimento, expandindo, assim, as possibilidades de investigação em relação a este gênero (LITI, 2015; BORNEMAN & PRETORIUS, 2015).

A evolução das leveduras do gênero *Saccharomyces* mostra uma relação direta de cada espécie com o ambiente natural; populações que coexistem no mesmo habitat desenvolvem convergência fenotípica, enquanto a competição entre espécies e linhagens de nichos diferentes é observada com raridade ou de forma instável. Essas interações definem traços metabólicos e estratégias de sobrevivência, apresentando como fator

determinante a diferente utilização e disponibilidade de recursos em cada ambiente (LITI *et al.*, 2009; SPOR *et al.*, 2009). Em meio aos fatores extrínsecos (como concentração de oxigênio, fontes de carboidrato e pH), a temperatura é um fator determinante, pois influencia diretamente no crescimento dos micro-organismos, está intimamente relacionada ao processo de evolução, interfere ativamente no desempenho industrial, regulando a velocidade de fermentação, dentre outros aspectos, e define a distribuição natural das espécies no ambiente. Análises filogenéticas apontam eventos no desenvolvimento evolucionário que marcam a adaptação e o favorecimento de determinadas espécies ao crescimento em temperaturas mais altas ou mais baixas. No gênero *Saccharomyces*, a espécie *S. cerevisiae* apresenta a maior termotolerância dentre as demais espécies, com temperatura ótima de crescimento a 32,3°C, e temperatura máxima de 45,4°C. Sugere-se que a temperatura tenha um importante papel na predominância de *S. cerevisiae* como fermentadora em detrimento de outras espécies não-*Saccharomyces*. Em contrapartida, *S. kudriavzevii* é uma espécie que apresenta crescimento ótimo em menores temperaturas, com temperatura ótima de crescimento a 23,6°C e máxima de 36,8°C (SALVADÓ, *et al.*, 2011).

Saccharomyces cerevisiae é a espécie de maior eminência no gênero por sua relação de destaque nas atividades humanas que envolvem o processo de fermentação (BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). Liti e colaboradores (2009) em um estudo realizado com 70 isolados de leveduras originados de diversos ambientes (linhagens obtidas em laboratório, panificação, vinho, deterioração de alimentos, fermentação natural, sakê, probióticos e plantas), identificaram por meio de sequenciamento genômico as espécies *S. paradoxus* e *S. cerevisiae*, a primeira relacionada a populações bem delineadas geograficamente, isolada em sua maioria de cascas de espécies de carvalho, e a segunda apresentando ampla variação fenotípica, porém, pouca diferenciação quando comparada à *S. paradoxus*. Neste estudo, a população de *S. cerevisiae* foi definida em dois grupos, um contendo linhagens “puras” geograficamente delimitadas (América do Norte, África e Malásia) e o outro contendo linhagens relacionadas à produção de vinho na Europa, produção de sakê e recombinantes dessas linhagens “puras”. A alta variação fenotípica de *S. cerevisiae* sugere que esta habita uma maior diversidade de nichos ecológicos, o que implica em maiores chances de recombinação e formação de híbridos, variação esta que, portanto, revela evidências do processo de seleção natural (LITI *et al.*, 2009; LIBKIND *et al.*, 2011).

A espécie mais próxima filogeneticamente à *S. cerevisiae* é *S. paradoxus*; contudo, apesar dessa relação, *S. paradoxus* não apresenta associação a processos industriais, sendo considerada uma espécie selvagem, encontrada em ambientes naturais como cascas de árvores, exsudatos e no solo ao redor de árvores do gênero *Quercus*, um tipo de carvalho (JHONSON *et al.*, 2004; BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). De fato, encontra-se descrito em diversos trabalhos o isolamento de leveduras do gênero *Saccharomyces* de materiais associados a cascas de carvalho (JHONSON *et al.*, 2004; SAMPAIO & GONÇALVES, 2008; LITI *et al.*, 2009; LIBKIND *et al.*, 2011; HYMA & FAY, 2013). Nesse contexto, foi proposto que este substrato seria o nicho ecológico original de leveduras *Saccharomyces*, enquanto ambientes ricos em açúcar, como flores e frutas em decomposição corresponderiam a um habitat secundário, já que apresentam ocorrência sazonal (SAMPALIO & GONÇALVES, 2008). Porém, ainda não se encontra esclarecido se cascas de carvalho são o habitat primário das leveduras selvagens ou se essa associação se deve a uma amostragem tendenciosa (KOWALLIK; MILLER & GREIG, 2015).

Saccharomyces pastorianus é uma levedura criotolerante encontrada em ambientes de fermentação de bebidas, como cervejas e vinhos, sendo que não existem relatos do isolamento desta espécie a partir de ambientes naturais, e a mesma depende, assim, de atividades humanas para a propagação (LIBKIND *et al.*, 2011). Já *S. mikatae* e *S. kudriavzevii* foram isoladas pela primeira vez no Japão a partir de folhas em decomposição, e *S. cariocanus* de moscas do gênero *Drosophila* no Brasil (NAUMOV *et al.*, 2000). O estudo de Sampaio e Gonçalves (2008) relata o isolamento, a partir de cascas de carvalho, de *S. kudriavzevii* e *S. uvarum* a uma temperatura de 10°C (espécies caracterizadas como criotolerantes), e *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* à temperatura de 30°C (espécies termotolerantes). Constatou-se que mais de uma das quatro espécies isoladas foram encontradas em uma mesma amostra, mostrando diferentes preferências na temperatura de crescimento, fator este determinante para a ocorrência de simpatria entre as espécies. A variação circadiana (isto é, um período de 24 horas no qual ocorrem alterações ambientais de luz, temperatura, ventos e umidade no decorrer do dia e da noite) da temperatura permite que duas espécies em associação simpátrica se desenvolvam no mesmo habitat, com a espécie mais adaptada a altas temperaturas possuindo um melhor desempenho nos períodos mais quentes do dia, sendo válido o inverso para as espécies adaptadas a baixas temperaturas (SAMPALIO & GONÇALVES, 2008; SALVADÓ *et al.*, 2011).

Saccharomyces arboricolus é a espécie do gênero de identificação mais recente, relatada como isolada de cascas de árvores da espécie *Quercus fabri* coletadas de diferentes regiões da China (WANG & BAY, 2008; NAUMOV; NAUMOVA & MASNEUF-POMARÈDE, 2010). As espécies *S. eubayanus* e *S. uvarum*, consideradas espécies “irmãs”, já foram isoladas de cascas de árvores do gênero *Nothofagus* e no solo em florestas da Patagônia argentina, onde ocorrem em simpatria, mas estão isoladas geneticamente por barreiras pós-zigóticas e ecologicamente por preferências de hospedeiro (*S. eubayanus* associada a *N. antarctica* e *N. pumilio*, e *S. uvarum* a *N. dombeyi*). *Saccharomyces uvarum* e *S. eubayanus* são criotolerantes e também podem ser encontradas durante o processo de fermentação de bebidas, como vinho e cervejas do tipo *lager*, ambientes aos quais também está associada a levedura *S. bayanus*. A partir dessas ocorrências, acredita-se que tenha surgido a relação de hibridização complexa com a contribuição de alelos de *S. eubayanus* e *S. uvarum* e alguns genes de *S. cerevisiae* ao genoma que deu origem a *S. bayanus*, espécie somente encontrada em ambientes de fermentação associados ao homem (LIBKIND *et al.*, 2011).

4.2 Processo de domesticação e aplicações industriais e biotecnológicas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em bebidas e alimentos fermentados

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm sido utilizada por milhares de anos pela humanidade em processos de produção de alimentos e bebidas devido à sua capacidade fermentativa vigorosa, o que a torna um micro-organismo de grande importância econômica e cultural (LEGRAS *et al.*, 2007; SICARD & LEGRAS, 2011; LITI, 2015). Pouco se sabe em relação ao desenvolvimento da transição e adaptação das linhagens selvagens “iniciais” de *S. cerevisiae* em linhagens de aplicação otimizadas para tecnologias humanas (LITI *et al.*, 2009; LIBKIND *et al.*, 2011; SICARD & LEGRAS, 2011). Tais linhagens provêm de um decurso ancestral, e foram possivelmente originadas na região da Mesopotâmia tendo expandido, a partir dessa localidade, pelo mundo (LEGRAS *et al.*, 2007). Acredita-se que na era Neolítica (7000 a.C.) a fermentação era conduzida por meio da ocorrência natural das leveduras no substrato/ambiente (matéria-prima, ferramentas, vetorizadas por insetos), ocorrendo uma provável troca e interação de leveduras entre diferentes processos fermentativos, como de alimentos para bebidas. Não se tem conhecimento acerca de quando foi iniciada a prática da utilização consciente de leveduras (ou seja, do fermento) na fabricação de bebidas e alimentos (SICARD & LEGRAS, 2011; STEENSELS &

VERSTREPEN, 2014). Acredita-se que alguns produtores notaram um aumento na velocidade, qualidade e consistência do produto desejado ao inocular no processo de fermentação uma pequena quantidade de um produto fermentado já finalizado. Porém, somente no final do século dezenove que este hábito foi gradualmente substituído por culturas selecionadas contendo uma única linhagem ou algumas linhagens combinadas (STEENSELS & VERSTREPEN, 2014).

A determinação das linhagens selvagens “originais” de *S. cerevisiae* apresenta-se como um desafio, já que existem dúvidas quanto à existência de tais linhagens e o processo evolucionário que resultou nas linhagens atuais data de séculos (LITI, *et al.*, 2009). A variabilidade desses organismos é atribuída a amplas correlações filogenéticas globais, com interações populacionais de espécies provindas de ambientes fermentativos diversos (cerveja, vinho, sakê, panificação), muito provavelmente carregadas pela ação humana, além de ambientes naturais (LITI *et al.*, 2009; SICARD & LEGRAS, 2011; LITI, 2015). Estudos populacionais podem auxiliar uma melhor compreensão desse processo ao analisarem isolados selvagens e relacionados às atividades humanas, revelando o impacto evolucionário da intervenção do homem em *S. cerevisiae* (LITI, 2015). No estudo realizado por Fay e Benavides (2005), isolados de *S. cerevisiae* de processos e substratos variados, como fermentações induzidas (vinho e sakê) e naturais (frutas em decomposição), exudatos de árvores e pacientes imunocomprometidos, foram submetidos à análise de diversidade de sequências de DNA. Pôde-se observar que as linhagens fermentadoras de vinhos e de sakê formaram dois grupos distintos, apresentando baixa diversidade dentre as linhagens, condizente com o fato de serem domesticadas. A divergência entre os grupos aparenta ter ocorrido anteriormente ao processo de domesticação, mantendo-os separados por um considerável período de tempo (11900 anos atrás, calculados com base na taxa de mutação, sugerindo ao menos dois eventos de domesticação, um ocorrido após a divergência – duplicação total do genoma – e outro no momento de diferenciação das linhagens vínicas e das linhagens de sakê). A análise dos isolados sugere que a espécie *S. cerevisiae* é constituída por populações tanto domesticadas como selvagens (FAY & BENAVIDES, 2005).

As linhagens de *S. cerevisiae* aplicadas milenarmente em usos tecnológicos humanos são denominadas linhagens “domesticadas” (LIBKIND *et al.*, 2011). A domesticação é definida como um processo de modificação genética de uma espécie selvagem para a criação de uma linhagem alterada, apta a atender necessidades humanas (DOEBLEY; GAUT & SMITH, 2006). Em 1857, Louis Pasteur, impelido pela

utilização intensa e bem estabelecida de leveduras na produção de vinhos e cervejas, constatou o papel essencial de *S. cerevisiae* na fermentação alcoólica (LITI, 2015). Na década de 1930, a pesquisa de híbridos com características genéticas desejáveis para a produção de cerveja por Ojvind Winge resultou nos experimentos iniciais em relação à genética de leveduras (BARNETT, 2007). Atualmente, para definição e delineamento padrão nas pesquisas com *S. cerevisiae*, implementou-se a utilização da linhagem isolada de referência S288c (Figura 3A), ou de linhagens derivadas a partir da mesma (LITI, 2015). Obtida pelo cruzamento de várias linhagens parentais, S288c detém 88% do *poll* genético atribuído à linhagem EM93, isolada em 1938 a partir de figos em decomposição por Emil Mrak no estado da Califórnia, Estados Unidos (MORTIMER & JOHNSTON, 1986). Esta linhagem apresenta a característica de manter um estado haplóide estável, o que facilita o estudo de alterações geradas por mutações (ENGEL *et al.*, 2014; LITI, 2015). Posteriormente, Goffeau e colaboradores (1996) foram os responsáveis por finalizar o sequenciamento da linhagem S288c, que foi o primeiro organismo eucarioto a ser completamente sequenciado.

Uma das características que culminou no processo de domesticação de *S. cerevisiae* foi a seleção de diferentes linhagens com melhor desempenho na fermentação de produtos específicos, já que a composição química do substrato varia de acordo com o tipo de matéria-prima utilizada, como vinho (uva) e sakê (arroz), por exemplo (LITI, 2015). Devido ao fato de espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces*, especialmente *S. cerevisiae*, dominarem os processos de fermentações espontâneas, tais leveduras foram inicialmente selecionadas para a utilização na maioria das fermentações controladas (STEENSELS & VERSTREPEN, 2014). Diversas características desejáveis à fermentação alcoólica evidenciam a predominância de *S. cerevisiae* nesse processo: rápida conversão de açúcares a etanol em condições aeróbicas e anaeróbicas (DASHKO *et al.*, 2014); produção de elevadas concentrações de etanol, que além de contribuir com a dominância da levedura durante todo o processo por ser tóxico aos demais micro-organismos, protege as bebidas contra a deterioração microbiana (STEENSELS & VERSTREPEN, 2014); tolerância a altos níveis de etanol (DASHKO *et al.*, 2014); repressão da respiração pela glicose (efeito Crabtree) permitindo que a fermentação ocorra mesmo na presença de oxigênio (MERICCO *et al.*, 2007; DASHKO *et al.*, 2014; STEENSELS & VERSTREPEN, 2014); desenvolvimento da estratégia “produção-acúmulo-consumo”, na qual após a total utilização da glicose para produção de etanol, o metabolismo Crabtree-positivo muda (na presença de

oxigênio) para o metabolismo de respiração, e o etanol acumulado torna-se substrato, passando a ser degradado (THOMSON *et al.*, 2005; SICARD & LEGRAS, 2011; STEENSELS & VERSTREPEN, 2014); crescimento adaptado à elevadas temperaturas (SALVADÓ *et al.*, 2011); e tolerância à pressão osmótica, estresse resultante das altas concentrações de açúcar no início da fermentação (TAO *et al.*, 2012; ZHENG & WANG, 2015). Essas características podem ser observadas individualmente em outras leveduras, porém, somente *S. cerevisiae* e espécies próximas, as apresentam de maneira combinada e harmonizada (STEENSELS & VERSTREPEN, 2014).

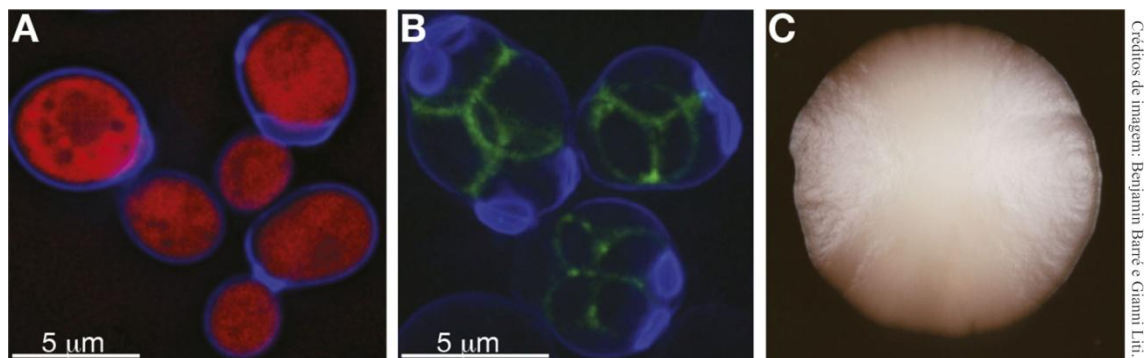


Figura 3. *Saccharomyces cerevisiae*: células individuais e como população. (A) Células em brotamento da linhagem referência de *S. cerevisiae* S288c, expressando RFP (*red fluorescent protein*), que marca o citoplasma da célula. As células também foram coradas com *calcofluor-white*, que cora as paredes externas das células em azul. (B) Células em processo de esporulação da linhagem YPS606, uma linhagem de *S. cerevisiae* isolada de carvalho norte americano, coradas com *calcofluor-white*, nas quais a proteína SPS2 foi marcada com GFP (*green fluorescent protein*), que cora a parede dos ascósporos em verde. (C) Colônia clonal com tamanho populacional de aproximadamente 7×10^6 células, derivada de uma única colônia isolada de *S. cerevisiae* em meio ágar sólido. Tal formato em colônia nunca foi observado em ambiente natural (LITI, 2015).

Diversos estudos abordam as bases genéticas que estruturam as características apresentadas por *S. cerevisiae* que o tornam o micro-organismo de escolha para processos fermentativos, na tentativa de elucidar a via evolucionária que culminou nas linhagens de fermentação especializadas atuais (STEENSELS & VERSTREPEN, 2014). Sugere-se que há menos de 100 milhões de anos atrás ocorreu um processo evolucionário no qual espécies intimamente relacionadas divergiram após uma duplicação total do genoma (SICARD & LEGRAS, 2011; DASHKO *et al.*, 2014; HAGMAN & PIŠKUR, 2015). Pode-se evidenciar, pela observação em diversas

linhagens de *S. cerevisiae* especialmente linhagens de origem na panificação e produção de cerveja, a exibição de quatro alelos em vários *loci*, sugerindo uma parcial (aneuploidização) ou total (poliploidização) duplicação do genoma durante a domesticação dessa espécie (SICARD & LEGRAS, 2011). Em geral, os *loci* linhagem-específicos residem em regiões subteloméricas do genoma, localização esta que aparenta ser o epicentro da diversidade genética devido à presença do grande número de repetições subteloméricas que atuam como origens de integração, duplicação e perda de segmentos genômicos entre linhagens (BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). A duplicação de vários genes determinantes, como os que codificam a enzima álcool desidrogenase, transportadores de hexoses e enzimas ligadas à glicólise, após a duplicação total do genoma, possivelmente contribuíram na adequação de *S. cerevisiae* como condutora dos processos de fermentação industriais (STEENSELS & VERSTREPEN, 2014). Esses eventos incomuns de alteração do genoma refletem a influência invasiva da atividade humana por meio da imposição de forças de pressão seletiva, desenvolvidas durante a fermentação industrial (BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). Três principais *loci* definem classes específicas de linhagens de leveduras industriais: RTM1; BIO1 e BIO6; e uma sequência circular indeterminada de cinco genes específicos de linhagens vínicas (Figura 4) (BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). O grupo de genes RTM1 é encontrado predominantemente em linhagens fermentadoras de cerveja, e também no grupo circular presente nas linhagens vínicas. Associado à utilização de sacarose, confere à linhagens de destilação empregadas na produção de álcool resistência a compostos inibitórios presentes no melaço (NESS & AIGLE, 1995; BORNEMAN & PRETORIUS, 2015). Os genes BIO1 e BIO6 são fases de leitura aberta que codificam enzimas responsáveis por conferir a capacidade de síntese da biotina, uma vitamina essencial, e estão presentes em linhagens fermentadoras de sakê (WU; ITO & SHIMOI, 2005; HALL & DIETRICH, 2007).

Dentre os processos associados a fermentações industriais, a panificação é um dos que mais progride em busca de melhorias na manufaturação por meio de avanços em análises e estudos de leveduras selecionadas. O pão é um dos produtos mais consumidos mundialmente, tendo adquirido grande importância econômica conforme o sobressaimento da produção comercial à caseira no início do século XX (GÉLINAS, 2010; GÉLINAS, 2012; BEKATOROU; PSARIANOS & KOUTINAS, 2006). As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são consideradas ingredientes essenciais na panificação, e estima-se que em todo o mundo sejam produzidas anualmente em torno

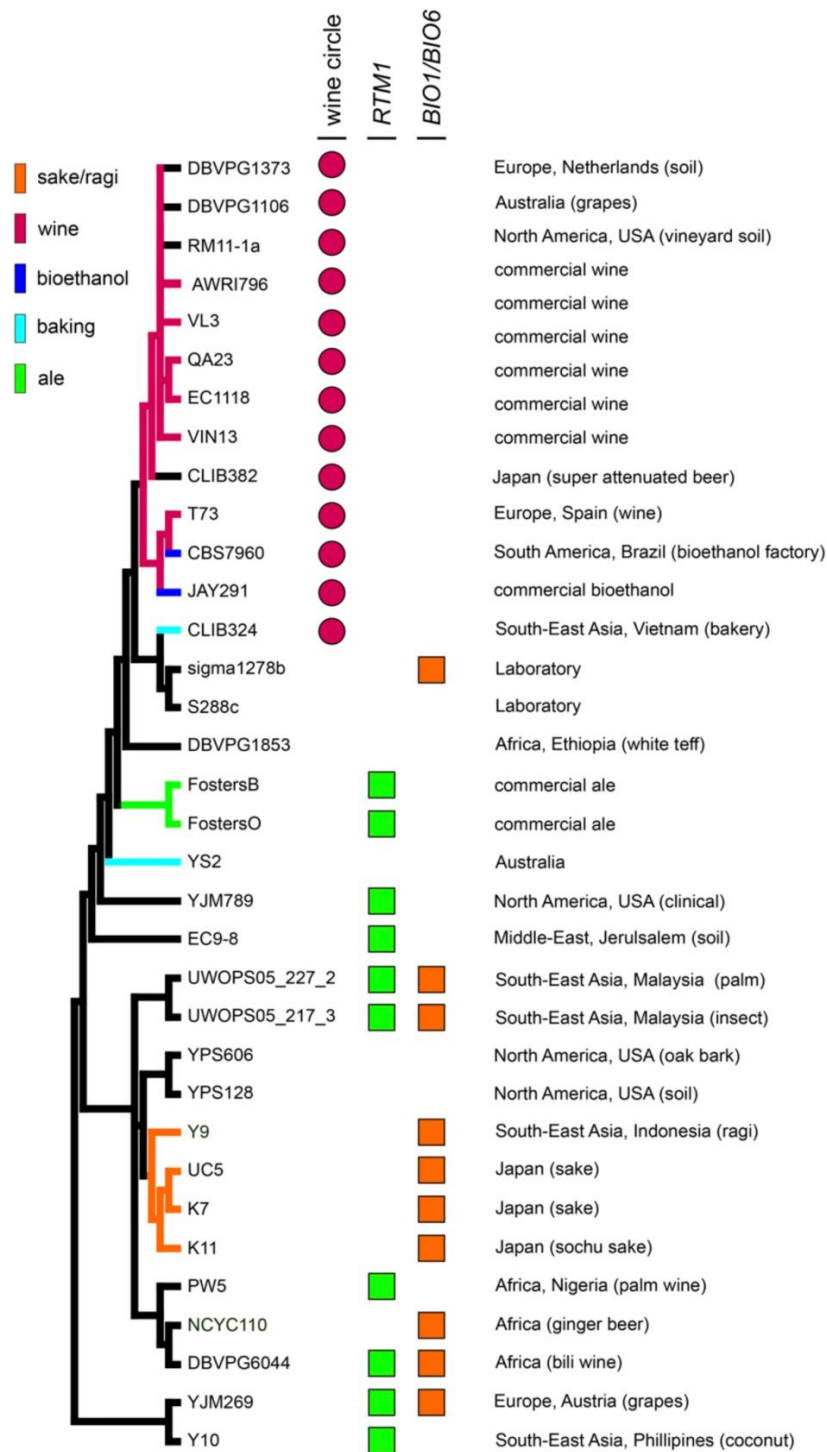


Figura 4. Comparação genômica de linhagens de *S. cerevisiae*. Filogenia de máxima verossimilhança, construída a partir de uma variedade de linhagens de *S. cerevisiae* que possuem os dados de sequenciamento integral do genoma disponíveis. Ramificações envolvendo linhagens industriais estão marcadas de acordo com seu uso documentado (sakê/ragi, vinho a base de uva, bioetanol, panificação ou produção de cerveja tipo ale). Também é indicada para cada linhagem a presença de três *loci* genômicos linhagem-específicos (círculo do vinho, grupo RTM1, e BIO1/BIO6), e os substratos e locais de isolamento (BORNEMAN & PRETORIUS, 2015).

de 2 milhões de toneladas (com base em 30% do peso seco) de leveduras para panificação (SHIMA & TAKAGI, 2009). Dentre as características apresentadas por estas linhagens, são desejáveis um rápido crescimento, uma rápida utilização de açúcares (sacarose e maltose), alto rendimento de biomassa em meio com elevadas concentrações de açúcares, e produção de altas taxas de gás carbônico, o que proporciona porosidade e volume ao pão durante a fermentação da massa (BEKATOROU; PSARIANOS & KOUTINAS, 2006). Porém, além destas características ótimas de produção, deve-se considerar o estresse gerado durante o processo de panificação e a resposta imediata de *S. cerevisiae*. As células de *S. cerevisiae* ficam expostas a várias fontes de estresse associadas ao ambiente de panificação como congelamento e descongelamento, dessecação e estresse oxidativo, que podem causar sérios danos à estrutura celular, levando à inibição do crescimento, diminuição da viabilidade da levedura e decréscimo na fermentação. Para evitar esses danos, a célula pode desenvolver mecanismos de tolerância como a produção de proteínas e moléculas protetoras, como por exemplo, trealose, prolina e glicerol (SHIMA & TAKAGI, 2009; ASLANKOOHI *et al.*, 2015). O processo de fermentação pela levedura também leva à produção e atividade de metabólitos secundários, resultando na liberação de compostos orgânicos voláteis que conferem aroma ao produto final (CHO & PETERSON, 2010; MAKHOUL *et al.*, 2015).

Saccharomyces cerevisiae também é a principal levedura utilizada na produção de cerveja e outras bebidas, como sakê, cidra, hidromel e destilados. Esta utilização está relacionada à capacidade desta espécie em converter rapidamente glicose e outras hexoses em etanol, e também tolerar as elevadas concentrações de etanol produzidas (LEGRAS *et al.*, 2007; TAMANG & FLEET, 2009; SICARD & LEGRAS, 2011; IGLESIAS *et al.*, 2014). A cerveja é uma bebida alcoólica (2–8% de concentração de álcool) fermentada a partir do extrato de grãos cereais maltados, principalmente a cevada. Apresenta sabor distinto originado dos constituintes do malte, do lúpulo e dos produtos do metabolismo de leveduras (TAMANG & FLEET, 2009). Existem também vários tipos de cerveja, como *ale*, *lager*, *stout* e *pilsner*, que são classificados de acordo com a temperatura de fermentação e a matéria-prima utilizada (MILANI; GARDNER & SILVA, 2015). Características importantes de linhagens fermentadoras empregadas na produção de cerveja incluem a floculação, que permite a sedimentação da levedura e remoção da biomassa para clarificação do produto, alto desempenho fermentativo,

produção de glicerol e formação de compostos aromáticos (DEQUIN, 2001; TAMANG & FLEET, 2009).

Dentre as bebidas destiladas encontra-se a cachaça, segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil. Originada a partir da fermentação do mosto de cana de açúcar, a cachaça possui teor alcoólico de 38-48% a 20°C e é fabricada por aproximadamente 30 mil produtores no país em um volume anual de cerca de 1,3 bilhões de litros (CAMPOS *et al.*, 2010). A cachaça apresenta altos níveis de alcoóis, ésteres etílicos, aldeídos e ácidos orgânicos que são responsáveis pelos sabores distintos da bebida fermentada final (CARDOSO *et al.*, 2004). O processo de fermentação do caldo da cana de açúcar tem início espontaneamente, a partir de leveduras encontradas na matéria-prima, ou por meio do preparo de uma cultura iniciadora de forma empírica e sem padronização, conhecida como “fermento caipira”, ou ainda utilizando-se linhagens comerciais voltadas para panificação (SCHWAN *et al.*, 2001; BADOTTI *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2010). Devido à utilização popularizada do inóculo caseiro, cada região e unidades produtoras de cachaça possuem variações no rendimento e qualidade do produto final (CAMPOS *et al.*, 2010). Estudos mostram que a espécie prevalente na fermentação da cachaça é *S. cerevisiae* cuja população aumenta a cada ciclo de fermentação, conseqüentemente culminando na dominância da espécie no processo (PATARO *et al.*, 2000; GUERRA *et al.*, 2001; SCHWAN *et al.*, 2001; BADOTTI *et al.*, 2010). A cada ciclo de fermentação é adicionado caldo de cana de açúcar fresco à dorna de fermentação, mantendo-se a concentração de açúcar elevada, e durante a fase inicial do ciclo a atividade de multiplicação dos micro-organismos leva à acidificação e ao aumento da concentração de álcool do mosto de cana (MORAIS *et al.*, 1997; BADOTTI *et al.*, 2010). Estas características do meio oscilam durante os ciclos de fermentação e agem selecionando leveduras resistentes ao estresse, levando ao desaparecimento de espécies afetadas pela variação das condições estressantes, o que justifica, adicionalmente, a variabilidade das características fisiológicas encontrada entre as linhagens fermentadoras de cachaça de diferentes regiões (BADOTTI *et al.*, 2010).

O sakê, bebida alcoólica fermentada tradicional japonesa, tem como matéria prima o arroz e teor alcoólico de aproximadamente 15%. Uma vez que o arroz é composto por amido (amilose e amilopectina) e *S. cerevisiae* fermenta somente açúcares simples como a glicose, faz-se necessária inicialmente a presença de outros micro-organismos, como *Aspergillus oryzae* e bactérias ácido-láticas, para a sacarificação do

amido. Esse processo ocorre por meio da produção de enzimas - glicoamilases e α -amilases - por exemplo, que degradam o amido em glicose e oligossacarídeos, permitindo assim a fermentação por *S. cerevisiae* e a produção de etanol (KITAGAKI & KITAMOTO, 2013). Existe interesse na obtenção de linhagens fermentadoras de sakê que produzam etil caproato e isoamil acetato, compostos que conferem aromas frutados similares à maçã e banana, e não produtoras de ureia, responsável pela formação de etil carbamato, um potencial carcinógeno (KITAGAKI & KITAMOTO, 2013; SHIROMA *et al.*, 2014).

Além da cerveja e das demais bebidas supramencionadas, *S. cerevisiae* se destaca como levedura dominante na fermentação do vinho, bebida de relevância na história da humanidade por possuir importante valor cultural e socioeconômico, influenciando os campos da arte, economia e religião. O vinho encontra-se associado a aspectos geográficos e arqueológicos, fazendo-se presente na mitologia e antigas tradições humanas, tendo sido amplamente utilizado em práticas médicas na antiguidade como analgésico e desinfetante (MARSIT & DEQUIN, 2015). Atualmente, estudos tem comprovado sua ação benéfica à saúde quando em uso moderado, reduzindo os riscos, por exemplo, de doença cardíaca coronariana, aterosclerose e danos ao envelhecimento celular (ALANÓN; PÉREZ-COELLO & MARINA, 2015). Participam do processo de fermentação do mosto da uva diversas espécies de leveduras, bactérias e fungos filamentosos originados de comunidades microbianas presentes na uva e no ambiente de produção. Estas espécies não-*Saccharomyces* são responsáveis por iniciar a fermentação alcoólica espontânea do mosto da uva, porém, em um curto período de tempo, o crescimento de *S. cerevisiae* ultrapassa o das demais espécies e domina o processo (FLEET, 2008). Esse fenômeno reflete diversos fatores atribuídos a espécies não-*Saccharomyces*, como baixa capacidade fermentativa, baixa tolerância à limitação de oxigênio e à elevadas concentrações de SO₂ e etanol (MARSIT & DEQUIN, 2015). A utilização de culturas de *S. cerevisiae* iniciadoras oprime o crescimento de espécies não-*Saccharomyces*, uma prática favorável ao processo de produção devido ao fato da biomassa formada pelas espécies não-*Saccharomyces* no início da fermentação alterar a composição química final do vinho (FLEET, 2008), o conceito de inoculação de culturas puras de leveduras, com características selecionadas e melhoradas na fermentação do vinho foi introduzido por Müller-Thurgau em 1890 (PRETORIUS, 2000).

4.3 Vinho: caracterização e produção

O vinho é uma matriz complexa, formada por moléculas de composição variada em diferentes concentrações, como proteínas, aminoácidos, carboidratos, compostos fenólicos, componentes voláteis e compostos inorgânicos. A composição química é influenciada por diversos fatores incluindo variedades de uva, clima, práticas de viticultura, localização geográfica, colheita, linhagens de leveduras e o processo de fermentação (ALANÓN; PÉREZ-COELLO & MARINA, 2015). Este conjunto de características encontradas em um ecossistema e influenciado pela cultura e tradições locais na produção do vinho é denominado *terroir*, e confere qualidades únicas a vinhos produzidos em diferentes regiões (LEEUWEN *et al.*, 2004; ALANÓN; PÉREZ-COELLO & MARINA, 2015).

Dentre os constituintes dos vinho, os polifenóis encontrados na casca, semente e polpa da uva determinam características organolépticas importantes, sendo os principais responsáveis pela diferença entre vinhos tintos e brancos por definirem a cor, amargor e paladar adstringente dessas bebidas (IVANOVA *et al.*, 2011b; IVANOVA-PETROPULOS *et al.*, 2015). Os polifenóis são divididos em dois grupos, flavonoides (antocianinas, flavan-3-óis, flavonóis e dihidroflavonóis) e não-flavonoides (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos e derivados, estilbenos e fenóis voláteis) (IVANOVA *et al.*, 2011a). No vinho, flavan-3-óis (como as catequinas) originam as proantocianidinas, ou taninos condensados, que são responsáveis por conferir adstringência quando na forma de oligômeros e polímeros, e amargor quando encontrados na forma de monômeros. As antocianinas são responsáveis pela formação de pigmentos, contribuindo para a estabilidade e definição da cor vermelha no vinho tinto. As principais antocianinas em vinhos produzidos por variedades da espécie de uva *Vitis vinifera* (espécie mais utilizada na produção de vinhos) são 3-O-glicosídeos, 3-O-acetilglicosídeos, 3-O-p-cumaroil-glicosídeos, e em menor quantidade, 3-O-cafeoilglicosídeos (IVANOVA *et al.*, 2011a; IVANOVA *et al.*, 2011b; IVANOVA-PETROPULOS *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2016). Os polifenóis são, portanto, fatores de qualidade na uva e no vinho, pois além de contribuírem em relação à cor e características sensoriais da bebida atuam também em reações de oxidação, interações com proteínas e no comportamento de envelhecimento do vinho. Adicionalmente, apresentam ação anti-inflamatória, antimicrobiana e agem na prevenção contra doenças cardiovasculares (IVANOVA *et al.*, 2011b; FERREIRA *et al.*, 2016). Normalmente, a

quantidade de polifenóis em vinhos brancos é menor do que em vinhos tintos devido ao fato de uvas de variedade branca não sintetizarem antocianinas (IVANOVA *et al.*, 2011b). Em vinhos brancos, os flavonóis são os responsáveis pela pigmentação, conferindo coloração amarelada, enquanto nos vinhos tintos, apesar das antocianinas, afetam a coloração por copigmentação. Esses polifenóis estão presentes na casca da uva, são dependentes de luz para sua biossíntese e apresentam atividade antioxidante (CASTILLO-MUÑOZ *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2016). Os ácidos hidroxicinâmicos também influenciam a pigmentação de vinhos brancos, concedendo coloração dourado-escurecida sob oxidação com moléculas não-fenólicas (FERREIRA *et al.*, 2016). As diferenças na composição de polifenóis possibilitam a utilização destes como ferramenta para autenticação e diferenciação de cultivares, determinando e solidando a qualidade e o valor de mercado do produto final (CASTILLO-MUÑOZ *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2016).

O acúmulo de antocianinas em variedades de uvas vermelhas inicia o amadurecimento (*véraison*) (Figura 5), período no qual as uvas passam por mudanças de tamanho com a ocorrência de crescimento, acúmulo de solutos, aumento da concentração de açúcares e mudanças de cor variando entre amarelo esverdeado para uvas brancas, e vermelho com nuances de azul e lilás para uvas vermelhas (KENNEDY *et al.*, 2001; IVANOVA *et al.*, 2011b). O desenvolvimento da uva consiste em dois períodos de crescimento sigmoidal separados por uma fase lag (estacionária). No primeiro período, de até aproximadamente 60 dias, ocorre rápida divisão celular, a formação do pericarpo da uva e do embrião da semente, a expansão em volume e o acúmulo de solutos, prevalentemente ácidos málicos e tartáricos (que concedem acidez ao vinho) em vacúolos no mesocarpo, ácidos hidroxicinâmicos, os taninos (proantocianidinas), e compostos aromáticos como as metoxipirazinas (KENNEDY, 2002; LUND & BOHLMANN, 2006; IVANOVA *et al.*, 2011b). Na segunda etapa de crescimento tem início a *véraison*, com ocorrência da maturação do pericarpo, marcada pelas mudanças de cores e aumento no tamanho da uva, estímulos estes causados pela produção do hormônio ácido abscísico. Os solutos acumulados no primeiro período de desenvolvimento têm sua concentração reduzida significativamente devido ao aumento do volume; ocorre a produção de sacarose por meio da fotossíntese e a hidrólise da mesma nos açúcares constituintes glicose e frutose. Além disso, ocorre a produção de metabólitos secundários de extrema importância para o vinho, como as antocianinas e compostos aromáticos (terpenos, norisoprenóides, ésteres, glicosídeos e tióis), sendo

alguns em sua forma precursora transformados posteriormente em compostos voláteis durante a fermentação e o processo de envelhecimento (Figura 6) (KENNEDY, 2002; LUND & BOHLMANN, 2006; KUHN *et al.*, 2013).

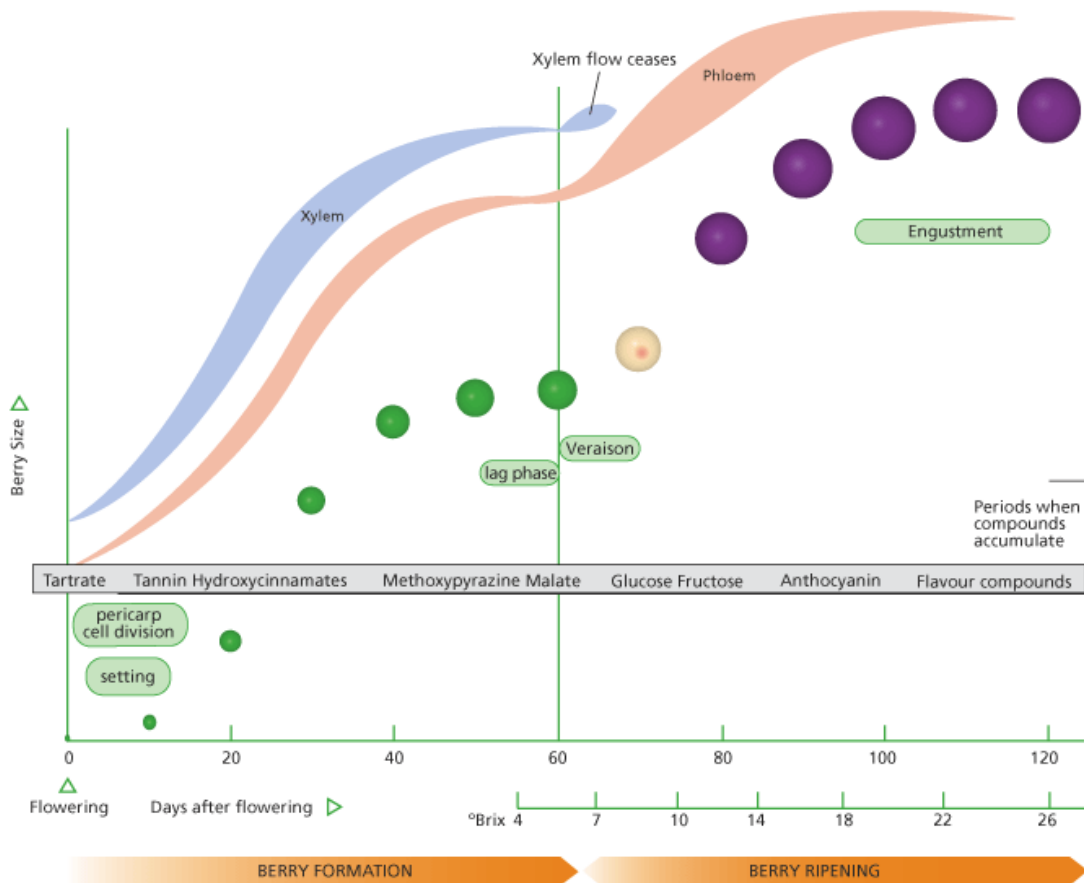


Figura 5. Diagrama exibindo o tamanho relativo e cor da uva a intervalos de 10 dias após floração e principais eventos de desenvolvimento. Os períodos de acúmulo de compostos, o índice de refração do suco ($^{\circ}\text{Brix}$), e uma indicação da taxa de influxo de xilema e floema pela seiva vascular na uva são também apresentados (COOMBE, 2001).

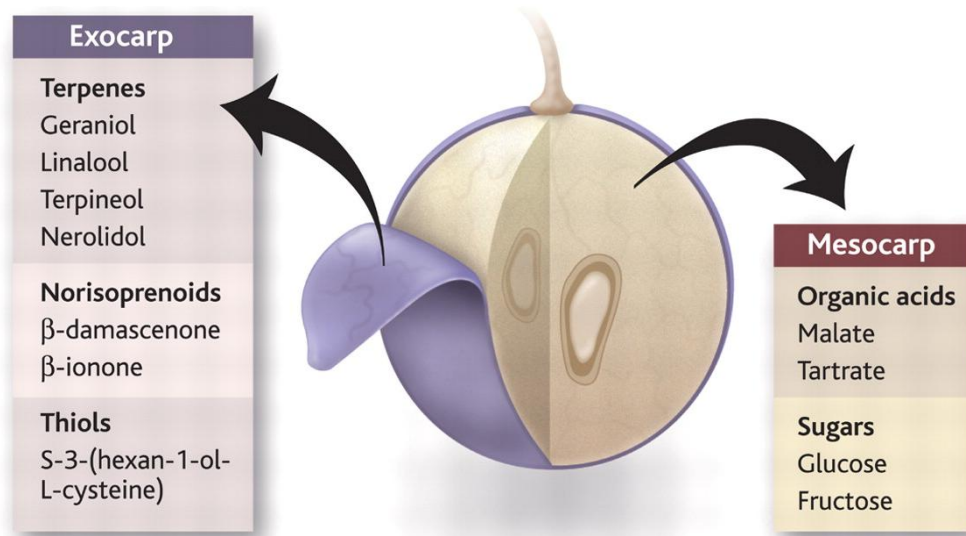


Figura 6. Representação de alguns dos principais determinantes químicos de aromas e qualidade do vinho presentes na uva, predominantemente localizados nos tecidos do mesocarpo (polpa) e exocarpo (casca). Compostos potencialmente voláteis como terpenos, norisoprenóides e tióis são armazenados de forma conjugada à açúcares e aminoácidos em vacúolos nas células do exocarpo. Os compostos são volatilizados por meio de rompimento físico e subsequente clivagem por enzimas presentes na uva, produzidas pelas leveduras e por enzimas de utilização industrial (glicosidases e peptidases) durante o processo de produção do vinho (LUND & BOHLMANN, 2006).

O tempo ótimo de amadurecimento das uvas varia conforme estímulos ambientais que afetam seu metabolismo, como as condições de luz (radiação ultravioleta), disponibilidade de água (irrigação) e temperatura. Déficit moderado de água, radiação UV-B e baixas temperaturas afetam positivamente o amadurecimento por meio do aumento do conteúdo total de solutos e de antocianinas (KENNEDY, 2002; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a; KUHN *et al.*, 2013). Estes fatores definem o momento da colheita, e na produção de vinho as datas de colheita são definidas de forma à otimizar o balanço entre doçura, acidez e o desenvolvimento pleno aromático e fenólico da uva, usualmente ocorrendo entre 12 a 14 semanas após a frutificação (LUND & BOHLMANN, 2006). No processo de produção do vinho, a utilização da linhagem de levedura para a fermentação alcoólica do mosto da uva depende do produto final objetivado, já que linhagens diferentes de *S. cerevisiae* levam à formação de metabólitos diversificados, que influenciam diretamente nas características organolépticas do vinho. Para o controle da fermentação preconiza-se o uso de

linhagens iniciadoras industrializadas de *S. cerevisiae* (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 2011).

Na produção convencional de vinho tinto (Figura 7), após a colheita as uvas são desengaçadas, isto é, ocorre a remoção dos ramos dos cachos, e esmagadas (rompimento físico). É realizado então o preenchimento do tanque de fermentação, no qual as uvas são maceradas (extração dos sólidos - casca, polpa, sementes) e as leveduras são inoculadas. A maceração é realizada simultaneamente à fermentação alcoólica do mosto, que ocorre numa faixa de temperatura entre 20°-30°C (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a). Durante o processo, é feito o bombeamento do mosto para suprir a necessidade de oxigênio durante a fermentação, sendo que a promoção dessa aeração inicial auxilia na prevenção de fermentações vagarosas, uma vez que as leveduras encontram-se em fase de crescimento, além de auxiliar na extração de compostos fenólicos do bagaço e na homogeneização do conteúdo do tanque de fermentação. O monitoramento dessa etapa é primordial já que oxigenação excessiva pode causar reações negativas como a produção de aromas indesejáveis e deterioração microbiana (crescimento de bactérias ácido-acéticas) (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a; BARTOWSKY & HENSCHKE, 2008; LAURIE *et al.*, 2014). Como pigmentos vermelhos estão localizados na casca da uva, uma maceração mais leve e delicada permite a obtenção de vinhos de coloração clara, como os vinhos rosé e os vinhos utilizados para produção de *champagne* (que passam por uma segunda fermentação para a carbonatação, conferindo efervescência). Durante a produção do vinho é indispensável o controle da cinética de fermentação, que pode ser mensurada analisando-se a quantidade de açúcar consumido, de álcool formado ou de dióxido de carbono liberado, podendo ser realizada também por meio da medida da densidade (massa de açúcar por unidade de volume do mosto). Além disso, é importante o controle da temperatura do tanque de fermentação, acompanhamento este determinante para que não ocorram fermentações vagarosas e produção de compostos indesejáveis (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a). O final da fermentação alcoólica é avaliado pela medida da concentração de açúcar, preconizando-se uma concentração menor que 2 g de açúcar por litro. Após a depleção total de açúcares pode ter início a fermentação malolática (fermentação secundária) devido ao crescimento de bactérias no mosto fermentado. Esta fermentação pode ser utilizada intencionalmente em regiões onde o vinho é caracteristicamente de alta acidez, como zonas de clima frio. A fermentação malolática atua na desacidificação do vinho, convertendo o ácido málico em ácido lático e dióxido de carbono, processo este

normalmente carregado por bactérias ácido-láticas (*Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., e *Pediococcus* spp.). Além disso, tal fermentação secundária também influencia na produção do vinho em regiões mais quentes por meio de alterações na composição da bebida, aprimorando características organolépticas e evidenciando a atuação positiva de bactérias na estabilização do vinho e no enriquecimento aromático (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a; STYGER; PRIOR & BAUER, 2011). Também é interessante durante a vinificação o controle dos níveis de concentração do etanol, pois este pode acabar prevalecendo sobre o sabor e aroma finais do vinho, estudos tem sido desenvolvidos no intento de modificar geneticamente os genes das isoenzimas glicerol-3-fosfato desidrogenases, GPD1 e GPD2, para desviar carbono da glicólise para produção de glicerol, porém, também há de se haver cuidado pois, a alta produção de glicerol pode levar a concentrações indesejáveis de ácido acético (PRETORIUS; CURTIN & CHAMBERS, 2012). Após as fermentações finais, o bagaço do mosto é prensado e o vinho drenado, passando por uma etapa de filtração para então ser armazenado em barris, nos quais ocorre o envelhecimento; a etapa final constitui o engarrafamento (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a). Na produção do vinho, o dióxido de enxofre (SO₂) é adicionado para auxílio na conservação e manutenção da estabilidade devido a seu papel como substância antimicrobiana e antioxidativa. A dosagem de adição desse gás deve ser controlada para que não haja alterações organolépticas no vinho, pois o dióxido de enxofre pode destruir o tecido celular dissolvendo os constituintes do bagaço, e assim afetar a pigmentação e causar a neutralização de compostos aromáticos na bebida (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a; GUERRERO & CANTOS-VILLAR, 2015).

A produção de vinho branco requer a extração do suco da uva e vários processos de clarificação do mesmo antes do início da fermentação alcoólica, uma vez que a ausência do contato do processo de fermentação com a casca é o que realmente distingue o vinho branco do vinho tinto. A clarificação e remoção de sólidos leva à eliminação de leveduras selvagens presentes na matéria vegetal. Porém, a inoculação de leveduras selecionadas compensa tal perda e favorece a produção de alcoóis superiores, ácidos graxos e ésteres correspondentes. É interessante salientar que vinhos brancos podem ser produzidos a partir de uvas vermelhas quando estas são prensadas em condições adequadas, evitando-se a liberação de antocianinas da casca e consequente coloração do mosto (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006a).

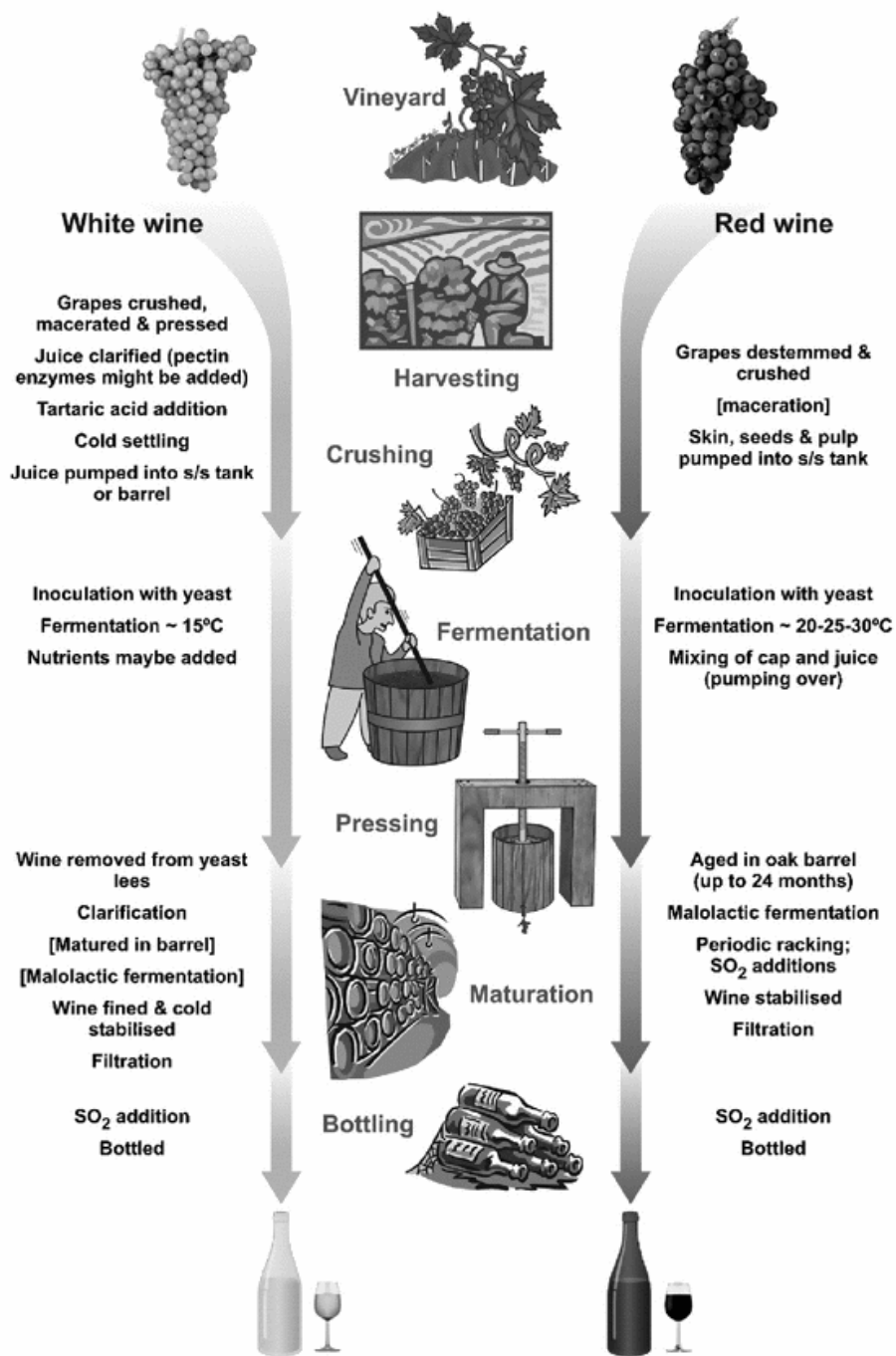


Figura 7. Principais etapas na produção de vinho branco e vinho tinto (BARTOWSKY & PRETORIUS, 2009).

4.4 Compostos aromáticos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae*: influência na composição de vinhos

Aromas constituem uma grande variedade de compostos voláteis, cuja percepção olfatória varia de acordo com o tipo e a concentração. As características de várias substâncias aromáticas são determinadas por limiares, explicitados a seguir: (i) limiar de percepção: concentração mínima na qual a presença de uma substância odorífica é detectada sem necessariamente a identificação do odor; (ii) limiar de reconhecimento: limiar a partir do qual há a percepção e identificação de um composto odorífico específico; e (iii) limiar de preferência: concentração máxima na qual um composto está presente sem originar um julgamento negativo (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006b). No vinho os aromas e componentes estimulantes de odor e sabor podem ser formados durante o desenvolvimento da uva antes da colheita (óleos essenciais, aromas frutados e vegetais), por micro-organismos presentes no mosto (bactérias ácido-acéticas, bactérias ácido-láticas, fungos filamentosos), pela fermentação alcoólica por leveduras e pelo processamento do vinho (tratamentos térmicos, cozimento, envelhecimento) (SWIEGERS *et al.*, 2005; CARLQUIST *et al.*, 2015). Os aromas derivados essencialmente da uva são denominados primários ou varietais; os componentes aromáticos produzidos durante a fermentação sob a influência do metabolismo de leveduras são denominados secundários, e os aromas resultantes de transformações durante o processamento final, como por exemplo, no envelhecimento, são denominados terciários ou “*bouquet*” (GONZÁLES; MUÑOS & CARRASCOSA, 2011).

Os mecanismos por meio dos quais as leveduras provocam impacto nos aromas presentes no vinho ocorrem por meio do biocontrole de bolores presentes antes da colheita e que atuam na qualidade da uva; a fermentação alcoólica do suco da uva em vinho, conduzido por leveduras; e na biossíntese de aromas durante a fermentação. Esses micro-organismos atuam também metabolizando aromas neutros encontrados na uva em aromas ativos, impactam o aroma do vinho após o processo de fermentação por meio da autólise celular e influenciam no crescimento de bactérias que causam deterioração e fermentação malolática (FLEET, 2003; STYGER; PRIOR & BAUER, 2011). O perfil de aroma das bebidas alcoólicas formado durante a fermentação é principalmente atribuído às atividades bioquímicas e metabólicas que ocorrem no

interior da célula leveduriforme. Os compostos aromáticos produzidos pelas leveduras são intermediários das vias metabólicas de catabolismo dos componentes do meio, como açúcares, compostos nitrogenados e compostos sulfurados, utilizados para produção de fatores necessários para o crescimento celular, como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, dentre outros (NEDOVIĆ *et al.*, 2015). Portanto, a concentração de compostos aromáticos ao final da fermentação é definida por fatores atuantes no decorrer desta (temperatura, composição do meio, pH) (MOURET *et al.*, 2014) que influenciam diretamente no comportamento da linhagem de levedura utilizada e sua expressão gênica.

Os principais compostos aromáticos ativos produzidos durante a fermentação por leveduras são: alcoóis (etanol, alcoóis superiores), ésteres (ésteres de acetato, ésteres de ácidos graxos de cadeia média), ácidos orgânicos (ácidos graxos de cadeia média), compostos carbonílicos (acetaldeído, dicetonas vicinais) e compostos sulfurados (sulfeto de hidrogênio, dióxido de enxofre, dimetil sulfeto) (Figura 8) (NEDOVIĆ *et al.*, 2015). Durante a fermentação os fatores causadores de pressão seletiva no ambiente (acidez, altas concentrações de açúcar e etanol) favorecem as leveduras que apresentam o catabolismo fermentativo mais eficiente, particularmente as linhagens de *S. cerevisiae*, sendo um de seus principais papéis catalisar de forma rápida, completa e eficiente a conversão dos açúcares presentes no mosto a etanol, dióxido de carbono e compostos aromáticos sem o desenvolvimento de compostos sensoriais indesejáveis (PRETORIUS, 2000; SWIEGERS *et al.*, 2005).

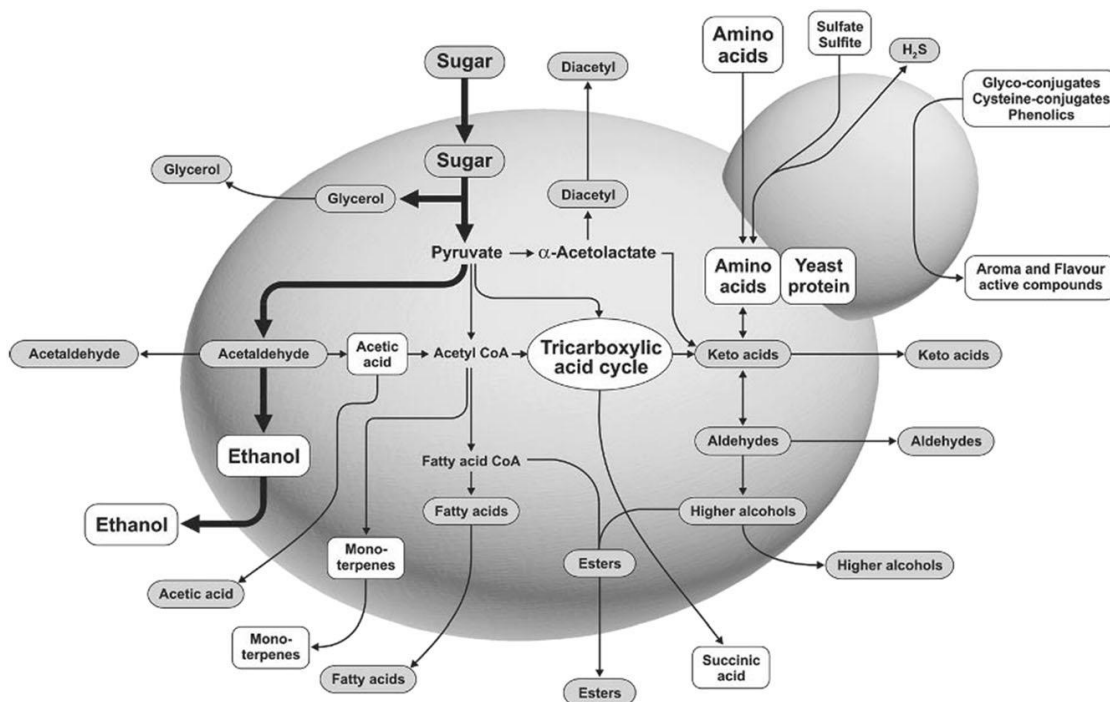


Figura 8. Representação esquemática da síntese dos principais grupos de aromas durante a fermentação por leveduras vínicas (BARTOWSKY & PETRORIUS, 2009).

Dentre os compostos aromáticos mais produzidos (Tabela 1) está a classe dos ésteres. A produção de ésteres por leveduras durante a fermentação possui efeito significativo em relação à percepção de aromas frutados. São formados dois grupos principais: primeiramente, os ésteres de acetato, sendo os mais importantes o acetato de etila (aromas frutado e semelhante a solventes), o acetato de isoamila (aroma de pera), o acetato de isobutila (aroma de banana) e o 2-fenil-etil acetato (aromas de mel, rosas e flores) (SWIEGERS *et al.*, 2005; CORDENTE *et al.*, 2012). Os ésteres de acetato possuem o grupo acil derivado do acetato (na forma de acil-CoA) e o grupo álcool é composto por uma molécula de etanol ou de algum álcool complexo derivado do metabolismo de aminoácidos. O segundo grupo compreende os ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média, como o hexanoato de etila e o octanoato de etila (aroma de maçã) (CORDENTE *et al.*, 2012). A taxa de formação de ésteres durante a fermentação é dependente de dois fatores: a concentração dos co-substratos acil-CoA e álcool, e a atividade das enzimas aciltransferases e esterases envolvidas em sua síntese (SAERENS *et al.*, 2006; SAERENS *et al.*, 2008). Os genes *ATF1*, *ATF2*, *EHT1*, *EEB1* e *IAH1* foram caracterizadas em *S. cerevisiae* como relacionados à produção de ésteres (SAERENS *et al.*, 2010), sendo que *ATF1* e *ATF2* codificam a produção de aciltransferases; *EHT1* e *EEB1* codificam proteínas com atividades na síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos de cadeia média; e *IAH1* codifica esterases de atividade hidrolítica que atuam no controle das concentrações de acetato de isoamila (CORDENTE *et al.*, 2012).

Na fermentação alcoólica também ocorre a formação de alcoóis alifáticos e aromáticos conhecidos como alcoóis superiores; dentre estes alcoóis, o feniletanol (aroma floral) é um dos maiores contribuintes no perfil de aromas do vinho (CORDENTE *et al.*, 2012). Em elevadas concentrações (acima de 400 mg/L) alcoóis superiores podem conferir aromas indesejáveis, como odor e sabor pungentes (Tabela 1). Os alcoóis alifáticos incluem o propanol, álcool isoamílico, isobutanol e o álcool amílico ativo; dentre os alcoóis aromáticos encontram-se o álcool 2-fenetílico e o tirosol (SWIEGERS *et al.*, 2005). As concentrações de aminoácidos no mosto influenciam as concentrações de alcoóis superiores já que estes são seus precursores. Alcoóis superiores de cadeia ramificada, álcool isoamílico, isobutanol e o álcool amílico ativo

Tabela 1. Compostos aromáticos comumente encontrados no vinho (SWIEGERS *et al.*, 2005).

Compound	Concentration in wine (mg/L)	Aroma threshold (mg/L)	Aroma descriptor
Ethyl acetate	22.5–63.5	7.5*	VA, nail polish, fruity
Isoamyl acetate	0.1–3.4	0.03*	Banana, pear
2-Phenylethyl acetate	0–18.5	0.25*	Flowery, rose, fruity
Isobutyl acetate	0.01–1.6	1.6****	Banana, fruity
Hexyl acetate	0–4.8	0.7**	Sweet, perfume
Ethyl butanoate	0.01–1.8	0.02*	Floral, fruity
Ethyl hexanoate	0.03–3.4	0.05*	Green apple
Ethyl octanoate	0.05–3.8	0.02*	Sweet soap
Ethyl decanoate	0–2.1	0.2*****	Floral, soap
Propanol	9.0–68	500**	Pungent, harsh
Butanol	0.5–8.5	150*	Fusel, spiritous
Isobutanol	9.0–174	40*	Fusel, spiritous
Isoamyl alcohol	6.0–490	30*	Harsh, nail polish
Hexanol	0.3–12.0	4**	Green, grass
2-Phenylethyl alcohol	4.0–197	10*	Floral, rose
Acetic acid	100–1150	280*	VA, vinegar
Acetaldehyde	10–75	100**	Sherry, nutty, bruised apple
Diacetyl	<5	0.2** / 2.8***	Buttery
Glycerol	5–14 g/L	5.2 g/L**	Odourless (slightly sweet taste)
Linalool	0.0017–0.010	0.0015*****/0.025*****	Rose
Geraniol	0.001–0.044	5*****/30*	Rose-like
Citronellol	0.015–0.042	8*****/100*	Citronella
2-acetyl-1-pyrroline (ACPY)	Trace	0.0001*****	Mousy
2-acetyltetrahydropyridine (ACPTY)	0.0048–0.1	0.0016*****	Mousy
4-ethylphenol	0.012–6.5	0.14*/0.6***	Medicinal, barnyard
4-ethyl guaiacol	0.001–0.44	0.033*/0.11***	Phenolic, sweet
4-vinyl phenol	0.04–0.45	0.02*****	pharmaceutical
4-vinyl guaiacol	0.0014–0.71	10*****	Clove-like, phenolic

* 10% etanol, ** vinho, *** vinho tinto, **** cerveja, ***** vinho sintético, *****água

são sintetizados pela levedura por meio da via de Ehrlich, que envolve a degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. A via de Ehrlich envolve três etapas: uma transaminação que resulta na formação de um α -cetoácido; a descarboxilação do α -cetoácido e formação de um aldeído fusel; e a redução deste para formação de um álcool fusel (ou álcool superior) (CORDENTE *et al.*, 2012). Estudos indicam que a superexpressão dos genes *BAT1* e *BAT2* que codificam as aminoácido-transaminases são responsáveis pelo aumento de características frutadas no vinho (aromas de pera e damasco) (LILLY; LAMBRECHTS & PRETORIUS, 2000).

A produção de compostos sulfurados também exerce importante papel na composição organoléptica do vinho. Estes compostos apresentam baixo limiar de detecção, pois são geralmente responsáveis por conferir características sensoriais negativas à bebida (Tabela 2). Com base nas estruturas químicas, compostos de enxofre são classificados em cinco categorias: sulfetos, polisulfetos, compostos heterocíclicos, tioésteres e tióis, e sua descrição de aromas é variada, apresentando características negativas como aromas semelhantes a repolho, ovo podre, cebola e borracha. Em contrapartida, alguns compostos sulfurados podem apresentar aromas positivos como semelhantes à morango e toranja. O desenvolvimento destes compostos inclui a degradação de aminoácido contendo enxofre, pesticidas contendo enxofre ou precursores do enxofre derivados da uva (SWIEGERS *et al.*, 2005).

Tabela 2. Compostos derivados do enxofre, incluindo tióis, comumente encontrados no vinho (SWIEGERS *et al.*, 2005).

Compound	Concentration in wine (µg/L)	Aroma threshold (µg/L)	Aroma descriptor
Hydrogen sulfide	Trace->80	10-80	rotten egg
Methanethiol (methyl mercaptan)	5.1, 2.1	0.3	cooked cabbage, onion, putrefaction, rubber
Ethanethiol (ethyl mercaptan)	1.9-18.7	1.1	onion, rubber, natural gas
Dimethyl sulfide	1.4-61.9	25	asparagus, corn, molasses
Diethyl sulfide	4.1-31.8	0.93	cooked vegetables, onion, garlic
Dimethyl disulfide	2	15, 29	cooked cabbage, intense onion
Diethyl disulfide	Trace-85	4.3	garlic, burnt rubber
3-(Methylthio)-1-propanol (methionol)	140-5000	500	cauliflower, cabbage, potato
Benzothiazole	11	50	rubber
Thiazole	0-34	38	popcorn, peanut
4-Methylthiazole	0-11	55	green hazelnut
2-Furanmethanethiol	0-350 ng/L	1 ng/L	roasted coffee, burnt rubber
Thiophene-2-thiol	0-11	0.8	burned, burned rubber, roasted coffee
4-Mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP)	0-30 ng/L	3 ng /L	cat urine, box tree/ blackcurrant, broom
3-Mercaptohexan-1-ol (3MH)	50-5000 ng/L	60 ng/L	passionfruit, grapefruit
3-Mercaptohexyl acetate (3MHA)	1-100 ng/L	4 ng /L	Riesling-type note, passionfruit, box tree

5 CONCLUSÃO

A evolução da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de forma paralela à história do desenvolvimento tecnológico e científico humano exerce um papel influenciador no desenvolvimento de diversas pesquisas abordando aspectos biológicos, metabólicos, químicos e mais recentemente evolucionários desse micro-organismo. O esclarecimento de características relacionadas à ecologia de leveduras *Saccharomyces* spp. e, ao processo de domesticação de *S. cerevisiae*, integra informações de relevância fundamental para compreensão da construção do gênero *Saccharomyces* a partir das interações de hibridização e recombinação genéticas, e auxilia a revelar por meio das técnicas de sequenciamento e comparação genômica as origens ambientais das espécies *Saccharomyces* de uso industrial e suas correlações nos ambientes de fermentação influenciados pela ação do homem. O entendimento destas relações, que permitem uma melhor caracterização das linhagens de *S. cerevisiae* possibilita o melhoramento (por meio de métodos atuais como a engenharia genética) desse micro-organismo tendo em vista as aplicações industriais do mesmo quanto aos processos fermentativos alcoólicos, dentre outras áreas de atuação. Neste contexto, uma das características fenotípicas principais de interesse de *S. cerevisiae* diz respeito à produção de compostos aromáticos durante a produção do vinho, produção essa que varia de acordo com a linhagem empregada e está relacionada à presença tanto de aromas desejáveis quanto indesejáveis na bebida. Os aromas e sabores produzidos durante a fermentação alcoólica do mosto de uva conferem complexidade à composição final do vinho, e a variedade de linhagens de *S. cerevisiae* permite a diversificação no perfil aromático. Esses fatores agregam valor de mercado a um dos produtos mais consumidos no mundo, gerando exclusividade e atração do consumidor. Sendo assim, a escolha da linhagem de *S. cerevisiae* e a sua caracterização tem um importante impacto no desenvolvimento da composição organoléptica do vinho, bem como em outras bebidas fermentadas e nos demais processos biotecnológicos que fazem uso desse micro-organismo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANÓN, M. E.; PÉREZ-COELLO, M. S.; MARINA, M. L. **Wine science in the metabolomics era.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 74, p. 1–20, 2015.

ASLANKOOHI, E.; REZAEI, M. N.; VERVOORT, Y.; COURTIN, C. M.; VERSTREPEN, K. J. **Glycerol Production by Fermenting Yeast Cells Is Essential for Optimal Bread Dough Fermentation.** PLoS ONE, v. 10, n. 3, e0119364, 2015.

BADOTTI, F.; BELLOCH, C.; ROSA, C. A.; BARRIO, E.; QUEROL, A. **Physiological and molecular characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça strains isolated from different geographic regions in Brazil.** World J. Microbiol. Biotechnol., v. 26, p. 579–587, 2010.

BARNETT, J. A. **A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics.** *Yeast*, v. 24, p. 799–845, 2007.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. **Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review.** Int. J. Food Microbiol., v. 125, p. 60–70, 2008.

BARTOWSKY, E. J.; PRETORIUS, I. S. **Microbial formation and modification of flavor and off-flavor compounds in wine.** In: KÖNIG, H.; UNDEN, G.; FRÖHLICH, J. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine.* Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, 2009.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. **Production of food grade yeasts.** Food Technol Biotechnol., v. 44, n. 3, p. 407–415, 2006.

BORNEMAN, A. R.; PRETORIUS, I. S. **Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex.** Genetics, v. 199, p. 281–291, Fev. 2015.

CAMPOS, C. R.; SILVA, C. F.; DIAS, D. R.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; SCHWAN, R. F. **Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the**

production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. Journal of Applied Microbiology, v. 108, p. 1871–1879, 2010.

CARDOSO, D. R.; ANDRADE-SOBRINHO, L. G.; LEITE-NETO, A. F.; RECHE, R. V.; ISIQUE, W. D.; FERREIRA, M. M. C.; LIMA-NETO, B.; FRANCO, D. F. **Comparison between cachaça and rum using pattern recognition methods.** J. Agric. Food. Chem., v. 52, p. 3429–3433, 2004.

CARLQUIST, M.; GIBSON, B.; YUCEER, Y. K.; PARASKEVOPOULOU, A.; SANDELL, M.; ANGELOV, A. I.; GOTCHEVA, V.; ANGELOV, A. D.; ETSCHMANN, M.; BILLERBECK, G. M.; LIDÉN, G. **Process engineering for bioflavour production with metabolically active yeasts – a mini-review.** Yeast, v. 32, p. 123–143, 2015.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. **Flavonol profiles of Vitis vinifera white grape cultivars.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 23, n. 7, p. 699–705, 2010.

CHAMBERS, P. J.; PRETORIUS, I. S. **Fermenting knowledge:** the history of winemaking, science and yeast research. EMBO reports, v. 11, n. 12, p. 914–920, 2010.

CHO, I. H.; PETERSON, D. G. **Chemistry of bread aroma:** A review. Food Sci. Biotechnol. v. 19, p. 575–582, 2010.

COOMBE, B. G. **Ripening berries a critical issue.** Australian Viticulture, v. 5, n. 2, p. 28–34, 2001.

CORDENTE, A. G.; CURTIN, C. D.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S. **Flavour-active wine yeasts.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 96, p. 601–618, 2012.

DASHKO, S.; ZHOU, N.; COMPAGNO, C.; PIŠKUR, J. **Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?** FEMS Yeast Research, v. 14, p. 826–832, Jun. 2014.

DE DEKEN, R. H. **The Crabtree effect**: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiology*, v. 44, p. 149–156, 1966.

DEQUIN, S. **The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 56, p. 577–588, 2001.

DOEBLEY, J. F.; GAUT, B. S.; SMITH, B. D. **The molecular genetics of crop domestication**. *Cell*, v. 127, p. 1309–1321, 2006.

ENGEL, S. R.; DIETRICH, F. S.; FISK, D. G.; BINKLEY, G.; BALAKRISHNAN, R.; COSTANZO, M. C.; DWIGHT, S. S.; HITZ, B. C.; KARRA, K.; NASH, R. S.; SHUAI, W.; WONG, E. D.; LLOYD, P.; SKRZYPEK, M. S.; MIYASATO, S. R.; SIMISON, M.; CHERRY, J. M. **The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now**. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, v. 4, n. 3, p. 389–398, 2014.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; MARTÍNEZ, M.; RUBIRES, X.; YUSTE-ROJAS, M.; TORRES, M. **Applied Wine Microbiology**. In: CARRASCOSA, A. V.; MUÑOZ, R.; GONZÁLEZ, R. *Molecular Wine Microbiology*. 1^a ed. Elsevier, cap. 14, p. 341–354, 2011.

FAY, J.C.; BENAVIDES, J.A. **Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae***. *PLoS Genetics*, v. 1, p. 66-71, 2005.

FERREIRA, V.; FERNANDES, F.; PINTO-CARNIDE, O.; VALENTÃO, P.; FALCO, V.; MARTÍN, J. P.; ORTIZ, J. M.; ARROYO-GARCÍA, R.; ANDRADE, P. B.; CASTRO, I. **Identification of *Vitis vinifera* L. grape berry skin color mutants and polyphenolic profile**. *Food Chemistry*, v. 194, p. 117–127, 2016.

FLEET, G. H. **Yeast interactions and wine flavor**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 86, p. 11 – 22, 2003.

FLEET, G. **Wine yeasts for the future**. *FEMS Yeast Res.*, v. 8, p. 979–995, 2008.

FRANCIS, I. L.; NEWTON, J. L. **Determining wine aroma from compositional data**. *Aust. J. Grape Wine Res.*, v. 11, p. 114–126, 2005.

GÉLINAS, P. **Mapping early patents on baker's yeast manufacture.** *Comp. Rev. Food. Sci. Food. Saf.*, v. 9, p. 483–497, 2010.

GÉLINAS, P. **In search of perfect growth media for baker's yeast production: mapping patents.** *Comp. Rev. Food. Sci. Food. Saf.*, v. 11, p. 13–33, 2012.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. **Life with 6000 genes.** *Science*, v. 274, n. 5287, p. 546–567, Out. 1996.

GONZÁLEZ, R.; MUÑOZ, R.; CARRASCOSA, A. V. **Production of Wine Starter Cultures.** In.: CARRASCOSA, A. V.; MUÑOZ, R.; GONZÁLEZ, R. *Molecular Wine Microbiology*. 1ª ed. Elsevier, cap. 11, p. 279–302, 2011.

GUERRA, J. B.; ARAÚJO, R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. **Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça.** *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 33, p. 106–111, 2001.

GUERRERO, R. F.; CANTOS-VILLAR, E. **Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 42, p. 27–43, 2015.

HAGMAN, A.; SÄLL, T.; PIŠKUR, J. **Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin.** *FEBS Journal*, v. 281, p. 4805–4814, Ago. 2014.

HAGMAN, A.; PIŠKUR, J. **A Study on the Fundamental Mechanism and the Evolutionary Driving Forces behind Aerobic Fermentation in Yeast.** *PLoS ONE*, v. 10, n. 1, p. 1–24, Jan. 2015. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0116942>.

HALL, C.; DIETRICH, F. S. **The reacquisition of biotin prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae* involved horizontal gene transfer, gene duplication and gene clustering.** *Genetics*, v. 177, p. 2293–2307, 2007.

HAZELWOOD, L. A.; DARAN, J. M.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; DICKINSON, J. R. **The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism.** Appl. Environ. Microb., v. 74, p. 2259–2266, 2008.

HEARD, G. M.; FLEET, G. H. **Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines.** Appl. Environ. Microb., v. 50, p. 727–728, 1985.

HYMA, K. E.; SAERENS, S. M.; VERSTREPEN, K. J.; FAY, J. C. **Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of *Saccharomyces cerevisiae*.** FEMS Yeast Res., v. 11, p. 540–551, 2011.

HYMA, K. E.; FAY, J. C. **Mixing of vineyard and oak-tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards.** Molecular Ecology, v. 22, n. 11, p. 2917–2930, Jun. 2013.

IVANOVA, V.; DÖRNYEI, Á.; MÁRK, L.; VOJNOSKI, B.; STAFILOV, T.; STEFOVA, M.; KILÁR, F. **Polyphenolic content of Vranec wines produced by different vinification conditions.** Food Chemistry, v. 124, n. 1, p. 316–325, 2011a.

IVANOVA, V.; STEFOVA, M.; VOJNOSKI, B.; DÖRNYEI, Á.; MÁRK, L.; DIMOVSKA, V.; STAFILOV, T.; KILÁR, F. **Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening.** Food Research International, v. 44, n. 9, p. 2851–2860, 2011b.

IVANOVA-PETROPULOS, V.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; BOROS, B.; STEFOVA, M.; STAFILOV, T.; VOJNOSKI, B.; DÖRNYEI, Á.; KILÁR, F. **Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 41, p. 1–14, 2015.

JOHNSON, L. J.; KOUFOPANOU, V.; GODDARD, M. R.; HETHERINGTON, R.;

SCHAFER, S. M.; BURT, A. **Population genetics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus***. *Genetics*, v. 166, p. 43–52, Jan. 2004.

KENNEDY, J. A.; HAYASAKA, Y.; VIDAL, S.; WATERS, E. J.; JONES, G. P. **Composition of Grape Skin Proanthocyanidins at Different Stages of Berry Development**. *Jour. of Agricultural & Food Chemistry*, v. 49, p. 5348–5355, 2001.

KENNEDY, J. **Understanding grape berry development**. *Practical Winery and Vineyard Journal*, 2002. Disponible em: <<http://www.practicalwinery.com/JulyAugust02/julaug02p14.htm>>.

KING, E. S.; KIEVIT, R. L.; CURTIN, C.; SWIEGERS, J. H.; PRETORIUS, I. S.; BASTIAN, S. E. P.; FRANCIS, I. L. **The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference**. *Food Chem.*, v. 122, p. 618–626, 2010.

KITAGAKI, H.; KITAMOTO, K. **Breeding Research on Sake Yeasts in Japan: History, Recent Technological Advances, and Future Perspectives**. *Annu. Rev. Food. Sci. Technol.*, v. 4, p. 215–235, 2013.

KUHN, N.; GUAN, L.; DAI, Z. W.; WU, B. H.; LAUVERGEAT, V.; GOMÈS, E.; LI, S. H.; GODOY, F.; ARCE-JOHNSON, P.; DELROT, S. **Berry ripening: recently heard through the grapevine**. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, n. 16, p. 4543–4559, 2014.

KURTZMAN, C. P. **Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Ascomycetous Yeasts and Yeast-like Taxa**. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts a Taxonomic Study*. 5^a ed. Elsevier, v. 2, p. 293–307, 2011.

LAURIE, V. F.; SALAZAR, S.; CAMPOS, M. I.; CÁCERES-MELLA, A.; PEÑA-NEIRA, A. **Periodic Aeration of Red Wine Compared to Microoxygenation at Production Scale**. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 65, n. 2, p. 254–260, 2014.

LEEUVEN, C. V.; FRIANT, P.; CHONE, X.; TREGOAT, O.; KOUNDOURAS, S.; DUBOURDIEU, D. **Influence of climate, soil, and cultivar on Terroir**. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 55, p. 207–217, 2004.

LEGRAS, J-L.; MERDINOGLU, D.; CORNUET, J-M.; KARST, F. **Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history**. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 2091–2102, 2007.

LIANG, Z.; OWENS, C. L.; ZHONG, G-Y.; CHENG, L. **Polyphenolic profiles detected in the ripe berries of *Vitis vinifera* germplasm**. *Food Chemistry*, v. 129, p. 940–95, 2011.

LIBKIND, D.; HITTINGER, C. T.; VALÉRIO, E.; GONÇALVES, C.; DOVER, J.; JOHNSTON, M.; GONÇALVES, P.; SAMPAIO, J. P. **Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, v. 108, p. 14539–14544, 2011.

LILLY, M.; LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. **Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 744–753, 2000.

LITI, G.; CARTER, D. M.; MOSES, A. M.; WARRINGER, J.; PARTS, L.; JAMES, S. A.; DAVEY, R. P.; ROBERTS, I. N.; BURT, A.; KOUFOPANOU, V.; TSAI, I. J.; BERGMAN, C. M.; BENSASSON, D.; O’KELLY, M. J. T.; OUDENAARDEN, A. V.; BARTON, D. B. H.; BAILES, E.; NGUYEN BA, A. N.; JONES, M.; QUAIL, M. A.; GOODHEAD, I.; SIMS, S.; SMITH, F.; BLOMBERG, A.; DURBIN, R.; LOUIS, J. E. **Population genomics of domestic and wild yeasts**. *Nature*, v. 458, p. 337–341, 2009.

LITI, G. **The natural history of model organisms: The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae***. *eLife*, v. 4, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.05835>>.

LUND, S. T.; BOHLMANN, J. **The Molecular Basis for Wine Grape Quality—A Volatile Subject**. *Science*, v. 311, p. 804–805, 2006.

MAKHOUL, S.; ROMANO, A.; CAPOZZI, V.; SPANO, G.; APREA, E.; CAPPELLIN, L.; BENOZZI, E.; SCAMPICCHIO, M.; TILMANN, D. M.; GASPERI, F.; HANNA EL-NAKAT, H.; GUZZO, J.; BIASIOLI, F. **Volatile Compound Production During the Bread-Making Process: Effect of Flour, Yeast and Their Interaction**. *Food. Bioprocess. Technol.*, v. 8, p. 1925–1937, 2015.

MERICO, A.; SULO, P.; PIŠKUR, J.; COMPAGNO, C. **Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex**. *FEBS Journal*, v. 274, p. 976–989, 2007.

MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; LINARDI, V. R.; PATARO, C.; MAIA, A. B. R. A. **Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of Brazilian sugar-cane aguardente**. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 13, p. 241–243, 1997.

MORTIMER, R. K.; JOHNSTON, J. R. **Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center**. *Genetics*, v. 113, p. 35–43, 1986.

MOURET, J. R.; CADIÈRE, A.; AGUERA, E.; ROLLERO, S.; ORTIZ-JULIEN, A.; SABLAYROLLES, J. M.; DEQUIN, S. **Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae***. *Yeast*, v. 32, p. 257–269, 2015.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; MASNEUF-POMARÈDE, I. **Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai**. *Antonie van Leeuwenhoek* v. 98, p. 1–7, 2010.

NAUMOV, G. I.; JAMES, S. A.; NAUMOVA, E. S.; LOUIS, E. J.; ROBERTS, I. N. **Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae***. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 1931–1942, 2000.

NEDOVIĆ, V.; GIBSON, B.; MANTZOURIDOU, T. F.; BUGARSKI, B.; DJORDJEVIĆ, V.; KALUŠEVIĆ, A.; PARASKEVOPOULOU, A.; SANDELL, M.; ŠMOGROVIČOVÁ, D.; YILMAZTEKIN, M. **Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes.** *Yeast*, v. 32, p. 173–216, 2015.

NESS, F.; AIGLE, M. **RTM1: a member of a new family of telomeric repeated genes in yeast.** *Genetics*, v. 140, p. 945–956, 1995.

NGUYEN, H-V.; GAILLARDIN, C. **Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Sacharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species.** *FEM Yeast Research*, v. 5, p. 471–483, 2005.

OTTERSTEDT, K.; LARSSON, C.; BILL, R. M.; STÅHLBERG, A.; BOLES, E.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. **Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *European molecular biology organization*, v. 5, 2004.

PASTEUR, L. **Nouveaux faits concernant l'histoire de la fermentation alcoolique.** *Comptes Rendus Chimie*, v. 47, p. 1011–1013, 1858.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. **Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil.** *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p. 1–9, 2000.

POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. **Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 55, p. 468–477, 1989.

PRETORIUS, I. S. **Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking.** *Yeast*, v. 16, p. 675–729, 2000.

PRETORIUS, I. S.; CURTIN, C. D.; CHAMBERS, P. J. **The Winemaker's bug: From ancient wisdom to opening new vistas with frontier yeast science.** *Bioengineered bugs*, v. 3, p 147–156, 2012.

REESS, M. **Botanische Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze.** FELIX, V. A. Leipzig, p. 95, 1870.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications.** 2^a ed. John Wiley & Sons, v. 1, 2006a.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments.** 2^a ed. John Wiley & Sons, v. 2, 2006b.

SAERENS, S. M. G.; VERSTREPEN, K. J.; VAN LAERE, S. D. M.; VOET, A. R. D.; VAN DIJCK, P.; DELVAUX, F. R.; THEVELEIN, J. M. **The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with mediumchain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity.** *J. Biol. Chem.*, v. 281, p. 4446–4456, 2006.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. **Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation.** *Appl. Environ. Microbiol.* v. 74, p. 454–461, 2008.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F. R.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M. **Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiol. Biotechnol.*, v. 3, p. 165–177, 2010.

SALVADÓ, Z.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; GUILLAMÓN, J. M.; SALAZAR, G.; QUEROL, A.; BARRIO, E. **Temperature Adaptation Markedly Determines Evolution within the Genus *Saccharomyces*.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 7, p. 2292–2302, Abr. 2011.

SAMPAIO, J. P.; GONÇALVES, P. **Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*.** Applied and Environmental Microbiology, v. 74, p. 2144–2152, 2008.

SCHMITT, M. J.; KLAVEHN, P.; WANG, J.; SCHOÈNIG, I.; TIPPER, D. J. **Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin.** Microbiology (UK) v. 142, p. 2655–2662, 1996.

SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; SANTOS, J. J.; RODRIGUES, V. J.; WHEALS, A. E. **Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations.** Antonie Van Leeuwenhoek, v. 79, p. 89–96, 2001.

SHIMA, J.; TAKAGI, H. **Stress-tolerance of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress protective molecules and genes involved in stress tolerance.** Biotechnol. Appl. Biochem., v. 53, p.155–64, 2009.

SHIROMA, S.; JAYAKODY, L. N.; HORIE, K.; OKAMOTO, K.; KITAGAKI, H. **Enhancement of ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitophagy function.** Applied and Environmental Microbiology, v. 80, n. 3, p. 1002–1012, 2014.

SICARD, D.; LEGRAS, J-L. **Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex.** C. R. Biologies, n. 334, p. 229–236, 2011.

SPOR, A.; NIDELET, T.; SIMON, J.; BOURGAIS, A.; DE-VIENNE, D.; SICARD, D. **Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations of *Saccharomyces cerevisiae*.** BMC Evolutionary Biology, v. 9, n. 296, 2009.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. **Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations.** Annu. Rev. Microbiol., v. 68, p. 61–80, 2014.

STYGER, G.; PRIOR, B.; BAUER, F. F. **Wine flavor and aroma**. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., v. 38, p. 1145–1159, 2011.

SUMBY, K. M.; GRBIN, P. R.; JIRANEK, V. **Microbial modulation of aromatic esters in wine**: current knowledge and future prospects. Food Chem., v. 121, p. 1–16, 2010.

SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I. S. **Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor**. Australian Journal of Grape and Wine Research, n. 11, p. 139–173, 2005.

TAMANG, J. P.; FLEET, G. H. **Yeasts diversity in fermented foods and beverages**. In: SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. 1^a ed., Springer Netherlands, p. 169–198, 2009.

TAO, X.; ZHENG, D.; LIU, T.; WANG, P.; ZHAO, W.; ZHU, M.; JIANG, X.; ZHAO, Y.; WU, X. **A novel strategy to construct yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity fermentation**. PLoS ONE, v. 7, n. 2, e31235, 2012. Disponível em: <doi:10.1371/journal.pone.0031235>.

THOMSON, J. M.; GAUCHER, E. A.; BURGAN, M. F.; DE KEE, D. W.; LI, T.; ARIS, J. P.; BENNER, S. **Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast**. Nat. Genet., v. 37, p. 630–35, 2005.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. ***Saccharomyces Meyen ex Reess (1870)***. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts a Taxonomic Study*. 5^a ed. Elsevier, v. 2, p. 733–746, 2011.

VERDUYN, C.; ZOMERDIJK, T. P. L.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. **Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspension with an enzyme electrode**. Applied Microbiology Biotechnology, v. 19, p. 181–185, 1984.

WANG, S-A.; BAI, F-Y. ***Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 58, p. 510–514, 2008.

WU, H.; ITO, K.; SHIMOI, H. **Identification and characterization of a novel biotin biosynthesis gene in *Saccharomyces cerevisiae*.** Appl. Environ. Microbiol., v. 71, p. 6845–6855, 2005.

ZHENG, Y-L.; WANG, S-A. **Stress Tolerance Variations in *Saccharomyces cerevisiae* Strains from Diverse Ecological Sources and Geographical Locations.** PLoS ONE, v. 10, n. 8, e0133889, 2015.