

**UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS
NÍVEL MESTRADO**

PAMELA MARTINEZ LIMA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES E AVALIAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE AROMAS DURANTE AS FERMENTAÇÕES NA FORMA PURA,
MISTA E SEQUENCIAL EM MOSTO SINTÉTICO**

**São Leopoldo
2020**

PAMELA MARTINEZ LIMA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES E AVALIAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE AROMAS DURANTE AS FERMENTAÇÕES NA FORMA PURA,
MISTA E SEQUENCIAL EM MOSTO SINTÉTICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS

Orientadora: Profa. Dra. Jessica Fernanda Hoffmann
Profa. Dra. Tanise Gemelli

São Leopoldo
2020

Ficha catalográfica

A ficha catalográfica é obrigatória para dissertações e teses, não pode contar na paginação do trabalho.

A Catalogação Internacional na Publicação (CIP) determina que a ficha catalográfica deve ser incluída no verso da folha de rosto e elaborada por um bibliotecário, com registro no Conselho Regional de Biblioteconomia (CRB). Constitui-se de um conjunto de informações bibliográficas descritas, de forma ordenada, seguindo o Código de Catalogação Anglo-Americano vigente.

Atenção: Na maioria dos cursos a ficha é incluída após a banca, verifique com o seu orientador ou na secretária do seu curso.

PAMELA MARTINEZ LIMA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES E AVALIAÇÃO DA
PRODUÇÃO DE AROMAS DURANTE AS FERMENTAÇÕES NA FORMA PURA,
MISTA E SEQUENCIAL EM MOSTO SINTÉTICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS

Aprovado em 25 de março de 2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Jessica Fernanda Hoffmann – Universidade do Vale do Rio dos Sinos
(UNISINOS)

Profa. Dra. Daiana de Souza – Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS)

Dr. Cláudio Eduardo dos Santos Cruxen – Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar meus agradecimentos a Deus, pois através da fé e na força que ele me proporcionou, acreditei mais em mim e nas minhas capacidades.

Quero agradecer também o meu marido, Rodrigo Dorfey que sempre me motivou e me ajudou na concretização deste projeto em minha vida.

À minha família, muito obrigada por toda a compreensão e apoio em todos os momentos que precisei.

À universidade UNISINOS, ao Itt Nutrifor e ao Mestrado Profissional em Nutrição e Alimentos pela alta qualidade de ensino, agregando fortemente na minha formação.

Aos colegas do instituto, Laura, Pamela e Camila por desenvolverem os experimentos, como suporte em diversas outras etapas fundamentais para realização deste trabalho.

Na Souza Cruz, ao colega Luís pelo entendimento da importância e proporcionar a estrutura do laboratório para o exercício dos experimentos finais e a colega Bruna por todo o aporte e compartilhamento do seu conhecimento, o que contribuíram muito para minha formação profissional e desempenho de um bom trabalho.

À minha orientadora, prof. Dra. Jessica Fernanda Hoffmann que no momento que estava mais precisando me proporcionou um novo ânimo e corroborou de forma ímpar o alcance desta conquista.

E a todos que de forma direta ou indireta fizeram parte na construção e na finalização deste projeto, muito obrigada.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

O uso de leveduras em processos fermentativos é importante, pois além da produção de etanol e gás carbônico, contribuem significativamente para a produção de compostos de aroma. Leveduras do grupo não-*Saccharomyces* vêm recebendo maior espaço devido ao potencial de incremento na geração moléculas aromáticas, principalmente ésteres e álcoois, que contribuem positivamente no aroma de bebidas fermentadas. Assim, o objetivo do presente estudo foi selecionar uma levedura não-*Saccharomyces* capaz de gerar aromas e avaliar seu potencial de produção de ésteres e álcoois durante as fermentações na forma pura, mista e sequencial em mosto sintético. Das 32 linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* pesquisadas em ágar YMA, a UMSC 19.11 foi selecionada devido a habilidade em produzir ésteres, especialmente o acetato de fenetila, além da viabilidade para realização das fermentações em mosto sintético. Essa cepa foi inoculada na forma pura, mista e sequencial em mosto sintético e os ésteres e álcoois foram avaliados após 3, 7 e 10 dias de fermentação a 20 °C e 25 °C. Treze compostos voláteis, incluindo 8 ésteres e 5 álcoois foram identificados. Acetato de fenetila na fermentação pura com a cepa não-*Saccharomyces*, à 25 °C por 3 dias foi expressivamente produzido, na fermentação mista o destaque foi para a produção de isopentanol e álcool fenetílico e na fermentação sequencial o hexanoato e octanoato de etila. Contudo, a produção de etanol foi maior nas fermentações utilizando a cepa *S. cerevisiae*. De maneira geral, a temperatura de 25 °C demonstrou ter sido mais favorável o grupo acetil ésteres e a temperatura de 20 °C para etil ésteres. Os resultados desse trabalho indicaram que a levedura não-*Saccharomyces*, identificada como *Hanseniaspora opuntiae*, demonstra capacidade em contribuir de maneira positiva na geração de aromas em mosto sintético, o que corrobora na continuidade de seu estudo e na sua possível aplicação em bebidas fermentadas.

Palavras-chave: Aromas. Fermentação. Leveduras. Ésteres. Álcoois

ABSTRACT

The use of yeasts in fermentation processes is important, because in addition to the production of ethanol and carbon dioxide, they contribute significantly to the production of aroma compounds. Yeasts from the non-*Saccharomyces* group have been receiving more space due to the potential to increase the generation of aromatic molecules, especially esters and alcohols, which contribute positively to the aroma of fermented drinks. Thus, the objective of the present study was to select a non-*Saccharomyces* yeast capable of generating aromas and to evaluate its production potential of esters and alcohols during fermentations in pure, mixed and sequential form in synthetic must. Of the 32 strains of non-*Saccharomyces* yeasts surveyed, UMSC 19.11 was selected due to its ability to produce esters, especially phenethyl acetate, in addition to the feasibility for carrying out fermentations in synthetic must. This strain was inoculated in pure, mixed and sequential form in synthetic must and the esters and alcohols were evaluated after 3, 7 and 10 days of fermentation at 20 °C and 25 °C. Thirteen volatile compounds, including 8 esters and 5 alcohols have been identified. Phenethyl acetate in pure fermentation with the non-*Saccharomyces* strain, at 25 °C for 3 days, was expressively produced, in mixed fermentation the highlight was the production of isopentanol and phenethyl alcohol and in sequential fermentation, hexanoate and ethyl octanoate. However, ethanol production was higher in fermentations using the *S. cerevisiae* strain. In general, the temperature of 25 °C showed that the acetyl esters group was more favorable and the temperature of 20 °C for ethyl esters. The results of this work indicated that the non-*Saccharomyces* yeast, identified as *Hanseniaspora opuntiae*, demonstrates its capacity to contribute positively to the generation of aromas in synthetic must, which corroborates the continuity of its study and its possible application in fermented beverages.

Key-words: Aromas. Fermentation. Yeast. Esters. Alcohols

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Objetivos.....	10
1.1.1 Objetivo Geral.....	10
1.1.2 Objetivos Específicos.....	10
1.2 Justificativa.....	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1 Uso de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e não-<i>Saccharomyces</i> na fermentação.....	12
2.2 Compostos voláteis de aroma e a relevância das moléculas das classes de ésteres e álcoois para bebidas fermentadas.....	14
2.3 Impacto das fermentações utilizando culturas mistas e sequenciais na produção de ésteres e álcoois.....	16
2.4 Análise de ésteres e álcoois.....	18
3 METODOLOGIA.....	19
REFERÊNCIAS.....	21
APÊNDICE A - SELEÇÃO DE LEVEDURA NÃO-SACCHAROMYCES E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES E ÁLCOOIS DURANTE AS FERMENTAÇÕES NA FORMA PURA, MISTA E SEQUENCIAL EM MOSTO SINTÉTICO.....	24

1 INTRODUÇÃO

O uso de leveduras em processos fermentativos para produção de bebidas fermentadas é importante, pois além da produção de etanol e gás carbônico, contribuem significativamente para a produção de compostos aromáticos, os quais podem fornecer particularidades em relação à complexidade aromática de cada bebida. (GSCHAEDLER, 2017).

O processo fermentativo era inicialmente realizado na forma espontânea, ou seja, utilizando somente a microbiota existente em um determinado substrato e sem o uso de culturas iniciadoras. Inúmeras mudanças no processo de fermentação industrial foram ocorrendo a partir do uso de inóculos de linhagens de leveduras comerciais. Os processos fermentativos são utilizados para a produção de metabólitos de grande importância para indústrias de bebidas, alimentos, cosméticos, medicina e biocombustíveis, como os aromas, corantes, ácidos, entre outros. (HIRST; RICHTER, 2016).

Tradicionalmente as leveduras do gênero *Saccharomyces sp.*, especialmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, são as comumente empregadas no processo de produção de bebidas fermentadas, entretanto, outros gêneros de leveduras estão sendo propostos como uma alternativa que poderia impactar positivamente na qualidade final dos produtos. (ESCALANTE, 2016). O interesse crescente em leveduras não-*Saccharomyces* em processos fermentativos é devido a possível redução do teor de etanol, elevação da acidez, produção de pigmentos e da estabilidade, e por incrementar a complexidade aromática das bebidas fermentadas, entre elas, a cerveja e o vinho. (HU *et al.*, 2018a). Este grupo já foi considerado como levedura deteriorante na fermentação de vinhos e seus metabólitos produzidos eram classificados como desagradáveis, causando um impacto negativo na qualidade do produto, no entanto, sabe-se hoje que elas exercem papel importante na qualidade aromática de diferentes produtos. (CHEN *et al.*, 2018).

As leveduras que compõem o grupo não-*Saccharomyces* são dos gêneros: *Hanseniaspora sp.*, *Issatchenkia sp.*, *Pichia sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Brettanomyces sp.*, *Zygosaccharomyces sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Candida sp.* e *Torulaspora sp.* (PETRUZZI *et al.*, 2017). Estudos demonstram que as leveduras não-*Saccharomyces* são capazes de produzir ésteres, como o acetato de isoamila (aroma

semelhante a banana) e o acetato de fenetila (aroma frutado). (DOMIZIO *et al.*, 2011). As leveduras do gênero *Hanseniaspora* sp. podem contribuir na formação de moléculas voláteis, como a produção de acetato de fenetila e na elevação do teor de açúcares em mosto de uva. (ADRIANA *et al.*, 2016 ; SANTOS, 2015)

Além de selecionar e isolar leveduras não-*Saccharomyces* para desenvolvimento de novos aromas, é importante estudar os processos de fermentação pois a dinâmica da produção de compostos aromáticos pode ser alterada em função da forma de aplicação das culturas. Nos processos de fermentação mista ou sequencial de linhagens não-*Saccharomyces* com a espécie *S. cerevisiae*, foram observadas alterações nos níveis de lactato de etila, 2,3-butanodiol, 2-feniletanol e acetato de 2- fenitila, além de que as leveduras não-*Saccharomyces* contribuem na retenção das propriedades organolépticas desejadas. (LOIRA *et al.*, 2015).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Selecionar uma levedura não-*Saccharomyces* com habilidade de produzir aromas e avaliar seu potencial em processos fermentativos de forma pura, mista e sequencial com a espécie *S. cerevisiae* em mosto sintético, visando a formação de ésteres e álcoois.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Selecionar a partir do Banco de Leveduras do Itt Nutrifor uma levedura não-*Saccharomyces* com potencial de produção de ésteres;
- b) Identificar a espécie da levedura não-*Saccharomyces* selecionada;
- c) Avaliar a produção de ésteres e álcoois nos processos de fermentação com a cultura não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* na forma pura, mista ou sequencial.

1.2 Justificativa

Atualmente, a indústria de bebidas fermentadas (ex. vinho, cerveja) vem utilizando leveduras não-*Saccharomyces* de forma progressiva, além do uso corriqueiro de leveduras *S. cerevisiae*. O interesse nas leveduras não-*Saccharomyces* são nos

compostos voláteis formados, pois elas são capazes de promover variados tipos de compostos de aroma e sabor, gerando diferentes opções e estilos em bebidas fermentadas. No entanto, por serem linhagens nativas, as propriedades do processo fermentativo podem sofrer alterações, implicando em falta de padronização nos atributos sensoriais e no aspecto visual das bebidas. (MICHEL *et al.*, 2016).

A levedura *S. cerevisiae* até recentemente, era considerada a principal espécie utilizada na fermentação alcoólica, devido à capacidade de produzir compostos que favorecem as características sensoriais em bebidas fermentadas. O processo de fermentação se dá a partir da biotransformação executada pela levedura *S. cerevisiae*, a qual realiza a metabolização dos açúcares e demais moléculas presentes nos mostos à etanol, gás carbônico e outros compostos secundários. No entanto, linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* vem recebendo maior interesse, por possuírem a habilidade de melhorar o sabor e o aroma de bebidas fermentadas e gerarem importantes metabólitos voláteis específicos que beneficiam o perfil sensorial do produto. (LU *et al.*, 2017).

Com o crescente interesse das diferentes indústrias na obtenção de incremento de aromas, as leveduras classificadas como não-*Saccharomyces* vem ganhando espaço, pois estas possuem um alto potencial em promover novos atributos sensoriais. O processo fermentativo possibilita a promoção de diversos compostos voláteis, de forma natural, o que atrai fortemente o mercado consumidor, gerando oportunidades para pesquisa e inovação em avaliar a aplicação deste processo de forma mista e/ou pura de leveduras não-*Saccharomyces* e a espécie *S. cerevisiae*.

Assim, realizar a seleção de leveduras não-*Saccharomyces* e a aplicação delas em um processo fermentativo é de grande valia, pois dessa forma, novas leveduras podem ser fornecidas no mercado. Além do mais, para uma expressiva geração de compostos voláteis em bebidas fermentadas, faz-se necessário buscar maior entendimento na aplicação de leveduras não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* em fermentações mista e sequencial e os parâmetros físico-químicos ideais para o favorecimento desta produção, trazendo a importância deste trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Uso de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces* na fermentação

A utilização de microrganismos para conversão de uma molécula em outra a partir de um substrato, é uma prática antiga e utilizada de forma abrangente para produção de bebidas. O processo de fermentação dos açúcares para geração do etanol resulta de um processo bioquímico na qual as leveduras degradam os açúcares presentes em uma determinada matriz e produzem álcool na ausência de oxigênio. (COSTA, 2017).

Dentre os microrganismos utilizados no processo de fermentação estão as leveduras. As leveduras pertencem ao grupo dos eucariotos que vivem em diferentes habitats como água, solo, ar e na parte externa de plantas e frutas. (ESCALANTE, 2016). Além do etanol, muitos outros compostos são produzidos, os quais contribuem ao perfil sensorial das bebidas.

O processo fermentativo por muito tempo foi executado na forma espontânea, tendo os microrganismos nativos como principais catalisadores. Estes microrganismos nativos englobavam também um grupo elevado de leveduras classificadas como não convencionais. (GSCHARDLER, 2017). No século XIX, mudanças no processo de fermentação industrial ocorreram através da inoculação de linhagens de leveduras comerciais. Atualmente, os processos fermentativos são utilizados para gerar metabólitos de relevância para as indústrias de bebidas, alimentos, cosméticos, medicina e biocombustíveis (HIRST; RICHTER, 2016).

As leveduras utilizadas na fermentação de bebidas podem ser divididas em dois grupos *Saccharomyces* sp. e não-*Saccharomyces*. Dentro do grupo das *Saccharomyces* sp., a espécie *S. cerevisiae* é evidenciada como a principal levedura atuante na fermentação de mostos para produção de vinhos e cervejas (PADILLA *et al.*, 2016). Características relacionadas a aroma e sabor, bem como à presença de componentes bioativos no vinho são atribuídas a esse microrganismo durante o processo fermentativo. (LI *et al.*, 2017).

Estruturalmente, o grupo das *Saccharomyces* contém forma esférica ou elíptica. A *S. cerevisiae* é a mais comumente utilizada no processo de fermentação de vinhos e cervejas por apresentar alta habilidade fermentativa, desenvolvimento ágil e adapta-se de maneira simples. Possui tolerância em variados níveis de concentração de SO₂,

sendo um diferencial em relação ao grupo das não-*Saccharomyces*, pois estes não sobrevivem. (ESCALANTE, 2016).

As linhagens de levedura não-*Saccharomyces* eram categorizadas como deteriorantes e formadores de metabólitos que promoviam efeitos sensoriais indesejáveis em vinhos. (CHEN *et al.*, 2018). No entanto, hoje em dia observa-se que as leveduras não-*Saccharomyces*, quando aplicadas na fermentação de forma pura (isolada) ou associada com a *S. cerevisiae*, aprimoraram o sabor de variadas classes de vinhos. (AZZOLINI *et al.*, 2014). O benefício do uso das leveduras não-*Saccharomyces* está associada a melhoria da complexidade aromática, no incremento da quantidade de glicerol ou manoproteína, no equilíbrio da acidez volátil, na estabilidade da cor e na redução do teor de álcool. (CURIEL *et al.*, 2017).

As leveduras não-*Saccharomyces* podem crescer tanto na ausência, quanto na presença de oxigênio, o que promove a competição com o grupo *Saccharomyces* pelos nutrientes, assim como geram metabólitos secundários e/ou modificação do metabolismo de *S. cerevisiae* durante o processo de fermentação. (PETRUZZI *et al.*, 2017).

Espécies do gênero *Hanseniaspora* sp. / *Kloeckera* sp. foram estudadas para serem aplicadas como fonte de enzimas nas vinícolas, além dos demais processos biotecnológicos. Leveduras pertencente a este gênero são classificadas como não-patogênicas e consideradas como microrganismos seguros (GRAS). Níveis de terpenos podem ser aumentados em vinho Moscatel a partir do uso dessas espécies durante a fermentação. (LÓPEZ *et al.*, 2014). Este grupo também é simbolizado por estar fortemente presente na flora dos bagaços de uva, altamente atuante na fermentação do vinho e suas linhagens podem ser aplicadas na forma de culturas iniciais no processo fermentativo dos vinhos, sidras e bebidas aromatizadas. (STERNES *et al.*, 2016).

No entendimento de perfil sensorial, espécies *H. guilliermondii*, *H. uvarum* e *H. vineae* promovem melhorias na intensidade dos aromas e dos sabores como acetato de 2-feniletila, acetato de isoamila, ésteres de etila de ácidos graxos de cadeia média, benzenoides, terpenos e reduções na concentração final de álcoois superiores. Para melhoria da cor e da composição polifenólica em vinhos tintos, espécies *H. clermontiae*, *H. opuntiae*, *H. guilliermondii* e *H. Vineae* são as mais adequadas, como podem aprimorar parâmetros de qualidade, intensidade de antocianinas totais e produzirem vitisina A, vitisina B e malvidina-3-O-glicosídeo-4-vinilguaiacol. (BENITO *et al.*, 2019).

2.2 Compostos voláteis de aroma e a relevância das moléculas das classes ésteres e álcoois para bebidas fermentadas

O conhecimento científico dos compostos químicos responsáveis pelo sabor característico dos alimentos justifica-se pela importância que estes desempenham na qualidade dos produtos, inclusive nas bebidas fermentadas. Os compostos voláteis do aroma são, em sua maioria, substâncias termolábeis, sujeitos a rearranjos, ciclizações e oxidações, quando submetidos a qualquer aumento de temperatura. O estudo dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor dos alimentos é útil na caracterização e classificação dos produtos, além do mais, eles têm uma grande influência na tomada de decisão dos consumidores quando optam por consumir um produto ou não. (REINECCIUS; PETERSON, 2013).

Os aromas encontrados em bebidas fermentadas são formados por reações bioquímicas ocorridas dentro da célula de levedura, no decorrer do processo fermentativo. Inicialmente, os açúcares presentes no mosto são transformados em etanol, moléculas voláteis e há formação de moléculas intermediárias que são os álcoois e ésteres superiores. As estirpes utilizadas na elaboração dos diferentes tipos de bebidas fermentadas podem utilizar diversas fontes de carbono (glicose, sacarose, frutose, maltose, galactose, rafinose e maltotriose) e com isso produzir uma diversidade de compostos. (CAPECE *et al.*, 2018).

Dentre as classes de compostos voláteis podemos citar os álcoois, aldeídos, cetonas, tiois, ésteres, fenólicos, entre outros. (ELMORE, 2015b). Os tiois são os responsáveis pelo aroma frutado alcançado em diversos vinhos brancos, como o Sauvignon Blanc. Deste grupo, três moléculas apresentam maior relevância para este tipo de vinho, como 3-sulfanilhexan-1-ol, acetato de 3-sulfanilhexil (3SHA) e 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona (4MSP) (RENAULT *et al.*, 2016).

Aromas florais, frutados ou de característica herbal podem ser atribuídos aos álcoois superiores. No entanto, a presença desses aromas depende de suas ações estarem associadas com outras moléculas de sabor ativo. Os principais representantes desse grupo presentes na cerveja são: 1-propanol, isobutanol, álcool isoamílico e álcool fenílico. Os álcoois superiores podem ser formados através das leveduras na forma de um subproduto, mediante as etapas de metabolismo e catabolismo de aminoácidos. No decorrer do catabolismo, os aminoácidos são degradados dentro das células das leveduras, ocorrendo um processo denominado transaminação, sendo realizado por

quatro enzimas transaminase. O metabolismo dos aminoácidos inicia-se com um carboidrato, o qual é substituído por uma molécula de α -cetoácido e por fim, este ácido é transaminado no aminoácido equivalente, produzindo os álcoois superiores através do processo de descarboxilação e redução dos α -cetoácidos. (MICHEL *et al.*, 2016).

Algumas substâncias voláteis produzidas não são apreciadas. Moléculas do grupo dos aldeídos, formadas a partir da reação de Maillard, substâncias como furfural e aldeídos advindos da oxidação de ácidos graxos e trans-2-nonenal, são componentes classificados como sabores excêntricos em cervejas. O grupo das cetonas como diacetil (2,3-butanodiona) é controlado no momento da elaboração da cerveja, pois colabora para um sabor amanteigado bastante desagradável. (VRHOVSEK *et al.*, 2018).

Os ésteres são os compostos voláteis mais abundantes em vinhos, com cerca de 160 compostos identificados até o momento. Embora vários ésteres podem ser formados durante a fermentação, os mais abundantes são os derivados do ácido acético (acetato de etila, acetato de isoamila, acetato de isobutila e acetato de 2-feniletila) e ésteres etílicos de ácidos graxos saturados (butanoato de etila, caproato de etila, caprilato de etila) e caprato de etila. (PADILLA *et al.*, 2016). O grupo dos ésteres de acetato auxiliam significativamente nas características organolépticas de todos os alimentos e bebidas, especialmente na fermentação de vinhos e cervejas. Podem promover aromas de características frutais e florais. Estes são produzidos através da transferência de um grupo acetil-CoA para o grupo hidroxila de um álcool. De acordo com o tipo do substrato álcool, a enzima responsável pela catálise dessa reação é a enzima álcool acetiltransferase (AATase). (HIRST; RICHTER, 2016; MORRISSEY *et al.*, 2015).

Em se tratando do grupo etil éster de ácidos graxos de cadeia longa, estas moléculas são formadas a partir do processo de esterificação dos ácidos graxos ao grupo álcool e o etanol. (GARAVAGLIA, 2014). Para a cerveja, alguns compostos de ésteres são fundamentais no que se refere ao sabor como o hexanoato de etila que promove aromas de maçã e anis e octanoato de etila que também apresenta aroma de maçã, porém mais ácido. (MICHEL *et al.*, 2016).

As espécies de leveduras utilizadas no processo fermentativo podem impactar diretamente o tipo de compostos voláteis formados. Espécies pertencentes aos gêneros *Candida* sp., *Hansenula* sp. e *Pichia* sp. foram descritas como tendo maior capacidade de produzir acetato de etila do que as linhagens de *S. cerevisiae*. (PADILLA *et al.*, 2016). Além disso, em um estudo em que a produção de éster foi agrupada por gêneros de

leveduras, *Hanseniaspora* sp. e *Pichia* sp. se destacaram pela produção de acetato de etila. Leveduras do gênero *Hanseniaspora* sp. são consideradas um potente produtor de ésteres específicos de acetato de frutas, como acetato de 2-feniletila e acetato de isoamila, enquanto os gêneros *Pichia* sp. e *Rhodotorula* sp. produziram níveis notáveis de acetato de isoamila. (VIANA *et al.*, 2008). Entre as espécies de *Hanseniaspora* sp., especificamente *H. uvarum* é relatado para ser um bom produtor de ésteres em geral, enquanto *H. guilliermondii* e *H. osmophila* são fortes produtores de 2- acetato de feniletila. (ROJAS *et al.*, 2003; VIANA *et al.*, 2008).

2.3 Impacto das fermentações utilizando culturas mistas e sequenciais na produção de ésteres e álcoois

A tendência na fermentação de vinhos e cervejas é a utilização da aplicação de culturas mistas ou sequenciais. (LLEIXÀ *et al.*, 2016). A fermentação na forma mista consiste na adição simultânea e na mesma proporção de leveduras do gênero *Saccharomyces* sp. e não-*Saccharomyces*, enquanto, a inoculação de forma sequencial, é alterada a ordem de adição das leveduras. Diversos ensaios vêm sendo realizados a fim de entender as ações benéficas sobre a diferenciação e a qualidade dos vinhos fermentados de forma mista com leveduras não-*Saccharomyces* associadas à espécie *S. cerevisiae*. Nas fermentações realizadas de forma simultânea e sequencial, a *Torulaspora. delbrueckii* é recomendada para esses tipos de fermentações por proporcionarem menor formação de glicerol, acidez e elevação da espuma, além do incremento de compostos sensoriais para vinhos. (CANONICO *et al.*, 2018).

Para elevar o antagonismo de não-*Saccharomyces*, a realização da fermentação de forma sequencial pode ser uma alternativa proveitosa de inoculação. Inúmeros procedimentos foram avaliados a partir da utilização do processo fermentativo sequencial, variando o tempo da segunda inoculação (após 24 horas), o que evidenciaram a presença e o aporte das espécies não-*Saccharomyces*. (SIESTO *et al.*, 2016). Além disso, a inoculação sequencial de *T. delbrueckii* e *S. cerevisiae*, demonstrou ser mais benéfico no âmbito de geração de moléculas de aroma quando comparado a fermentação mista, ambas na temperatura de 25 °C e no período de 3 dias (LIU *et al.*, 2018). Utilizando a fermentação de forma sequencial com a espécie *Metchnikowia pulcherrima*, associada a *S. cerevisiae* foi relatado um aumento significativo das

moléculas acetato de fenetila, acetato de isoamila e de terpenol no vinho. (LIU *et al.*, 2016).

Em se tratando da inoculação mista, Renault *et al.* (2015) demonstraram que a co-inoculação de *T. delbruecki* e *S. cerevisiae* proporcionou o aumento de acetato de isobutila e acetato de isoamila, possivelmente, por uma interação positiva entre as espécies. Além disso, os autores demonstraram que os compostos propanoato de etila, isobutanoato de etila e hidrocinaurato de etila são marcadores da levedura *T. delbruecki*.

Para controle do processo fermentativo neste formato, a dominância e a obstinação das espécies de leveduras são altamente influenciadoras. De acordo com Siesto *et al.* (2016), as linhagens pertencentes ao grupo não-*Saccharomyces* co-inoculada com a espécie *S. cerevisiae* na proporção de 1:1, não gerou interferência no desenvolvimento da *S. cerevisiae*. Porém, no âmbito de obter maior permanência das leveduras não-*Saccharomyces* associada a *S. cerevisiae* no processo de fermentação, a inoculação nas concentrações 100:1 com linhagens de *Lachancea thermotolerans* e *Saccharomyces ludwigii*, *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, foi mais promissora.

Um outro estudo em literatura sobre a fermentação mista, ambas as leveduras avaliadas (não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae*) foram aplicadas ao mesmo tempo em amostras de vinho nas temperaturas: 20 °C, 25 °C e 30 °C e no período de 15 dias. O resultado mostrou que para a fermentação realizada na temperatura de 25 °C as amostras apresentaram maior ênfase para perfil sensorial frutal e moderada percepção da nota floral. Para a temperatura de 20 °C os resultados foram bastante similares à 25 °C, porém apresentando maior intensidade ao floral. (SUN *et al.*, 2015).

A fermentação utilizando as leveduras *H. opuntiae* e *S. cerevisiae* demonstraram bom desempenho na produção de aromas após o período de 120 horas e não apresentando diferença estatística da amostra fermentada contendo apenas a *H. opuntiae*. Para as amostras compreendendo somente a espécie comercial *S. cerevisiae*, já estatisticamente demonstrou diferença. Com esse resultado foi possível concluir que a cepa *H. opuntiae* corroborou para aprimoramento do aroma do vinho (ASSIS *et al.*, 2014). A essencial ação da aplicação da inoculação de forma mista ou sequencial de linhagens não-*Saccharomyces* com *S. cerevisiae* está no incremento da concentração de moléculas de interesse, como os ésteres. (ROLLER *et al.*, 2018).

2.4 Análise de Ésteres e álcoois

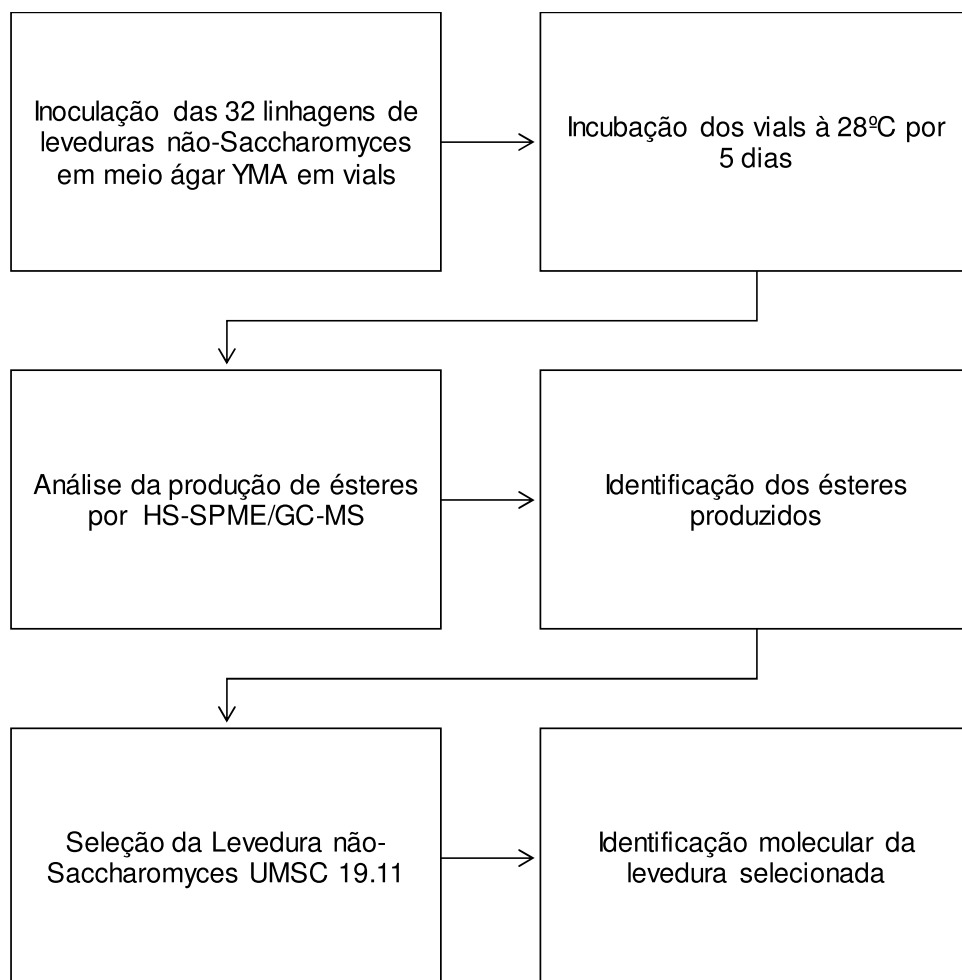
Os métodos para extração de compostos aromáticos e conseqüentemente voláteis se dividem em dois grupos: extração baseada em solventes e extração em *headspace*, sendo a última a mais utilizada. A técnica de microextração em fase sólida (do inglês SPME – *Solid-phase microextraction*) é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de compostos voláteis no *headspace*. A SPME usa uma fibra de sílica fundida, com diferentes materiais para adsorção dos compostos, montada dentro de um *holder*, onde durante o processo de extração ocorre um equilíbrio entre a amostra, o *headspace* e a fibra, para todos os compostos voláteis da amostra. (ELMORE, 2015a). Através da técnica SPME é possível detectar compostos voláteis das mais diferentes classes químicas, como ésteres, álcoois, aldeídos, furanos, cetonas, entre outros. (JELEN *et al.*, 2012). Após a extração e adsorção dos compostos voláteis na fibra, os compostos voláteis são desorvidos no sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para separação, identificação e quantificação dos compostos (ELMORE, 2015b).

3 METODOLOGIA

A metodologia desenvolvida na presente dissertação está ilustrada no fluxograma abaixo e descrita de maneira detalhada no Apêndice A - Seleção de levedura não-*saccharomyces* e avaliação da produção de ésteres e álcoois durante as fermentações na forma pura, mista e sequencial em mosto sintético.

A primeira parte do estudo (Figura 1) consistiu em selecionar uma levedura não-*Saccharomyces* a partir do banco de leveduras do Itt Nutrifer com potencial de geração de ésteres. Após a etapa de seleção, a levedura selecionada foi encaminhada para a identificação molecular.

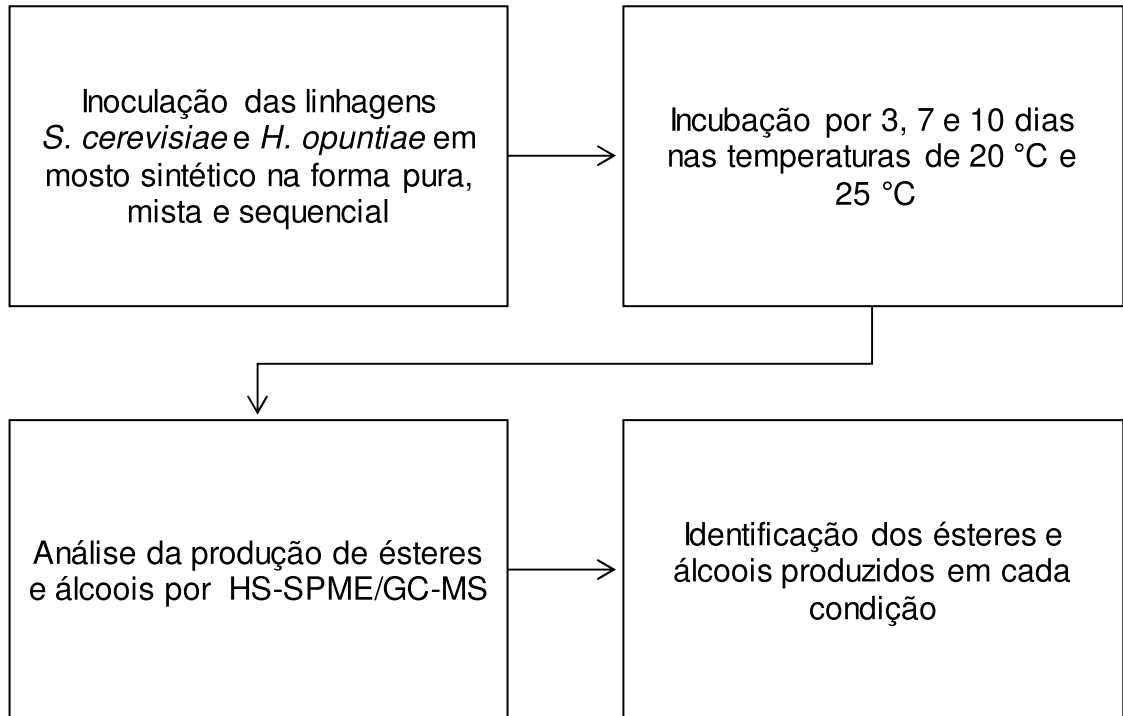
Figura 1 – Esquema da metodologia empregada para a seleção de uma levedura não-*Saccharomyces* produtora de ésteres.



Na segunda parte do estudo (Figura 2) foi realizada a aplicação da levedura selecionada em processos fermentativos em mosto sintético com a finalidade de verificar

quais os ésteres e álcoois são formados em função do tipo de inoculação (pura, mista ou sequencial) e do tempo e temperatura de incubação.

Figura 2 – Esquema da metodologia empregada na aplicação da levedura em processos fermentativos em mosto sintético.



REFERÊNCIAS

- ADRIANA, P. C. S. *et al.* Improving production of aromatic compounds by indigenous yeasts in Chenin Blanc grape must. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 28, p. 2433–2442, 2016.
- ASSIS, M. O. *et al.* Impact of a Non-*Saccharomyces* Yeast Isolated in the Equatorial Region in the Acceptance of Wine Aroma. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 9, p. 759–769, 2014.
- AZZOLINI, M. *et al.* Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspora delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 277–293, 2014.
- BENITO, Á.; CALDERÓN, F.; BENITO, S. The influence of non-*Saccharomyces* species on wine fermentation quality parameters. **Fermentation. MDPI AG**, v. 5, n. 54, p. 1-18, 2019.
- CANONICO, L.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulaspora delbrueckii* for secondary fermentation in sparkling wine production. **Food Microbiology**, v. 74, p. 100–106, 2018.
- CAPECE, A. *et al.* Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 38, 2018.
- CHEN, K. *et al.* Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. **Food Microbiology**, v. 69, p. 51–63, 2018.
- COSTA, B. N. Fermentação alcóolica: Principais aplicações e fatores que interferem no processo. **Universitas Nusantara PGRI Kediri**, v. 1, p. 1–7, 2017.
- CURIEL, J. A. *et al.* Different non-*Saccharomyces* yeast species stimulate nutrient consumption in *S. cerevisiae* mixed cultures. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2121, OCT, p. 1-9, 2017.
- DOMIZIO, P. *et al.* Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 3, p. 170-180, 2011.
- ELMORE, J. S. Extraction techniques for analysis of aroma compounds. In: Flavour Analysis and Perception in food and Beverages. **Woodhead Publishing**, p. 31-46, 2015a.
- ELMORE, J. S. Aroma extract analysis. In: Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages. **Woodhead Publishing**, p. 47-61, 2015b.
- ESCALANTE, W. D. E. Perspectives and Uses of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Fermented Beverages. **Intech**, v. 1, p. 13, 2016.

GARAVAGLIA, J. Otimização da produção de acetil e etil ésteres pela levedura *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08. 2014. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

GSCHAEDLER, A. Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 73–77, 2017.

HIRST, M. B.; RICHTER, C. L. Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 67, n. 4, p. 361–370, 2016.

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, 2018.

JELEŃ, H. H.; MAJCHER, M.; DZIADAS, M. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. **Analytica chimica acta**, v. 738, p. 13–26, 2012.

LI, X. *et al.* Effects of Six Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Strains on Phenolic Attributes, Antioxidant Activity, and Aroma of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv.) Wine. v. 2017, 2017.

LIU, P.T. *et al.* The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 356–363, 2016.

LIU, S. *et al.* Chemical composition of bilberry wine fermented with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* and *Schizosaccharomyces pombe*) and *Saccharomyces cerevisiae* in pure, sequential and mixed fermentations. **Food Chemistry**, v. 266, n. June, p. 262–274, 2018.

LLEIXÀ, J. *et al.* *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* competition during microvinification under different sugar and nitrogen conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1959, DEC, p. 1-10, 2016.

LOIRA, I. *et al.* Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulasporea delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. **Food Research International**, v. 76, p. 325–333, 2015.

LÓPEZ, S.; MATEO, J. J.; MAICAS, S. Characterisation of *Hanseniaspora* isolates with potential aromaenhancing properties in muscat wines. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 35, n. 2, p. 292–303, 2014.

LU, Y. *et al.* The effects of co- and sequential inoculation of *Torulasporea delbrueckii* and *Pichia kluyveri* on chemical compositions of durian wine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 7853-7863, 2017.

MICHEL, M. *et al.* Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, p. 569-587, 2016.

- MORRISSEY, J. P. *et al.* Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. **Yeast**, v. 32, n. 1, p. 3-16, 2015.
- PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–20, 2016.
- PETRUZZI, L. *et al.* Microbial resources and enological significance: opportunities and benefits. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 995, 2017.
- REINECCIUS, G., PETERSON, D. **Principles of food analysis. In: Instrumental assessment o food sensory quality.** Woodhead Publishing, p. 53-102, 2013.
- RENAULT, P. *et al.* Enhanced 3-sulfanylhexas-1-ol production in sequential mixed fermentation with *Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* reveals a situation of synergistic interaction between two industrial strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 293, MAR, p. 1-10, 2016.
- RENAULT, P. *et al.* Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 40–48, 2015.
- ROJAS, V. *et al.* Acetate ester fformation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 181-188, 2003.
- ROLLERO, S. *et al.* Fermentation performances and aroma production of non-conventional wine yeasts are influenced by nitrogen preferences. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 5, 1 ago. 2018.
- SANTOS, A. P. C. Efeito da inoculação combinada de leveduras indígenas em mosto chenin blanc na composição do aroma e aceitação do consumidor. 2015. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.
- STERNES, P. R. *et al.* Genome sequences of three species of *Hanseniaspora* isolated from spontaneous wine fermentations. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, p. 1–2, 2016.
- SUN, S. Y. *et al.* Sequential culture with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* and management of fermentation temperature to improve cherry wine quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 6, p. 1880-1887, June, 2015.
- VIANA, F *et al.* Rational selection of non-*Saccharomyces* wine for mixed starters based on ester formationand enological traits. **Food Microbiology**, v. 25, p. 778-785, 2008.
- VRHOVSEK, U. *et al.* Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 15, 2018.

APÊNDICE A - SELEÇÃO DE LEVEDURA NÃO-SACCHAROMYCES E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES E ÁLCOOIS DURANTE AS FERMENTAÇÕES NA FORMA PURA, MISTA E SEQUENCIAL EM MOSTO SINTÉTICO

Artigo formatado nas normas da revista International Journal of Food Microbiology

TÍTULO: SELEÇÃO DE LEVEDURA NÃO-SACCHAROMYCES E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES E ÁLCOOIS DURANTE AS FERMENTAÇÕES NA FORMA PURA, MISTA E SEQUENCIAL EM MOSTO SINTÉTICO

Pâmela Martinez Lima*

Jessica Fernanda Hoffmann

Tanise Gemelli

Resumo: Leveduras do grupo não-*Saccharomyces* vem recebendo maior consideração devido ao potencial de incrementarem aromas às bebidas fermentadas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi selecionar uma levedura não-*Saccharomyces* com potencial de gerar moléculas aromáticas durante as fermentações na forma pura, mista e sequencial, associada a *S. cerevisiae*. Das 32 leveduras não-*Saccharomyces* avaliadas em meio ágar YMA, a cepa UMSC 19.11 foi selecionada devido à expressiva formação dos ésteres acetato de fenetila e acetato de isoamila. Essa cepa foi inoculada na forma pura, mista e sequencial em mosto sintético e os compostos de aroma foram avaliados após 3, 7 e 10 dias de fermentação a 20° C e 25° C. Como resultado, treze compostos voláteis, incluindo 8 ésteres e 5 álcoois foram identificados. O éster acetato de fenetila apresentou relevante formação na fermentação pura com a levedura *H. opuntiae*, principalmente no tempo de 3 dias à 25 °C. Na fermentação mista o destaque foi para a produção de isopentanol e álcool fenetílico e para a fermentação sequencial o hexanoato e octanoato de etila. A produção de etanol foi maior nas fermentações utilizando a cepa *S. cerevisiae* na forma pura e sequencial. De maneira geral, a

* Bióloga e Mestranda no Programa de Mestrado em Nutrição e Alimentos, palima_1985@yahoo.com.br.

temperatura de 25 °C demonstrou ter sido mais favorável para o grupo acetil ésteres e a temperatura de 20 °C para os etil ésteres. Os resultados desse trabalho indicaram que a levedura não-*Saccharomyces*, identificada como *H. opuntiae*, pode contribuir na geração de aromas em mosto sintético.

Palavras-chave: Aromas, Ésteres, Fermentação, Leveduras.

Abstract: Yeasts from the non-*Saccharomyces* group are receiving greater consideration due to the potential to increase aromas in fermented drinks. Thus, the objective of the present work was to select a non-*Saccharomyces* alteration with the potential to generate aromatic molecules during fermentations in pure, equivocal and sequential form, associated with *S. cerevisiae*. Of the 32 non-*Saccharomyces* yeasts, available in YMA agar medium, a UMSC 19.11 strain was selected due to the expressive formation of ethyl acetate and isoamyl acetate esters. This strain was inoculated in pure, mixed and sequential form into synthetic must and the aroma compounds were evaluated after 3, 7 and 10 days of fermentation at 20° C and 25° C. As a result, thirteen volatile compounds, including 8 esters and 5 alcohols were identified. The phenethyl acetate ester showed a relevant formation in the pure fermentation with yeast *H. opuntiae*, mainly in the time of 3 days at 25 ° C. The mixed fermentation the highlight production was to isopentanol and phenethyl alcohol and for the sequential fermentation of ethyl hexanoate and ethyl octanoate. Ethanol production was higher in fermentations using the *S. cerevisiae* strain in pure and sequential form. In general, the temperature of 25 ° C proved to be more favorable for the acetyl esters group and the temperature of 20 ° C for the ethyl esters. The results of this work indicate that the non-*Saccharomyces* yeast, identified as *H. opuntiae*, can contribute to the generation of aromas in fermented products.

Keywords: Flavors, Esters, Fermentation, Yeast.

1 INTRODUÇÃO

As leveduras desempenham papel fundamental nos processos fermentativos para produção de bebidas fermentadas, pois além de promoverem a formação de etanol e gás carbônico, contribuem significativamente para a produção de compostos aromáticos, os quais podem fornecer particularidades em relação a complexidade aromática de cada bebida (Gschaedler, 2017).

Em vinhos, cervejas e sidras o processo de fermentação é comumente realizado utilizando a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, por promover a geração de produtos uniformes e padronizados (Escalante, 2016). No entanto, há um crescente interesse no emprego de espécies não-*Saccharomyces* por apresentarem distintas atividades no que se refere a redução do teor de etanol, elevação da acidez, incorporação e estabilidade da cor e promoção de moléculas químicas ou aromáticas particulares nas bebidas fermentadas (Chen et al., 2018 ; Hu et al., 2018).

As linhagens de leveduras que compõem o grupo das não-*Saccharomyces* são dos gêneros: *Hanseniaspora* sp., *Issatchenkia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp. e *Torulaspota* sp.. Diversos estudos têm demonstrado que as leveduras não-*Saccharomyces* são capazes de produzir ésteres, como o acetato de isoamila (aroma semelhante a banana) e o 2-fenilacetato (aroma frutado), compostos considerados relevantes no aroma de bebidas (Domizio et al., 2011). As leveduras do gênero *Hanseniaspora* sp. podem contribuir na formação de moléculas voláteis, como a produção de 2-feniletila, e também na elevação do teor de açúcares em mosto de uva (Adriana et al., 2016). A espécie *H. opuntiae* tem sido descrita em relação ao seu metabolismo e à formação de compostos de aroma em vinhos. Esta cepa pode promover uma significativa redução na quantidade final de etanol e elevar o teor de glicerol nos vinhos (Luan et al., 2018a).

Entender a dinâmica dos processos de fermentação na produção de compostos aromáticos é também de grande importância, pois pode ser alterada em função da forma de aplicação das leveduras. Nos processos de fermentação mista ou sequencial de linhagens não-*Saccharomyces* com a espécie *S. cerevisiae*, foram observadas alterações nos níveis de lactato de etila, 2,3-butanodiol, 2-feniletanol e acetato de 2-fenitila e em relação as leveduras não-*Saccharomyces*, estas contribuem na retenção das propriedades organolépticas desejadas (Loira et al., 2015).

Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar uma levedura não-*Saccharomyces* com potencial de produção ésteres e de álcoois importantes para bebidas fermentadas e avaliar sua capacidade de gerar esses compostos em mosto sintético quando inoculado na forma de cultura pura, mista e sequencial em diferentes tempos e temperaturas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção das leveduras não-*Saccharomyces* produtoras de aromas

No banco de microrganismos do laboratório de Biologia Celular e Molecular do Itt Nutrifor, foram pré-selecionadas 32 linhagens de leveduras (Tabela 1). Essas leveduras foram isoladas de vinhedos da cultivar de Uva Merlot, plantados no Vale dos Vinhedos, na cidade de Bento Gonçalves, na região da Serra Gaúcha (CROSATO et al., 2018) e na cidade de Vacaria, na região dos Campos de Cima da Serra. A identificação do gênero (*Saccharomyces* sp. ou não-*Saccharomyces*) foi realizada em trabalho anterior por PCR Multiplex (Reação em Cadeia da Polimerase) e visualização por microscópio (Crosato et al., 2018).

Tabela 1 - Origem e codificação das linhagens de leveduras utilizadas no trabalho

Origem das linhagens	Codificação banco de microrganismos
Regiões da Serra e Campanha, RS.	UMSC19.11, USC9.5, USC9.1, USC4.5, USC3.25, USC3.19, UMS03.20, USC9.13 UMSC9.15, USV1.6, USV4.19, USV4.34, USV6.1 UMS04.3, UMS17.17, UMS24.05, UMS12.12,UMSC03.22,UMSC11.8 UMSC12.2,UMSC22.15,UMSC22.27,USC10.15,USC10.1,USC19.3,USC23.6, USC23.7, USC26.19, USC26.25, USC22.12, UMS17.8, 6.6*

*controle positivo. Cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

Antes de iniciar o processo de seleção, foi necessário realizar avaliação de viabilidade e pureza em cada cepa de levedura. Deste modo, as 32 leveduras pré-selecionadas foram recuperadas do ultrafreezer ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), e $100\text{ }\mu\text{L}$ foram inoculados em 50 mL de caldo YM (Yeast Medium Broth). O caldo YM é composto por extrato de levedura (0.3 %); extrato de malte (0.3%); peptona (0.5 %) e glicose (1.0 %). Finalizado este processo, cada levedura foi incubada sob agitação orbital (150 rpm) à $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, entre 24 h e 48 h para crescimento. Um Erlenmeyer sem inoculação foi adicionado ao teste para controle do processo. Transcorrido o período de crescimento, cada Erlenmeyer contendo a respectiva levedura foi plaqueada através da técnica de esgotamento em meio Ágar YMA (Yeast Medium Agar) e incubadas em BOD à $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 48 horas. Este meio de cultura apresenta a mesma composição do caldo YM, porém é acrescentado o Ágar (1.5 %). Ao concluir o processo de recuperação das leveduras, foi realizada a avaliação de viabilidade e pureza das linhagens. Desta forma, cada placa foi examinada na lupa para uma verificação total e de todos os campos de cada placa para garantir que não havia alguma contaminação.

2.2 Análise da produção dos ésteres pelas leveduras não-*Saccharomyces* em meio ágar YMA

Após a verificação da viabilidade e pureza, foi iniciada a análise para a realização do *screening* da produção de ésteres por leveduras não-*Saccharomyces*. Para este ensaio, 10 mL do meio ágar YMA foram vertidos em vials de 20 mL . Os vials contendo o meio ficaram inclinados para solidificar na forma de bisel. Com o meio já solidificado, em cada tubo, foi inoculada uma colônia de cada levedura viável e os tubos foram incubados à $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 dias. Um tubo sem inoculação foi incubado nas mesmas condições como controle negativo do processo. Completado o período de crescimento, cada tubo foi encaminhado para a análise de compostos voláteis.

Os ésteres foram extraídos pela técnica de microextração em fase sólida no headspace (HS-SPME). Antes da exposição da fibra, os frascos foram aquecidos a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos para volatilização das moléculas. Posteriormente, a fibra de poldimetilsiloxano / divinilbenzeno / carboxeno (PDMS / DVB / CAR) (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) foi exposta ao headspace por 10 minutos. Após extração, as fibras de SPME foram retiradas dos frascos e inseridas no sistema de injeção do GC-MS para

a separação e identificação dos ésteres. O tempo de dessorção térmica foi de 10 min a 250 °C no modo splitless.

A identificação dos ésteres foi realizada em um sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (Shimadzu GCMS QP 2010 Plus), de acordo com o método proposto por Garavaglia (2014). A separação dos ésteres foi realizada utilizando a coluna capilar ZBWAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com polietilenoglicol (Supelco) utilizando gás hélio (grau de pureza 99,99%, White Martins, São Paulo, Brasil) como gás de arraste em um fluxo de 1 mL/min. A temperatura do forno foi de 50 °C mantida por 1 min e após, aumentada para 80 °C a uma taxa de 3 °C/min e, após um aumento adicional para 200 °C a uma taxa de 20 °C/min o tempo de corrida foi de 17 min. O espectrômetro de massas foi operado com ionização de impacto de elétrons de 70 eV, temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C. Os compostos foram analisados no modo de varredura, na faixa m/z : 40 a 400.

Os ésteres foram identificados a partir da comparação dos espectros de massas experimentais com os espectros teóricos contidos na biblioteca NIST11. A integração dos picos foi realizada no modo automático e o valor de área de cada composto identificado foi anotado. A partir das áreas de cada composto foi realizado um gráfico de mapa de calor (*heat map*) no programa Metaboanalyst 4.0 (Chong; Wishart; Xia, 2019) de forma a visualizar em que grupo havia maior produção de ésteres.

2.3 Identificação molecular da levedura não-*Saccharomyces*

A identificação molecular da levedura não-*Saccharomyces* foi conduzida no laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular da Unisinos. O isolamento do DNA foi realizado utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification da Promega, conforme as especificações do fabricante. A amplificação do fragmento ITS, com aproximadamente 600 pb, incluindo os ITS 1 e o ITS 2, separados pelo rRNA 5.8S, foi feita utilizando os seguintes primers: ITS 1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS 4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (Bruns et al., 1990).

As reações foram preparadas em volume final de 25 uL com 50 ng de DNA, 1,5 mM MgCl₂, 200 uM de cada dNTP, 0,5 uM de cada primer, 1U da enzima Taq Polimerase e 1X do tampão de PCR. Foram realizados 35 ciclos de amplificação consistiram numa etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30

segundos e a extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de uma extensão final na mesma temperatura, porém, por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram purificados enzimaticamente utilizando Exonuclease I e FastAP da Thermo Fischer Scientific e encaminhados para sequenciamento pelo método de Sanger pela empresa Macrogen (Seoul, Coreia do Sul). A qualidade das sequências foi avaliada por meio da visualização das bandas com o software ChromasPro 1.5. As sequências foram verificadas também usando a ferramenta online BLASTn para comparação com a sequências depositadas no banco de dados do GeneBank (NCBI).

2.4 Análise da produção dos ésteres e álcoois pela levedura não-*Saccharomyces* (UMSC 19.11) em mosto sintético na forma de cultura pura, mista ou sequencial

2.4.1 Preparo do mosto sintético

O mosto sintético foi preparado de acordo com Fairbairn et al. (2017), utilizando o meio YNB (meio base para levedura) sem aminoácidos e suplementado com glicose (20,0 %), ácido málico (0,2 %), ácido tartárico (0,3 %); sulfato de amônio (0,03 %), fosfato de amônio (0,03 %) e caseína hidrolisada (0,02 %) para um volume de 1 L.

2.4.2 Preparo dos inóculos

As linhagens (*S. cerevisiae* e UMSC 19.11) foram crescidas em meio Caldo YM para a produção de biomassa no período de 24 h a 48 h. Ao término do crescimento, as leveduras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos para obtenção do *pellet*. O sobrenadante foi removido e cada *pellet* foi ressuscitado na diluição 1/10 do inóculo em solução salina 0,85%. Em seguida, foram coletados 1 mL de cada *pellet* e transferidos para um tubo *ependorf* para realização da diluição. A diluição foi conduzida através da coleta de 100 µL de célula de cada levedura em 900 µL de solução salina. Ao final foi obtido uma diluição de 1:10 e o processo foi repetido para obtenção das diluições 1:100 e 1:1000.

A diluição 1:100 foi contada para a levedura *S. cerevisiae* e a diluição 1:1000 para cepa de levedura não-*Saccharomyces* (UMSC 19.11). As contagens foram realizadas em câmaras de Neubauer e padronizando conforme os tratamentos. Para a fermentação

sequencial a *S. cerevisiae* foi inoculada 24 h antes na concentração $1,0 \times 10^9$ cels mL⁻¹ e para o restante das fermentações (mista e pura) a mesma levedura foi inoculada na concentração 5×10^8 cels mL⁻¹. Já a cepa não-*Saccharomyces* (UMSC 19.11), devido ao seu crescimento ter sido mais baixo comparado com a *S. cerevisiae*, para todos os tratamentos que continham a inoculação desta cepa a concentração da suspensão foi padronizada em 5×10^8 cels mL⁻¹.

2.4.3 Fermentação em escala laboratorial

Foram preparadas cinco fermentações: (1) fermentação pura utilizando somente a cepa não-*Saccharomyces* (UMSC 19.11) no mosto sintético; (2) fermentação pura utilizando somente a levedura *S. cerevisiae*; (3) processo de fermentação de cultura mista, no qual ambas as leveduras foram inoculadas no mesmo tempo e proporção (1:1); (4) inoculação sequencial e a cepa UMSC 19.11 foi inoculada 24 h após a inoculação da espécie *S. cerevisiae*.; (5) fermentação somente o mosto sintético como controle do processo.

Todas as fermentações foram feitas em triplicata. As inoculações de cada levedura foram realizadas adicionando 0,50 µL em 50 mL do mosto sintético disposta em Erlenmeyers de 250 mL de volume. A concentração celular para cada levedura foi padronizada de acordo com o preparo das fermentações, ou seja, para a fermentação sequencial a levedura *S. cerevisiae* foi de $1,0 \times 10^9$ cels mL⁻¹, inoculada 24 h antes da cepa não-*Saccharomyces* (UMSC 19.11) e esta foi inoculada na concentração celular de 5×10^8 cels mL⁻¹. Na fermentação mista as leveduras (*S. cerevisiae* e UMCS 19.11) foram inoculadas ao mesmo tempo e na proporção 5×10^8 cels mL⁻¹. As fermentações de cultura pura ambas as leveduras foram inoculadas isoladamente também na concentração 5×10^8 cels mL⁻¹. Os Erlenmeyers de cada fermentação foram incubados em estufas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C. As coletas para análise dos compostos voláteis foram realizadas após 3, 7 e 10 dias de incubação. Esta coleta foi realizada em duplicata, totalizando 74 amostras.

2.4.4 Análise dos ésteres e álcoois produzidos em mosto sintético por HS-SPME-GC-MS

Ao final do processo fermentativo (3, 7 ou 10 dias), foram coletados 20 mL dos mostos fermentados e centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm para a separação do

líquido fermentado e o *pellet*. O *pellet* foi lavado e os líquidos fermentados foram divididos em 2 tubos vials e guardados em freezer para a análise dos compostos voláteis.

Para a análise dos ésteres, 5 mL do sobrenadante foram transferidos para vials de 20 mL e 2g de NaCl foram adicionados. A mistura foi incubada por 15 min a 40 °C. A fibra SPME foi exposta por 20 min a 40 °C. Após esse período, a dessorção foi realizada por 5min a 250 °C (Vallverdú-Queralt et al., 2015). As condições de GC-MS estão descritas no item 2.2, no entanto, para essas análises foi utilizada a coluna DB-5 (30m x 0.25mm x 0.25µm, Agilent Technologies).

2.4.5 Análise estatística

Para o primeiro estudo, a partir das áreas de cada composto foi realizado um gráfico de mapa de calor (*heat map*) no programa Metaboanalyst 4.0 (Chong; Wishart; Xia, 2019) de forma a visualizar em que grupo havia maior produção de cada um dos ésteres.

Para o segundo estudo, os resultados foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$). Em caso de significância estatística, para o fator cultura e tempo foi aplicado o teste Tukey ($P < 0,05$) e para o fator temperatura foi aplicado o teste t ($P < 0,05$). Um gráfico de mapa de calor (*Heat map*) foi gerado com o valor médio das áreas dando ênfase a forma de aplicação das leveduras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção das leveduras não-*Saccharomyces* com potencial de produção de aromas

A fim de selecionar leveduras não-*Saccharomyces* com potencial de produção de ésteres para aplicação em diferentes bebidas fermentadas, o perfil de compostos voláteis em meio ágar YMA de 32 leveduras foi avaliado por HS-SPME-GC-MS. Na tabela 2 estão apresentados os doze acetil e etil ésteres identificados nas 32 amostras. De maneira geral, os resultados indicaram que as espécies de leveduras não-*Saccharomyces* produzem compostos aromáticos semelhantes à espécie *S. cerevisiae*, mas as proporções relativas entre os ésteres foram diferentes. Estas leveduras possuem eficácia em alcançar produções mais relevantes de moléculas aromáticas como os álcoois superiores, acetatos e ésteres, os quais são gerados em porção maior quando comparadas a levedura *S. cerevisiae* (Rollero et al., 2018).

As diferenças nos perfis desses compostos aromáticos, ou em outras palavras, as proporções relativas entre os ésteres específicos, são indicativas de que essas espécies provavelmente vão gerar produtos alimentícios fermentados com novos perfis de sabor. Estes resultados preliminares também sugerem que as vias envolvidas na formação desses compostos aromáticos, como a via Ehrlich, ou as enzimas específicas responsáveis pela síntese de ésteres (ATF1P, ATF2P em *S. cerevisiae*), também estão presentes em leveduras não-*Saccharomyces*. No entanto, a regulação de sua expressão, ou possivelmente a funcionalidade das enzimas (especificidade do substrato ou eficiência catalítica), são diferentes em leveduras não convencionais em comparação com as espécies de *Saccharomyces* sp. (Gamero et al., 2016).

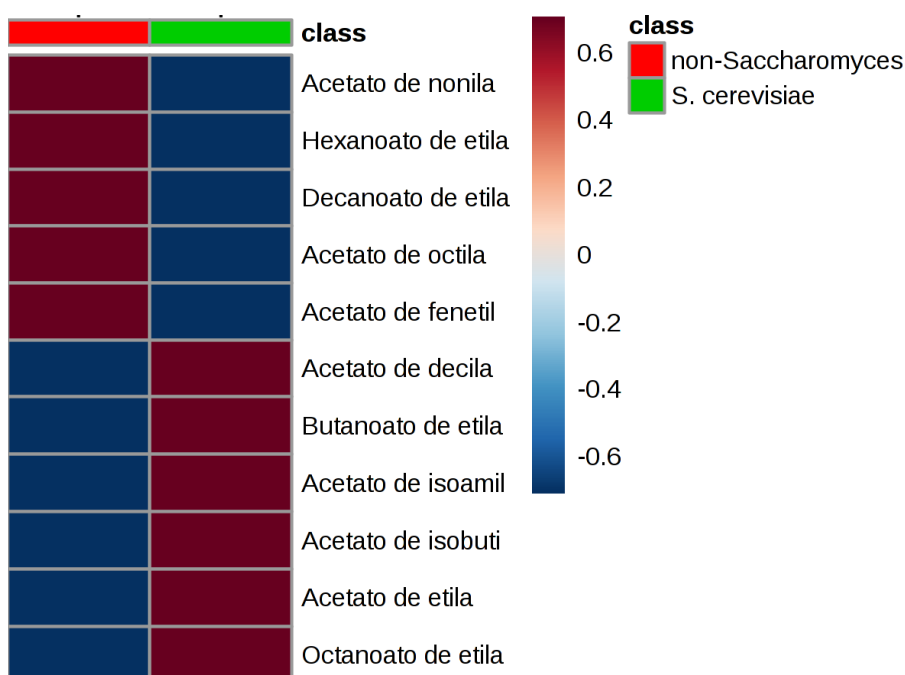
Tabela 2 - Ésteres identificados por HS-SPME-GC-MS em meio ágar YMA

Leveduras	Acetato de etila	Acetato de isobutila	Butanoato de etila	Acetato de isoamil	Acetato de heptila	Octanoato de etila	Acetato de octila	Acetato de nonila	Decanoato de etila	Acetato de decila	Acetato de fenetila	Hexanoato de etila
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UMS 03.22	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
UMS 11.8	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
UMS 12.12	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
UMS 17.7	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
UMS 17.8	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
UMS 22.15	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
UMS 2405	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
UMS 3.20	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
UMS 4.3	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
UMS 9.15	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UMSC 12.2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
UMSC 22.27	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
USC 10.1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
USC 10.15	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
USC 19.11	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
USC 22.12	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
USC 23.19	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
USC 23.6	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
USC 23.7	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
USC 26.25	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
USC 3.19	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
USC 3.25	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
USC 4.5	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
USC 9.1	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
USC 9.13	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
USC 9.5	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
USV 1.6	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
USV 4.19	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
USV 4.34	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
USV 6.1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ = presença; - = ausência.

A Figura 1 mostra uma representação de mapa de calor (*heat map*) para os ésteres identificados nesse trabalho. A coloração vermelha indica uma produção relativamente alta, enquanto a cor azul indica uma produção relativamente baixa de cada acetil ou etil éster identificado.

Figura 1 - Mapa de calor (*heat map*) representando o aumento ou a diminuição das áreas dos ésteres produzidos pelas leveduras não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* em meio Ágar YMA.



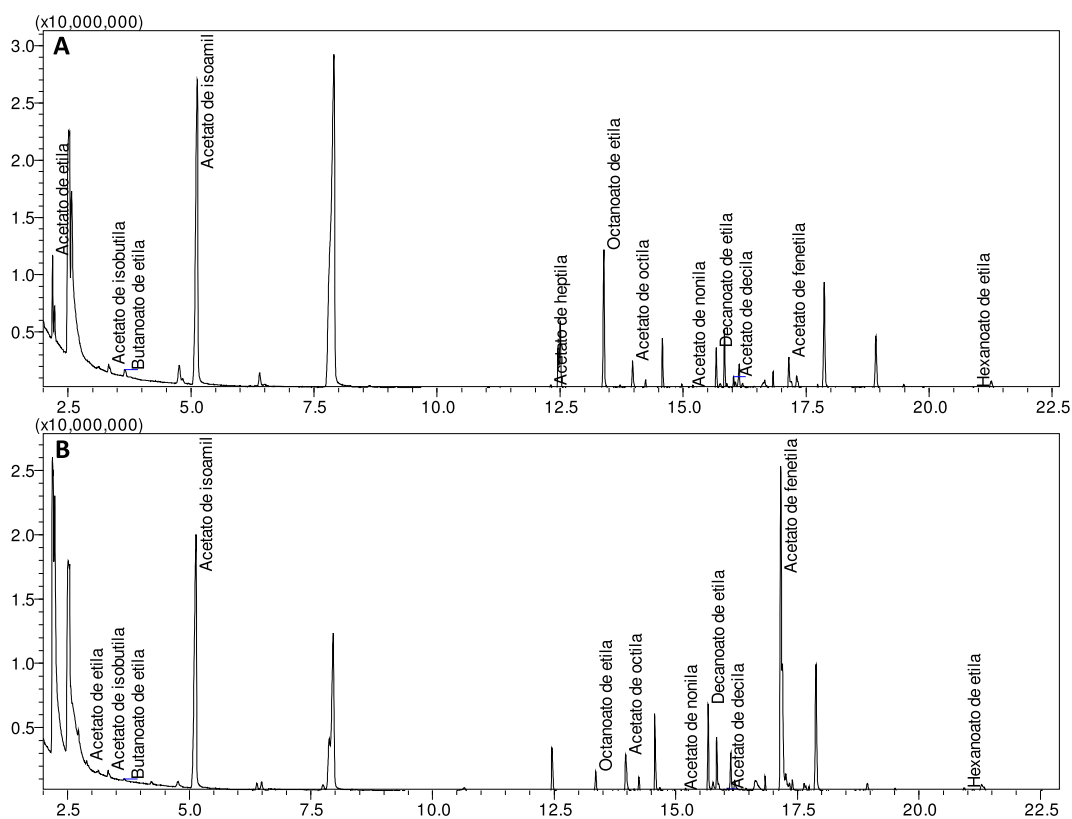
Em média, a levedura *S. cerevisiae* produziu maior teor de acetato de decila, butanoato de etila, acetato de isoamila, acetato de isobutila, acetato de etila e octanoato de etila (Figura 1). No entanto, as leveduras não-*Saccharomyces* UMS 2405 e UMSC 19.11 apresentaram maior formação do composto acetato de isoamila do que a levedura *S. cerevisiae*.

O grupo das leveduras não-*Saccharomyces* se destacaram pela maior produção de acetato de nonila (UMSC 12.2, USC 9.5 e USC 23.7), hexanoato de etila (USC 9.5, UMSC 12.2, UMS 03.22, USV 1.6 e USC 19.11), decanoato de etila (UMSC 12.2, USV 1.6, USC 3.25, UMS 03.22), acetato de octila (USC 26.25) e acetato de fenetila (USC 9.15, USC 9.13, USC 9.5, USC 4.5 e UMSC 19.11).

De modo geral, os ésteres produzidos estão relacionados a aromas frutados e florais. As moléculas principais do grupo dos acetil ésteres são o acetato de etila (aroma frutal), acetato de isoamil (aroma de banana) e acetato de 2-fenil (aroma de rosa). Os compostos hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila, pertencente ao grupo dos ésteres de etila, e são relatados por promoverem aroma de maçã tanto para o vinho quanto para cerveja (Vrhovsek et al., 2018).

Na figura 2 estão apresentados os cromatogramas característicos dos ésteres produzidos pela levedura *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* UMSC 19.11. De maneira geral, diferentes leveduras não-*Saccharomyces* poderiam ser selecionadas para serem utilizadas na fermentação em mosto sintético. No entanto, pela expressiva formação de acetato de isoamila e acetato de fenetila, a cepa UMSC 19.11 foi escolhida (Figura 2). Essa molécula é responsável pelo aroma de banana e/ou maçã em produtos fermentados (Hirst and Richter, 2016). Além disso, ésteres pertencentes ao grupo do ácido fenilacético apresentam aroma de mel (Regina and Marques, 2011).

Figura 2 - Cromatograma representativo dos ésteres produzidos pela levedura *S. cerevisiae* (A) e não-*Saccharomyces* UMSC 19.11 (B) em meio ágar YMA



Esses resultados preliminares indicam que espécies de leveduras não-*Saccharomyces* são capazes de produzir ésteres que são conhecidos por serem importantes em fermentações na indústria da cerveja e vinho e que são produzidos por leveduras da espécie *S. cerevisiae*. Estes resultados preliminares confirmam o significativo potencial inexplorado de leveduras não-*Saccharomyces* em fermentações alimentares.

As diferenças nos perfis ésteres oferecem muitas possibilidades para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios fermentados com aromas distintos. Dessa forma, para verificar a capacidade de crescer e produzir perfis de ésteres, a levedura UMSC 19.11 foi selecionada para a fermentação em mosto sintético na forma pura, mista e sequencial com a *S. cerevisiae*.

3.2 Identificação molecular

De acordo com o resultado da identificação molecular realizada pelo laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular da Unisinos, a levedura não-*Saccharomyces* (UMSC 19.11) é pertencente ao gênero *Hanseniaspora* sp., espécie *Hanseniaspora opuntiae*. Na tabela 3 está ilustrado as bases de dados utilizadas para a identificação, o nível de similaridade, e a quantidade de pares de bases para sequenciamento.

Tabela 3 - Resultado da identificação molecular da cepa não-*Saccharomyces* UMSC 19.11

Amostra	GenBank		BoldSystems		Pares de bases recuperadas no sequenciamento
	Espécie	Similaridade	Espécie	Similaridade	
UMSC 19.11	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,30 - 100%	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	99,72 - 99,86%	719 pb

O gênero *Hanseniaspora* sp. compõe onze espécies, além de uma espécie do gênero *Kloeckera* sp., é usualmente encontrada em frutas, solos e em exsudatos de árvores. Sua forma é apiculada e se caracteriza como gênero anamórfico ao gênero *Kloeckera* sp. e as leveduras do gênero *Hanseniaspora* sp. podem contribuir muito para a qualidade do vinho, pois produzem concentrações desejáveis de ésteres e ácidos graxos em fermentação espontânea (Jindamorakot et al., 2009 ; Viana et al., 2011).

Esses autores sugerem que as *Hanseniapore* podem produzir vinhos com características diferenciadas quando combinadas com *S. cerevisiae*.

Recentemente a espécie *H. opuntiae* foi caracterizada pelo potencial significativo de diminuir o teor de etanol e elevar a quantidade de glicerol nos vinhos (Luan et al., 2018b). Além disso, as espécies *H. opuntiae* e *H. guilliermondii* contribuíram para o aroma do vinho, mesmo com o tempo de fermentação inferior a *S. cerevisiae* (Martins et al., 2017).

3.3 Compostos voláteis produzidos pela levedura não-*Saccharomyces* em mosto sintético na forma de cultura pura, mista ou sequencial

Treze compostos voláteis, sendo cinco álcoois e oito ésteres foram identificados nos mostos fermentados (Figura 3, Tabela 4). Conforme observado na Figura 3A, nenhum composto foi detectado no mosto sintético sem adição de culturas, demonstrando que todos os compostos identificados são decorrentes da utilização das leveduras no processo fermentativo.

Figura 3 - Cromatograma característico do mosto sintético não-fermentado (A) e da *H. opuntiae* na forma pura e fermentada por 10 dias a 25°C (B).

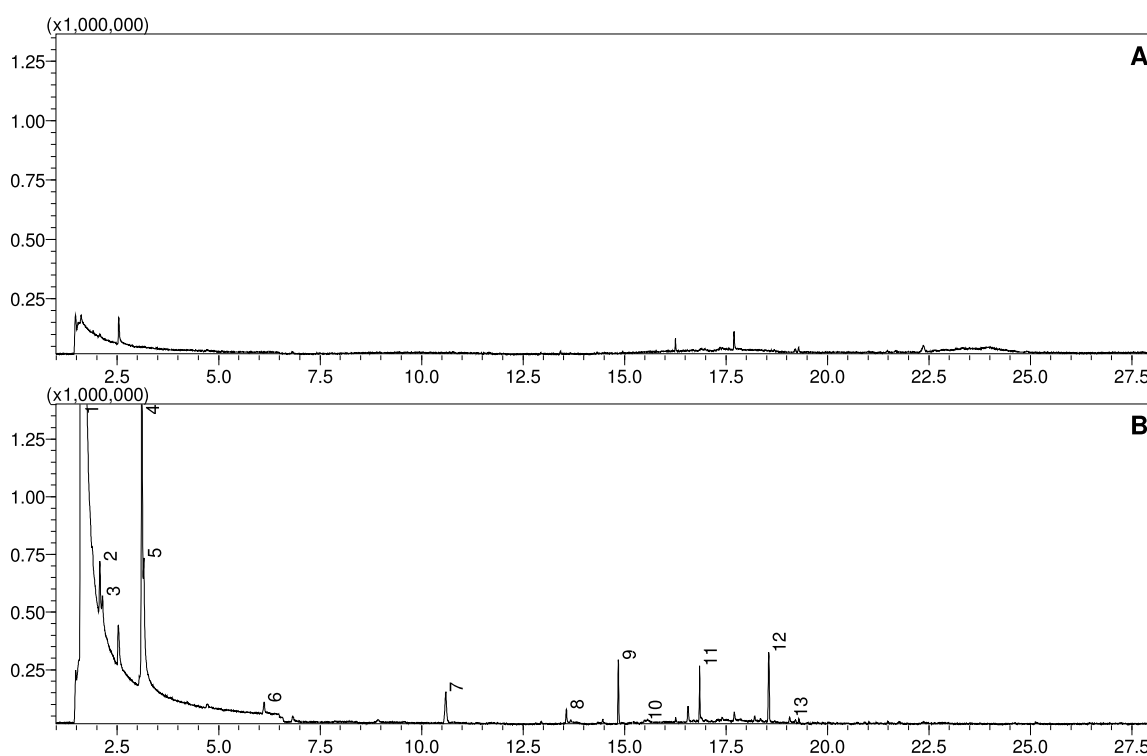


Tabela 4 - Perfil qualitativo das treze moléculas identificados nas diferentes fermentações realizadas em mosto sintético

#	TR	Composto	% Similaridade	Classe	Descrição do aroma	Referência
1	1,61	Etanol	98	Álcool	Álcoólico	(Hirst and Richter, 2016)
2	2,07	Acetato de etila	98	Éster	Frutado; solvente	(Canónico et al., 2018)
3	2,14	Isobutanol	95	Álcool	Álcoolico; solvente	(De-La-Fuente-Blanco et al., 2016)
4	3,11	Isopentanol	98	Álcool	Frutado	(Zhu et al., 2018)
5	3,16	2-metil- 1-Butanol	95	Álcool	Álcoólico	(Loira et al., 2015)
6	6,12	Acetato de isopentila	95	Éster	Banana	(Sun; Jiang; Zhao, 2011)
7	10,59	Hexanoato de etila	99	Éster	Maçã, frutado	(Canónico et al., 2018)
8	13,56	Álcool fenético	97	Álcool	Rosas, mel	(Hirst and Richter, 2016)
9	14,85	Octanoato de etila	99	Éster	Maçã, anis	(Canónico et al., 2018)
10	15,56	Acetato de fenetila	98	Éster	Floral, frutado, mel	(Lleixà et al., 2016)
11	16,85	Decanoato de etila	96	Éster	Frutal (maçã, morango, pêra e anis)	(Hirst and Richter, 2016)
12	18,55	Dodecanoato de etila	98	Éster	Frutal e floral	(Meersman et al., 2016)
13	19,07	Decanoato de isopentila	98	Éster	Maçã e Anis	(Canónico et al., 2018)

TR – Tempo de retenção

Os compostos identificados contribuem com aromas diferenciados para as bebidas, como por exemplo, aroma alcóolico (etanol e isobutanol), aroma frutado (acetato de etila, isopentanol, hexanoato de etila), aroma floral (álcool fenético, acetato de fenetila) e aroma frutado (octanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila) (Tabela 4), demonstrando o potencial aromático que essas leveduras proporcionam as bebidas fermentadas.

Foi observada interação tripla significativa para todas as variáveis analisadas no presente estudo ($P < 0,05$). Na tabela 5 estão apresentados os resultados das áreas dos acetil ésteres identificados em cada tipo de cultura empregada, em duas temperaturas (20 °C e 25 °C) e três tempos de fermentação (3, 7 e 10 dias).

Tabela 5 - Alteração do valor de área dos acetil ésteres ($\times 10^5$ mAU) em função da interação entre as culturas utilizadas x temperatura x tempos de fermentação.

Acetato de etila						
Cultura	20°C			25°C		
	3	7	10	3	7	10
<i>S. cerevisiae</i>	34,4 cB*	44,8 bA*	34,1 dB ^{ns}	53,3 cA	33,8 cB	31,1 bB
<i>H. opuntiae</i>	243,9 aA ^{ns}	197,5 aAB*	173,2 aB*	253,7 aA	100,2 aB	43,4 bC
Mista	121,4 bB ^{ns}	160,9 aA*	124,0 bB*	168,0 bB	96,8 aC	265,5 aA
Sequencial	112,6 bA ^{ns}	70,3 bB ^{ns}	71,8 cB*	101,0 cA	60,9 bB	48,9 bC

Acetato de isopentila						
Cultura	20°C			25°C		
	3	7	10	3	7	10
<i>S. cerevisiae</i>	5,8 dB*	9,0 cA ^{ns}	9,0 cA ^{ns}	13,1 cA	8,0 cB	9,0 bB
<i>H. opuntiae</i>	27,9 bA ^{ns}	9,0 cB ^{ns}	7,4 cB ^{ns}	21,8 bA	7,7 cC	11,6 aB
Mista	10,7 cC ^{ns}	14,9 bB ^{ns}	18,5 bA*	14,5 cA	12,7 bB	12,0 aB
Sequencial	61,3 aA*	25,7 aB*	24,2 aB*	39,0 aA	18,4 aB	13,0 aB

Acetato de fenetila						
Cultura	20°C			25°C		
	3	7	10	3	7	10
<i>S. cerevisiae</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>H. opuntiae</i>	57,4 aA*	34,6 aB ^{ns}	24,9 aB ^{ns}	85,5 aA	32,6 aB	25,9 aB
Mista	4,5 cA ^{ns}	3,4 bAB ^{ns}	2,3 bB ^{ns}	8,9 bA	5,5 bB	2,2 bC
Sequencial	7,6 bA ^{ns}	2,8 bB ^{ns}	ND	6,9 bA	3,1 bB	ND

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre os tipos de cultura pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferenças significativas entre tempos de fermentação, em cada temperatura, pelo teste Tukey ($P < 0,05$). * indica diferença significativa entre a temperatura pelo teste t ($P < 0,05$). ns = não significativo.

Nas fermentações utilizando a cultura pura de *H. opuntiae*, mista e sequencial foi observado a formação do acetato de etila, acetato de isopentila e acetato de fenetila. Na fermentação utilizando a espécie *S. cerevisiae* na forma pura, não foi observada a formação de acetato de fenetila, demonstrando que a responsável pela formação desse composto no mosto sintético foi a levedura *H. opuntiae*. Esses resultados demonstram que o uso isolado de *H. opuntiae* ou a associação das culturas na forma mista e sequencial pode ser favorável ao aroma de bebidas fermentadas, visto que o composto acetato de fenetila contribui com os aromas floral (rosas) e frutal (Martínez et al., 2018; Viana et al., 2009).

Em relação aos tempos de fermentação, de maneira geral, foi observado que nos períodos de três e sete dias a formação de acetil ésteres foi maior, independente da temperatura utilizada. Esse resultado pode estar relacionado ao metabolismo das leveduras ao invés do processo fermentação propriamente dito, pois a etapa de metabolização das leveduras, promove a geração ésteres com características sensoriais frutados e florais (Palma, 2014).

A formação de acetato de etila é dependente da cepa utilizada, da temperatura e do tempo de fermentação. Quando se faz contraste dos valores das moléculas produzidas em relação ao tempo, observou-se que a molécula acetato de etila, na fermentação pura com a cepa *H. opuntiae* foi produzida de forma superior, assim como nas fermentações mista e sequencial em que a mesma cepa foi aplicada. A fermentação pura com a não-*Saccharomyces* e a fermentação mista, destacaram-se os tempos de 7 e 10 dias. Já para a fermentação sequencial, somente o período de 10 dias demonstrou efeito significativo para este composto, porém valor de área bastante inferior quando comparado às outras fermentações.

A inoculação na forma sequencial proporcionou a maior formação do composto acetato de isopentila em ambas as temperaturas, mas foi maior na temperatura de 20°C o que corrobora com o estudo realizado por Sun et al. 2015, os quais os ésteres de acetato de etila e lactato de etila foram enriquecidos à 20 ° C. A molécula acetato de isopentila foi relatado como um composto responsável por aroma de banana em vinhos (Sun et al., 2011).

A levedura *H. opuntiae* produziu os maiores teores do éster acetato de fenetila, no tempo de 3 dias, e teve maior produção a 25 °C do que a 20 °C. De modo geral, para os demais tipos de fermentação a geração desta molécula foi inferior. Além disso, a

levedura *S. cerevisiae* não gerou o acetato de fenetila a nível de detecção pelo método. Esse resultado mostrou que essa cepa não possui a mesma eficiência que a cepa não-*Saccharomyces*, e que não está envolvido na produção deste éster nas fermentações mista e sequencial.

Analisando as duas temperaturas (20 °C e 25 °C) para os quatro tipos de fermentações empregadas, no que se refere aos valores de área para cada acetil éster, a temperatura de 25 °C demonstrou ter sido mais favorável, principalmente pela obtenção de resultados significativos.

Na tabela 6 estão apresentados os resultados das áreas dos etil ésteres identificados em cada tipo de fermentação empregada em relação aos três tempos aplicados, nas temperaturas de 20°C e 25°C. Nas temperaturas de 20 °C e 25 °C a fermentação utilizando a espécie *H. opuntiae* na forma pura, não produziu o composto decanoato de isopentila nos três tempos de fermentação. As moléculas hexanoato de etila e octanoato de etila foram produzidas apenas aos 10 dias.

As moléculas decanoato de etila e dodecanoato de etila também requerem destaque devido a relevante formação destes nas fermentações mista, sequencial e pura com a *S. cerevisiae*. Em se tratando das fermentações pura e mista, o tempo de 3 dias foi significativamente superior e para a fermentação sequencial evidenciou-se o período de 10 dias como produção significativa para estas moléculas. Ambos compostos apresentaram baixa formação pela levedura *H. opuntiae*, comprovando que a *S. cerevisiae* dispõe capacidade de produção destes. O composto decanoato de etila contribui com os aromas de frutas como pera e uva, conhaque e floral, já a molécula dodecanoato de etila os aromas são também frutados e florais (Meersman et al., 2016)

Para o grupo dos etil ésteres, a temperatura de 20 °C exibiu maior benefício, ao contrário das moléculas de ésteres de acetil. Ainda no grupo dos etil ésteres a fermentação de cultura pura com a cepa não-*Saccharomyces* (*H. opuntiae*) apresentou menor eficiência de produção, quando comparada as outras fermentações. Contudo, a fermentação sequencial foi o que melhor exibiu eficácia na produção destes compostos, principalmente para o octanoato de etila. De acordo com (CANONICO et al., 2018), estas moléculas apresentam perfil sensorial de maçã e anis.

Tabela 6 - Alteração do valor de área dos etil ésteres ($\times 10^5$ mAU) em função da interação entre as culturas utilizadas x temperatura x tempos de fermentação.

Hexanoato de etila						
	20°C			25°C		
	3	7	10	3	7	10
<i>S. cerevisiae</i>	35,5 bA*	36,4 bA*	37,0 cA*	14,0 bA	16,5 bA	9,2 bB
<i>H. opuntiae</i>	ND	ND	1,1 d	ND	ND	14,4 a
Mista	16,2 cC ^{ns}	28,4 bB*	48,0 bA*	16,3 bA	10,5 cB	8,9 bB
Sequencial	79,9 aA*	53,1 aB*	56,8 aB*	130,4 aA	26,8 aB	10,1 bB
Octanoato de etila						
	20°C			25°C		
	3	7	10	3	7	10
<i>S. cerevisiae</i>	46,9 bB*	59,4 abA*	48,0 cB*	14,7 cC	42,6 bA	29,1 abB
<i>H. opuntiae</i>	ND	ND	2,7 d*	ND	3,4 cB	22,9 bA
Mista	39,8 bB*	45,4 bB ^{ns}	63,2 bA*	26,6 bB	42,2 bA	26,1 abB
Sequencial	114,6 aA*	88,4 aB*	85,6 aB*	141,5 aA	62,4 aB	31,0 aC
Decanoato de etila						
	20°C			25°C		
	3	7	10	3	7	10
<i>S. cerevisiae</i>	123,8 aA*	91,6 aB*	32,0 bC ^{ns}	97,9 aA	73,0aB	35,7 abC
<i>H. opuntiae</i>	2,3 cB ^{ns}	5,0 dA*	5,4 cA*	0,6 dC	11,6 dB	28,6 bA
Mista	126,1 aA*	78,3 bB*	38,5 bC*	47,3 cA	49,9 cA	49,9 aA
Sequencial	87,6 bB ^{ns}	67,5 cC ^{ns}	106,0 aA*	82,0 bA	68,1 bB	29,1 bC
Dodecanoato de etila						
	20°C			25°C		
	3	7	10	3	7	10
<i>S. cerevisiae</i>	68,0 aB*	162,9 aA*	58,0 bB*	17,0 cC	91,4 a A	26,8 bB
<i>H. opuntiae</i>	2,8 cB ^{ns}	12,5 dA ^{ns}	0,7 cB*	4,0 dC	10,9 cB	16,2 cA
Mista	74,1 aB*	113,0 bA*	34,5 bC*	54,4 bA	42,2 bB	54,3 aA
Sequencial	50,8 bB*	42,2 cB*	188,8 aA*	113,8 aA	49,2 bB	15,6 cC
Decanoato de isopentila						
	20°C			25°C		
	3	7	10	3	7	10
<i>S. cerevisiae</i>	4,1 aB*	30,8 aA*	3,5 bB ^{ns}	1,7 cB	5,6 aA	2,0 aB
<i>H. opuntiae</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mista	4,9 aA ^{ns}	8,5 bA ^{ns}	0,5 cB ^{ns}	5,9 bA	2,7 bB	2,4 aB
Sequencial	4,2 aB ^{ns}	3,0 bB*	5,4 aA*	8,9 a	ND	ND

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre os tipos de cultura pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferenças significativas entre tempos de fermentação, em cada temperatura, pelo teste Tukey ($P < 0,05$). * indica diferença significativa entre a temperatura pelo teste t ($P < 0,05$). ns = não significativo.

Na tabela 7 estão apresentados os resultados das áreas dos álcoois identificados em cada tipo de fermentação empregada em relação aos três tempos aplicados, nas temperaturas de 20 °C e 25 °C. Dentre os álcoois identificados, o isopentanol mostra-se mais interessante, pois apresenta propriedades aromáticas de maior correspondência aos ésteres como doce e floral em vinhos. (Luan et al., 2018b).

Referindo-se a produção de etanol, conforme a tabela 7 a temperatura de 25 °C apresentou maior produção em todas as fermentações e tempos avaliados. Os valores de etanol gerados pela fermentação pura pela cepa *H. opuntiae* foi consideravelmente menor que as fermentações pura, mista e sequencial, aplicadas a levedura *S. cerevisiae*. Além disso, os valores de etanol nas fermentações mista e sequencial foi menor em comparação a fermentação pura com a *S. cerevisiae* à 25 °C. Na fermentação sequencial uma certa homogeneidade entre os valores foi obtida em ambas as temperaturas.

Os resultados para o álcool fenílico não apresentou expressiva geração nas quatro fermentações empregadas. As fermentações mista e sequencial demonstraram maior produção dessa molécula na temperatura de 25 °C. Além das características sensoriais que o álcool fenílico possui (rosas como o acetato de fenetila), este poder ser uma molécula precursora para este éster (Martínez et al., 2018).

Em relação aos álcoois, pode-se dizer que linhagens de leveduras pertencentes ao grupo das não-*Saccharomyces* possuem capacidade de reduzir a concentração de etanol e disponibilizam metabólitos bastante buscados em bebidas fermentadas como glicerol, ácido pirúvico e manoproteínas (Benito et al., 2015).

Tabela 7 - Alteração do valor de área dos álcoois ($\times 10^5$ mAU) em função da interação entre as culturas utilizadas x temperatura x tempos de fermentação

Etanol						
Cultura	20°C			25°C		
	3 dias	7 dias	10 dias	3 dias	7 dias	10 dias
<i>S. cerevisiae</i>	3627,4 bB*	5800,9 aA ^{ns}	3686,1 bB*	7051,9 aA	5478,0 bC	6568,8 aB
<i>H. opuntiae</i>	1565,2 cA*	1722,1 cA*	1090,1 cB*	2520,4 cAB	2210,9 cB	2765,3 bA
Mista	3717,5 bC*	4470,2 bB*	5027,8 aA*	5600,1 bA	5381,3 bA	3625,3 bB
Sequencial	5027,2 aAB*	5459,3 aA*	4813,6 aB*	5708,5 bB	6778,2 aA	6067,4 aB

Isobutanol						
Cultura	20°C			25°C		
	3 dias	7 dias	10 dias	3 dias	7 dias	10 dias
<i>S. cerevisiae</i>	9,9 bB*	20,8 aA ^{ns}	12,1 cB*	25,6 aB	23,2 bB	57,0 bA
<i>H. opuntiae</i>	5,2 cB ^{ns}	9,1 dB ^{ns}	31,5 aA ^{ns}	9,7 cC	12,8 cB	26,5 cA
Mista	7,1 bcB*	19,1 bA ^{ns}	19,1 bA*	18,9 bB	17,4 cB	70,6 aA
Sequencial	16,1 aA ^{ns}	15,0 cA*	12,5 cB*	18,6 bC	31,4 aB	53,0 bA

Isopentanol						
Cultura	20°C			25°C		
	3 dias	7 dias	10 dias	3 dias	7 dias	10 dias
<i>S. cerevisiae</i>	189,8 cB*	263,3 bA ^{ns}	253,0 bA*	424,8 bA	259,0 cC	348,2 cB
<i>H. opuntiae</i>	55,3 dA*	50,2 cA ^{ns}	50,7 cA*	94,6 cB	59,4 dC	181,3 dA
Mista	250,0 bB*	379,4 aA ^{ns}	353,5 aA*	665,6 aB	369,2 bC	1192,4 aA
Sequencial	458,7 aA ^{ns}	271,9 bB*	279,3 bB*	436,0 bA	463,2 aA	516,8 bA

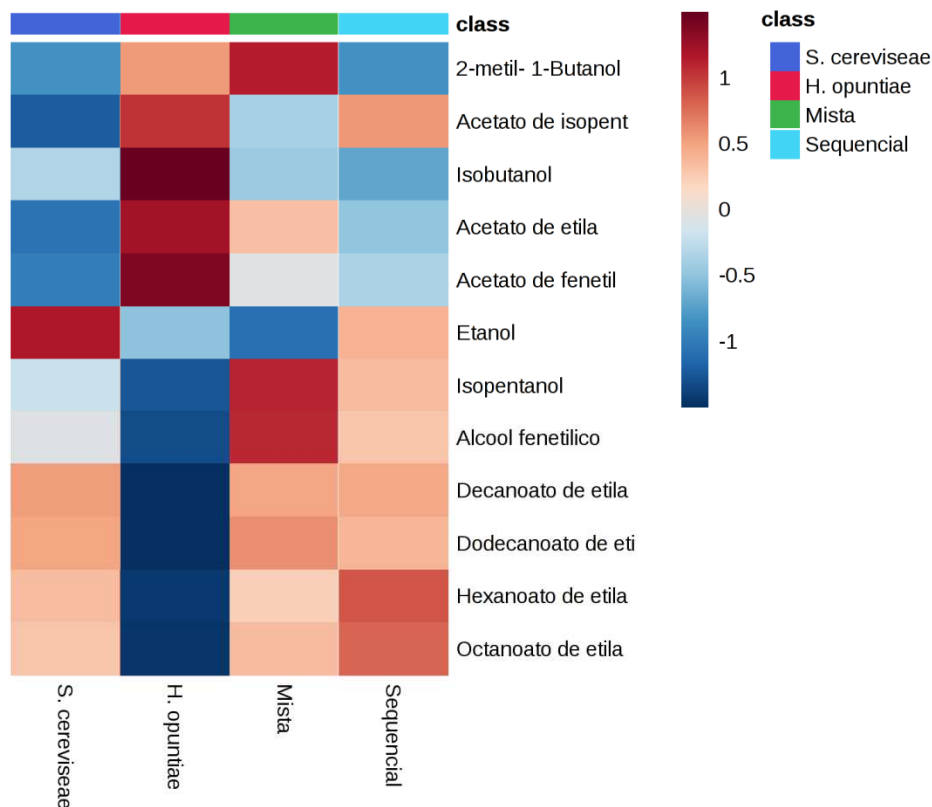
2-metil- 1-Butanol						
Cultura	20°C			25°C		
	3 dias	7 dias	10 dias	3 dias	7 dias	10 dias
<i>S. cerevisiae</i>	23,7 bcA*	22,5 bA ^{ns}	21,1 cA*	43,9 bA	26,5 bcC	32,6 bB
<i>H. opuntiae</i>	30,1 abB*	22,6 bC*	42,8 bA ^{ns}	40,4 bA	15,5 cB	41,2 bA
Mista	21,8 cC*	125,8 aB ^{ns}	170,6 aA*	209,6 aA	134,9 aB	197,2 aA
Sequencial	32,9 aA ^{ns}	16,6 bC*	23,2 cB*	35,4 bA	39,4 bA	48,4 bA

Álcool fenílico						
Cultura	20°C			25°C		
	3 dias	7 dias	10 dias	3 dias	7 dias	10 dias
<i>S. cerevisiae</i>	13,8 bAB*	16,1 aA*	9,9 bB*	30,5 aA	25,8 aAB	18,9 cB
<i>H. opuntiae</i>	3,3 cB*	5,0 bA ^{ns}	2,9 cB*	8,3 bB	4,7 cC	20,3 cA
Mista	12,7 bA*	11,8 abA*	15,0 aA*	34,5 aB	16,2 bC	70,5 aA
Sequencial	30,0 aA ^{ns}	15,8 aB ^{ns}	12,7 aB*	25,8 aB	18,2 bC	32,8 bA

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre os tipos de cultura pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferenças significativas entre tempos de fermentação, em cada temperatura, pelo teste Tukey ($P < 0,05$). * indica diferença significativa entre a temperatura pelo teste t ($P < 0,05$). ns = não significativo.

O mapa de calor abaixo (Figura 4) ilustra a média dos ésteres e álcoois em função da forma da cultura utilizada na fermentação, independente da temperatura e tempo.

Figura 4 - Mapa de calor (*heat map*) ilustrando a média dos ésteres e álcoois em função da forma de aplicação da levedura na fermentação.



As cores de tom rosa até o tom bordô, representam maior produção e a cor azul como menor produção. Os compostos isobutanol (> 1,0) e acetato de fenetila (> 1,0) foram destaque na fermentação utilizando a cepa não-*Saccharomyces* (*H. opuntiae*) na fermentação de cultura pura. O acetato de isopentila e o acetato de etila também foram produzidos em maior quantidade nas fermentações utilizando essa cepa. No entanto, foi à fermentação que alcançou menor quantidade de geração dos compostos.

A maior produção de acetato de fenetila pela levedura não-*Saccharomyces* mostrou que esta é a responsável pela geração deste éster. Nas fermentações utilizando a espécie *S. cerevisiae* na fermentação pura, mista ou sequencial, a formação deste foi inferior. A molécula acetato de fenetila é referência no que diz respeito a aroma frutado em vinhos (Viana et al., 2009).

Para a fermentação mista os compostos que se destacaram foram o 2-metil-1-butanol, o isopentanol e o álcool fenetílico. O álcool fenetílico atingiu uma produção relevante na fermentação mista (média de 1,0). Esse composto volátil exibe atributo floral de alta intensidade e elevada habilidade em incrementar características organolépticas aos produtos finais, fazendo com que esta molécula seja a mais aplicada nas indústrias de perfumaria (Martínez et al., 2018). O aumento da concentração do éster acetato de fenetila e do álcool fenetílico em vinhos, podem potencializar o aroma floral (Varela et al., 2016).

O etanol foi o destaque nas fermentações utilizando a levedura *S. cerevisiae* nas fermentações pura e sequencial (> 1,0). Este resultado é de grande relevância quando comparado a fermentação pura com a cepa não-*Saccharomyces*, a qual a produção de etanol foi inferior. Isto é, a geração de etanol está diretamente relacionada a espécies *S. cerevisiae*, corroborando o emprego de linhagens não-*Saccharomyces* em processos fermentativos de vinhos para redução da quantidade de etanol (Gschaedler, 2017).

Dessa forma, podemos destacar que a levedura *H. opuntiae* contribuiu significativamente com a produção de acetil ésteres (acetato de etila, acetato de isopentila e acetato de fenetila), enquanto a levedura *S. cerevisiae* é a responsável pela produção de etil ésteres e álcoois nos mostos fermentados. Assim, a levedura *H. opuntiae* pode ser utilizada na forma de cultura pura, mista ou sequencial em processos fermentativos para impactar positivamente na complexidade aromática de bebidas fermentadas.

4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados alcançados e relacionando-os ao objetivo do trabalho, uma cepa não-*Saccharomyces* (UMSC 19.11) foi selecionada pela habilidade de produzir compostos voláteis. Esta cepa não somente apresentou potencial de produção em meio ágar YMA, como também nas diferentes fermentações realizadas em mosto sintético. A cepa não-*Saccharomyces* UMSC 19.11 pertence ao gênero *Hanseniaspora* sp. e foi identificada como a espécie *H. opuntiae*.

Nos diferentes processos fermentativos empregados, foram detectadas treze moléculas de aromas. Dentre os treze compostos, oito pertencem a classe dos ésteres, o que contempla o sucesso de obtenção de moléculas éster mediante a presença de uma cepa de levedura não-*Saccharomyces* nos processos fermentativos. Acetato de fenetila e acetato de etila, tiveram significativas produções, principalmente nas fermentações em que a cepa *H. opuntiae* foi aplicada. A fermentação pura com a *H. opuntiae* mostrou alta relevância para o acetato de fenetila na temperatura de 25 °C e no tempo de 3 dias. Quanto as fermentações realizadas com a cepa não-*Saccharomyces* associada a espécie *S. cerevisiae*, estas também foram eficientes, pois demonstraram incremento e aumento de produção de compostos voláteis, especialmente isopentanol e hexanoato de etila.

A produção de etanol foi maior na fermentação pura utilizando *S. cerevisiae*, seguida a fermentação sequencial e mista. Em contraste, a fermentação pura utilizando a levedura *H. opuntiae* a formação do etanol foi significativamente menor. Para o álcool fenetílico, a produção foi maior na fermentação sequencial à 25 °C e nos 3 tempos avaliados.

Contudo, no que diz respeito ao processo fermentativo, a temperatura de 25 °C e o tempo de 3 dias destacaram-se pela expressividade de formação de determinados ésteres e álcoois. A seleção de uma levedura não-*Saccharomyces* ainda pouco explorada e seu efeito positivo nas fermentações na forma pura, mista e sequencial na promoção de moléculas aromáticas foi promissor e viabilizam a relevância do trabalho e a continuidade do estudo de um processo fermentativo através da levedura *H. opuntiae* para aplicação no âmbito industrial em diferentes bebidas fermentadas.

5 AGRADECIMENTOS

À ITT-Nutrifor pela disponibilidade de insumos e estrutura para o desenvolvimento deste trabalho, ao Mestrado Profissional pela abertura de maiores oportunidades profissionais e a Souza Cruz pela compreensão e estrutura durante este trabalho

6 REFERÊNCIAS

Adriana, P.C.S., Regina, V., Bruna, A.S.M., Maria, E. e Cirne de O.M., 2016. Improving production of aromatic compounds by indigenous yeasts in Chenin Blanc grape must. *African J. Agric. Res.* 11, 2433–2442. <https://doi.org/10.5897/ajar2016.10964>

Benito, Á., Calderón, F., Palomero, F., Benito, S., 2015. Combine use of selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains as an alternative to the traditional malolactic fermentation in red wine production. *Molecules* 20, 9510–9523. <https://doi.org/10.3390/molecules20069510>

Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *Research Gate*, 38, 315-322 <https://www.researchgate.net/publication/223397588>.

Canonico, L., Comitini, F., Ciani, M., 2018. *Torulasporea delbrueckii* for secondary fermentation in sparkling wine production. *Food Microbiol.* 74, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.009>

Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J.M., Morata, A., Tesfaye, W., Calderon, F., Suárez-Lepe, J.A., Han, S., Benito, S., 2018. Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiol.* 69, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.018>

Chong, J., Wishart, D.S. and Xia, J. 2019. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Cur. Protoc. in Bioinf.* 68, e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>

Crosato, G., Carlot, M., De Iseppi, A., Garavaglia, J., Pinto, L.M.N., Ziegler, D.R., Ramos, R.C. de S., Rossi, R.C., Nadai, C., Giacomini, A., Corich, V., 2018. Genetic variability and physiological traits of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from “Vale dos Vinhedos” vineyards reflect agricultural practices and history of this Brazilian wet subtropical area. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2490-z>

De-La-Fuente-Blanco, A., Sáenz-Navajas, M.P., Ferreira, V., 2016. On the effects of higher alcohols on red wine aroma. *Food Chem.* 210, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.021>

Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage

wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>

Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., Hazelwood, L., 2016. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiol.* 60. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.006>

Garavaglia, J., 2014. Otimização da produção de acetil e etil ésteres pela levedura *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Gschaedler, A., 2017. Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. *Curr. Opin. Food Sci.* 13, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.004>

Fairbairn, S., Mckinnon, A., Musarurwa, H., Ferreira, A.C., Bauer, F.F., 2017. The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Frontiers in Microbiology. Food Microbiol.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02554>

Hirst, M.B., Richter, C.L., 2016. Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 67, 361–370. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.15098>

Hu, K., Jin, G.J., Xu, Y.H., Tao, Y.S., 2018. Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* 108, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.037>

Jindamorakot, S., Ninomiya, S., Limtong, S., Yongmanitchai, W., Tuntirungkij, M., Potachoen, W., Tanaka, K., Kawasaki, H., Nakase, T., 2009. Three new species of bipolar budding yeasts of the genus *Hanseniaspora* and its anamorph *Kloeckera* isolated in Thailand. *FEMS Yeast Res.* 9, 1327–1337. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00568.x>

Lleixà, J., Manzano, M., Mas, A., Portillo, M. del C., 2016. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* competition during microvinification under different sugar and nitrogen conditions. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01959>

Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M.J., González, C., Calderón, F., Suárez-Lepe, J.A., 2015. Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulasporea delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. *Food Res. Int.* 76, 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.030>

Luan, Y., Zhang, B.-Q., Duan, C.-Q., Yan, G.-L., 2018a. Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. *LWT* 92, 177–186. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.02.004>

Luan, Y., Zhang, B.Q., Duan, C.Q., Yan, G.L., 2018b. Effects of different pre-fermentation

cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. *LWT - Food Sci. Technol.* 92, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.004>

Martínez, O., Sánchez, A., Font, X., Barrena, R., 2018. Bioproduction of 2-phenylethanol and 2-phenethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* through the solid-state fermentation of sugarcane bagasse. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 4703–4716. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8964-y>

Martins, F., De Oliveira Mamede, M.E., Da Silva, A.F., Guerreiro, J., Da Cunha Lima, S.T., 2017. Ultraestrutura celular e expressão de proteínas de leveduras *Hanseniaspora* sob efeito do estresse etanólico. *Brazilian J. Food Technol.* 20. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.6516>

Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G., Verstrepen, K.J., 2016. Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increased acetate ester production. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 732–746. <https://doi.org/10.1128/AEM.02556-15>

Palma, 2014. Caracterização Qualitativa Do Perfil Elaborados Com Um Assemblage Inovador. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto alegre.

Regina, S., Marques, R., 2011. Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa convencional e bidimensional para classificação de méis. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós Graduação do Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Divol, B., 2018. Fermentation performances and aroma production of non-conventional wine yeasts are influenced by nitrogen preferences. *FEMS Yeast Res.* 18, 1-11. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy055>

Sun, S.Y., Jiang, W.G., Zhao, Y.P., 2011. Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on the profile of volatile compounds and polyphenols in cherry wines. *Food Chem.* 127, 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.039>

Vallverdú-Queralt, A., Boix, N., Piqué, E., Gómez-Catalan, J., Medina-Rejon, A., Sasot, G., Mercader-Martí, M., Llobet, J.M., Lamuela-Raventos, R.M., 2015. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Chem.* 181, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.098>

Varela, C., Sengler, F., Solomon, M., Curtin, C., 2016. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* 209, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.024>

Viana, F., Belloch, C., Vallés, S., Manzanares, P., 2011. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 235–240.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.005>

Viana, F., Gil, J. V., Vallés, S., Manzanares, P., 2009. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.025>

Vrhovsek, U., Wendland, J., Groenewald, M., Boekhout, T., Walther, A., Carlin, S., Ravasio, D., 2018. Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. *Fermentation* 4, 15. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010015>

Waldir, D.E.E, 2016. Perspectives and Uses of Non-Saccharomyces Yeasts in Fermented Beverages. *Intech Open. Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages* 13, 1-19. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>

Zhu, J.C., Wang, L.Y., Xiao, Z.B., Niu, Y.W., 2018. Characterization of the key aroma compounds in mulberry fruits by application of gas chromatography–olfactometry (GC-O), odor activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) and flame photometric detection (FPD). *Food Chem.* 245, 775–785. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.112>