

Inovações biotecnológicas nas leveduras e no processo fermentativo de cervejarias e vinícolas

RESUMO

Rui Rafael Faraco Giacomoni

rui-giacomoni@uergs.edu.br
orcid.org/0009-0006-9542-8094

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

Adriana Cibele de Mesquita Dantas

adriana-dantas@uergs.edu.br
orcid.org/0000-0003-3413-2821

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil

Com o avanço da biotecnologia e a compreensão dos benefícios que o homem tem com as leveduras, os estudos nesta área se intensificaram. Este trabalho propõe uma revisão sobre os fundamentos e as inovações biotecnológicas no uso de leveduras nos processos fermentativos nas cervejarias e vinícolas. Muitas inovações e aplicações estão sendo realizadas através do uso de ferramentas biotecnológicas em diversos estudos: a genética das leveduras e sua relação com a evolução da espécie, a diversidade de cepas associadas as melhorias nos processos fermentativos em diferentes regiões geográficas. O genoma sequenciado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, traz informações relevantes quanto a identificação de genes reguladores de vias metabólicas responsáveis por formar distintos aromas e sabores em bebidas fermentadas como a cerveja e o vinho. Dados com base molecular permitiu a identificação de genes da floculação em leveduras das cervejas e genes de interesse relacionados a compostos indesejáveis nos vinhos, dos quais foram desenvolvidas cepas recombinantes com tais características. Para a maior parte das modificações genéticas, além das alterações metabólicas introduzidas, não foi revelada nenhuma diferença significativa entre os vinhos produzidos com uma estirpe comercial e os vinhos produzidos com a correspondente estirpe modificada, em termos de características enológicas.

PALAVRAS-CHAVE: Levedura. Diversidade. Genoma. Cervejarias. Vinícolas.

INTRODUÇÃO

Muito antes que o homem entendesse a biologia, lidava com a biotecnologia no preparo de bebidas fermentadas a partir de cereais, na Babilônia e do Egito (8.000 a 6.000 anos a.C), da produção de pão no Egito (4.000 a.C) e da produção de vinhos na Grécia (2.000 a.C). Os povos dessa época não faziam ideia de que as leveduras fossem as responsáveis no processo de fermentação (PRETORIUS, 2016; SICARD e LEGRAS, 2011; STEENSELS e VERSTREPEN, 2014).

Os microrganismos foram descobertos em 1675 por Anton Van Leeuwenhoek e, Louis Pasteur descobriu a associação dos microrganismos com o processo de fermentação (PASTEUR, 1866; BARNETT, 2000; FALEIRO; ANDRADE; JUNIOR, 2011). As leveduras são fungos unicelulares, uma matéria prima primordial para produzir certos alimentos e bebidas nas quais o seu crescimento por brotamento ou fissão binária, produzem os alimentos mais consumidos no mundo, como os pães, vinhos, cervejas, queijos, entre outros (BORNEMAN e PRETORIUS, 2015; PRETORIUS; BOEKE, 2018).

A levedura *Saccharomyces* spp. é classificada dentro da divisão Ascomycota pelo critério da presença ou ausência da sexualidade, e a identificação das espécies são baseadas em características morfológicas, fisiológicas e moleculares (KURTZMAN *et al.*, 2011), apresentam grande diversidade genética, são aplicadas nos vários ramos da biotecnologia, devido, em grande parte, às propriedades fermentativas e enzimáticas (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Cepas de levedura de *S. cerevisiae* são utilizadas em processos fermentativos, devido seu curto período de replicação, sua facilidade de domesticação, alta eficiência de esporulação, baixa patogenicidade e pequeno tamanho do genoma (GALLONE *et al.*, 2018).

A elaboração de bebidas alcoólicas (destiladas ou não) envolve a fermentação, ou seja, a ativação de rotas bioquímicas específicas que permite a conversão de açúcares fermentáveis em álcool, bem como produzir elevado número de compostos bioativos que conferem aroma, sabor e cor específicas de cada tipo de bebida (CORBO *et al.*, 2014; STEENSELS e VERSTREPEN, 2014). O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica que compreendesse os fundamentos e aplicações de ferramentas biotecnológicas em leveduras em processos fermentativos para uso nas cervejarias e vinícolas.

METODOLOGIA

A pesquisa bibliográfica teve por base artigos de revisão e estudos experimentais publicados, relacionados com o tema deste trabalho, periódicos nacionais e internacionais bem como dissertações e teses limitando-se à busca por textos escritos em inglês, espanhol e português pela pesquisa em bases de dados eletrônicas, dentre as quais estão a *Scientific Eletronic Library Online* (SciELO) e Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde (LILACS), PubMed, *Science Direct*, *Google Scholar* e *NCBI*. Utilizaram-se ainda livros e sites oficiais sobre leis nacionais e internacionais. Para levantamento bibliográfico foram utilizados os uni termos e termos combinados como palavras-chaves: *Saccharomyces* spp., leveduras, bioquímica, genoma, genética, tecnologia de DNA recombinante, cerveja e vinhos. O período de buscas foi realizado no período de julho de 2021 até dezembro de 2023. As publicações foram limitadas nos últimos 5 anos, no entanto, algumas citações mais antigas se fizeram necessárias para o bom entendimento histórico relevante sobre os temas pesquisados.

LEVEDURAS E SUA DIVERSIDADE DE GÊNEROS E ESPÉCIES

As leveduras fazem parte do Reino Fungi, mas se diferenciam de outros fungos por serem unicelulares, reproduzem-se de forma assexuada por brotamento ou gemulação, crescem e se reproduzem mais rápido que os bolores, devido a sua maior relação área/volume. O gênero *Saccharomyces* sp. apresenta células elípticas que medem de 6 a 8 μm de comprimento por 5 μm de largura (DUJON, 2010).

O processo de brotamento, o núcleo se divide por constrição e uma porção dele penetra no broto juntamente com outras organelas. O nível de ploidias na proliferação assexuada foram conservados ao longo de 2 bilhões de gerações, apresentam no modo vegetativo e alternância entre a fase haploide (um conjunto de cromossomos) e a fase diploide (dois conjuntos de cromossomos) (SILVA, 2019).

O conhecimento do nível de ploidia impacta na evolução do genoma, na hereditariedade de seu parente selvagem mais próximo *S. paradoxus* e no genótipo de *S. cerevisiae* (ZÖRGÖ *et al.*, 2013). A perda de diversidade de cepas de *Saccharomyces* utilizadas na produção de vinho e cerveja tem ocorrido por

fenômenos genéticos tais como, poliploidia, mutações por deleções, transferência horizontal de genes e/ou rearranjos cromossômicos em (DELOBEL e TESNIÈRE, 2014).

Estudos tradicionais na identificação de linhagens das espécies de *Saccharomyces* são pouco confiáveis, demorados, inadequados para identificação de leveduras (NAUMOV; LEE; NAUMOVA, 2013; CARON *et al.*, 2009). No entanto, estudos de compatibilidade vegetativa e da capacidade da levedura usar uma variedade de fontes de carbono, são imprescindíveis para conhecer a sua diversidade e seletividade nutricional em cada habitat (AZHAR *et al.*, 2017).

A taxonomia das espécies e gêneros tem sido realizadas a partir de um conjunto de dados: genômicos, genotípicos, fenotípicos e ecológicos (HYMA e FAY, 2013; BORNEMAN e PRETORIUS, 2015). A diversidade genômica de linhagens de leveduras são utilizadas para determinar a relação de genomas com genes sistêmicos e conservados, assim como o posicionamento dos genes responsáveis pela fermentação no cromossomo (BISSON, 2012).

As linhagens de *S. cerevisiae* que são utilizadas milenarmente em usos tecnológicos são denominadas linhagens domesticadas (LIBKIND *et al.*, 2011). 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 uva (vinho), arroz (saquê) e cevada (cerveja), por exemplo. Cerca de 80% das leveduras selvagens pertence ao gênero *Saccharomyces cerevisiae* se originam em diferentes fontes (LITI, 2015 LEUTERT *et al.*, 2023).

Cepas de leveduras industriais têm a sua diversidade genética e fenotípica de cepas selvagens, ou seja, alguns microrganismos ancestrais que se adaptaram à habitats artificiais, um processo conhecido como domesticação. A domesticação controlada de cepas selvagens gera novas cepas com características melhoradas que lhes permitam sobreviver em ambientes artificiais (GALLONE *et al.*, 2018).

Dados obtidos através do sequenciamento do genoma de isolados diploides de *S. cerevisiae*, revelou-se um nível de heterozigosidade maior do que o inicialmente considerado em isolados domesticados. Os altos níveis de

heterozigidade refletem mistura populacional devido à domesticação e devido o autobenefício que ocorre durante raros ciclos sexuais. Esses efeitos facilitam a rápida adaptação a novos ambientes, aumentando a diversidade genética e fenotípica na população derivada de um único isolado (MAGWENE, 2014).

Estudos da diversidade genética entre 651 variedades de leveduras de vinho oriundas de 56 origens geográficas em todo o mundo, incluem no gênero *Saccharomyces*, as espécies: *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* (VAUGHAN-MARTINI e MARTINI, 2011).

Estima-se que o processo de especiação em *Saccharomyces* começou com uma duplicação do genoma inteiro (WGD) evento que remonta a ~100 milhões de anos atrás (BELDA *et al.*, 2016). A seleção natural ocorreu durante várias intervenções antropogênicas e moldaram os genomas de espécies de *Saccharomyces* numa gama diversificada envolvidas nos processos de fermentação (PETER *et al.*, 2018).

No entanto, não só gênero *Saccharomyces* é o personagem principal na fermentação de bebidas, mas outras leveduras também têm papel importante nas indústrias biotecnológicas. Estudos com 120 leveduras selvagens isoladas e propagadas a partir de cervejas, mostraram que, além de várias espécies de *Saccharomyces*, foram encontradas em diferentes espécies dos gêneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces* (ALMEIDA e SILVA, 2005; KROGERUS *et al.*, 2017).

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E ESTUDOS MOLECULARES NAS LEVEDURAS

As características que fazem desta levedura um modelo de estudos incluem sua reprodução em curto tempo (90 min sob condições ótimas de crescimento); cultivo simples de haploides, diploides e poliploides em meios definidos; eficiência da esporulação e eficiência na hibridização cruzada com acasalamento entre dois tipos de opostos; facilidade de isolamento e de mapeamento de mutantes; eficácia na transformação genética, na manutenção de múltiplas cópias de plasmídeos circulares, bem como a integração cromossômica através de homólogos na

recombinação; tamanho relativamente pequeno do genoma; e disponibilidade de bibliotecas de genes baseadas em chips (PRETÓRIUS, 2017a).

Algumas cepas comerciais de *S. cerevisiae* são inadequadas na introdução de novas características às bebidas alcoólicas, enfatizando a necessidade de uma indústria de microrganismos aprimorados, ou seja, modificados. A exploração de leveduras selvagens tem sido utilizada nos processos de produção e para tanto é necessário obter amostras autóctones de espécies comestíveis e não comestíveis (MAPELLI-BRAHM *et al.*, 2020).

Trabalhos pioneiros de Øjvind Winge (1930), Carl e Gertrude Lindgren (1940 e 1950), Robert Mortimer (1960 e 1970), e seus colaboradores, culminou no desenvolvimento do primeiro mapa cromossômico (décadas de 1970 e 1980) realizado a partir de uma levedura haploide chamada 'S288C. O mapa cromossômico final tem 16 cromossomos lineares, variando de ~200 a ~2000 kb. Ter um mapa do cromossomo abrangente despertou o interesse de biólogos moleculares para utilizar este eucarioto como modelo experimental para clonagem de genes e sequenciamento do genoma (DIXON e PRETORIUS, 2020).

A sequência do genoma de *S. cerevisiae* foi realizada através de um consórcio internacional com 94 laboratórios em 19 países, utilizando de modernas tecnologias de sequenciamento (GOFFEAU *et al.*, 1996; OLIVER, 1996). A manutenção e a anotação desta sequência genômica estão disponíveis no Banco de Dados Genômicos (SGD; www.syntheticyeast.org), servem como referência de *S. cerevisiae* para pesquisa genômica em outros tipos de leveduras com tamanho total do genoma 12,07 Mb de DNA nuclear, 85 kb de DNA mitocondrial e 6,3 kb de DNA plasmidial. O genoma carrega 428 genes de RNA total e 280 genes (RNAm) (www.yeastgenome.org) (PETER *et al.*, 2018).

O monitoramento da contribuição de cada espécie ou população, tanto em microbiologia industrial quanto em estudos de diversidade de leveduras, envolve estudos na genética molecular de leveduras em de culturas crescimento para manipulação genética de cepas industriais. A exemplo, transformação genética em levedura cervejeira foi realizada com a introdução do gene maltose-permease, *glucoamylase* em *S. cerevisiae var. Diastaticus* e a introdução de genes de floculação de levedura (*FLO1*), acetolactato bacteriano descarboxilase (*ALDC*) para contornar a formação diacetil (ZHOU *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, os métodos moleculares foram incluídos como parte de uma identificação rápida e confiável em leveduras, permitindo, assim, a investigação de muitas espécies em um período muito mais curto. Os métodos fundamentados em ferramentas moleculares à base de PCR e relacionados a sequenciamento de DNA são os mais comuns devido à sua confiabilidade, e são aplicados com sucesso para diferenciação de espécies, bem como para identificação de leveduras (GABEL, 2019).

Combinando genômica funcional com proteômica, fenótipos moleculares na levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser atribuído à escala do genoma e ao nível dos sistemas que revelam princípios de como função gênica relaciona-se com proteína expressão. Entender como o genótipo leva ao fenótipo é crucial para biologia molecular, biotecnologia e prever o fenótipo de um mutante requer conhecimento das respostas e funções da rede de proteínas (BENSIMON; HECK; AEBERSOLD, 2012). No entanto, muitas proteínas ainda carecem de anotação funcional. A genômica funcional, auxiliada pela edição do genoma, tem de tornar-se uma ferramenta essencial para estudar a função de proteínas e variações genéticas. A coleção de cepas de *S. cerevisiae* foi pioneira em experimentos genômicos funcionais (GIAEVER e NISLOW, 2014), possibilitando o estudo de interações genéticas de metabólitos de importância, integrando a deleção sistemática de genes, transcriptômica e metabolômica, fornecendo informações baseadas em suas relações moleculares.

O impacto de variações genéticas sistemáticas sobre o proteoma permanece menos bem compreendido. Até pouco tempo atrás, era desafiador aplicar tecnologias de proteoma em escala genômica ampla. No entanto, análise de proteomas tem sido realizado em coleções específicas de cepas de *S. cerevisiae*, focadas na função mitocondrial, quinases ou enzimas metabólicas (MESSNER *et al.*, 2023).

PRODUTOS METABÓLITOS PRODUZIDOS PELAS LEVEDURAS

O gênero *Saccharomyces* tem sido modelo de estudo na biotecnologia moderna (ONYEMA *et al.*, 2023), sua aplicação nos processos de fermentação modificam a síntese de biocompostos, uma vez que, as leveduras produzem

enzimas extracelulares (ADEBO e MEDINA-MEZA, 2020; MAPELLI-BRAHM *et al.*, 2020).

No metabolismo da glicose, via glicolítica, ocorre uma interação entre genes, enzimas e elementos inorgânicos envolvidos nas principais reações de fermentação. A disponibilidade de açúcares e aminoácidos na levedura influenciam na formação do sabor, que desempenham um importante papel no processo de fermentação devido sua atuação como cofatores enzimáticos (LIU; HUANG; GENG, 2018), assim como, as condições ambientais e a disponibilidade de nutrientes. Quando as condições favorecem o crescimento, o piruvato produzido na glicólise ainda contém bastante poder redutor aproveitado pela célula no ciclo de Krebs. Em primeiro lugar, o piruvato é utilizado para produzir acetil-CoA, que é uma forma ativada de acetato (CH_3COO^-) que leva à formação de compostos sensoriais e diferentes sabores derivados de levedura. Na fermentação, substâncias de aroma ativo são produzidos pelas células das leveduras presentes (SAERENS; DUONG; NEVOIGT, 2010).

A qualidade da cerveja está diretamente relacionada com a etapa da fermentação (SILVA, 2019). A produção de concentrações equilibradas de compostos secundários desejáveis, como os alcoóis superiores e seus ésteres, e as baixas concentrações de compostos indesejáveis, como o diacetil, o sulfeto de hidrogênio e o dimetil sulfeto, influenciam diretamente no sabor e aroma, contribuindo para a obtenção de um produto de qualidade (MOURET *et al.*, 2015).

O acetaldeído é um dos principais compostos carbonílicos produzidos durante a fermentação alcoólica. No citoplasma, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído e CO_2 . Em seguida, o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. Por outro lado, o piruvato também pode ser convertido em ácido acético e, posteriormente, a acetil-CoA (PIŠKUR e COMPAGNO, 2014). Geralmente, altas concentrações de acetaldeído em cervejas estão associadas com aroma de maçãs verdes ou grama recém cortada e a enzima aldeído desidrogenase (ALDH) é uma das enzimas chave em seu metabolismo. Parte do acetaldeído produzido durante a fermentação é metabolizado pelas leveduras durante a maturação da cerveja (SHEN *et al.*, 2014).

Os compostos traços de ésteres voláteis em bebidas fermentadas compreendem o conjunto mais importante de compostos de aroma ativo

derivados de levedura. Estes compostos de aroma denominado “*yeast-bouquet*” são metabólitos secundários produzidos por inúmeras espécies de leveduras, representados, principalmente por ésteres acetato, ésteres etílicos, álcoois superiores, carbonilas e ácidos graxos voláteis (CORDENTE *et al.*, 2012).

Leveduras selvagens tem sido isolada e estudada para incrementar o sabor natural de bebidas fermentadas. Em cervejas, o sabor é diferenciado na realização de uma fermentação mista utilizando leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae/pastorianus* (IATTICI; CATALLO; SOLIERI, 2020). Um total de 60 cepas pertencentes aos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Wickerhamomyces* foram avaliados na produção de álcoois e ésteres aromáticos em comparação com uma estirpe de levedura Lager de referência (NEDOVIĆ *et al.*, 2015).

Quantidades maiores dos álcoois superiores e ésteres voláteis responsáveis pelo sabor e aroma floral e frutado são altamente desejados nas bebidas fermentadas. As concentrações típicas de álcoois superiores na cerveja estão na faixa de 100-200 mg.L⁻¹ e no vinho na faixa de 2-44 mg.L⁻¹ (VIDAL *et al.*, 2013; ROBINSON *et al.*, 2014).

Compreender a bioquímica dos ésteres voláteis é, portanto, de considerável importância para definir a qualidade sensorial das bebidas, como a presença de acetato e dos ésteres etílicos, na produção de aromas frutados e florais (OLIVEIRA *et al.*, 2022). As leveduras são essenciais para muitos processos biotecnológicos, com uma complexidade de redes regulatórias na expressão gênica de fermentações alcoólicas (DZIALO *et al.*, 2017).

Combinando princípios de engenharia genética e bioquímica, é possível melhorar o rendimento destes compostos aromáticos e de sabores através da construção de vias metabólicas em cepas de leveduras nativas ou modificadas (VAN WYK; KROUKAMP; PRETORIUS, 2018).

Em *S. cerevisiae*, a produção de ésteres acetato ocorre através da expressão do gene *EST2* na síntese de duas enzimas, a enzima álcool acetil transferase (*ATF1*) e a enzima éster sintase, as quais a esterase hidrolisa a quantidade de ésteres acumulados no meio fermentativo (VAN WYK *et al.*, 2019). Várias enzimas estão envolvidas na formação de ésteres, mas as mais conhecidas são a AATase e

AATaseII (EC 2.3.1.84), que são codificadas pelos genes *ATF1* e *ATF2*, respectivamente (VAN WYK *et al.*, 2020; VAN WYK *et al.*, 2021).

A maior proporção na produção destes ésteres em cervejas permanece dentro das células de leveduras Lager quando fermentadas por *S. pastorianus*, *S. carlsbergensis* e *S. uvarum*. Em leveduras Ale fermentadas pela *S. cerevisiae*, o que explica a combinação de sabores mais complexos em cervejas. A escolha da levedura pode determinar o sabor da cerveja, ou seja, uma das principais diferenças entre os diversos estilos de cerveja é o tipo de levedura utilizada (SILVA-FILHO *et al.*, 2005).

INOVAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS EM LEVEDURAS NAS CERVEJARIAS

As cervejas são classificadas pelo teor de álcool e extrato pelo malte ou de acordo com o tipo de fermentação. As cervejas de alta fermentação são aquelas cujas leveduras (cepas Ale) são ativas em temperatura de 20 °C a 25 °C e pH entre 4,1 e 4,2, estas flutuam após fermentação do mosto, gerando um produto de cor cobre avermelhada, sabor forte, ligeiramente ácido e com teor alcoólico entre 4% e 8% (as alemãs, por exemplo). Cervejas de baixa fermentação, ou seja, quando expostas a temperaturas entre 9 °C e 14 °C, pH 3,8, o levedo (cepas Lager) fica depositado no fundo do tanque (OLIVEIRA *et al.*, 2022). As leveduras mais utilizadas em cervejaria são de duas espécies do gênero *Saccharomyces*: *Saccharomyces cerevisiae* (alta fermentação) e *Saccharomyces uvarum* (baixa fermentação) (DRAGONE e ALMEIDA E SILVA, 2010).

A floculação é uma propriedade das leveduras formarem flocos, como agregados como parte fundamental no processo de separação da biomassa/cerveja pronta. As tipo Ale formam flocos que ficam mais na superfície do fermentador, as do tipo Lager formam flocos que sedimentam e ficam alojadas no fundo do fermentador. Isso decorre devido as interações entre as proteínas de superfície de uma célula e os receptores glicídicos de outra célula (MESSNER *et al.*, 2023). As cepas de alta fermentação, incapazes de flocular e subindo para o topo das dornas de fermentação, o que permite a classificação das leveduras dos agentes que inibem a sua floculação.

Componentes proteicos como lectina em excesso interrompem a floculação assim como alguns açúcares simples podem prevenir ou reverter a floculação (VERSTREPEN *et al.*, 2003). A floculação é um processo complexo que envolve a expressão de genes específicos como *FLO1*, *FLO5*, *FLO8* e *FLO11*, sendo a sua transcrição relacionada também aos fatores externos como nutrientes presentes no meio, estresse, pH, oxigênio e temperatura. Está diretamente relacionada com a composição ou morfologia das células (FIGUEIREDO, 2016).

Essa distinção foi caracterizada fenotipicamente, fenótipo *FLO1* não flocula na presença de manose, fenótipo *NewFLO* não flocula na presença de manose, sacarose, glicose e maltose e o fenótipo *M1* floculam tanto na presença de manose quanto sacarose, mas não na ausência de etanol. Estas cepas são do tipo Ale que possuem envelopes celulares altamente hidrofóbicos, o que é importante na formação de flocos. Fenótipo *FLO1* e *NewFLO* usam interações entre proteínas tipo lecitinas e mananas da superfície celular e necessitam de Ca^{2+} para que ocorra a floculação. A ausência deste íon previne a floculação assim como não flocula na presença de manose enquanto a presença de sacarose, glicose e maltose (GIBSON e LITI, 2015; SIM *et al.*, 2013).

Os grandes fabricantes têm sua própria cepa de levedura que coevoluem com o estilo de cerveja que se fabrica, ou seja, se adaptam a condições específicas de fabricação. Dois fabricantes produzindo o mesmo estilo de cerveja, com a mesma cepa de levedura, em diferentes formas de cultivo e crescimento das leveduras, e produzirão cervejas diferentes e únicas. As principais tendências de inovação para expandir o portfólio de starters de cerveja, inclui: i) a imitação de leveduras Lager através da criação de híbridos sintéticos entre *S. cerevisiae* e cepas não-*cerevisiae* tolerantes ao frio; ii) estudos das técnicas de engenharia evolutiva para melhorar o desempenho fermentativo no mosto e melhorar o sabor; iii) procura de novas cepas com performantes de *S. cerevisiae* provenientes de biofermentadores; iv) a utilização de leveduras não-*S. cerevisiae* como agentes aromatizantes (HU *et al.*, 2018c).

Com sequenciamento de próxima geração, o número de genomas de cerveja Lager analisados aumentaram e muitos traços fenotípicos e seus genes ligados e fenótipos industriais fornecem novos insights sobre como as leveduras cervejeiras evoluíram, quais os principais eventos de domesticação de leveduras de cerveja e

diferencialmente adaptadas a nichos industriais específicos, muito útil na compreensão de assinaturas genéticas em cervejas (GIBSON *et al.*, 2017).

Acredita-se que *S. eubayanus* seja proveniente da Patagônia, e foi levada para Europa, a bordo de navios, sendo responsável pela porção “não-*cerevisiae*” da espécie *S. pastorianus* (BOKULICH e BAMFORTH, 2013). Dessa maneira, o híbrido gerado apresentou vantagens em relação às cepas parentais. Dentre as vantagens podemos citar a fermentação dos açúcares maltose e maltotriose, provenientes da espécie *S. cerevisiae* (GIBSON e LITI, 2015) e a capacidade de fermentação em baixas temperaturas, herança da *S. eubayanus*, permitindo produção de cerveja nos meses frios do ano (LIBKIND *et al.*, 2011).

Análises filogenéticas indicaram que esses isolados pertencem a subpopulações distintas daquelas provenientes da Patagônia e com maior grau de similaridade quando comparado à porção “não-*cerevisiae*” de *S. pastorianus*. Esta espécie possui duas linhagens, conhecidas como Saaz e Frohberg, as quais diferem quanto às sequências do genoma e níveis de ploidia. Essas duas linhagens de cepas foram isoladas no final do século XIX por Paul Lindner e inicialmente utilizadas nas regiões da Bohemia e Alemanha (GIBSON e LITI, 2015). A linhagem denominada Saaz, referenciada como grupo 1, foi amplamente utilizada na República Checa e na cervejaria Carlsberg, na Dinamarca. A linhagem Frohberg (grupo 2), foi utilizada na Holanda e Dinamarca (GIBSON e LITI, 2015).

Estudos de genômica comparativa demonstraram que a maioria das cepas de *S. cerevisiae* Ale são geneticamente distintas dos selvagens, agrupadas em duas linhagens independentes: *Beer1*, que consiste em três cepas separadas Bélgica/Alemanha, Grã-Bretanha e Estados Unidos; *Beer2*, que contém leveduras originárias da Bélgica, do Reino Unido, dos Estados Unidos, da Alemanha e Europa Oriental (GALLONE *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Geralmente, as cepas de cerveja exibem variações em larga escala na estrutura do genoma, incluindo alterações na ploidia e grandes duplicações segmentares ou variações no número de cópias. A maioria das pequenas variações estruturais do genoma, são comumente localizadas em regiões entre uma cepa de *S. cerevisiae* e uma cepa *S. bayanus* (WILLAERT, 2020).

Estudos com 120 leveduras selvagens isoladas a partir da cerveja, que, além de várias espécies de *Saccharomyces*, são encontradas espécies dos gêneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (ALMEIDA e SILVA, 2005).

A descoberta da origem de algumas cepas como sendo híbridas de leveduras gerou subsídios para recriação dessas espécies em laboratório, tornando-se uma importante ferramenta biotecnológica na construção de cepas cervejeiras alternativas que não são geneticamente modificadas (OGM) (KROGERUS *et al.*, 2017). Além disso, auxiliou na compreensão das complexas origens evolutivas de diferentes espécies cervejeiras.

Avanços importantes foram usando a tecnologia de DNA recombinante em diferentes estratégias de transformação da levedura, têm aberto a possibilidade do uso das leveduras recombinantes que: fermentam uma ampla variedade de açúcares; floculam apropriadamente e em tempos curtos de fermentação; toleram melhor o stress químico e físico, causado pela fermentação e produzem uma cerveja mais estável e saborosa (WALKER, 2000).

A partir desses estudos, foram geradas novas cepas de *S. pastorianus* que têm como características alta atenuação, tolerância aos diferentes estresses fermentativos e melhor performance fermentativa quando comparadas às cepas empregadas na indústria atualmente (MERTENS *et al.*, 2015). Para a construção de cepas híbridas em laboratório utilizam-se técnicas moleculares para obtenção de organismos geneticamente modificados (OGMs). A introdução de modificações genéticas por meio de técnicas de biologia molecular (deleção ou introdução de genes) para construção de cepas melhoradas é outra estratégia que, embora seja permitida em alguns países, não apresenta uma boa aceitação pelos consumidores (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ; ÚBEDA; BRIONES, 2015).

As leveduras geneticamente modificadas têm sido desenvolvidas com a finalidade de: a) manter a concentração de diacetil em valores inferiores quanto a detecção sensorial, b) facilitar a filtração da cerveja, e c) produzir cervejas com baixos teores de carboidratos (CARVALHO *et al.*, 2006). Entretanto, a legislação vigente não permite a utilização de tais organismos na indústria cervejeira e, além disso, há uma baixa aceitação de OGMs por parte da população consumidora (SAERENS; DUONG; NEVOIGT, 2010; RICE, 2019). Desta forma, técnicas

alternativas para geração de cepas híbridas que não envolvam a engenharia genética para o desenvolvimento de híbridos têm sido valiosas, tanto para a indústria cervejeira quanto para a aceitação do público. Destacam-se os métodos de hibridização interespecífica por formação de esporos e hibridização rara (KROGERUS *et al.*, 2017).

INOVAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS EM LEVEDURAS NA VINIFICAÇÃO

A fermentação da uva é conduzida principalmente por leveduras. *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura dominante usada em processo de vinificação, que pode converter açúcar em álcool bem adaptada as condições enológicas (LIN *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2018a). No entanto, cerca de 100 gêneros de leveduras existentes, aproximadamente vinte são relevantes ao processo de vinificação: *Brettanomyces* sp. e seu equivalente sexual *Dekkera* sp., *Candida* sp., *Citeromyces* sp., *Cryptococcus* sp., *Debaryomyces* sp., *Hanseniaspora* e seu equivalente assexuado *Kloeckera* sp., *Issatchenkia* sp., *Kluyveromyces* sp., *Lodderomyces* sp., *Metschnikowia* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces* sp., *Saccharomycodes* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Torulaspora* sp., *Zygoascus* sp. e *Zygosaccharomyces* sp. (BARNETT *et al.*, 2000; PRETORIUS, 2000).

Na última década, inúmeros estudos em leveduras de vinho foram realizados, sequenciamento multigênico (STEFANINI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012), análise de microssatélites (LEGRAS *et al.*, 2007), sequenciamento de genoma completo (LITI *et al.*, 2009) ou sequenciamento associado ao local de restrição (Rad-seq) (CROMIE *et al.*, 2013) têm fornecido uma visão profunda da estrutura populacional desta levedura.

Cepas domesticadas de *S. cerevisiae* utilizadas para a produção de vinhos, foram derivados da população natural através de eventos de domesticação independentes (FAY e BENAVIDES, 2005; LEGRAS *et al.*, 2014). Isolados de *S. cerevisiae* foram agrupadas em cinco linhagens distintas, com base na sua origem tecnológica e geográfica, são elas: África Ocidental, Malásia, Norte Americana e Europeia. Muitas cepas com genomas resultantes de cruzamentos entre linhagens também foram identificadas e demonstraram que as sequências de *S. paradoxus* diferem por seis genes agrupados em três subtipos correlacionados com a origem geográfica (LITI *et al.*, 2009; SCHACHERER *et al.*, 2009; ZÖRGÖ *et al.*, 2013).

Os genomas de outras linhagens do gênero *Saccharomyces* obtidas de diversos nichos ecológicos, mostram novos discernimentos sobre a origem da linhagem moderna do vinho, bem como a evolução de seus fenótipos e sua diversidade genética (SALINAS *et al.*, 2012; BISSON, 2012). Os vinhedos proporcionam um ambiente físico nas superfícies da baga da uva, estabelecendo comunidades microbianas complexas compreendendo leveduras, bactérias e fungos filamentosos (WANG e LIU, 2013).

Para avaliar sua confiabilidade na discriminação de diferentes espécies de leveduras e agrupamento de isolados pertencentes à mesma espécie, técnica de impressão digital (*fingerprinting*) tem sido utilizada. Em leveduras isoladas de vinhos engarrafados (amostra de "menor diversidade") e em leveduras isoladas dos ambientes vinícolas e de vinhedos (amostra de "maior diversidade"), foram observadas uma alta variabilidade intra e interespecífica nos perfis de impressões digitais, com *clusters* compostos por isolados pertencentes a diferentes gêneros e espécies (MENDES, 2015).

Na indústria do vinho, as composições de espécies dessas comunidades são de significativa importância, presentes no processo de fermentação e nas propriedades aromáticas do vinho. A seleção das leveduras para modular o sabor e a cor em vinhos ocorrem através do monitoramento dos compostos bioquímicos durante a fermentação alcoólica do vinho, produzidas por múltiplas combinações de cepas de *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* (NSYs) (HU *et al.*, 2018b).

Os fenóis voláteis são um grupo de compostos que podem estar presentes em vinhos exercendo uma forte influência no seu aroma. Destacam-se neste grupo o 4-etil-fenol e o 4-etil-guaiacol, em vinhos tintos, e o 4-venil-fenol e 4-vinil-guaiacol em vinhos brancos. Estes compostos quando presentes em baixíssimas concentrações não prejudicam significativamente os aromas dos vinhos. No entanto, a medida que a concentração aumenta, sobretudo do 4-etil-fenol, começam a ser perceptíveis aromas que rapidamente levam a depreciação dos vinhos, provocando consequentemente perdas econômicas significativas aos produtores. O aparecimento destes compostos em elevadas concentrações resulta da atividade metabólica de estirpes de leveduras do gênero *Dekkera/Bretanomyces* (Rebelo *et al.*, 2003).

Tem sido relatada, que a distribuição geográfica de linhagens de *S. cerevisiae* nas diferentes regiões vitivinícolas, apresentam diferentes composições da microflora em diferentes vinhedos (SETATI *et al.*, 2012). Durante fermentação alcoólica, distintas cepas de *S. cerevisiae* sintetizam vários compostos de aroma, os quais influenciam na qualidade organoléptica dos vinhos. Isolados de 22 espécies em vinhedos foram sequenciadas, identificando 106 linhagens agrupadas de acordo com o perfil de compostos voláteis obtidos de interesse enológico (MENDES, 2015).

As modificações introduzidas não devem alterar as características essenciais da atividade do hospedeiro no processo de fermentação. Para a maior parte das modificações genéticas, além das alterações metabólicas introduzidas não foi revelada nenhuma diferença significativa entre os vinhos produzidos com uma estirpe comercial e os vinhos produzidos com a correspondente estirpe modificada, em termos de características enológicas (YIN *et al.*, 2020).

A compreensão do processo de expressão dos genes de fermentação do vinho contribuirá para o conhecimento da composição genética das estirpes de leveduras comerciais e influenciará o melhoramento das estirpes enológicas através da engenharia genética (VILANOVA *et al.*, 2012).

A manipulação dos genes de levedura, seja modulando sua expressão, removendo-os geneticamente ou mutando aminoácidos importantes, desempenhou um papel crucial em nossa compreensão atual da função desses genes em leveduras – especialmente em um contexto de vinificação. O termo "auto clonado" pode ser aplicado a uma levedura geneticamente modificada (LGM) quando pouco ou nenhum DNA estranho está presente, melhorado pela edição do genoma baseada em CRISPR/Cas9, já demonstrado em leveduras de vinho (VAN WYK *et al.*, 2020; VIGENTINI *et al.*, 2017).

Duas cepas de leveduras de vinhogeneticamente modificadas, são registradas e aprovadas para uso comercial pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América. A principal levedura geneticamente modificada *ML01* contém dois genes heterólogos: um gene de conversão maloláctico de *Oenococcus oeni* e um gene de transporte de malato de *Schizosaccharomyces pombe*. Essa manipulação permitiu que a levedura efetivamente transportasse malato e o

convertesse em lactato. Este foi um passo revolucionário na vinificação (MUYSSON *et al.*, 2019).

Pela primeira vez, a levedura *S. cerevisiae* pode ser usada para fermentação maloláctica significativa e, subsequentemente, eliminar a necessidade de bactérias ácido-lácticas. Isso simplificou o processo de vinificação, já que a conversão de malato em lactato por bactérias é frequentemente prejudicada por resultados imprevisíveis. Além disso, as aminas biológicas, como a histamina, liberadas pela bactérias ácido-lácticas estão presentes no produto do vinho, ao qual alguns indivíduos podem ter uma reação, como dor de cabeça. O *ML01* é permitido para vinificação comercial desde 2003 nos EUA e 2006 no Canadá, sendo a Moldávia o único país que permite seu uso na Europa com métodos baseados em qPCR sendo desenvolvidos para detectar sua presença (VAUDANO; COSTANTINI; GARCIA-MORUNO, 2016).

A segunda cepa autorizada (*ECMo01*) degrada consistentemente a ureia, que pode reagir espontaneamente com etanol dentro das fermentações do vinho para formar carbamato de etila, um carcinogênico para os seres humanos. A cepa *ECMo01* é uma cepa auto clonada contendo uma cópia adicional do gene da ureia amidolyase *DUR1,2* que catalisa a hidrólise da ureia e produzir menos carbamato de etila no vinho (COULON *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2023).

O uso mais amplo de levedura de vinho transgênica tem sido um tópico controverso de discussão. Há também tentativas vigorosas de desenvolver novas linhagens usando técnicas de melhoramento especificamente para evitar abordagens de LGM (VAN WYK *et al.*, 2019). Embora a literatura forneça um argumento convincente para mais ensaios em larga escala, ainda há um sentimento geral negativo do público em relação à implementação de qualquer tipo de modificação genética na vinificação (PÉREZ-TORRADO; QUEROL; GUILLAMÓN, 2015).

CONCLUSÕES

A biotecnologia incorpora, um âmbito maior que econômico, de cunho inovador para soluções e inovações no uso de leveduras na fermentação. O emprego de uma determinada linhagem vai depender dessas análises conjuntas,

auxiliando na identificação de substâncias metabólicas capazes de conferir aroma e sabor diferentes.

S. cerevisiae é considerado um organismo modelo eucariótico para estudos de pesquisa e acadêmicos, bem como sua aplicação no uso de bebidas fermentadas produzidas nas indústrias cervejeira e de vinificação. A análise da variabilidade genética entre espécies tem sido inovadora quando se considera o conhecimento da dinâmica de comunidades e de populações de leveduras tanto na indústria como na microbiota ambiental. Para tanto, é necessário isolamento de microrganismos silvestres em diferentes ambientes ecológicos, para que sejam utilizados em processos biotecnológicos, seja por suas enzimas e/ou pelos genes que as tornam potencialmente aplicáveis em diferentes processos industriais.

Sem dúvida, um dos maiores avanços na pesquisa de leveduras foi o sequenciamento do genoma, uma ferramenta poderosa para análise de molecular em estudar a expressão gênica e de metabólitos que podem ser utilizadas numa escala de produção fermentativa. As leveduras que compõem a microbiota natural das diversas regiões produtoras estão correlacionadas com a evolução no processo fermentativo, em termos de rendimento na fermentação e na formação de compostos secundários que definem aroma e sabor específicos e distintos que qualificam o produto. Isso implica distribuição geográfica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes regiões vitivinícolas e sua composição da microflora em diferentes vinhedos.

Muitos genes estranhos ou recombinantes foram expressos em leveduras de vinho e cerveja e posteriormente foram usados para fazer essas bebidas em escala de laboratório. Estas abordagens mais, demonstraram que as alterações introduzidas não originam efeitos colaterais inesperados ou adversos, como por exemplo a produção de substâncias tóxicas. No futuro, estirpes específicas poderão servir de reserva genética natural em programas de melhoramento de leveduras, desde que a ligação entre os fenótipos observados e a análise da expressão global revele informações úteis.

Embora a maioria dos esforços se concentre em melhorar ou diversificar a composição do aroma, alguns casos também abordaram outras questões enológicas, como contaminação ou acidez. A segurança alimentar de um alimento derivado de um OGM deve ser avaliada por comparação com o alimento mais

próximo cujo consumo, historicamente, é tido por seguro, devendo detectar compostos toxicológicos, analíticos e nutricionais mais aprofundadas.

Biotechnological innovations in yeast and the fermentation process in breweries and wineries

RESUMO

With the advancement of biotechnology and the understanding of the benefits that man has with yeast, studies in this area have intensified. This work proposes a review of the fundamentals and biotechnological innovations in the use of yeast in fermentation processes in breweries and wineries. Many innovations and applications are being carried out using biotechnological tools in several studies: the genetics of yeasts and their relationship with the evolution of the species, the diversity of strains associated with improvements in fermentation processes in different geographic regions. The sequenced genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* provides relevant information regarding the identification of regulatory genes of metabolic pathways responsible for forming different aromas and flavors in fermented beverages such as beer and wine. Molecular-based data allowed the identification of flocculation genes in beer yeasts and genes of interest related to compounds prepared in wines, from which recombinant strains with such characteristics were developed. For most genetic modifications, apart from metabolic alterations, no significant difference was revealed between wines produced with a commercial strain and wines produced with the corresponding modified strain, in terms of oenological characteristics.

KEYWORDS: Yeast. Diversity. Genome. Breweries. Wineries.

REFERÊNCIAS

ADEBO, O. A.; MEDINA-MEZA, I. G. Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: a mini review. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 927, 2020.
<http://doi.org/10.3390/molecules25040927>.

ALMEIDA E SILVA, J. B. C. *In*: Venturini Filho, G. W. **Tecnologia de Bebidas**. São Paulo: Edgar Blucher, v. 1, p. 347-380, 2005.

AZHAR, S. H. M. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. **Biochemistry And Biophysics Reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.
<http://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 755-771, 2000.
[https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<755::AID-YEA587>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<755::AID-YEA587>3.0.CO;2-4).

BELDA, I. *et al.* Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β -lyase activity. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 225, p. 1-8, 2016.
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.001>.

BENSIMON, A.; HECK, A. J.R.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry–Based Proteomics and Network Biology. **Annual Review Of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 379-405, 2012. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-100424>.

BISSON, L. F. Geographic Origin and Diversity of Wine Strains of *Saccharomyces*. **American Journal Of Enology And Viticulture**, v. 63, n. 2, p. 165-176, 2012. <http://doi.org/10.5344/ajev.2012.11083>.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The Microbiology of malting and brewing. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 157-172, 2013. <http://doi.org/10.1128/mnbr.00060-12>.

BORNEMAN, A. R; PRETORIUS, I. S. Genomic Insights into the *Saccharomyces sensu stricto* Complex. **Genetics**, v. 199, n. 2, p. 281-291, 2015.
<http://doi.org/10.1534/genetics.114.173633>.

CARON, D. A. *et al.* Defining DNA-based operational taxonomic units for microbial-eukaryote ecology. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 75, n. 18, p. 5797-5808, 2009. <http://doi.org/10.1128/aem.00298-09>.

CARVALHO, G. B. M. de *et al.* Utilização da banana como adjunto na obtenção de mosto cervejeiro de alta densidade: um estudo para fim biotecnológico clássico inédito. *In: Congresso Mineiro de Propriedade Intelectual*, UFJF, Juiz de Fora – MG, 2006.

CORBO, M. R. *et al.* Functional Beverages: the emerging side of functional foods. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 13, n. 6, p. 1192-1206, 2014. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12109>

CORDENTE, A. G. *et al.* Flavour-active wine yeasts. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 601-618, 2012. <http://doi.org/10.1007/s00253-012-4370-z>.

COULON, J. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. **American Journal Of Enology And Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 113-124, 2006. <http://doi.org/10.5344/ajev.2006.57.2.113>.

CROMIE, G. A. *et al.* Genomic sequence diversity and population structure of *saccharomyces cerevisiae* assessed by RAD-seq. **G3 Genes | Genomes | Genetics**, v. 3, n. 12, p. 2163-2171, 2013. <http://doi.org/10.1534/g3.113.007492>.

DELOBEL, P.; TESNIÈRE, C. A simple FCM method to avoid misinterpretation in *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle Assessment between G0 and Sub-G1. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. e84645, 2014. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0084645>.

DENG, H. *et al.* Research progress on the application of different controlling strategies to minimizing ethyl carbamate in grape wine. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 22, n. 3, p. 1495-1516, 2023. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.13119>.

DIXON, T. A.; PRETORIUS, I. S. Drawing on the past to shape the future of synthetic yeast research. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7156, 2020. <http://doi.org/10.3390/ijms21197156>.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, J. B. de. Cerveja. *In: VENTURINI FILHO, W. G. Bebidas Alcoólicas: Ciências e tecnologia*. v.1. São Paulo: Blücher, 2010.

DUJON, B. Yeast evolutionary genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 7, p. 512-524, 2010. <http://doi.org/10.1038/nrg2811>.

DZIALO, M. C. *et al.* Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. **Fems Microbiology Reviews**, v. 41, n. 1, p. 95-128, 2017. <http://doi.org/10.1093/femsre/fux031>.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; JUNIOR, F. B. R. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011, 730 p.

FAY, J. C.; BENAVIDES, J. A. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Plos Genetics**, v. 1, n. 1, p. 5, 2005. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010005>.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; ÚBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Study of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains for breeding through fermentation efficiency and tetrad analysis. **Current Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 441-449, 2015. <http://doi.org/10.1007/s00284-014-0741-2>.

FIGUEIREDO, B. I. C. de. **Cruzamentos entre leveduras da fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes: potencial para produção de cervejas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. 2016. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/6453>. Acesso em: 27 jun. 2023.

GABEL, B. Wine origin authentication linked to terroir – wine fingerprint. **Bio Web Of Conferences**, v. 15, p. 02033, 2019. <http://doi.org/10.1051/bioconf/20191502033>.

GALLONE, B. *et al.* Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 49, p. 148-155, 2018. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005>.

GALLONE, B. *et al.* Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1397-1410, 2016. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>.

GIAEVER, G.; NISLOW, C. The yeast deletion collection: a decade of functional genomics. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 451-465, 2014. <http://doi.org/10.1534/genetics.114.161620>.

GIBSON, B.; LITI, G. *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. **Yeast**, 2015. <http://doi.org/10.1002/yea.3033>.

GIBSON, B. *et al.* New yeasts—new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. **Fems Yeast Research**, v. 17, n. 4, 2017. <http://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>.

GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996. <http://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>.

GONÇALVES, M. *et al.* Distinct domestication trajectories in top-fermenting beer yeasts and wine yeasts. **Current Biology**, v. 26, n. 20, p. 2750-2761, 2016. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.040>.

HU, K. *et al.* Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 108, p. 119-127, 2018a. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.037>.

HU, K. *et al.* Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum*/*S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement. **Food Chemistry**, v. 239, p. 495-501, 2018b. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.151>.

HU, L. *et al.* Selection of non-*Saccharomyces* yeasts for orange wine fermentation based on their enological traits and volatile compounds formation. **Journal of Food Science And Technology**, v. 55, n. 10, p. 4001-4012, 2018c. <http://doi.org/10.1007/s13197-018-3325-5>.

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, 2013. <http://doi.org/10.1111/mec.12155>.

IATTICI, F.; CATALLO, M.; SOLIERI, L. Designing new yeasts for craft brewing: when natural biodiversity meets biotechnology. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 3, 2020. <http://doi.org/10.3390/beverages6010003>.

KROGERUS, K. *et al.* Inheritance of brewing-relevant phenotypes in constructed *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, 2017. <http://doi.org/10.1186/s12934-017-0679-8>.

KURTZMAN, C. P. *et al.* Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. **The Yeasts**, p. 87-110, 2011.
<http://doi.org/10.1016/b978-0-444-52149-1.00007-0>.

LEGRAS, J.-L.; ERNY, C.; CHARPENTIER, C. Population Structure and Comparative Genome Hybridization of European Flor Yeast Reveal a Unique Group of *Saccharomyces cerevisiae* Strains with Few Gene Duplications in Their Genome. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 108089, 2014.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0108089>.

LEGRAS, J.-L. *et al.* Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2091-2102, 2007.
<http://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03266.x>.

LEUTERT, M., BARENTE, A.S., FUKUDA, N.K. *et al.* The regulatory landscape of the yeast phosphoproteome. **Nat Struct Mol Biol** **30**, 1761–1773 (2023).
<https://doi.org/10.1038/s41594-023-01115-3>

LIBKIND, D. *et al.* Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 35, p. 14539-14544, 2011.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>.

LIN, X. *et al.* Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on the profile of volatile compounds in pineapple wine. **Journal Of Food Science And Technology**, v. 55, n. 10, p. 4119-4130, 2018. <http://doi.org/10.1007/s13197-018-3338-0>.

LITI, G. The fascinating and secret wild life of the budding yeast *S. cerevisiae*. **Elife**, v. 4, 2015. <http://doi.org/10.7554/elife.05835>.

LITI, G. *et al.* Population genomics of domestic and wild yeasts. **Nature**, v. 458, n. 7236, p. 337-341, 2009. <http://doi.org/10.1038/nature07743>.

LIU, T.; HUANG, S.; GENG, A. Recombinant diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain development for rapid glucose and xylose co-fermentation. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 59, 2018. <http://doi.org/10.3390/fermentation4030059>.

MAGWENE, P. M. Revisiting Mortimer's genome renewal hypothesis: heterozygosity, homothallism, and the potential for adaptation in yeast. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, p. 37-48, 2014.
http://doi.org/10.1007/978-94-007-7347-9_3.

MAPELLI-BRAHM, P. *et al.* The impact of fermentation processes on the production, retention and bioavailability of carotenoids: an overview. **Trends In Food Science & Technology**, v. 99, p. 389-401, 2020. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.013>.

MENDES, S. D. C. **Potencial biotecnológico de leveduras selvagens provenientes de regiões vinícolas de Santa Catarina**. 2015. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/117893>. Acesso em: 18 jun. 2023.

MERTENS, S. *et al.* A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in Lager beers. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 81, n. 23, p. 8202-8214, 2015. <http://doi.org/10.1128/aem.02464-15>.

MESSNER, C. B. *et al.* The proteomic landscape of genome-wide genetic perturbations. **Cell**, v. 186, n. 9, p. 2018-2034, 2023. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.026>.

MOURET, J. R. *et al.* Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 2015. <http://doi.org/10.1002/yea.3028>.

MUYSSON, J. *et al.* The Use of CRISPR-Cas9 genome editing to determine the importance of glycerol uptake in wine yeast during icewine fermentation. **Fermentation**, v. 5, n. 4, p. 93, 2019. <http://doi.org/10.3390/fermentation5040093>.

NAUMOV, G. I.; LEE, C-F.; NAUMOVA, E. S. Molecular genetic diversity of the *Saccharomyces* yeasts in Taiwan: *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 217-228, 2013. <http://doi.org/10.1007/s10482-012-9803-2>.

NEDOVIĆ, V. *et al.* Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. **Yeast**, 2015. <http://doi.org/10.1002/yea.3042>.

OLIVEIRA, S. D. *et al.* O metabolismo das leveduras nos processos fermentativos: uma revisão. In: MEDEIROS, J. A.; NIRO, C. M. **Pesquisas e Atualizações em Ciência dos Alimentos**. Agron Food Academy, 2022. p. 16-25. <http://doi.org/10.53934/9786599539657-1>.

OLIVER, S. G. From DNA sequence to biological function. **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 597-600, 1996. <http://doi.org/10.1038/379597a0>.

ONYEMA, V. O. *et al.* A Brief Review: *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity potential and promising cell factories for exploitation in biotechnology and industry processes - west african natural yeasts contribution. **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 100162, 2023. <http://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100162>.

PASTEUR L. **Études sur le vin: ses maladies, causes qui les provoquent, procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir.** 3. ed. Paris: Imprimerie Impériale, 1866. 264 p.

PÉREZ-TORRADO, R.; QUEROL, A.; GUILLAMÓN, J. M. Genetic improvement of non-GMO wine yeasts: strategies, advantages and safety. **Trends In Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 1-11, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.05.002>.

PETER, J. *et al.* Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. **Nature**, v. 556, n. 7701, p. 339-344, 2018. <http://doi.org/10.1038/s41586-018-0030-5>.

PÍŠKUR, J.; COMPAGNO, C. **Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism.** 1. ed. Heidelberg: Springer, 2014. 326p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55013-3>.

PRETORIUS I.S. Solving yeast jigsaw puzzles over a glass of wine. **EMBO Rep** 2017a; 18:1875–84.

PRETORIUS, I. S.; BOEKE, J. D. Yeast 2.0—connecting the dots in the construction of the world's first functional synthetic eukaryotic genome. **Fems Yeast Research**, v. 18, n. 4, 2018. <http://doi.org/10.1093/femsyr/foy032>.

PRETORIUS, I. Conducting wine symphonics with the aid of yeast genomics. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 36, 2016. <http://doi.org/10.3390/beverages2040036>.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8%3C675::aid-yea585%3E3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8%3C675::aid-yea585%3E3.0.co;2-b).

REBELO, F.; ESTEVINHO, L. M.; MORAIS, J. S.; ROCHA, A.; ANDRADE, J. V.; (2003). Detecção de fenóis voláteis e leveduras do género *Dekkera* em vinhos de Trás-os-

Montes. In 11as Jornadas de Biologia Leveduras "Professor Nicolau van Uden. Bragança, Portugal. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10198/5616>. Acesso em: 09 ago. 2024.

RICE, C. Bioengineered brewing yeast for easy, fast, reproducible sour beer production. **Anais... ASBC-ASEV Joint Symposium: Yeast and Fermented Beverage Flavor**. Sonoma County, CA, USA. 2019.

ROBINSON, A. L. *et al.* Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. **American Journal Of Enology And Viticulture**, v. 65, n. 1, p. 1-24, 2014. <http://doi.org/10.5344/ajev.2013.12070>.

SAERENS, S. M. G.; DUONG, C. T.; NEVOIGT, E. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1195-1212, 2010. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2486-6>.

SALINAS, F. *et al.* The Genetic Basis of Natural Variation in Oenological Traits in *Saccharomyces cerevisiae*. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 49640, 2012. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0049640>.

SCHACHERER, J. *et al.* Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 458, n. 7236, p. 342-345, 2009. <http://doi.org/10.1038/nature07670>.

SETATI, M. E. *et al.* The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. **Plos One**, v. 7, n. 12, p. 52609, 2012. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0052609>.

SHEN, N. *et al.* Domesticating brewing yeast for decreasing acetaldehyde production and improving beer flavor stability. **European Food Research And Technology**, v. 238, n. 3, p. 347-355, 2014. <http://doi.org/10.1007/s00217-014-2169-0>.

SICARD, D.; LEGRAS, J.-L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus. Biologies**, v. 334, n. 3, p. 229-236, 2011. <http://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.12.016>.

SILVA, C. H. P. de M. **Microbiologia da cerveja**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2019. 369 p.

SILVA-FILHO, E. A. da *et al.* Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 1, p. 13-23, 2005. <http://doi.org/10.1007/s10482-004-7283-8>.

SIM, L. *et al.* Structural and biochemical characterization of the N-terminal domain of flocculin Lg-Flo1p from *Saccharomyces pastorianus* reveals a unique specificity for phosphorylated mannose. **The Febs Journal**, v. 280, n. 4, p. 1073-1083, 2013. <http://doi.org/10.1111/febs.12102>.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. Taming Wild Yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. **Annual Review Of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 61-80, 2014. <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>.

STEFANINI, I. *et al.* Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 109, n. 33, p. 13398-13403, 2012. <http://doi.org/10.1073/pnas.1208362109>.

VAN WYK, N. *et al.* The Whiff of Wine Yeast Innovation: strategies for enhancing aroma production by yeast during wine fermentation. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 67, n. 49, p. 13496-13505, 2019. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06191>.

VAN WYK, N.; KROUKAMP, H.; PRETORIUS, I. The Smell of Synthetic Biology: engineering strategies for aroma compound production in yeast. **Fermentation**, v. 4, n. 3, p. 54, 2018. <http://doi.org/10.3390/fermentation4030054>.

VAN WYK, N. *et al.* Effect of Isomixing on Grape Must Fermentations of *ATF1*-Overexpressing Wine Yeast Strains. **Foods**, v. 9, n. 6, p. 717, 2020. <http://doi.org/10.3390/foods9060717>.

VAN WYK, N. *et al.* Biotechnology of Wine Yeasts. **Encyclopedia Of Mycology**, p. 428-446, 2021. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-819990-9.00007-x>.

VAUDANO, E.; COSTANTINI, A.; GARCIA-MORUNO, E. An event-specific method for the detection and quantification of *ML01*, a genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* wine strain, using quantitative PCR. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 234, p. 15-23, out. 2016. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.017>.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts**. 5. ed. London: Elsevier. v. 2, p. 733–746. 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00061-6>.

VERSTREPEN, K. J. *et al.* Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5228-5237, 2003. <http://doi.org/10.1128/aem.69.9.5228-5237.2003>.

VIDAL, E. E. *et al.* Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 701-708, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.147>.

VIGENTINI, I. *et al.* CRISPR/Cas9 System as a valuable genome editing tool for wine yeasts with application to decrease urea production. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, 2017. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02194>.

VILANOVA, M. *et al.* Volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* red cultivars from North West Spain: correlation between sensory and instrumental analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 720, p. 104-111, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.026>.

WALKER, G. M. **Yeast Technology**. In: *Yeast Physiology and Biotechnology*, p. 265-320, Wiley, Scotland, 2000.

WANG, C.; LIU, Y. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 172-177, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.014>.

WANG, Q.-M. *et al.* Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 22, p. 5404-5417, 2012. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05732.x>.

WILLAERT, R. G. Yeast Biotechnology 3.0. **Fermentation**, v. 6, n. 3, p. 75, 29 jul. 2020. MDPI AG. <http://doi.org/10.3390/fermentation6030075>.

YIN, L. *et al.* A multi-step screening approach of suitable non-*Saccharomyces* yeast for the fermentation of hawthorn wine. **Lwt**, [S.L.], v. 127, p. 109432, jun. 2020. Elsevier BV. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109432>.

ZHOU, X. *et al.* Genome comparison of three lager yeasts reveals key genes affecting yeast flocculation during beer fermentation. **Fems Yeast Research**, v. 21, n. 4, 2021. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab031>.

ZÖRGÖ, E. *et al.* Ancient Evolutionary Trade-Offs between Yeast Ploidy States. **Plos Genetics**, v. 9, n. 3, p. 1003388, 2013. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003388>.

Recebido: 28 nov. 2022.

Aprovado: 22 nov. 2023.

Publicado: 30 jun. 2024

DOI:10.3895/rbta.v18n1.16166

Como citar:

GIACOMONI, Rui Rafael Faraco; DANTAS, Adriana Cibele de Mesquita. Inovações biotecnológicas nas leveduras e no processo fermentativo de cervejarias e vinícolas. **R. bras. Tecnol. Agroindustr.**, v. 18, n. 1, p. 4248-4276, jan./jun. 2024. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta>>. Acesso em: XXX.

Formatação: Alex Gabriel Hein

Editoração: Prof.^a Dr.^a Elis Regina Duarte

Correspondência: Adriana Cibele De Mesquita Dantas

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

