

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**“Otimização da produção de acetil e etil ésteres pela levedura *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08”**

Tese de Doutorado

Juliano Garavaglia

Porto Alegre, RS, Brasil

Março de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**“Otimização da produção de acetil e etil ésteres pela levedura *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08”**

Autor: Juliano Garavaglia

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Patrícia Valente

Porto Alegre, RS, Brasil

Março de 2014

## **Agradecimentos**

A conclusão deste trabalho é apenas o início de muitos projetos que se concretizarão para o desenvolvimento ainda maior da pesquisa. Espero poder contribuir imensamente em toda a evolução da ciência durante o seu constante processo de mutação e desenvolvimento.

Agradeço a todos que contribuíram para o desenvolvimento desta importante etapa em minha jornada profissional, além das Instituições que colaboraram na forma de parceria, gostaria de agradecer profundamente:

A orientação recebida pela Profa. Dra. Patrícia Valente, a qual auxiliou no desenvolvimento deste trabalho, assim como, aos colegas do laboratório de Micologia pelo apoio e companheirismo.

As professoras Dra. Cláudia A. Zini do Instituto de Química da UFRGS, Dra. Juliane E. Welke do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS e Dra. Rosana de Cassia de Souza Schneider da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) pela orientação no desenvolvimento das análises cromatográficas utilizadas na pesquisa.

As Instituições parceiras, tais como, o Campus Bento Gonçalves do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, o qual foi imprescindível para o andamento desta pesquisa.

Aos bolsistas, Andressa Habekost, Thiago R. Bjerk e José Machado que auxiliaram nas etapas necessárias para o desenvolvimento do trabalho.

## **1. Instituições e Fontes Financiadoras**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em parceria com o Laboratório de Química Analítica Ambiental no Instituto de Química da UFRGS, o Laboratório de Cromatografia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) e o Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia do Campus Bento Gonçalves do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS). A presente pesquisa contou com recursos de financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS (PPGBCM).

## 2. Estrutura da Tese

A presente Tese está dividida no seguinte forma: Introdução, Objetivos (Geral e Específicos e Hipótese Científica para o desenvolvimento da Tese), dois Capítulos na forma de artigos científicos, Discussão, Conclusões, Perspectivas, Referências Bibliográficas e Anexos.

Na Introdução, são abordadas questões específicas relacionadas ao tema da Tese, baseadas nas Referências Bibliográficas consultadas e justificando o referido trabalho. Serão desenvolvidos assuntos como a importância e aplicação industrial dos ésteres como biomoléculas, principalmente o acetato de etila; a produção de ésteres por micro-organismos, evidenciando o papel das leveduras e as principais variáveis que interferem neste processo.

O Capítulo I mostra os experimentos iniciais do projeto e engloba todos os procedimentos utilizados para o desenvolvimento e validação do método de determinação de ésteres utilizando a microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa (GC). Estes resultados geraram o primeiro artigo, intitulado “Evaluation of acetate and ethyl esters production by yeast strains from South Brazilian wine and homemade cheeses in solid medium and headspace solid-phase microextraction procedure”, ainda em fase de preparação.

O Capítulo II contém os dados da produção de ésteres pela levedura selecionada nos experimentos iniciais, *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08, a otimização das condições de temperatura e agitação e o efeito das fontes de carbono (glicose e frutose) e do mosto de uva Chardonnay clarificado, bem como, os experimentos com diferentes condições de pH e em biorreatores de 5L. Estes resultados deram origem ao artigo intitulado “Evaluation and improvement of esters production by the yeast *Zygosaccharomyces bailii* isolated from Brazilian red wine”, submetido ao periódico *Food Microbiology*.

A Discussão contempla os comentários à luz da literatura sobre os resultados apresentados nos Capítulos I e II e a importância científica do estudo desenvolvido, bem como, o impacto dos resultados obtidos. Para finalizar, foram descritas as Conclusões e

Perspectivas geradas com o estudo, além das Referências Bibliográficas utilizadas na confecção da tese, seguida pelos Anexos.

### 3. Sumário

1. Instituições e Fontes Financiadoras .....	4
2. Estrutura da Tese .....	5
4. Introdução.....	10
4.1. Ésteres e sua importância.....	10
4.2. Produção de ésteres por leveduras .....	11
4.3. Leveduras <i>Zygosacharomyces</i> .....	16
4.4. Acetato de etila e outros ésteres .....	17
4.5. Principais fatores que influenciam a produção de ésteres por leveduras.....	18
4.6. Técnicas de extração e determinação de ésteres.....	21
5. Objetivos .....	23
5.1. Objetivo geral .....	23
5.2. Objetivos específicos .....	23
5.3. Hipótese científica .....	24
6. CAPÍTULO I.....	25
7. CAPÍTULO II.....	48
8. Discussão.....	74
9. Conclusões .....	81
10. Perspectivas .....	83
11. Referências Bibliográficas.....	84
12. Curriculum Vitae.....	91

## Resumo

Ésteres produzidos por via biotecnológica são considerados e classificados como naturais e sua demanda tem aumentado. Várias leveduras podem produzir ésteres e seu método de seleção é altamente importante para inúmeros tipos de indústrias. Trinta e quatro cepas de leveduras, isoladas de vinhos tintos em barris de carvalho elaborados na Serra Gaúcha e de queijos artesanais do Sul do Brasil, foram utilizadas neste trabalho. Cada cepa foi inoculada na superfície de meio sólido inclinado rico em glicose e nitrogênio, diretamente no frasco utilizado para a microextração em fase sólida (SPME) seguida pela injeção num cromatógrafo gasoso com detecção por espectrometria de massas (GC/MS) e quantificação utilizando detector de ionização de chama (GC-FID). O método foi desenvolvido e validado, sendo que a fibra DVB/PDMS/CAR, temperatura de extração de 80°C e 20 minutos de aquecimento da amostra antes da extração foram as condições ótimas estabelecidas. A metodologia de superfície e resposta foi usada para a otimização da produção de acetato de etila pela levedura *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08, e um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> foi aplicado para determinar as melhores condições de temperatura de cultivo ( $X_1$ , 20 até 36 °C) e agitação ( $X_2$ , 0 a 200 rev/min). Os melhores resultados foram obtidos com a temperatura de 28 °C e 0 rev/min, onde houve um aumento de 60% na produção de acetato de etila. Foram avaliados os efeitos das fontes de carbono (glicose e frutose) e do mosto de uva sobre a produção de acetato de etila. A máxima concentração de acetato de etila produzida foi de 71,11 mg/L, utilizando o mosto de uva como meio. Experimentos utilizando biorreatores de 4L levaram à produção máxima de 133,74 mg/L de acetato de etila, 14,57 mg/L de hexanoato de etila, 4.093,74 mg/L de octanoato de etila e 3.775,28 mg/L de decanoato de etila.

**Palavras-chave:** ésteres, acetato de etila, otimização, *Zygosaccharomyces bailii*, SPME, leveduras.



## Abstract

Esters produced by biotechnological means are legally labeled as natural and there is an increasing demand for these products. Several yeasts can accumulate esters, and their selection is highly interesting for many industries. Thirty-four yeast strains isolated from red wine oak barrels of Serra Gaúcha winemaking region and from homemade cheeses of Southern Brazil were used in this research. The yeasts were inoculated in agar slants of a solid medium rich in glucose and nitrogen, directly inside the extraction transparent glass vials, using a headspace solid phase microextraction (SPME) method followed by injection of gas chromatography with mass spectrometric detection (GC/MS), and quantification by flame ionization detector (GC/FID). The analytical method was developed and validated, and the DVB/PDMS/CAR fiber, extraction temperature of 80°C, and 20 minutes of sample heating time volatilization prior to the extraction step were the best conditions. A response surface methodology was used to optimize the production of ethyl acetate by *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08, which was selected, and a 2<sup>2</sup> full factorial central composite design was applied to determine the best conditions for the cultivation temperature ( $X_1$ , 20 to 36 °C) and stirring speed ( $X_2$ , 0 to 200 rev/min). The best results were found with temperature of 28 °C and medium agitation of 0 rev/min, with a 60% increase in ethyl acetate production. We evaluated the effect of the carbon sources (glucose and fructose) and grape must on ethyl acetate formation; the maximal yield was reached with grape must and the highest concentration of ethyl acetate produced was 71.11 mg/L. Employing experiments on bioreactors of 4L, it was possible to improve the esters production by this yeast; a maximal production of 133.74 mg/L of ethyl acetate, 14.57 mg/L of ethyl hexanoate, 4093.74 mg/L of ethyl octanoate, and 3775.28 mg/L of ethyl decanoate was reached.

**Keywords:** esters, ethyl acetate, optimization, *Zygosaccharomyces bailii*, SPME, wine yeasts.

## 4. Introdução

### 4.1. Ésteres e sua importância

A demanda conduzida pelos consumidores por sabores, aromas e outras moléculas naturais tem estimulado considerável progresso científico, industrial e comercial no desenvolvimento de novos processos e produtos utilizando micro-organismos (Schreier, 1997). Processos de produção em escala industrial foram desenvolvidos para produtos químicos de sabor e aroma, tais como muitos ésteres. Os ésteres são resultantes da combinação de uma molécula de álcool orgânico  $R^1OH$  com uma de ácido orgânico,  $R^2COOH$ ,  $[R^1 - O - C(=O) - R^2]$ , com eliminação de uma molécula de água, sendo que,  $R^1$  e  $R^2$  são radicais alquil ou aril, tanto em mono e di-ésteres ácidos (Clarke e Bakker, 2004).

Os ésteres são moléculas encontradas em diversos alimentos obtidos por via fermentativa e atuam diretamente sobre a qualidade organoléptica de vinhos e cervejas, sendo que os mais importantes são os acetil ésteres (Verstrepen et al., 2003). O grupo de acetil ésteres se caracteriza por ter origem a partir de alcoóis superiores, como o acetato de isoamila (aroma de banana) e o acetato de feniletila (aroma de rosas) (Ribereau-Gayon *et al.*, 2004). Certas leveduras produzem grandes quantidades destes compostos, os quais contribuem para o aroma de vinhos jovens (Park et al., 2009). Os ésteres voláteis apresentam-se em pequenos níveis nas bebidas fermentadas, mas são extremamente importantes para o flavor e o perfil aromático destes produtos (Lilly *et al.*, 2006).

Além disso, possuem um papel crucial, pois apresentam sensações agradáveis ao aroma, principalmente, os compostos formados a partir de ácido acético, alcoóis superiores e ácidos graxos com etanol (Torreas *et al.*, 2003). Os acetil ésteres são muito empregados como compostos aromáticos, pois são responsáveis por notas frutadas, adocicadas e florais (Plata *et al.*, 2005). De acordo com Ribereau-Gayon et al. (2006), o aroma frutado dos vinhos após o processo de fermentação é dado por uma mistura complexa de acetato de hexila, caprilato de etila e caproato de etila (compostos que

apresentam aroma de maçã), acetato de isoamila (aroma de banana) e acetato de 2-feniletila (aroma de rosas). Os etil ésteres são obtidos a partir da esterificação de ácidos graxos de cadeia longa e/ou curta e o grupo álcool e o etanol (Saerens et al., 2010). Destes, destacam-se o hexanoato de etila (aroma de maçã) e octanoato de etila (aroma de maçã ácida) (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Acetil ésteres e os etil éteres podem ser utilizados amplamente por distintas aplicações industriais (Park et al., 2009). Ésteres são empregados como moléculas aromatizantes em diversos alimentos industrializados, tais como, sorvetes, biscoitos, bebidas em geral, bolos e etc; podem ser utilizados como aditivos muito importantes e de elevados custos, na indústria de cosméticos e farmacêuticos (Singh *et al.*, 2008). Embora a maior parte destes compostos no mercado seja produzida via síntese química, maior interesse concerne na produção de ésteres via biossíntese, assim considerados, componentes naturais (Vandamme e Soetaert, 2002).

Acetato de etila, acetato de butila e butirato de butila, além de serem usados como compostos de flavor, podem ser empregados como solventes industriais e são capazes de dissolver uma ampla variedade de compostos (Park et al., 2009). O acetato de etila, um solvente altamente polar, é amplamente utilizado em tintas tipo laca a frio para móveis de madeira, acabamento para pintura de veículos e tintas para papel (Park et al., 2009). Podem ser usados também como solvente para celulose, podendo dissolver poliestireno (Löser *et al.*, 2013).

#### **4.2. Produção de ésteres por leveduras**

As leveduras são amplamente utilizadas pelo homem, podendo ser consideradas como benéficas e/ou deteriorantes na indústria de alimentos, dependendo da matriz onde se desenvolvem. Na indústria de bebidas, possuem um papel fundamental, pois são produtoras de etanol e inúmeros compostos voláteis, principalmente, espécies de *Saccharomyces cerevisiae*. No vinho, a fermentação alcoólica realizada por estas espécies de leveduras, contribui para o aroma do mesmo, pois produzem, principalmente, etanol, alcoóis superiores e ésteres (Mingorance-Cazorla *et al.*, 2003). Alguns gêneros de leveduras, assim como outros microrganismos, são grandes produtores de ésteres (Rojas *et al.*, 2003). Em condições ótimas, estes componentes

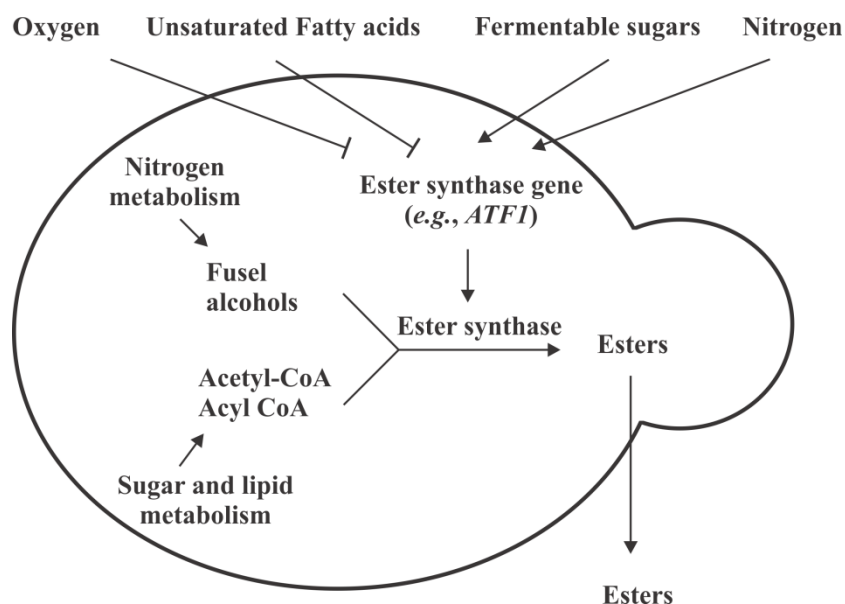
podem ser obtidos sem que ocorram perdas no crescimento e no metabolismo fermentativo de tais microrganismos (Voilley e Etiévant, 2006).

Leveduras são fungos unicelulares que se multiplicam por gemulação e são importantes por sua capacidade de realizar a fermentação alcoólica dos açúcares (Zambonelli, 1998). Por esta característica de seu metabolismo, são consideradas como as formadoras de muitos produtos fermentados. As leveduras do gênero *Saccharomyces* possuem várias aplicações industriais, principalmente, na produção de cerveja, vinho e produção de álcool (Verstrepen *et.al.*, 2003). O processo fermentativo leva à formação de uma mistura complexa de produtos que enriquecem o aroma e sabor, tanto de alimentos, quanto de bebidas obtidas por fermentação (Lilly *et al.*, 2006). O desenvolvimento da fermentação, tradicionalmente, possui um papel muito importante para a qualidade e quantidade de aromas desenvolvidos em bebidas. Os compostos do aroma denominado “yeast-bouquet” são metabólitos secundários produzidos por inúmeras espécies de leveduras, representados, principalmente por acetil ésteres, etil ésteres, alcoóis superiores, carbonilas e ácidos graxos voláteis (Cordente *et al.*, 2012). Inúmeras espécies de leveduras podem produzir ésteres, destacando-se as espécies do gênero *Saccharomyces*, bem como, do gênero *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces* e *Candida*. Na fermentação realizada por *Saccharomyces cerevisiae*, a produção de acetil ésteres ocorre através do balanço da expressão de duas enzimas, a enzima álcool acetil transferase (*ATF1*), também chamada de éster sintase, e o produto do gene *EST2*, uma enzima esterase que atua hidrolizando os ésteres acumulados no meio fermentativo (Saerens *et al.*, 2010).

Os ésteres são formados no citoplasma da célula da levedura *S.cerevisiae*, por exemplo. Como possuem solubilidade a lipídeos, os acetil ésteres se difundem rapidamente pela membrana para o meio de fermentação, acumulando-se (Verstrepen *et al.*, 2003). Os etil ésteres de ácidos graxos também são produzidos no citoplasma, porém sua transferência para o meio é mais dificultada e é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia de ácido graxo (Saerens *et al.*, 2010). Os acetil ésteres são sintetizados na célula da levedura pela enzima álcool acetil transferase (AATase), utilizando alcoóis superiores e acetil-CoA como substrato (Lilly *et al.*, 2006). Além disso, os acetil ésteres podem ser produzidos com a condensação de alcoóis superiores (metabolismo de aminoácidos) com etanol (Verstrepen *et al.*, 2004).

Várias enzimas são envolvidas na formação de ésteres, as mais caracterizadas são a AATase I e II (EC 2.3.1.84), as quais são codificadas pelos genes *ATF1* e *ATF2*, respectivamente (Lilly *et al.*, 2006) e enzima éster sintase (Verstrepen *et al.*, 2004), ambas bem caracterizadas em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, a atividade de enzimas esterase é muito importante e em leveduras *S. cerevisiae*, o gene *IAH1* (formalmente *EST2*) é responsável pela produção de esterases (Horsted *et al.*, 1998), as quais atuam sobre os ésteres formados, impedindo sua acumulação no meio. A ação conjunta destas enzimas é necessária para a produção e acúmulo de acetil ésteres no meio de fermentação.

Como exemplo, o acetato de isoamila é sintetizado através da ligação de acetil-CoA e álcool isoamílico realizada pela enzima AATase (*ATF1* e *ATF2*) (Yoshimoto *et al.*, 1999) e, logo após, é hidrolisado por uma esterase (*IAH1*) (Fumiyoshi e Horikoshi, 2005). O gene *ATF1* é localizado no cromossomo XV e *ATF2* no cromossomo VII, os quais codificam para a AATase em *S. cerevisiae* (Singh *et al.*, 2008). A Figura 1 ilustra estas rotas bioquímicas encontradas em distintas espécies de leveduras, principalmente *S. cerevisiae*.



**Figura 1:** Rotas bioquímicas utilizadas para a produção de acetil ésteres por *S. cerevisiae* (Verstrepen *et al.*, 2003).

Desta forma, estudos de clonagem e expressão destes genes podem aumentar a quantidade de ésteres acumulados no meio de fermentação, aumentando a qualidade aromática de bebidas e alimentos fermentados. Como os acetil ésteres possuem características complexas de aromas, o aumento em sua quantidade pode ressaltar o aroma de vinhos e cervejas, favorecendo sua aceitação no mercado. Segundo Fukuda et al. (1998), várias estratégias podem ser adotadas para aumentar a produção de acetil ésteres, ou seja, a super-produção de AATase e repressão do produto do gene *IAH1*. Estas estratégias podem ser viáveis, visto que o gene *ATF1* de *S. cerevisiae* já foi clonado e sequenciado e mutantes com plasmídeo contendo este gene podem produzir quantidades muito superiores de acetil ésteres (Fukuda et al., 1998; Fumiyoshi e Horikoshi, 2005; Yoshimoto et al., 1999).

Basicamente, dois fatores são importantes na formação de ésteres pela levedura, a concentração dos dois substratos, ou seja, acil-CoA/acetil-CoA e álcoois superiores ou ácidos graxos, e a atividade total das enzimas envolvidas na formação e hidrólise do respectivo éster, como a AATase, éster sintase e esterases, respectivamente (Verstrepen et al., 2004). Condições de cultivo, como temperatura, adição de ácidos graxos, fontes de nitrogênio e sua disponibilidade e nível de oxigenação, possuem influência sobre a síntese de ésteres, pois modificam a quantidade de acetil-CoA na célula (Verstrepen et al., 2004). A maioria destes efeitos foram elucidados utilizando cepas de levedura *S. cerevisiae*, pouco sendo conhecido sobre outras espécies de leveduras.

Como as condições de cultivo são importantes na biossíntese de ésteres, metodologias de otimização destas podem ser utilizadas para buscar leveduras produtoras de altas quantidades de ésteres. Portanto, a importância da otimização das condições de cultivo, bem como, da cepa de levedura empregada, desempenham papel importante no desenvolvimento de um processo industrial de biossíntese de ésteres (Saerens et al., 2010).

Desta forma, podem ser utilizadas diversas ferramentas para avaliar o efeito dos principais fatores que interferem na produção de ésteres, tais como, a metodologia de superfície de resposta. Esta metodologia é uma ferramenta estatística usada para encontrar as condições ideais em processos complexos, além disso, permite otimizar múltiplas variáveis, com um mínimo número de experimentos, sendo considerada mais rápida e menos trabalhosa do que outras técnicas (Stroescu et al., 2013). Principais

efeitos, bem como as interações entre os fatores avaliados, podem ser previstos usando esta técnica, tornando seu uso uma parte fundamental de processos biotecnológicos de grande escala (Batista et al., 2013).

Embora a maior parte destes compostos seja produzida por síntese química, grande interesse diz respeito à produção de ésteres via biossíntese. Esta demanda é atribuída ao desenvolvimento da consciência de saúde e nutrição humana e ao aumento de consumidores que buscam certo padrão ambiental (Park et al. 2009). Sendo assim, destaca-se a importância da aplicação de rotas biotecnológicas para obtenção de ésteres. Na Tabela 1, estão alguns exemplos de micro-organismos produtores de distintas moléculas de acetil ésteres e etil ésteres.

**Tabela 1:** Exemplos de micro-organismos produtores de ésteres, adaptado de Park et al. (2009).

<b>Micro-organismos</b>	<b>Ésteres produzidos</b>	<b>Fonte de carbono</b>
<i>Geotrichum</i> sp.	Isovalerato de etila, hexanoato de etila, butirato de etila	Desconhecido
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Acetato de etila	Soro de leite
<i>Neurospora</i> sp.	Hexanoato de etila	Não determinado
<i>Pichia anomala</i>	Acetato de etila	Glicose
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Acetato de etila, acetato de isoamila	Melaço
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Acetato de etila	Glicose
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Acetato de butila, butirato de butila, acetato de etila, butirato de etila, acetato de isoamila	Não determinado
<i>Williopsis saturnus</i>	Acetato de etila, acetato de isoamila	Melaço de beterraba
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.	Acetato de etila, hexanoato de etila, octanoato de etila	Frutose

Leveduras possuem maior importância, pois podem produzir ésteres de forma associada ao crescimento. Além disso, leveduras *S.cerevisiae* se destacam, pois possuem uma cinética de crescimento rápida e versátil; em sua maioria são microrganismos GRAS (“*generally recognized as safe*”) e podem assim ser utilizadas em alimentos; são capazes de produzir ésteres a partir de açúcares simples, tais como, glicose e frutose. Várias cepas de leveduras são reconhecidas como boas produtoras de acetil e etil ésteres. Leveduras classificadas como não-*Saccharomyces* também podem produzir ésteres, tais como, *Kluyveromyces marxianus* (Löser et al., 2013), *Hanseniaspora osmophila* (Viana et al., 2009), *Candida* sp., *Debaryomyces* sp., *Pichia* sp., *Hansenula* sp. (Mateos et al., 2006) e *Zygosaccharomyces* (Rojas et al., 2001).

#### **4.3. Leveduras *Zygosaccharomyces***

As leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* são toleram alta pressão osmótica, são leveduras fermentativas e são capazes de resistir a conservantes, tais como, ácido benzoico e sórbico (Wrent et al., 2010). São encontradas nas bagas de uvas e no mosto em fermentação (Barata et al., 2012), xaropes e sucos de frutas (Dang et al., 2010), entre outras amostras. Além disso, são capazes de crescer em ambientes com baixo pH (Dang et al., 2010).

Leveduras deste gênero, principalmente *Z. bailii*, possuem a capacidade de produzir ésteres (Rojas et al., 2003; Viana et al., 2008; Plata et al., 2005). Leveduras *Zygosaccharomyces* têm sido descritas como produtoras de altas concentrações de ácido acético, glicerol e ésteres (Rojas et al., 2001). De acordo com Viana et al. (2008), utilizando mosto de uva como substrato, a levedura *Z. bailii* foi capaz de produzir acetato de etila, acetato de isobutila, acetato de isoamila, acetato de feniletila e octanoato de etila.

Além disso, leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* conseguem fermentar altas quantidades de açúcares (Wrent et al., 2010), podem produzir inúmeros compostos durante este processo (Rojas et al., 2001), podendo também, ser utilizadas na biossíntese de ésteres e outros compostos. Porém, utilizam preferencialmente a frutose (Stratford et al., 2013) como fonte de carbonos.



#### 4.4. Acetato de etila e outros ésteres

Um dos principais ésteres produzidos por leveduras seja *S.cerevisiae* ou outras não-*Saccharomyces*, é o acetato de etila (Löser et al., 2013). Este éster é o principal responsável pelo aroma frutado e sua complexidade em vinhos e cervejas (Saerens et al., 2010). A Tabela 2 mostra os principais ésteres encontrados em cervejas, onde sua presença atua diretamente na complexidade aromática e qualidade organoléptica da mesma. No vinho, distintas quantidades são encontradas, variando de 39,9 a 292,8 mg/L e pode ser considerado com seu principal éster (Viana et al., 2008).

Em vinhos tintos da variedade de uva Merlot, por exemplo, elaborados na região da Serra Gaúcha no sul do Brasil, foi identificada a presença de acetato de etila (Welke et al. 2012). O acetato de etila é extensivamente utilizado, podendo ser degradado por via microbiológica e, assim, é um solvente com baixo impacto ambiental (Loser et al., 2013). A produção anual de acetato de etila é de 1,5 milhões de toneladas (Urit et al., 2012).

**Tabela 2:** Quantidade média dos principais acetil ésteres e etila encontrados na cerveja (Verstrepen et al., 2003).

<b>Componente</b>	<b>Concentração média (mgL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Descritor do aroma</b>
Acetato de etila	18,4	Frutado, solvente
Acetato de isoamila	1,72	Banana, pêra
Hexanoato de etila	0,14	Maçã, anisado
Octanoato de etila	0,17	Maçã ácida
Acetato de 2-feniletila	0,54	Rosas, mel, adocicado

Este éster é muito utilizado para a fabricação de tintas de impressão, adesivos, materiais fotorresistentes, formulações de revestimento, e utilizado como um agente de extração (Loser et al. 2013). Comparado com o etanol, outro produto obtido por via fermentativa, o mercado de acetato de etila é 30% maior e em função de sua

volatilidade, permite a criação de um processo de recuperação mais energeticamente favorável (Urit et al, 2011). A maioria das pesquisas tem sido destinada à formação de acetato de etila como compostos aromáticos e somente um número limitado de estudos foi focado na síntese microbiana de acetato de etila como um produto a granel (Urit et al., 2012).

De acordo com Liu et al. (2004), Passoth et al.(2006), Van Laere et al. (2008), Park et al. (2009) e Saerens et al. (2010), três principais rotas são utilizadas por leveduras para a síntese de ésteres. Primeiro, a reação de esterificação de etanol com acetato através da atividade de enzimas esterase e lipase. Segundo, através da reação do etanol com acetil-CoA, catalisada pela enzima álcool acetiltransferase. Terceiro, a reação abiótica de etanol com acetaldeído e redução enzimática do hemiacetal formado com atuação de NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenosina dinucleotídeo oxidado) e atividade da enzima hemiacetal desidrogenase.

Em relação à volatilidade apresentada pelos ésteres, cultivos altamente aerados não são recomendados para a obtenção de alto rendimento na biossíntese (Urit et al., 2011). Sendo assim, a otimização da aeração e/ou oxigenação do meio de cultura para a produção de acetato de etila e outros ésteres é muito importante, pois pode levar ao aumento da quantidade produzida por via fermentativa (Löser et al., 2013). Condições de temperatura de cultivo também possuem forte influência sobre a produção de acetil e etil ésteres (Park et al., 2009; Verstrepen et al., 2004), portanto, constituem um importante fator a ser otimizado para maior rendimento na biossíntese de ésteres por leveduras.

#### **4.5. Principais fatores que influenciam a produção de ésteres por leveduras**

De acordo com Verstrepen et al. (2003), a produção de ésteres está relacionada com a cepa de levedura, fonte de carbono e sua quantidade no meio, fonte de nitrogênio, fatores de crescimento, temperatura de cultivo e oxigênio dissolvido no meio de cultivo. A temperatura exerce um fator de grande influência sobre a produção de acetil ésteres, sendo que os mesmos são acumulados em maior quantidade com temperaturas mais baixas, em torno de 25 °C (Singh et al., 2008).

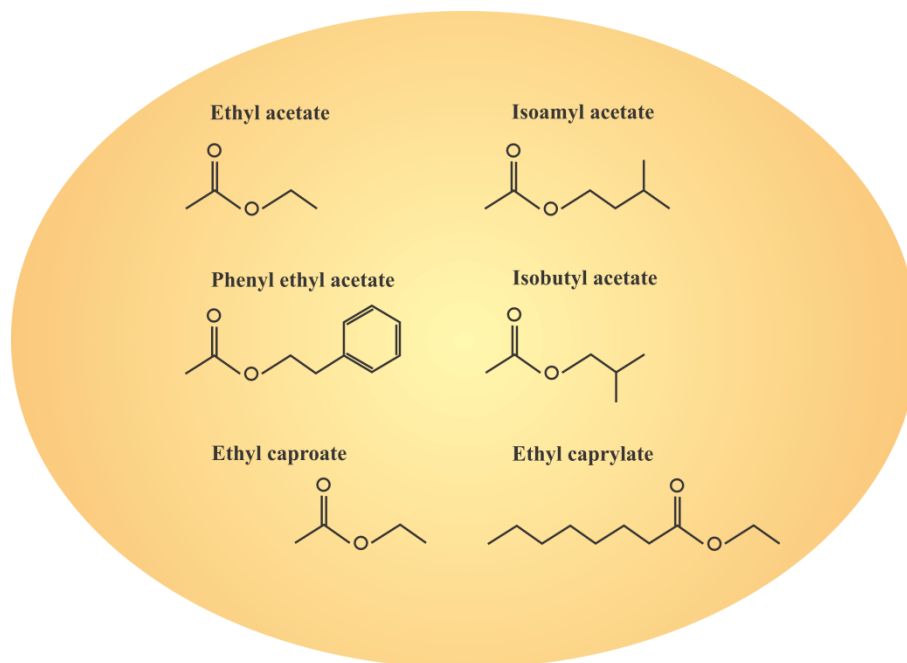
A capacidade de produção de ésteres varia dentre as espécies de leveduras e também com as condições de crescimento, além disso, sob condições anaeróbias a produção de acetil ésteres é aumentada (Plata et al., 2003). O oxigênio é fornecido por meio de aeração do meio de cultivo ou oxigenação anterior à inoculação, desta forma eliminando a necessidade de subsequente oxigenação durante o cultivo da levedura (Verbelen et al., 2009). O oxigênio atua influenciando o crescimento da levedura *S.cerevisiae* e disponibilidade de acetil-CoA na célula, além de reprimir diretamente a expressão dos genes *ATF1* e *ATF2* (enzima álcool acetil transferase) (Verstrepen et al., 2003; Saerens et al., 2010).

Durante a fermentação, em que prevalece condições reduzidas de aeração, leveduras *S. cerevisiae* produzem uma grande quantidade de ésteres, os quais são os mais importantes componentes de aroma ativo encontrados em bebidas fermentadas (Saerens et al., 2010). Neste contexto, a fermentação possui um efeito bastante importante sobre a qualidade de bebidas fermentadas, pois os ésteres são moléculas importantes e produzidas durante este processo (Cordente et al., 2012).

Em condições fermentativas, ou seja, alta quantidade de açúcares e baixa quantidade de oxigênio dissolvido, inúmeras leveduras produzem ésteres durante a fermentação do mosto de uva (Sumby et al., 2010), cervejas (Verstrepen et al., 2003), fermentado de suco de abacaxi (Pino e Queris, 2010) e fermentação do cacau (Rodriguez-Campos et al. 2012). A maior concentração dos ésteres no vinho é produzida com o processo de fermentação alcoólico desencadeado por leveduras *S. cerevisiae*, sendo que possuem efeito sensorial na qualidade aromática da bebida (Saerens et al., 2010). Do ponto de vista industrial, conhecer este metabolismo possibilita um maior controle do processo fermentativo e por consequência, uma otimização da quantidade e quais ésteres são produzidos. A Figura 2 demonstra os principais ésteres produzidos por *S. cerevisiae*.

O potencial dos micro-organismos associados ao vinho tem sido altamente caracterizado e assim, possuem um grande potencial na aplicação industrial para elaboração de vinhos de qualidade superior e com maior tipicidade (Sumby et al., 2010). De acordo com Plata et al. (2003), o perfil de voláteis do vinho durante o processo de fermentação é dominado pelos ésteres, formados com a fermentação alcoólica do mosto de uva. Sendo assim, a influência do regime de aeração durante a fermentação alcoólica

é bastante importante, uma variável determinante para otimização de um processo biotecnológico para produção de acetil e etil ésteres.



**Figura 2:** Principais ésteres produzidos por leveduras *S. cerevisiae* durante a fermentação do mosto de uva e que atuam sobre a qualidade sensorial do vinho (Saerens et al., 2010).

A quantidade de glicose atua diretamente sobre a produção de ésteres, principalmente acetato de etila, pois influencia a disponibilidade acetil-CoA na célula da levedura (Saerens et al., 2010). De acordo com Plata et al. (2004), a maior quantidade de acetato de etila foi encontrada em condições semi-anaeróbias e em altas quantidades de glicose (250 g/L). Além da quantidade total de açúcares no meio, os níveis relativos de diferentes açúcares assimiláveis no meio influenciam a produção de ésteres (Verstrepen et al., 2003). Altas quantidades de glicose e frutose favorecem a produção de ésteres, comparando, por exemplo, com a presença de maltose no meio (Verstrepen et al., 2003).

O rendimento de acetato de isoamila diminui quando os níveis de glicose são reduzidos (Singh et al., 2008). Na fermentação de mosto de uva em cultura mista de

*S.cerevisiae* e *Hanseniaspora osmophila*, a maior quantidade de acetato de etila e acetato de feniletila foi encontrada em altas quantidades de açúcares e durante a fase de maior consumo dos mesmos (Viana et al., 2009). O metabolismo de glicose gera uma alta quantidade de acetil-CoA na célula da levedura, favorecendo a síntese de ésteres (Verstrepen et al., 2003).

A temperatura possui um efeito importante sobre o crescimento de leveduras e, portanto, sobre a produção de acetil e etil ésteres. A produção desses ésteres é aumentada com o acréscimo da temperatura, variando de 15 a 25 °C (Vertrepen et al., 2003), sendo que a temperatura de 25 °C favorece o acúmulo de acetato de isoamila (Singh et al., 2008). Porém, de maneira geral, temperaturas mais baixas favorecem a produção de ésteres (Vertrepen et al. 2004). Um nível mais elevado de nitrogênio no meio também provoca um forte aumento na produção de ésteres (Verstrepen et al., 2003).

Outras condições podem interferir na produção de ésteres, tais como, pH, nitrogênio e sua disponibilidade no meio, além da quantidade de metais (ferro e cobre, principalmente). A disponibilidade de metais no meio de cultura pode aumentar a produção de ésteres, principalmente sobre a produção de acetato de etila (Urit et al., 2012).

#### **4.6. Técnicas de extração e determinação de ésteres**

Um grande número de métodos vem sendo utilizados para extração de ésteres e em função de sua volatilidade, várias técnicas de preparação das amostras têm sido desenvolvidas. De acordo com Plutowska e Wardencki (2008), várias técnicas de preparação de amostras podem ser empregadas, tais como, a extração líquido-líquido (LLE), a extração contínua líquido-líquido (LLCE), a microextração em fase sólida (SPME) e destilação por arraste de vapor (SD), seguidas por técnicas de determinação utilizando a cromatografia gasosa (GC).

Para substâncias voláteis, utiliza-se a técnica de *headspace*, a qual consiste na mistura gasosa de substâncias voláteis que circundam a amostra, seja volatilizada a alta temperatura ou temperaturas mais reduzidas (Zini, 2002). Além disso, são

caracterizadas por não serem invasivas (Zini, 2002), sendo que a principal técnica aplicada é a SPME. A SPME utiliza uma fibra de sílica fundida e com o exterior revestido com uma fase estacionária apropriada (Kole et al., 2011; Arthur e Pawliszyn, 1990). SPME é muito utilizada para concentração de componentes voláteis de alimentos e bebidas, amostras ambientais, entre outras (Bene et al., 2001). A SPME requer uma pequena quantidade de amostra, permite a extração de vários voláteis na mesma matriz e rapidamente, além de ser simples e de baixo custo (Plutowska e Wardencki, 2008).

As substâncias são concentradas na camada de adsorção que reveste a fibra de SPME e depois, diretamente são transferidas para o bico de injeção e separadas por um processo cromatográfico (Bene et al., 2001). Para ésteres, esta técnica de extração pode ser utilizada, pois possui boa sensibilidade (Watkins et al., 2012) e não utiliza solventes (Antalick et al., 2010).

Desta forma, é imprescindível que seja realizada uma seleção dos revestimentos das fibras de sílica de SPME, de acordo com o composto a ser extraído (Liu et al., 2012). Especificamente, no caso dos ésteres, fibras com várias camadas de revestimento são as mais indicadas (Antalick et al., 2010). Para extração de ésteres em vinhos, por exemplo, a fibra de tripla camada, composta por polidimetilsiloxana/divinil benzeno/carboxen (PDMS/DVB/CAR) é a mais recomendada (Antalick et al., 2010; Welke et al., 2012 e Sagratini et al., 2012).

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo geral

Selecionar leveduras da microbiota de vinhos tintos da Serra Gaúcha e de queijos artesanais da região litorânea do Estado, buscando isolados com alta produção de acetil e etil ésteres, além de otimizar as condições de cultivo visando o incremento da produção de ésteres.

### 5.2. Objetivos específicos

- Selecionar leveduras produtoras de ésteres isoladas a partir de vinhos tintos em barril de carvalho elaborados na região da Serra Gaúcha e de queijos produzidos na região litorânea, em meio sólido rico em glicose e nitrogênio;
- Caracterizar e identificar os melhores isolados de leveduras capazes de produzir altas quantidades de ésteres;
- Desenvolver e validar um método de *headspace*-SPME e GC/MS e GC/FID para determinação dos ésteres;
- Quantificar os ésteres produzidos, principalmente, acetato de etila, acetato de 2-fenil etila, hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila;
- Avaliar o efeito das condições de agitação e temperatura de cultivo na produção de acetato de etila pelo melhor isolado selecionado, utilizando a metodologia de superfície de resposta;
- Avaliar o efeito das fontes de carbono simples (glicose e frutose) e aplicação do meio complexo (mosto de uva) na produção de acetato de etila pela levedura selecionada;
- Avaliar o efeito do cultivo em biorreatores de 5L de volume sobre o acúmulo de acetil ésteres e etila pela levedura selecionada.

### 5.3. Hipótese científica

As leveduras isoladas a partir de vinhos tintos da Serra Gaúcha e queijos da região litorânea do estado são capazes de produzir ésteres em altas quantidades durante seu metabolismo fermentativo utilizando glicose como fonte de carbono. Além disso, com a otimização das condições de temperatura e agitação do cultivo líquido a produção de acetil e etil ésteres será aumentada, possibilitando o uso da levedura selecionada num processo industrial de produção de ésteres como insumo para distintos tipos de produtos e indústrias, ou então, possibilitar sua utilização como cultura *starter* num processo de fermentação alcoólica de vinhos, aumentando a complexidade aromática da bebida produzida.



## 6. CAPÍTULO I

**Evaluation of acetate and ethyl esters production by yeast strains from South Brazilian wine and homemade cheeses grown in solid medium using headspace solid-phase microextraction procedure**

Artigo em fase de revisão para submissão.

**Evaluation of acetate and ethyl esters production by yeast strains from South Brazilian wine and homemade cheeses grown in solid medium using headspace solid-phase microextraction procedure**

Juliano Garavaglia<sup>1</sup>, Andressa Habekost<sup>2</sup>, Thiago Rodrigues Bjerck<sup>2</sup>, Rosana de Cassia de Souza Schneider<sup>2</sup>, Juliane Elisa Welke<sup>3</sup>, Cláudia Alcaraz Zini<sup>4</sup>, Patricia Valente<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite, 500, Office 154, Zip Code 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; E-mail: julianogaravaglia@gmail.com; E-mail: patricia.valente@ufrgs.br

<sup>2</sup>Chromatography Laboratory, University of Santa Cruz do Sul, Av. Independência, 2293  
Zip Code 96815-900, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil; E-mail: rosana@unisc.br

<sup>3</sup>Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Office 118, Zip Code 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; E-mail: juliane.welke@ufrgs.br

<sup>4</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Office 210, Zip Code 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; E-mail: cazini@iq.ufrgs.br

\* Corresponding author: Phone: +55 51 33084196, Fax: +55 51 33083445, E-mail: patricia.valente@ufrgs.br

## Abstract

Microbial esters are labeled as natural and there is an increasing demand for these products. Several yeasts can accumulate esters, and their selection is highly interesting for many industries. Thirty-four isolates from artisanal cheeses and red wine in oak barrels in South Brazil were screened for acetate and ethyl esters production in solid medium, rich in glucose and nitrogen. The yeast cultures were realized directly inside the extraction vials and the extraction of esters was done using a headspace solid phase microextraction method followed by gas chromatography with mass spectrometric detection, and quantification by flame ionization detector. The DVB/PDMS/CAR fiber, extraction temperature of 80°C, and 20 minutes of sample heating time volatilization prior to the extraction step were the best conditions. The yeast strain *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 was able produce 4.9 mg L<sup>-1</sup> ethyl acetate, 120.96 mg L<sup>-1</sup> phenyl ethyl acetate, 76.29 mg L<sup>-1</sup> ethyl octanoate, and 17.30 mg L<sup>-1</sup> ethyl decanoate. Moreover, the yeast *Z. bailii* BCV 05 is also a reliable strain for industrial applications, since it can produce great levels of esters, mainly, phenyl ethyl acetate (77.0 mg L<sup>-1</sup>) and ethyl octanoate (76.29 mg L<sup>-1</sup>). The method proved to be successful, easy, fast to implement and can serve to select suitable yeast strains for industrial process applications.

## Keywords

Ethyl esters, acetate esters, SPME, food yeasts, wine yeasts

## 1. Introduction

Yeasts are important microorganisms for beverage, wine and dairy industries due to their ability to produce distinct types of volatile compounds during the fermentation process. The major volatile products of yeast metabolism are ethanol, glycerol, and carbon dioxide, besides compounds with characteristic aroma, such as acids, alcohols, higher alcohols and esters and, to a lesser extent, aldehydes and ketones (Mauriello *et al.*, 2009). The volatile esters are present at reduced levels in fermented drinks, but are extremely important for the flavor of these products (Lilly *et al.*, 2006), and are common constituents of some dairy products such as cheese, contributing to their flavor (Liu *et al.*, 2004). Various volatile compounds have also other applications besides the flavor industry or as components of beverage aroma. Esters, for example, can be applied as industrial solvents, such as ethyl acetate, butyl acetate, and butyl butyrate (Park *et al.*, 2009), and are valuable compounds used in the fragrance, flavor, pharmaceutical, and plastic industries (Sumbly *et al.*, 2010)

The most significant acetate esters are ethyl acetate ('fruity', 'solvent-like' aromas), isoamyl acetate ('banana' aroma), and 2-phenylethyl acetate ('honey', 'roses', 'flowery' aromas) (Cordente *et al.*, 2012). The prices of both compounds are subjected to considerable market fluctuations explained by their oil-based synthesis, but a market analysis demonstrates that the price of esters is always 30% higher than the market price of ethanol (Urit *et al.*, 2012). For example, butyl acetate demand over the last 10 years has ranged from 89 million to 107 million kg at an average price of \$1.06 kg<sup>-1</sup>; ethyl acetate, on the other hand, has ranged from 69 million to 91 million kg at an average price of \$1.02 kg<sup>-1</sup> (Park *et al.*, 2009). Both compounds have the potential to be produced via biological means. The size of the flavor and fragrance industry worldwide is considerable, estimated at US\$ 9.7 billion; whereas about 6,400 natural volatiles are known, only a few hundred are regularly used in flavors and fragrances industries (Voilley & Etiévant, 2006).

Esters produced by microorganisms are legally labeled as natural and there is an increasing demand for these products, mainly attributed to the expansion of a healthy-conscious lifestyle, which results in growing consumer interest for companies and products that meet certain environment and health standards (Singh *et al.*, 2008). Innumerable yeasts can accumulate esters during the fermentation processes, including

wine (Rojas *et al.*, 2003), dairy (Liu *et al.*, 2004) and beer yeasts (Verstrepen *et al.*, 2003). *Saccharomyces* can produce high levels of acetate and ethyl esters during beer (Verstrepen *et al.*, 2003), wine (Barata *et al.*, 2012) and pineapple juice fermentations (Pino & Queris, 2010), but yeasts classified as non-*Saccharomyces* can also produce esters (Plata *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2001).

The determination of esters is commonly performed by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS), and sample preparation prior to GC/MS analysis is crucial because they are produced at levels ranging from ng L<sup>-1</sup> to mg L<sup>-1</sup> (Jin *et al.*, 2012). Some esters are extremely unstable and volatile; in special those having minor molecule mass may be missed during analytical manipulation, decreasing the total level of measured volatile compounds (Khio *et al.*, 2012). There are several techniques employed for the extraction of these compounds, but the solid phase microextraction (SPME) has many advantages compared to the others because it is a solventless technique in which sampling, extraction and concentration are integrated in one step, followed by sample introduction in the analytical instrument (Plutowska & Wardencki, 2008). It also offers other advantages such as simplicity, high sensitivity and reproducibility, requires low sample volume and can be automated (Antalik *et al.*, 2010). Headspace SPME (HS-SPME) is the preferred option for volatile components extraction from matrices such as food and beverages, and it avoids damage of the fiber coating, providing longer life for the SPME fiber (Mullett & Pawliszy, 2003).

The aim of this work was to select yeast strains for the production of volatile esters with industrial relevance. In order to circumvent possible losses by volatilization of these compounds during the extraction step, yeasts were grown on agar slants inside the SPME vials, followed by *in situ* extraction techniques and determination of esters (HS-SPME-GC/MS). Furthermore the SPME conditions were tested to improve the ester quantification and minimize the losses, developing a simple solventless method, easy to implement for the selection of yeast strains able to produce esters in solid medium.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Yeasts, medium and culture conditions**

Thirty-four (34) yeast strains were isolated from different sources: 13 from Brazilian artisanal cheeses and 21 from red wine oak barrels from Serra Gaúcha wineries, Brazil (Table 1). For yeast identification, the divergent D1/D2 domain of the large subunit of rDNA genes was sequenced using the NL1 and NL4 primers, according Kurtzman & Robnett (1998). The sequences were obtained with the ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) using standard protocols. Identification was achieved using the BLAST algorithm with a 99% identity as the cut off value.

**Table 1:** Yeast isolates used in this work and their respective origin.

Origin of strains	Code number	Total of yeasts screened (n = 34)
Southern Brazil artisanal cheeses	QU 79, QU 110, QU 112, QU 68, QU 138, QU 29, QU 48, QU 27, QU 134, QU 135, QU 138, QU 21, QU 84 B	13
Red wine oak barrels from Serra Gaúcha wineries, Brazil	BCV 02, BCV 04, BCV 05, BCV 06, BCV 07, BCV 08, BCV 09, BCV 10, BCV 12, BCV 14, BCV 19, BCV 22, BCV 24, BCV 25, BCV 26, BCV 27, BCV 28, BCV 29, BCV 30, BCV 31, BCV 32	21

The production of esters was evaluated after yeast growth on GPYM agar slants [40 g L<sup>-1</sup> glucose (Oxoid), 5 g L<sup>-1</sup> peptone (Oxoid), 3 g L<sup>-1</sup> yeast extract (Oxoid), 3 g L<sup>-1</sup> malt extract (Oxoid), 1 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Synth, São Paulo, Brazil), 15 g L<sup>-1</sup> agar (Merck, Darmstadt, Germany) pH 6.0], modified from Rojas *et al.* (2003). 10 mL of this medium were transferred to 20 mL transparent glass vials (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and tightly capped with septa of polytetrafluoroethylene (PTFE) and silicon (Sigma-Aldrich). The vial was sterilized (121 °C for 15 minutes) and was kept at an inclined position until agar solidification to form the agar slants. A colony of each yeast was inoculated at the surface of the medium using a calibrated loop of 1 µL and incubated at 28 °C during five days. Then, the vial headspace was submitted to HS-

SPME and GC/MS procedures; the GC/MS conditions were defined using the experiments performed with the isolate named QU110, and the best conditions were applied to the other isolates for the screening analysis.

## 2.2. HS-SPME conditions

Three different SPME coatings were tested: polydimethylsiloxane (PDMS), polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), and polydimethylsiloxane/divinylbenzene/carboxen (PDMS/DVB/CAR), all with a nonbonded phase of 65, 50 and 100  $\mu\text{m}$ , respectively, and coupled in a manual holder. Fibers and holder were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Fiber coatings were conditioned according to manufacturer's instructions before use. Preliminary tests were performed under the following conditions in order to verify which fiber coating would result in higher ester chromatographic area: extraction equilibrium time of 20 minutes (sample heating period before the fiber exposition) and extraction time of 10 minutes (fiber exposition period inside the vial).

The following parameters were tested in order to search the best experimental SPME conditions: extraction temperature (50, 65 and 80  $^{\circ}\text{C}$ ) and extraction time (5, 10, 20 and 30 min). All experiments were performed in triplicate. The SPME fiber was introduced into the vials with the yeast biomass, where it was kept for a variable time (extraction time) with manual and occasional stirring. The volatiles were desorbed for 10 minutes in the injection port of a gas chromatograph with a mass spectrometry detector, using the splitless mode (section 2.3). Relative peak areas were used to compare the effect of the type of fiber and SPME parameters on the sorption-desorption of the esters.

## 2.3. Quantification of esters

Esters were analyzed using gas chromatography with mass spectrometric detection and flame ionization detector, using a Shimadzu GC 2010 equipment (Shimadzu, Tokyo, Japan), equipped with a ZBWAX capillary column (30 m x 0.25  $\mu\text{m}$  x 0.25 mm) with polyethylene glycol (Supelco). A Shimadzu GCMS QP 2010 Plus

mass detector was used in the scan mode (electron impact,  $m/z$  range: 40 to 400), coupled to a Shimadzu FID 2010 Plus detector for the quantification of ethyl and acetate esters. Helium (purity 99.99 %, from White Martins, São Paulo, Brazil) was used as carrier gas at  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Temperature of detector and injector was  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  and the oven temperature was programmed to start at  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , where it was kept for 1 min. It was then increased to  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  at  $3 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  and had a further increase until  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ ). Total run time was 17 min. All the peaks were identified from their mass spectra by comparison with spectra in Wiley6N and NIST98 libraries. Furthermore, the identification and quantification was made by comparison of the retention times and mass spectra of the analyzed samples and authentic standards (external standards, purchased from Sigma-Aldrich, ethyl acetate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl hexanoate, phenyl ethyl acetate, acetaldehyde and ethanol) obtained at identical chromatographic conditions, and by co-injection of standards and samples.

The HS-SPME-GC/MS method was validate by evaluation of linear range (LR), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ). The external standard calibration curve was constructed with eight standard solutions of ethyl acetate (Sigma-Aldrich) and ethyl octanoate (Sigma-Aldrich), sequentially analyzed in order of crescent concentrations. Each concentration was analyzed in triplicate. These compounds were used in the validation step because they were produced in high amounts by several yeast strains evaluated in the preliminary tests. The LOD and LOQ were established using the signal to noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively. The precision of the method was evaluated in terms of repeatability, and the intermediate precision was expressed as relative standard deviation (% RSD). The repeatability was verified by 7 injections of the standard solutions in the concentration of  $5 \text{ mg L}^{-1}$  in a single day while maintaining constant all the operational conditions. The intermediate precision was obtained by 7 injections of the same standard solution in three different days. The RSD was calculated using the average of the chromatographic peak areas of the compounds.

#### **2.4. Principal Component Analysis and statistical analysis**

Principal component analysis (PCA) was used to detect clustering and to establish relationships between yeast strains and esters quantified (ethyl acetate, phenyl



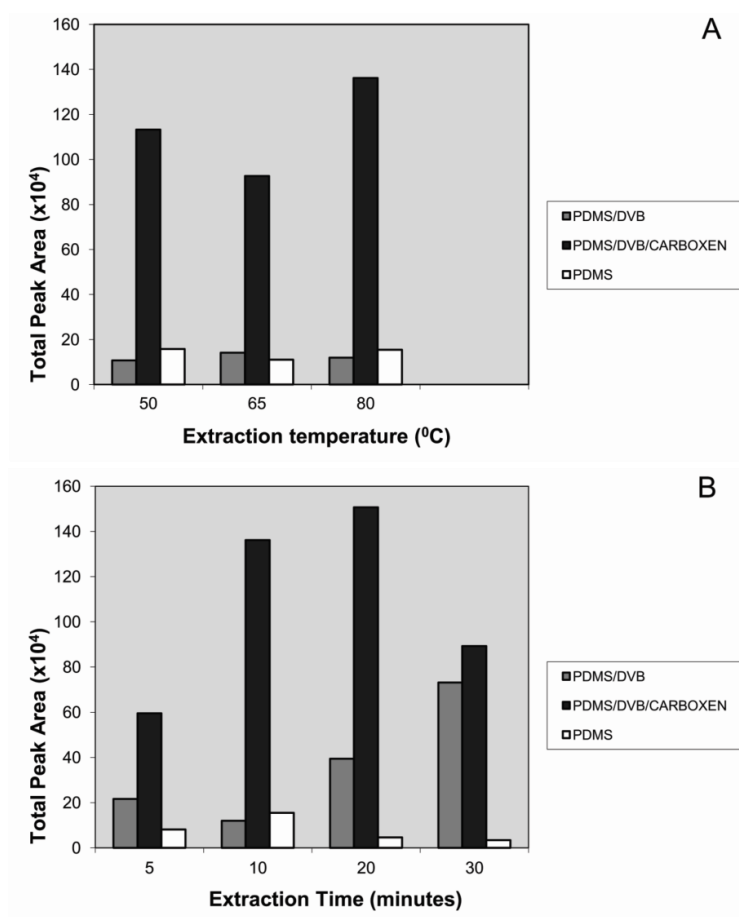
ethyl acetate, ethyl octanoate and ethyl decanoate) by the HS-SPME-GC/MS method. The amount of ester produced by each yeast strain was used in order to build the PCA matrix. The statistical software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, USA) was used for all statistical analysis, including one-way Analysis of Variance (ANOVA) in order to test for significant differences between quantities of esters produced by the yeasts. When significance was reached, a Tukey (HSD) post-hoc test (confidence interval of 95%) was performed.

### **3. Results and Discussion**

#### **3.1. HS-SPME method optimization**

In the first step of this work, experiments were performed in order to check the best coating materials for HS-SPME examination and to define the extraction conditions, using the yeast isolate QU 110. The sensitivity of the SPME extraction technique depends greatly on the value of the distribution constant of the analytes partitioned between the sample and the fiber coating material. For this reason, the extraction efficiencies of three SPME fiber coatings were tested in order to find which coating had the highest affinity toward esters.

The total area of chromatographic peaks identified as esters (acetate or ethyl esters) was used to identify the most appropriate SPME coating fibers. In the tested conditions (80 °C of extraction time, 20 min of equilibrium time and 10 min of extraction time), the PDMS/DVB/CAR was the SPME coating that showed a larger total area of ester chromatographic peaks. Furthermore, each fiber was exposed to three different extraction temperatures and periods of time. The major peak area was reached with the PDMS/DVB/CAR fiber in all tested conditions (Figure 1A and 1B). Similar outcomes were reported formerly for SPME extraction of volatiles from wines from Rio Grande do Sul (Brazil), with most compounds identified as esters (56%), and alcohols and acids detected as minor components (Welke *et al.*, 2012). This fiber was used to detect volatile compounds extracted from different matrices, such as chili pepper (Junior *et al.*, 2011), pineapple wine fermentation (Pino & Queris, 2010), yeast cultures and alcoholic beverages (Khio *et al.*, 2012), and proved to be suitable for the screening of yeasts capable of producing acetate and ethyl esters.



**Figure 1:** Total chromatographic peak area of ethyl and acetate esters produced by the yeast isolate QU110 as a function of time and temperature extraction, using different SPME coatings. A: extraction temperature. B: extraction time at 80°C.

The higher efficiency of PDMS/DVB/CAR fiber may be due to its triple film, which provides three distinct coatings, lending to it an intermediate polarity. The divinyl benzene (DVB) layer retains less volatile analytes, allowing the diffusion of the smaller and more polar ones to the carboxen (CAR) layer. Extraction occurs basically through sorption and is recommended for volatile and semivolatile compounds containing 3 to 20 carbons, covering a broad range of polarity (Ceva-Antunes *et al.*, 2006). The PDMS/DVB/CAR fiber was utilized in all further optimization experiments of this work.

The extraction time depends on the chemical nature of the target compounds and the polymeric phase (Junior *et al.*, 2011). An increase in the chromatographic peak areas

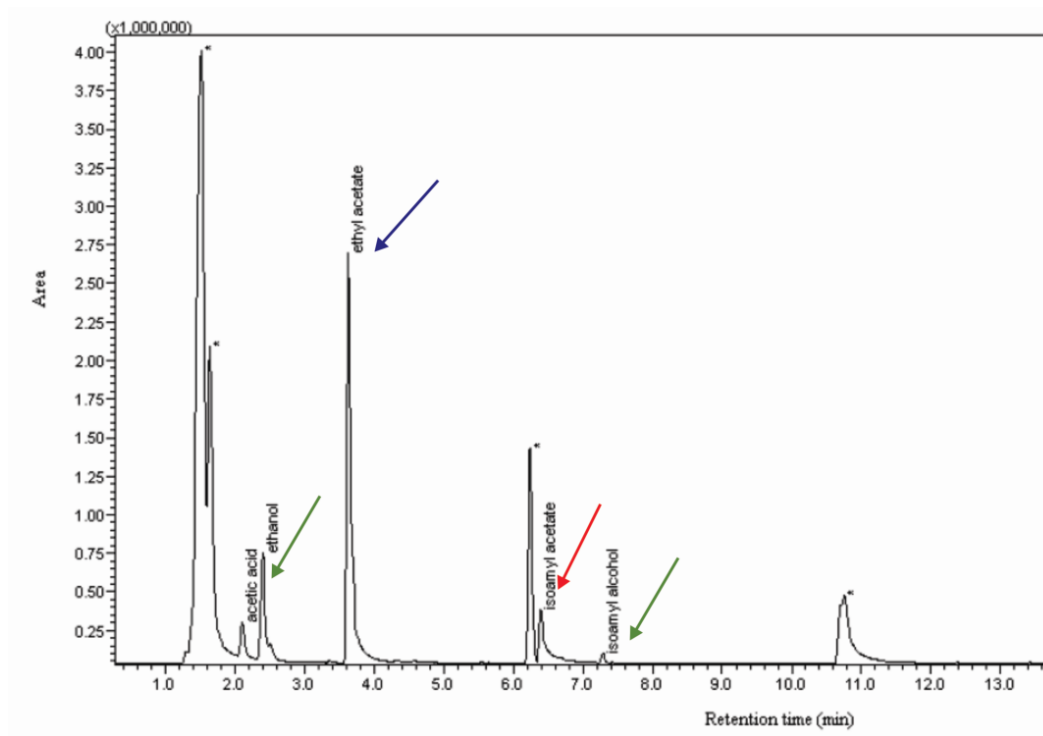
of esters was observed when the temperature of the extraction was increased, as shown in Figure 1A. The temperature of 80 °C was chosen for the experiments, because at this temperature a higher number of compounds and a larger chromatographic peak area were observed. High temperatures are supposed to increase the extraction efficiency of volatiles. The better extraction with increasing temperature occurs due to the enhanced mass transfer (kinetics) to the vial headspace (Welke & Zini, 2011). The highest peak area of volatile compounds at 80 °C (Figure 1A) was due to an increase of peaks corresponding to acetate and ethyl esters.

After choosing the best extraction temperature, this parameter was set as 80 °C and four different extraction times were tested in relation to SPME performance (Figure 1B). The PDMS/DVB/CAR fiber presented a large peak area after 20 minutes of extraction. Time and temperature are parameters closely related to each other, since an increase in temperature enables shorter exposure times, thus accelerating the analysis time (Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2002). The best SPME conditions were obtained with the PDMS/DVB/CAR fiber, temperature of 80 °C and extraction time of 20 min.

The linearity of the HS-SPME method was studied by extracting aqueous solutions of a mixture of ethyl acetate and ethyl octanoate standards in the concentrations between 0.05 and 100 mg L<sup>-1</sup>. The HS-SPME-GC/MS method showed good linearity in this wide range of concentrations, with correlation coefficient (R<sup>2</sup>) of 0.9791 for the ethyl acetate standard and 0.9746 for ethyl octanoate. The LOD and LOQ were of 0.63 mg L<sup>-1</sup> and 1.0 mg L<sup>-1</sup> for ethyl acetate, and 0.96 mg L<sup>-1</sup> and 2.9 mg L<sup>-1</sup> for ethyl octanoate, respectively. The repeatability (RSD) intra-day was measured for the two standard aqueous solutions and was defined as 2.34 % for ethyl acetate and 0.26 % for ethyl octanoate. These results show that the method has good quality validation parameters, and can be applied for the measurement of acetate and ethyl esters levels produced by the yeasts analyzed.

Figure 2 shows the chromatography separation of volatile compounds produced by yeast strain QU 110. Several compounds were produced, such as ethanol, acetaldehyde, ethyl acetate, acetic acid, isoamyl acetate, 2-phenylethyl acetate, ethyl octanoate, ethyl decanoate and isoamyl alcohol (Table 2). Initially, the yeast growth was done inside the SPME glass vial containing the GPYM medium in liquid form (GPYM broth), however little production of esters, observed through the number of

peaks detected by gas chromatograph, was verified. A higher production of esters was obtained when the GPYM medium was used in solid form (GYMP agar).

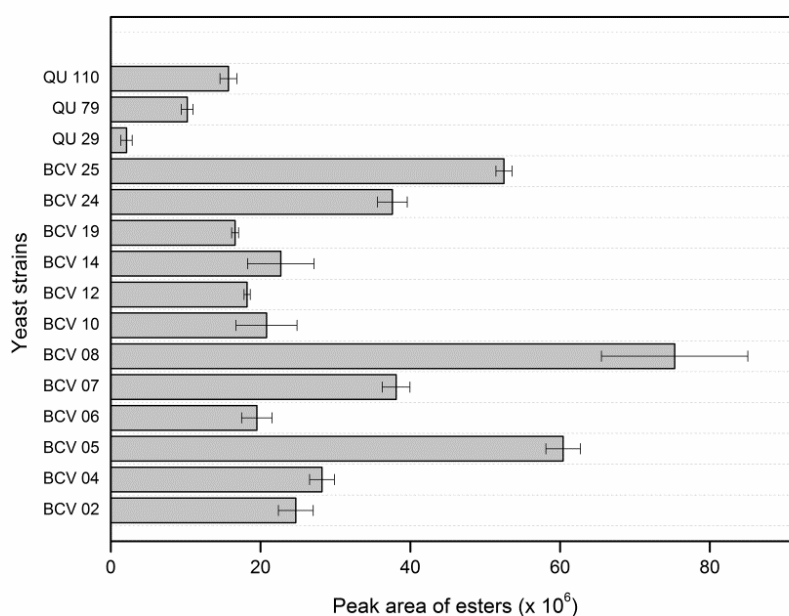


**Figure 2:** Chromatogram of volatile compounds produced by QU110 strain after growth on GYMP agar, obtained by HS-SPME.

The detection of ethyl and acetate esters produced by yeasts in solid medium probably occurred due to the higher contact of the yeast biomass with the oxygen in the headspace inside the glass vial. The average production of esters and the relative proportions of each compound are highly dependent on the yeast strain and other parameters, such as the oxygen concentration in the medium (Sumbly *et al.*, 2010). Furthermore, when the oxygen concentration is extremely low, ester accumulation drops due to insufficient yeast growth (Verstrepen *et al.*, 2003). The choice of the solid medium was also made because this method showed a good equilibrium of ester extraction from the medium, and large peak areas identified as esters were reached in the chromatograms.

### 3.2. Yeast identification and esters production

After the definition of the best conditions, the HS-SPME-GC/MS method was applied to 34 yeasts isolated from artisanal cheese and red wine oak barrels (Table 1) in order to select the strains that produced the higher amounts of acetate and ethyl esters. Ester production by yeasts associated to Brazilian wines and cheeses is highly unexplored, although these substrates are expected to be a good source of ester-producing yeasts. Figure 3 shows the total peak area of esters in the chromatograms obtained by best yeast isolates.



**Figure 3:** Total chromatographic peak area of ethyl and acetate esters produced by the strains analyzed by HS-SPME-GC/MS with PDMS/DVB/CAR coating fiber at the best extraction conditions (80 °C for temperature, 20 minutes for sample heating and 10 minutes for fiber exposition in the vial). The error bars indicate the standard deviations for three repeats.

The six best producer strains were selected for further analysis. All six strains produced ethanol, meaning that they fermented under the applied conditions. There were differences in the volatile compounds profiles between the strains, but the major

constituents of the chromatograms were ethanol, acetate and ethyl esters. Table 2 shows the amounts of esters produced by the selected six yeast strains. The four isolates from wine oak barrels were molecularly identified as *Zygosaccharomyces bailii*, and other two isolates from homemade cheeses as *Candida parapsilosis* (Table 2).

The yeast *Z. bailii* has already been detected in wine samples (Barata *et al.*, 2012). Although this species is recognized as a food and beverage contaminant, an osmotolerant and strongly fermentative yeast, little is known about its metabolism at different culture conditions or its capacity of producing esters. *Zygosaccharomyces* wine strains can yield high levels of 2-phenyl ethyl acetate, isoamyl acetate and ethyl acetate (Rojas *et al.*, 2001), and are capable to produce these esters through the esterification reaction with ethanol, isoamyl alcohol or 2-phenyl ethanol (Rojas *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2003).

**Table 2:** Esters production by the six best yeast strains measured by HS-SPME with gas chromatography and mass spectrometric detection. Values with the same letters are not significantly different according to the Tukey test (95%).

Yeast strain	Origin	Ethyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	Phenyl ethyl acetate (mg L <sup>-1</sup> )	Ethyl octanoate (mg L <sup>-1</sup> )	Ethyl decanoate(mg L <sup>-1</sup> )
<i>C. parapsilosis</i> QU 79	Homemade cheeses	4.74 <sup>a</sup>	1.09 <sup>e</sup>	1.08 <sup>e</sup>	0.9 <sup>c</sup>
<i>C. parapsilosis</i> QU 110	Homemade cheeses	1.73 <sup>b</sup>	6.07 <sup>d</sup>	6.17 <sup>d</sup>	19.3 <sup>a</sup>
<i>Z. bailii</i> BCV 02	Red wine oak barrels	4.08 <sup>a</sup>	13.0 <sup>c</sup>	145.36 <sup>a</sup>	0.67 <sup>c</sup>
<i>Z. bailii</i> BCV 05	Red wine oak barrels	1.77 <sup>b</sup>	77.0 <sup>b</sup>	76.29 <sup>b</sup>	11.15 <sup>b</sup>
<i>Z. bailii</i> BCV 08	Red wine oak barrels	4.91 <sup>a</sup>	120.97 <sup>a</sup>	29.16 <sup>c</sup>	17.3 <sup>a</sup>
<i>Z. bailii</i> BCV 25	Red wine oak barrels	1.85 <sup>b</sup>	2.59 <sup>de</sup>	2.57 <sup>e</sup>	1.11 <sup>c</sup>

Non-clinical isolates of *C. parapsilosis* are sporadically obtained from a variety of substrates, such as beer, olive and seawater (Lachance *et al.*, 2011), and have been already isolated from cheeses made from pasteurized milk (Westall and Filtenborg,

1998). This species has weak virulence factors and produces extracellular enzymes, such as phospholipases, proteinases and esterases (Ge *et al.*, 2012). Some strains have biotechnological applications, for instance, production of peptidases with keratinolytic properties (Vermelho *et al.*, 2010), and whole-cell biocatalysis (Lou *et al.*, 2009), emphasizing the importance of the screening of strains of this species for biotechnological purposes. *C. parapsilosis* yeast produces lipase/acetyltransferase enzymes and can catalyze the alcoholysis of various esters, which accumulate in the culture medium (Brunel *et al.*, 2004).

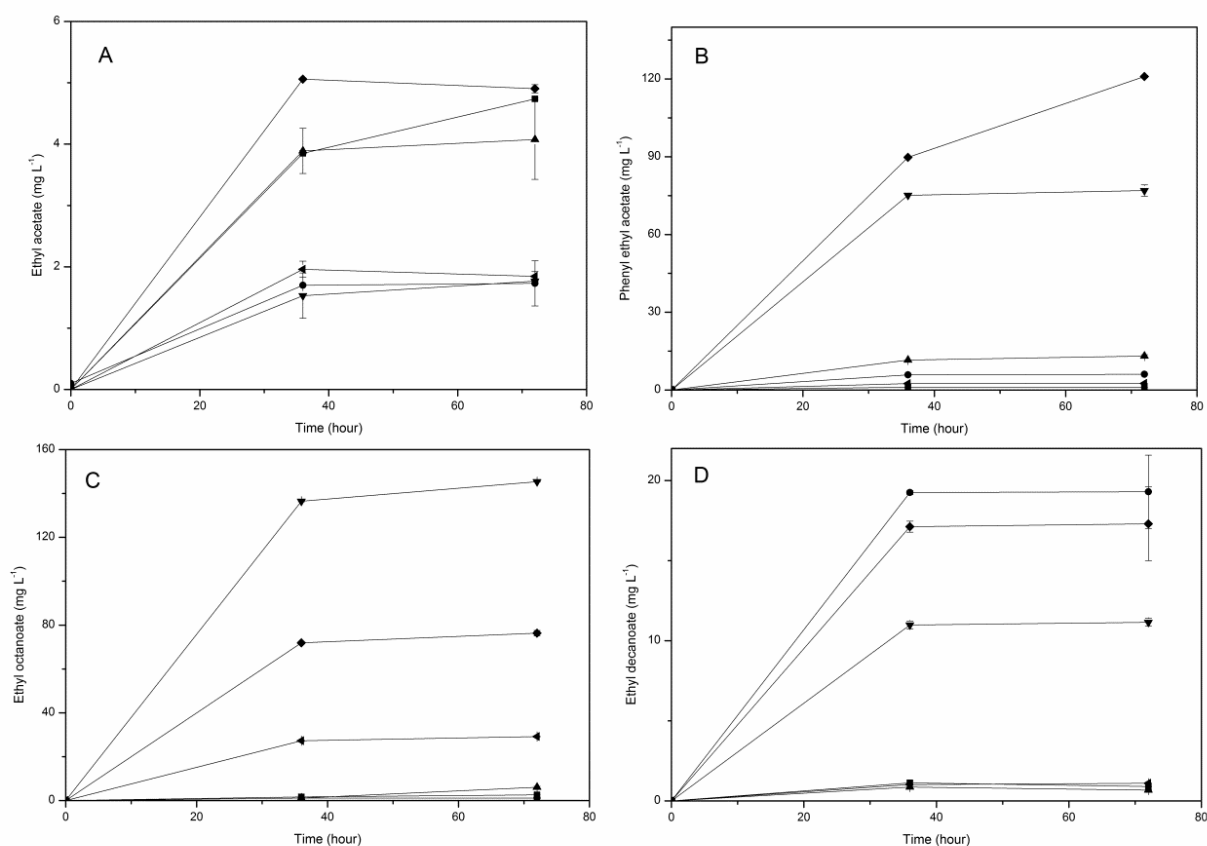
The yeasts were able to accumulate different amounts of ethyl acetate, phenyl ethyl acetate, ethyl decanoate and ethyl octanoate (Table 2). The strain *Z. bailii* BCV 08 produced more esters than the other strains tested. This yeast produced 4.91 mg L<sup>-1</sup> of ethyl acetate, 120.97 mg L<sup>-1</sup> of phenyl ethyl acetate, 17.3 mg L<sup>-1</sup> of ethyl decanoate, and 29.16 mg L<sup>-1</sup> of ethyl octanoate, the first three in significantly higher amounts than the other strains tested. These results demonstrate that this strain can be used to develop an industrial route for acetate and/or ethyl ester accumulation, either in the production of foods and beverages via fermentation or biocatalysis process.

The strains belonging to the species *Z. bailii* produced more esters than the ones belonging to *C. parapsilosis* (Figure 3, Table 2). *C. parapsilosis* QU 79 produced high levels of ethyl acetate (4.74 mg L<sup>-1</sup>) compared to the strain *C. parapsilosis* QU 110, but accumulated less ethyl decanoate (0.9 mg L<sup>-1</sup>). *C. parapsilosis* QU 110, on the other hand, produced a great amount of ethyl decanoate (19.3 mg L<sup>-1</sup>), and this feature distinguished it from the other yeasts evaluated. The two strains of *C. parapsilosis* had different profiles of esters production (Figure 4), emphasizing that ester production is a strain-specific trait.

The production of ethyl acetate, phenyl ethyl acetate, ethyl octanoate and ethyl decanoate was evaluated for the best yeasts along different times of cultivation (0, 36 and 72 hours). The concentration of ethyl acetate by most strains was maximal at 36 hours, and stabilized until 72 hours, with the exception of *C. parapsilosis* QU 79, whose production enhanced after 36 h of cultivation (Figure 4A). At 72 h the yeast *Z. bailii* BCV 08 accumulated more ethyl acetate than the other strains (Figure 4A, Table 2). This behavior is similar to other non-*Saccharomyces* strains from wine (Rojas *et al.*,

2003), *Kluyveromyces marxianus* (Urit *et al.*, 2012), *Pichia pastoris* (Brunel *et al.*, 2004) and *Candida* species (Neugnot *et al.*, 2002).

The accumulation of phenyl ethyl acetate by the strains *Z. bailii* BCV 08 and BCV 05 increased after 36 h of cultivation (Figure 4B). The production of this compound is related with the progress of the fermentation process for *Saccharomyces cerevisiae* (Saerens *et al.*, 2008), even in mixed cultures of yeasts (Andorrà *et al.*, 2012). Compared with the best strains tested, *Z. bailii* BCV 08 and BCV 05 can accumulate more ethyl octanoate and decanoate after 36 h of cultivation inside the vials and upon the agar slants surface. On the other hand, the remaining four best strains tested (*Z. bailii* BCV 02, *Z. bailii* BCV 25, *C. parapsilosis* QU 79 and *C. parapsilosis* QU 110) accumulated a small quantity of these compounds after 36 h (Figure 4 C and D).



**Figure 4:** Increasing of ethyl and acetate esters by the best yeast producers according to the cultivation time (0, 36 and 72h) and. The error bars indicate the standard deviations for three repeats. Squares: *C. parapsilosis* QU 79; circles: *C. parapsilosis* QU 110; up



triangles: *Z. bailii* BCV 02; down triangles: *Z. bailii* BCV 05; diamonds: *Z. bailii* BCV 08; left triangles: *Z. bailii* BCV 25. A: ethyl acetate. B: phenyl ethyl acetate. C: ethyl octanoate. D: ethyl decanoate.

Some esters, mainly ethyl acetate, ethyl octanoate and ethyl decanoate have great industrial interest because they can influence the flavor of foods and fermented drinks, providing fruity aromatic notes (isoamyl acetate, ethyl decanoate and ethyl octanoate), flowery notes (2-phenylethyl acetate) or solvent-like aromas (ethyl acetate) (Verstrepen *et al.*, 2003). These compounds may have a strong influence on wine aroma, giving a desirable and fruity character to Merlot wines (Welke *et al.*, 2012). The strains isolated from wine samples were capable of producing 2-phenylethyl acetate, even as strains isolated from cheese.

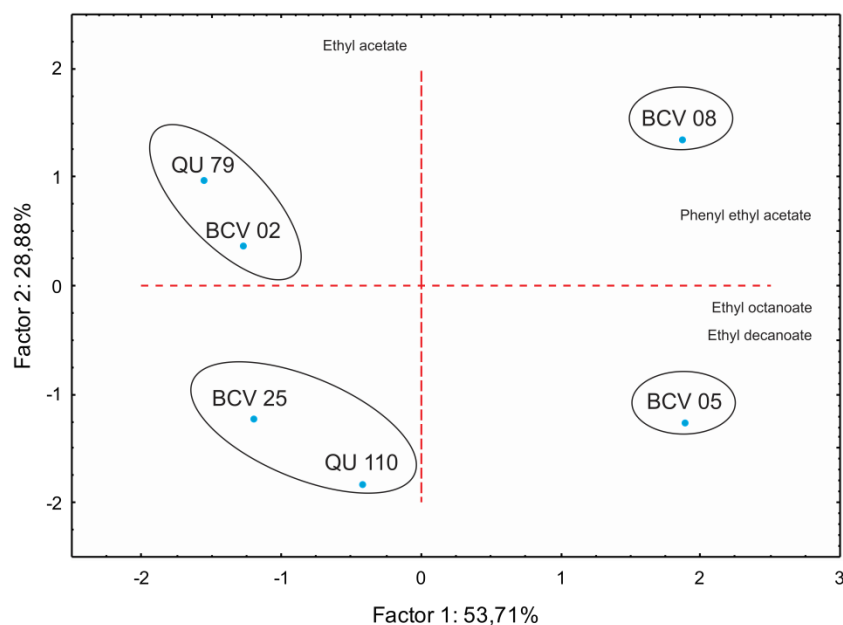
### 3.3. Principal component analysis

The principal component analysis (PCA), performed for the detection of esters produced for each of the six best producer strains, revealed that the two principal axes represent 82.59% of the total variation (Figure 5). PCA was used to identify the specific production of esters discriminating the yeasts tested.

The PCA yielded four different groups of yeasts. The first group comprised the strains *Z. bailii* BCV 02 and *C. parapsilosis* QU 79, and is distinguished from the others by ethyl acetate production. The second set is formed by the strain *Z. bailii* BCV 25 and *C. parapsilosis* QU 110, which is characterized by a minor production of acetate and ethyl esters. PCA analysis also distinguished the strains *Z. bailii* BCV 05 and *Z. bailii* BCV 08 from all yeasts tested.

The yeast *Z. bailii* BCV 08 was separated from the other clusters due to the high amount of phenyl ethyl acetate, whereas *Z. bailii* BCV 05 produced great amounts of ethyl octanoate and ethyl decanoate. This analysis demonstrated that the HS-SPME-GC/MS method was able to discriminate the yeasts according to the acetate and ethyl esters formation during fermentation, resulting in enough sensitivity to discriminate groups of strains with biotechnological interest. It proved to be a good tool for the rapid

selection of yeast producers of volatile compounds, and can be easily applied for yeast selection and aromatic profile identification in industrial fermentations.



**Figure 5:** Principal component analysis of the six best yeast strains according to their level of esters produced in solid medium.

#### 4. Conclusions

Using the proposed screening methodology, it was possible to detect acetate and ethyl esters produced by yeast cultures in solid medium. The best SPME conditions were defined and fixed at 80 °C for temperature, 20 minutes for sample heating before the fiber insertion on the vial and 10 minutes for PDMS/DVB/CAR fiber exposition inside the glass vial with the yeast biomass. The procedure method has a very good sensibility, does not require large sample volumes and can detect various esters, reducing the use of organic solvents and the discard of residues. The best yeast selected was *Z. bailii* BCV 08, due to its ability to produce acetate and ethyl esters; this strain produced high amounts of ethyl acetate (4.91 mg L<sup>-1</sup>), phenyl ethyl acetate (120.97 mg L<sup>-1</sup>) and ethyl decanoate (17.3 mg L<sup>-1</sup>), and these ester levels differentiated it from the other yeast strains tested. Moreover, the yeast *Z. bailii* BCV 05 also produced high

levels of esters. Furthermore, it was possible to evaluate the esters formed by both yeasts, thus facilitating their application in industrial processes to either enhance the aromatic complexity and quality of fermented foods and beverages or as a bulk product.

## 5. Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Council National of Technological and Scientific Development (CNPq) and the Cellular and Molecular Biology Post-graduate Program of Federal University of Rio Grande do Sul (PPGBCM-UFRGS) for financial support.

## 6. References

Andorrà I Berradre M Mas A Zarzoso BE Guillamón JM (2012) Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT-Food Sci Technol* 49: 8-13.

Antalick G Perello MC Revel G (2010) Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase micro-extraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem* 121: 1236-1245.

Barata A Malfeito-Ferreira M Loureiro V (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol* 153: 243-259.

Ceva-Antunes PMN Bizzo HR Silva AS Carvalho CPS Antunes OAC (2006) Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). *LWT- Food Sci Technol* 39: 436-442.

Cordente AG Curtin CD Varela C Pretorius IS (2012) Flavour-active wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:601-618.

Ge YP Lu GX Shen YN Liu WD (2011) *In vitro* evaluation of phospholipase, proteinase, and esterase activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. *Mycopathologia* 172: 429-438.

Jin Z Ntwali J Shuang-Yan H Sui-Ping Z Lin Y (2012) Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. *J Biotechnol* 159: 108-114.

Junior SB Melo AMT Zini CA Godoy HT (2011) Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction. *J Chromatogr A* 1218: 3345- 3350.

Khio SW Cheong MW Zhou W Curran P Yu B (2012) Characterization of the volatility of flavor compounds in alcoholic beverages through headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and mathematical modeling. *J Food Sci* 71: 61-70.

Kurtzman CP Robnett CJ (1998) Three new insect-associated species of the yeast genus *Candida*. *Can J Microbiol* 44: 965-973.

Lachance MA Boekhout T Scorzetti G Fell JW Kurtzman CP (2011) *Candida* Berkhout (1923). In: Kurtzman CP (ed) *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5<sup>th</sup> edition. Elsevier, Amsterdam, pp. 987-1278.

Lilly M Bauer FF Lambrechts MG Swiegers JH Cozzolino D Pretorius I (2006) The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* 23: 641-659.

Lou WY Zhang BB Smith TJ Zong MH (2009) Using a water-immiscible ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4-(trimethylsilyl)-3-butyn-2-one catalyzed by immobilized *Candida parapsilosis* CTCC M203011 cells. *BMC Biotechnol* 9: 90.

Mauriello G Capece A Auria MD Garde-Cerdán T Romano P (2009) SPME–GC method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiol* 26: 246-252.

Mullett WM & Pawliszy J (2003) The development of selective and biocompatible coatings for solid phase microextraction. *J Sep Sci* 26: 251-260.

Neugnot V Moulin G Dubreucq E Bigey F (2002) The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur J Biochem* 269: 1734-1745.

Park YC Shaffer CEH Bennett GN (2009) Microbial formation of esters. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 13-25.

Pino JA & Queris O (2010) Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques. *Food Chem* 122: 1241-1246.

Plata C Mauricio JC Ortega JM Mill C (2003) Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol* 20: 217-224.

Plutowska B & Wardencki W (2008) Determination of volatile fatty acid ethyl esters in raw spirits using solid-phase micro extraction and gas chromatography. *Anal Chim Acta* 613: 64-73.

Rodríguez-Bencomo JJ Conde JE Rodríguez-Delgado MA Garcia-Montelongo F Pérez-Trujillo JP (2002) Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J Chromatogr A* 963: 213-223.

Rojas V Gil JV Piñaga F Manzanares P (2001) Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int J Food Microbiol* 70: 283-289.

Rojas V Gil JV Piñaga F Manzanares P (2003) Acetate Ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int J Food Microbiol* 86: 181-188.

Saerens SMG Delvaux F Verstrepen KJ Van Dijck P Thevelein JM Delvaux FR (2008) Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 454-461.

Singh R Vadlani PV Harrison ML Bennett GN San KY (2008) Aerobic production of isoamyl acetate by overexpression of the yeast alcohol acetyl-transferases AFT1 and AFT2 in *Escherichia coli* and using low-cost fermentation ingredients. *Bioprocess Biosyst Eng* 31: 299-306.

Sumby KM Garbin PR Jiranek V (2010) Microbial modulation of esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chem* 121: 1-16.

Urit T Sukert A Bley Y Löser C (2012) Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey during aerobic batch cultivation at specific trace element limitation. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:1313-1323.

Vermelho AB Mazotto AM Melo AC Vieira FH Duarte TR Macrae A Nishikawa MM Silva EPB (2010) Identification of a *Candida parapsilosis* strain producing extracellular serine peptidase with keratinolytic activity. *Mycopathologia* 169: 57-65.

Verstrepen KJ Derdelinckx G Dufour JP Winderickx J Thevelein JM Pretorius IS Delvaux FR (2003) Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *J Biosci Bioeng* 96:110-118.

Voilley A & Etiévant P (2006) *Flavour in food*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Welke JE & Zini CA (2011) Comprehensive two-dimensional gas chromatography for analysis of volatile compounds in foods and beverages. *J Braz Chem Soc* 22: 609-622.

Welke JE Zanús M Lazarotto M Schmitt KG Zini CA (2012) Volatile Characterization by Multivariate Optimization of Headspace-Solid Phase Microextraction and Sensorial Evaluation of Chardonnay Base Wines. *J Braz Chem Soc* 23: 678-687.

Westall S & Filtenborg O (1998) Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiol* 15: 243-249.



## 7. CAPÍTULO II

### **Evaluation and improvement of esters production by *Zygosaccharomyces bailii* yeast isolated from Brazilian red wine.**

Artigo submetido ao periódico *Food Microbiology*.



**Evaluation and improvement of esters production by *Zygosaccharomyces bailii* yeast isolated from Brazilian red wine**

Juliano Garavaglia<sup>1</sup>, Andressa Habekost<sup>2</sup>, Thiago Rodrigues Bjerck<sup>2</sup>, Rosana de Cassia de Souza Schneider<sup>2</sup>, Sandra Denise Camargo Mendes<sup>3</sup>, Juliane Elisa Welke<sup>3</sup>, Cláudia Alcaraz Zini<sup>4</sup>, Patrícia Valente<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Sarmiento Leite, 500, Office 154, Zip Code 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; E-mail: julianogaravaglia@gmail.com; E-mail: patricia.valente@ufrgs.br

<sup>2</sup>Chromatography Laboratory, University of Santa Cruz do Sul, Av. Independência, 2293 Zip Code 96815-900, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil; E-mail: rosana@unisc.br

<sup>3</sup>Agricultural Research and Rural Extension Institute of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1347, Zip Code 88034-90, Florianópolis, SC, Brazil; E-mail: smendesbr@gmail.com

<sup>3</sup>Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Office 118, Zip Code 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; E-mail: juliane.welke@ufrgs.br

<sup>4</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Office 210, Zip Code 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; E-mail: cazini@iq.ufrgs.br

\* Corresponding author: Phone: +55 51 33084196, Fax: +55 51 33083445, E-mail: patricia.valente@ufrgs.br

**Abstract**

A response surface methodology was used to increase the production of esters by *Z. bailii* BCV 08, selected from twenty-one yeast strains isolated from red wine in Southern Brazil. A  $2^2$  full factorial central composite design was applied to determine the best conditions of temperature ( $X_1$ , 20 to 36 °C) and agitation ( $X_2$ , 0 to 200 rev/min). The results showed a second-degree polynomial regression model with good agreement of the experimental data ( $R^2 = 0.91$ ,  $P < 0.05$ ). The maximum production of esters was found at 28 °C and a stirring speed of 0 rev/min. Further experiments showed that the carbon source (glucose, fructose and grape must) was important for the accumulation of esters. Best results were found using grape must in bioreactor experiments and pH of 3.5, indicating that this medium can be used for the production of esters. In winemaking practices, this yeast strain could be mixed with *Saccharomyces cerevisiae* cultures, improving the fruity notes and wine flavor complexity.

**Keywords:** esters; response surface methodology; *Zygosaccharomyces bailii*; grape must fermentation, wine flavor

## 1. Introduction

Yeasts are important microorganisms in winemaking due to their ability to produce distinct types of volatile compounds. The major volatile products of yeast metabolism are ethanol, glycerol, and carbon dioxide, besides compounds with characteristic aroma, such as acids, alcohols, higher alcohols and esters and, to a lesser extent, aldehydes and ketones (Mauriello et al., 2009). The volatile esters are present at reduced levels in fermented drinks, but are extremely important for the flavor of these products (Lilly et al., 2006). For instance, ethyl hexanoate and ethyl octanoate are associated to an apple flavor and ethyl decanoate to floral and soap aromas (Saerens et al., 2010).

Several yeast strains produce esters, such as *Kluyveromyces marxianus* (Löser et al., 2013), *Hanseniaspora osmophila* (Viana et al., 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (Plata et al., 2005), oxidative or weakly fermentative yeasts (Mateos et al., 2006) and non-*Saccharomyces* strains, including *Zygosaccharomyces* (Rojas et al., 2001). This genus includes osmotolerant, strongly fermentative yeasts that are able to resist to weak-acid preservatives (Wrent et al., 2010). The yeast *Zygosaccharomyces bailii* can cause sediment and cloudiness during the wine fermentation (Barata et al., 2012), is a fructophilic yeast (Leandro et al., 2011), capable of surviving under acidic environments (Rodriguez et al., 2004) and frequently found in wines from distinct winemaking areas (Viana et al., 2008).

In this study, the response surface methodology (RSM) was applied to verify the influence of agitation and temperature cultivation as a strategy for enhancing the production of esters, by a strain of *Z. bailii* selected among yeasts isolated from Brazilian red wine barrels. Additionally, the influence of different carbon sources and bioreactor experiments were applied in order to study the ester production at larger scales.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Yeast strains and identification

Twenty-one yeast strains were isolated from red wine stored inside oak wood barrels in wineries in Serra Gaúcha, Brazil, a recognized winemaking region. For yeast identification, the divergent D1/D2 domain of the large subunit of rDNA genes was sequenced using the NL1 and NL4 primers, according Kurtzman and Robnett (1998). The sequences were obtained with the ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) using standard protocols. Identification was achieved using the BLAST algorithm with a 99% identity as the cut-off value.

The yeasts were maintained in solid Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) medium [20 g/L glucose (Oxoid, Hampshire, UK), 10 g/L peptone (Oxoid), 10 g/L yeast extract (Oxoid) and 20 g/L agar (Merck, Darmstadt, Germany)] at 4°C until use.

## **2.2. Yeast screening**

A preliminary screening to evaluate the esters production was performed using a solid phase micro-extraction (SPME) approach. Aliquots of 10 mL of GPYM medium [40 g L<sup>-1</sup> glucose (Oxoid), 5 g L<sup>-1</sup> peptone (Oxoid), 3 g L<sup>-1</sup> yeast extract (Oxoid), 3 g L<sup>-1</sup> malt extract (Oxoid), 1 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Synth, São Paulo, Brazil), and 20 g L<sup>-1</sup> agar (Merck), pH 6.0] were transferred to 20 mL transparent headspace vials (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and tightly capped with septa of polytetrafluoroethylene/silicon (Sigma-Aldrich).

The vials with medium and septa were sterilized (121 °C, 15 minutes). A colony of each yeast strain was inoculated on agar slants and incubated at 28 °C for five days. The vials were then submitted to headspace SPME, gas chromatography and mass spectrometric (GC/MS) procedures for ester analysis (section 2.7). Relative peak areas and their retention times with those of pure standards were used to compare the esters production by different yeast isolates.

## **2.3. Esters production**

Experiments to evaluate the kinetics of ethyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate and ethyl decanoate production were performed using GPYM liquid medium.

The kinetics was conducted in 250 mL conical shake flasks with 50 mL of GPYM broth. The inoculum was prepared by transferring 1 mL of the pre-cultured yeast (24 hours, optical density at 600 nm of 1.0) to the medium. The flasks were maintained at an agitation speed of 150 rev/min and 28 °C. Samples were collected at regular intervals until 48 hours and again at 72 hours.

#### 2.4. RSM experiments

This approach was applied to define the optimal conditions using the same culture medium described. A  $2^2$  full-factorial central composite design (CCD) was employed to generate the polynomial regression model. Temperature ( $X_1$ ) and agitation speed ( $X_2$ ) were chosen as the independent variables, and each one was tested at five levels with six star points and five replicates at the central point. Table 1 displays the real values and coded settings of the independent variables used on CCD. A total of 13 experiments were required for this procedure.

**Table 1:** Real values and coded settings of the independent variables and their different levels used for the central composite design (CCD).

Variables	Codes	Levels				
		$-\alpha$ (-1.41)	-1	0	1	$\alpha$ (1.41)
Temperature (°C)	$X_1$	20	24	28	32	36
Agitation (rev/min)	$X_2$	0	50	100	150	200

The independent variables were coded according to the following regression equation (Eq 1):

$$x_i = \left( \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \right) \quad (1)$$

where  $x_i$  is the coded value and  $X_i$  is the actual value of the  $i$ th independent variable,  $X_0$  is the actual value at centre point and  $\Delta X_i$  is the step change value.

The accumulation of ethyl acetate (mg/L) by the yeast after 36 hours, at this time, the production was maximal, according to previous results in GPYM broth. Because this ester is an important biotechnology bulk molecule, and has an aromatic pleasant fruity note (Saerens et al., 2010), was used as the dependent variable. Table 2 shows the coded settings and the actual values of the independent variables with their combinations and responses.

**Table 2:** Variables used in the CCD trials, showing the treatment combinations and the mean experimental responses for esters production.

Experiments	Temperature (°C) ( $X_1$ )	Stirring speed (rev/min) ( $X_2$ )	Ethyl acetate (mg/L) ( $Y$ )
1	-1	-1	19.56
2	1	-1	16.43
3	-1	1	7.31
4	1	1	6.12
5	0	0	11.72
6	0	0	11.79
7	0	0	11.60
8	0	0	11.58
9	0	0	12.02
10	-1.41	0	1.25
11	0	1.41	0.79
12	1.41	0	0.5
13	0	-1.41	18.98

The design is represented by a second-order polynomial regression model that was used to generate the response surface plots according to Eq. 2:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (2)$$

Where  $Y$  is the response variable;  $X_1$  and  $X_2$  are independent variables for temperature and agitation speed, respectively;  $b_0$  is the intercept term;  $b_1$  and  $b_2$  are the linear coefficients;  $b_{12}$  is the interactive coefficient and  $b_{11}$  and  $b_{22}$  are the quadratic coefficients.

Statistical analysis of the model was performed by the analysis of variance (ANOVA) method of regression and graphical analysis of the data. The significance of the regression coefficients was determined by Student's  $t$ -test; the second order model equation was determined by Fisher's test. The variance explained by the model is given by the multiple coefficient of determination,  $R^2$ . Optimal levels of the variables were determined by analysis of the response surface curves plotted by the data.

## 2.5. Carbon sources

The influence of carbon sources on the accumulation of esters by *Z. bailii* BCV 08 was estimated. The influence of glucose, fructose, the combination of the two sources (1:1) and a complex and natural medium, white grape must were tested using the optimal cultivation conditions for esters production (RSM experiments). The sugar used in the GPYM broth formulation was changed while maintaining the same final concentration (40 g/L). A clarified Chardonnay must [reducing sugars 267.38 g/l, pH 3.12, density 1.104, totally acidity 10.15 g/L expressed in tartaric acid, free SO<sub>2</sub> 15.2 mg/L, total SO<sub>2</sub> 52.5 mg/L, total nitrogen 635 mg/L] was used. All experiments were performed in triplicate.

## 2.6. Bioreactor experiments

The medium used in the bioreactor experiments was the same grape must used, steam-sterilized at 100 °C for 30 min. The inoculum preparation followed the same procedures described for shake flasks, and corresponded to 10% of the total working volume (400 mL). The experiments were performed using a 5.0 L BIOSTAT B Plus bioreactor (Sartorius Stedim Systems GmbH, Melsungen, Germany). The pH was controlled by automatic addition of 0.1 M NaOH or 0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and measured by a pH probe (Hamilton, Reno, USA). Dissolved oxygen concentration was measured using a polarographic O<sub>2</sub> probe (Hamilton, Reno, USA). All experiments were performed in triplicate. The total working volume in the bioreactor was 4 L of liquid grape must.

The culture agitation was done eventually; an agitation speed of 250 rev/min for 30 minutes was applied each 4 hours before taking samples. This procedure was applied to homogenize the culture broth and enhance the oxygen dissolution in the medium. The production of esters was evaluated under two different pH values (3.5 and 5.0), both maintained constant during yeast cultivation.

The production rate of each ester evaluated (ethyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate and ethyl decanoate) was determined as a ratio of ester produced to the yeast biomass accumulated according to a time unit (mg ester/g biomass/h). The ethyl acetate yield was calculated through the ratio of ethyl acetate level to the quantity of reducing sugar intake (mg ester/g reducing sugars consumption).

## 2.7. Analytical procedures

The biomass was measured by centrifugation of 10 mL of the samples for 15 min at 3000 g; the pellets were washed twice with distilled water and dried for 24 hours at 75 °C in a vacuum-oven. The optical density (OD) of the cells was determined using a spectrophotometer (Quimis, Q798U, SP, Brazil) at 600 nm. Reducing sugar concentrations were measured with the DNS method (Miller, 1959) using the 3,5-dinitrosalicylic acid reagent (Sigma-Aldrich).

Esters in preliminary experiments were measured by headspace SPME and gas chromatography (GC). Aliquots of 10 mL of yeast cultures were placed into 20 mL



glass vials and sealed with PTFE/silicon septa. A polydimethylsiloxane/divinylbenzene/carboxen (PDMS/DVB/CAR) fiber with a nonbonded phase of 100  $\mu\text{m}$  was used and was coupled in a manual holder (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The fiber was conditioned according to manufacturer's instructions. The vial was heated at 80  $^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes for esters volatilization. The fiber was then placed in the vial for exposition in the headspace and was maintained for 10 minutes, followed by desorption for 10 minutes in the injection port of a gas chromatograph and splitless mode. All conditions were previously tested and optimized.

Esters were measured by comparing the retention times and mass spectra of identical chromatographic conditions and by co-injection of the samples and authentic standards (Sigma-Aldrich). A Shimadzu GC 2010 chromatograph (Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with a ZBWAX capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm) with polyethylene glycol (Supelco) and a flame ionization detector (FID) (Shimadzu QP 1010 Plus, Tokyo, Japan) was used. Nitrogen (purity 99.99 %, White Martins, São Paulo, Brazil) was used as the carrier gas at 4 mL/min. The temperature of the detector and injector was 250  $^{\circ}\text{C}$ . The oven temperature was programmed to start at 50  $^{\circ}\text{C}$  and was maintained for 1 min. The temperature was increased to 80  $^{\circ}\text{C}$  at 3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and was further increased until 200  $^{\circ}\text{C}$  was reached (20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). The total run time was 17 minutes.

## **2.8. Statistical analysis**

The results of esters production were submitted to one-way ANOVA to test for significant differences among carbon sources. When significance was reached, Tukey's (HSD) post-hoc test (confidence interval of 95%) was performed. The software Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) was used.

## **3. Results and Discussion**

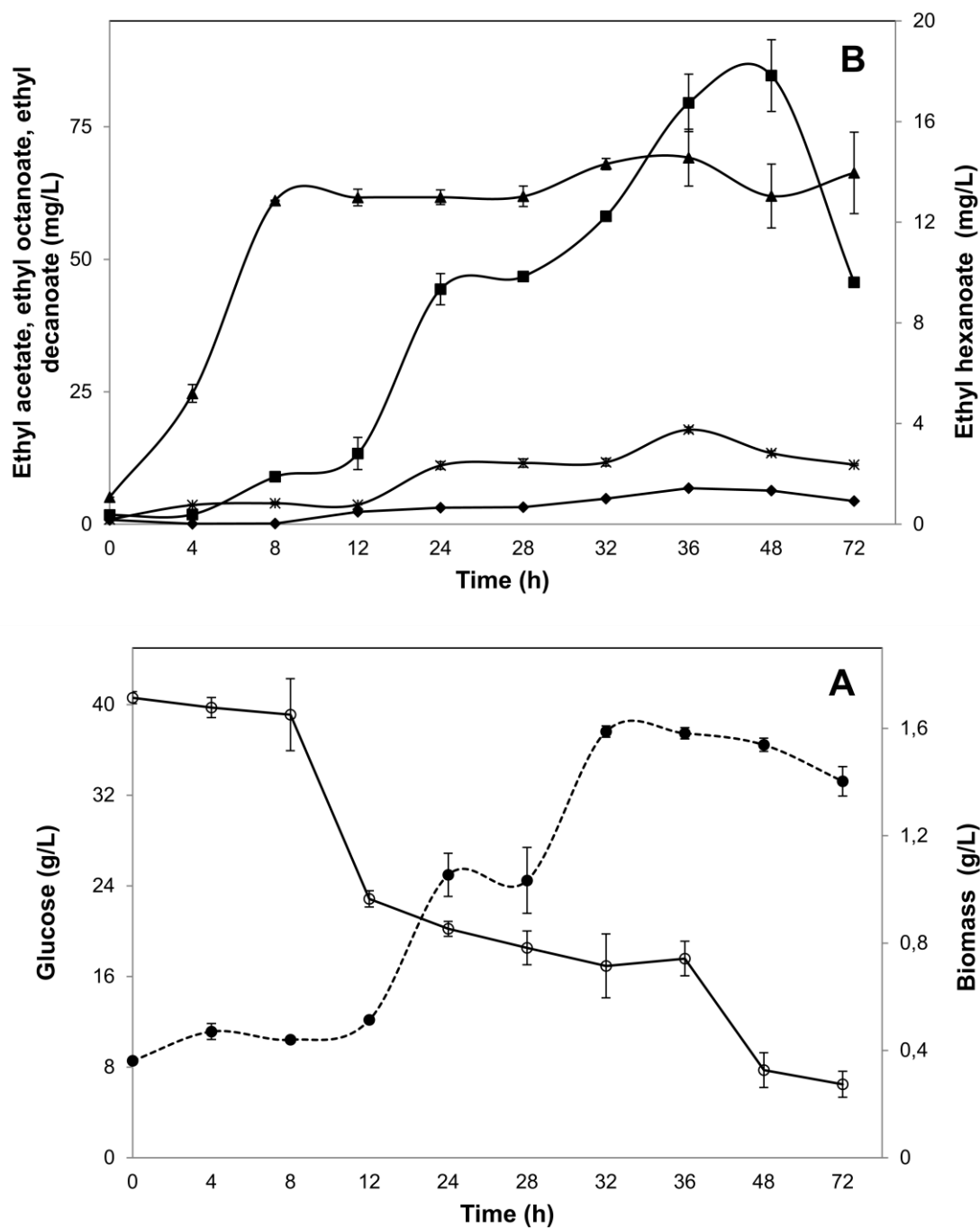
### **3.1. Yeast identification and screening experiments**

The headspace SPME-GC/MS method was applied at 21 yeasts to select that produces higher amounts of esters in GYPM agar slants. Ester production by yeasts associated to Brazilian wine is highly unexplored, although this substrate is anticipated to be a good source of ester-producing yeasts. The strain *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 produced 4.91 mg/L of ethyl acetate, 8.83 mg/L ethyl hexanoate, 17.3 mg/L ethyl decanoate and 76.29 mg/L ethyl octanoate in GYPM agar slants; was selected as a potential target for optimization of ester production at larger scales. This specie is associated to food and beverage microbiota, little is known about its metabolism at different culture conditions or capacity for producing esters (Dang et al., 2010). *Zygosaccharomyces* wine strains can yield of 2-phenyl ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl acetate and ethyl esters (Rojas et al., 2001) through ethanol esterification reaction (Rojas et al., 2003; Plata et al., 2003).

### 3.2. Production of esters

*Z. bailii* BCV 08 produced several esters, including ethyl acetate that is a highly interesting biotechnological compound (Barata et al., 2012, Löser et al., 2013, Park et al., 2009); therefore its production was increased. The production of ethyl hexanoate, ethyl octanoate and ethyl decanoate was evaluated under the optimized conditions for ethyl acetate.

The kinetics of esters production by *Z. bailii* BCV 08 is shown in Figure 1. These tests were performed to investigate the esters production by this yeast, which was related to biomass accumulation, as already reported in the literature (Rojas et al., 2001; Verstrepen et al., 2003; Saerens et al., 2010; Sumbly et al., 2010). Maximal biomass (1.58 g/L) was found after 32 h (late logarithmic growth phase).



**Figure 1:** Growth kinetics and metabolite production by *Z. bailii* BCV 08 in GYPM broth and shake flask (28 °C, 150 rev/min). The error bars indicate the standard deviation for three repeats. A: biomass (filled circles and dotted line), glucose (open circles and straight line). B: esters production; ethyl acetate (filled diamonds), ethyl hexanoate (filled up triangles), ethyl octanoate (filled squares) and ethyl decanoate (asterisks).

At 36 h, the strain entered at stationary growth phase, which corresponded to the maximum ethyl acetate concentration (4.42 mg/L). Previous experiments with *Kluyveromyces marxianus* demonstrated that the maximum production of ethyl acetate was reached after 20 h, when the yeast was in the stationary growth phase (Löser et al., 2013). *S. cerevisiae* can also produce high levels of esters at the early stationary phase after 36 h (Verstrepen et al., 2003).

Similar performance was achieved with ethyl hexanoate, ethyl octanoate and ethyl decanoate. Esters production was higher at 32 to 48 h, when the maximal concentration and biomass accumulation was achieved (Figure 1A). *Z. bailii* BCV 08 was capable to produce 12.08 mg/L of ethyl hexanoate, 84.68 mg/L ethyl octanoate and 17.84 mg/L ethyl decanoate (Figure 1B). Ethyl acetate yield ranged from 0.13 mg/g to 0.19 mg/g, whereas, maximal yield of ethyl hexanoate was 0.51 mg/g, ethyl octanoate was 3.45 mg/g and 0.78 mg/g ethyl decanoate found. In static cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora osmophilica* a production of about 0.6 mg/L ethyl octanoate and 0.3 mg/L of ethyl decanoate (Viana et al., 2009). During brewing fermentation, a *S. cerevisiae* strain was capable produce 0.57 mg/L ethyl octanoate, 0.276 mg/L ethyl hexanoate and 4.97 mg/L of ethyl decanoate (Hiralal et al., 2014).

In screening studies, *S. cerevisiae* was the best producer of ethyl octanoate and hexanoate compared to non-*Saccharomyces* yeasts (*Pichia anomala* and *Hanseniaspora guilliermondii*), yielding 0.45 mg/L and 0.5 mg/L of each ester, respectively (Rojas et al., 2003). These levels are clearly lower than those found in cultures with *Z. bailii* BCV 08 (Figure 1B).

A higher sugar consumption rate was reached when the esters and biomass accumulation was maximal. This behavior is similar to other non-*Saccharomyces* strains from wine (Rojas et al., 2003), *Kluyveromyces marxianus* (Urit et al., 2012), *Pichia pastoris* (Brunel et al., 2004) and *Candida* species (Neugnot et al., 2002). After 72 h, the strains consume 34.12 g/L of sugar, with a residual concentration of 6.48 g/L in the medium (Figure 1A).

### 3.3. Effect of culture conditions

In order to maximize the esters production by the yeast *Z. bailii* BCV 08, we used the RSM to analyze the effect of temperature and agitation on shake flasks experiments. These results are given in Table 2. Analysis of variance (*F*-test) showed that the second order model was well adjusted. The computed *F*-value (4.88) was higher than the *F*-value in the statistical table, indicating that the model was significant at a high confidence level (95%). The  $R^2$  value for the model was 0.91, indicating that 91% of the total variation was explained by the model. The significance of the coefficients was directly proportional to Student's *t*-test values and inversely proportional to the *P*-values. This suggests a satisfactory representation of the process model and a good correlation between the experimental and predicted values.

Table 3 shows the coefficients estimated by the model. We therefore propose the following second-order polynomial equation, Eq. 3:

$$Y = 12.79972 - 9.82194 X_2 - 0.79832 X_2^2 \quad (3)$$

Where *Y* is the predicted response;  $X_1$  and  $X_2$  are the coded values. The model, was suitable to describe the response of esters by *Z. bailii* BCV 08. Figure 2 shows the response surface curves generated from the predicted model presented in Eq. 2.

The coefficients, main effects and *P*-values are shown in Table 3. The quadratic effect of temperature was significant ( $X_1^2$ ,  $P = 0.01563$ ), indicating that even small variations will affect the production of esters. Temperature has been shown to be extremely important for the accumulation of esters (Saerens et al., 2008). The first order main effect of stirring speed was also highly significant ( $X_2$ ,  $P = 0.000277$ ).

The ethyl acetate production ranged from 0.5 to 19.56 mg/L. Table 2 presents the experimental design and the levels of ethyl acetate obtained. The highest productions of ethyl acetate (18.98 and 19.56 mg/L) were obtained at mild temperatures (24 °C and 28 °C, respectively), while the lowest production of ester was obtained at a high temperature (36°C). This indicates a strong negative influence of temperature on the production of ethyl acetate; moreover, this effect was verified to the other esters

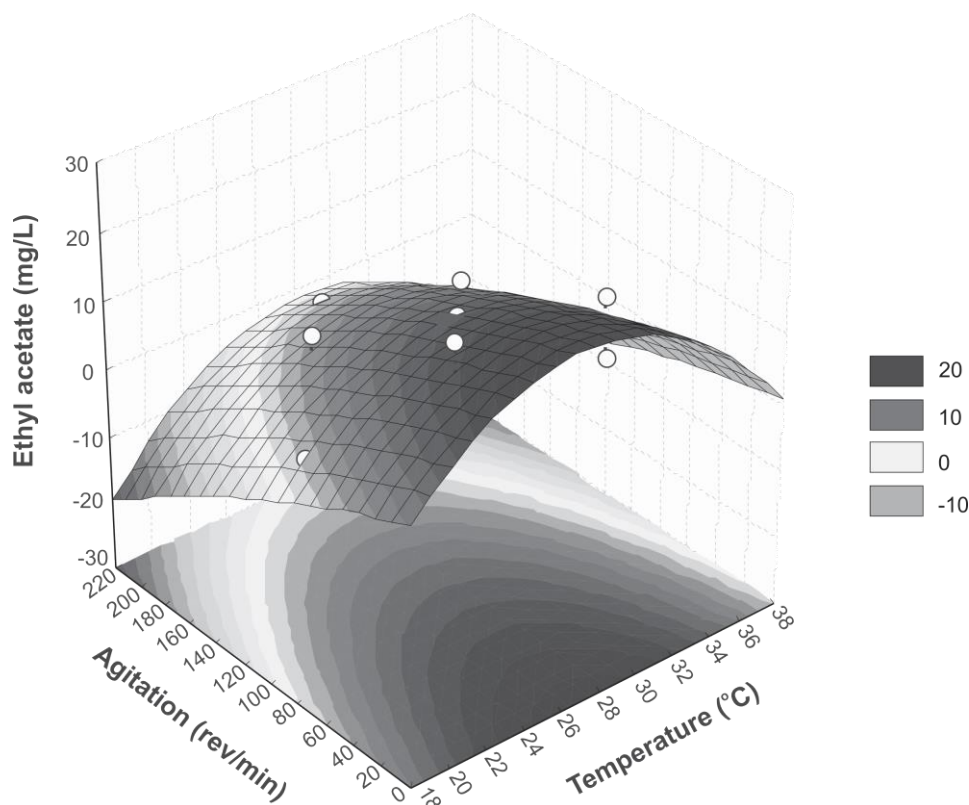
tested. In fact, higher concentrations of esters in wine were obtained at lower temperatures of fermentation (Molina et al., 2007).

**Table 3:** Coefficients estimated by the regression model.

Independent variables	Coefficients ( <i>b</i> )	Standard error	<i>P</i> value
Interaction	12.79972	0.31	0.000006
$X_1$	-0.96842	0.21	0.529889
$X_1^2$ *	-0.530429	0.16	0.001563*
$X_2$ *	-9.82194	0.22	0.000277*
$X_2^2$	-0.79832	0.16	0.476170
$X_1.X_2$	0.97059	0.36	0.713537

\* Statistically significant at the 95 % confidence level

The response surface curve of temperature and agitation speed by CCD is shown in Figure 2. The optimal value of ethyl acetate accumulation was reached when the temperature was maintained at the central point, 28 °C. Esters production levels are known to increase with increasing temperatures between 20 and 26 °C (Saerens et al., 2008). *Z. bailii* strains have an optimal growth temperature at approximately 30 °C (Dang et al., 2010), favoring esters production at around 28 °C.



**Figure 2:** Response surface curve plot of ethyl acetate production as a function of temperature and agitation by RSM experiments.

The stirring speed was evaluated because when the broth is stirred, aeration is generated in the medium, favoring biomass accumulation and esters production by some yeasts. In this study, the optimal accumulation of ethyl acetate was reached when the agitation was maintained at 0 rev/min (Figure 2), with a significant first order main effect ( $P$ -test) (Table 3).

Although few studies were done to evaluate the metabolism of esters in non-*Saccharomyces* strains, in *S. cerevisiae* they are mainly synthesized and excreted under anaerobic fermentation conditions (Malcorps and Dufour, 1992). Broth oxygenation during *S. cerevisiae* growth was reported to have a significant negative effect on ester formation that was caused by a decreased expression of the alcohol acetyltransferase gene ATF1 (Verbelen et al., 2009). Oxygen was found to inhibit the activity of alcohol acetyltransferase and ester synthase enzymes, thereby lowering the levels of esters produced by *S. cerevisiae* (Plata et al., 2005). Conversely, semi-anaerobic conditions

favor the esters production by non-*Saccharomyces* wine yeasts (Plata et al., 2003). According to the current study, a similar behavior was verified; the production of esters in static and non-aerated cultures was visibly improved.

To validate the statistical model, the production of ethyl acetate was measured at 28 °C and with no flasks agitation (0 rev/min), the optimal conditions indicated by the model. Thus, the coded values of  $X_1 = 0$  and  $X_2 = -1.41$  (Table 1) were used to calculate the response of the polynomial Eq. 2. The predictive production for the statistical model was 28.63 mg/L. Experimentally, 28.26 mg/L was achieved in these conditions, and demonstrates the fitness of the model. When we compared this result to the maximal level of ethyl acetate obtained by non-optimal culture conditions (4.42 mg/L), an increase of about six times was observed. The experimental production of ethyl acetate can be explained by the model proposed and that the conditions tested were optimized, indicating the maximal range of ester accumulation in the medium. Similar kinetics was observed for the production of ethyl hexanoate, ethyl octanoate and ethyl decanoate by *Z. bailii* BCV 08.

### 3.4. Influence of carbon sources

*Z. bailii* metabolizes fructose more easily than glucose (Dang et al., 2010). This effect is due to the kinetics of the transporters favoring the uptake of fructose and a partial inhibition of the glucose transporter by fructose (Leyva et al., 1999; James and Stratford, 2011). The fermentation metabolism is increased in the presence of fructose (Berthels et al., 2004), which most likely enhances esters production.

The glucose and fructose mixture (1:1) proved to be the most effective (Table 4). Esters have been reported to be more intense when fructose and glucose are available (Tronchoni et al., 2009). Moreover, we demonstrated that biomass production also increased when a mixture of glucose and fructose is available (Table 4). Esters production was further increased during grape must fermentation and under agitation of 0 rev/min and 28 °C conditions (Table 4). A total of 72.93 mg/L of ethyl acetate, 9.35 mg/L ethyl hexanoate, 271.72 mg/L ethyl octanoate and 132.99 mg/L ethyl decanoate was reached; this represents about 5, 1, 2 and 5 times more esters produced compared to the GYPM medium.



**Table 4:** Esters production (mg/L) by *Z. bailii* BCV 08 with different carbon sources after optimization (28 °C, 0 rev/min). Values with the same letters were not significantly different according to Tukey's test (95 %).

Carbon source	Biomass (g/L)	Ratio C/N	Ethyl acetate	Ethyl hexanoate	Ethyl octanoate	Ethyl decanoate
Glucose	6.93 <sup>ab</sup>	5:1	28.26 <sup>d</sup>	9.35 <sup>c</sup>	271,72 <sup>c</sup>	25,67 <sup>d</sup>
Fructose	7.0 <sup>a</sup>	5:1	48.25 <sup>c</sup>	10.45 <sup>b</sup>	290,31 <sup>c</sup>	58.76 <sup>c</sup>
Glucose and fructose	6.98 <sup>a</sup>	5:1	64.43 <sup>b</sup>	12.45 <sup>ab</sup>	347,97 <sup>b</sup>	107.21 <sup>b</sup>
Grape must	6.75 <sup>b</sup>	40:1	72.93 <sup>a</sup>	12.82 <sup>a</sup>	646,42 <sup>a</sup>	132.99 <sup>a</sup>

Grape must is a complex medium with a high sugar and nitrogen content and contains equal amounts of fructose and glucose (Tronchoni et al., 2009). Therefore, fermentation metabolism and accumulation of esters were favored in this medium. The production of esters by yeasts is related to increase of intracellular acetyl-CoA in the logarithmic growth phase during fermentation (Leyva et al., 1999; Plata et al., 2005). Then, the presence of fructose can increase the fermentation by *Z. bailii* BCV 08 and, consequently, esters accumulation.

The carbon to nitrogen (C/N) ratio of the medium is an important parameter for ester production (Saerens et al., 2008; Verstrepen et al., 2003). The grape must used had a high reducing sugars value, with a calculated C/N ratio of nearly 40:1 opposed to the 5:1 C/N ratio of GYPM broth (Table 4). This higher C/N ratio led to increase esters production by the yeast *Z. bailii* BCV 08.

This strain could be used as starter in a wine fermentation process at semi-anaerobic conditions, because it yields esters using grape must as medium, favoring the aromatic complexity of wine.

### 3.6. Bioreactor batch cultures

The bioreactor trials were performed without oxygenation, based on the previous results. Dissolved oxygen was kept at less than 1 mg/L throughout the experiments. Many variables are known to affect esters production, including pH (Saerens et al., 2008); therefore we evaluated this effect ester bioconversion by *Z. bailii* BCV 08.

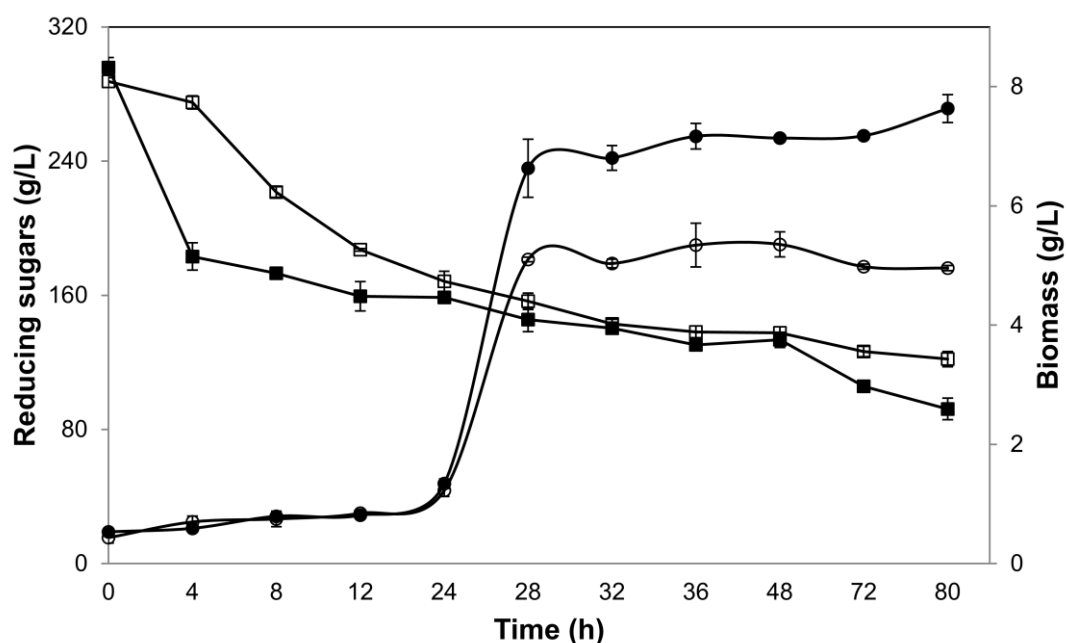
Table 5 shows the parameters of yeast growth in bioreactors under pH 3.5 and pH 5.0. Comparing the conditions, the yield of bioconversion of all esters was superior at pH 3.5, as well as the maximum concentration of each ester (Table 5). Final biomass accumulation, growth yield, sugar intake and ethanol production were higher at pH 3.5 than pH 5.0.

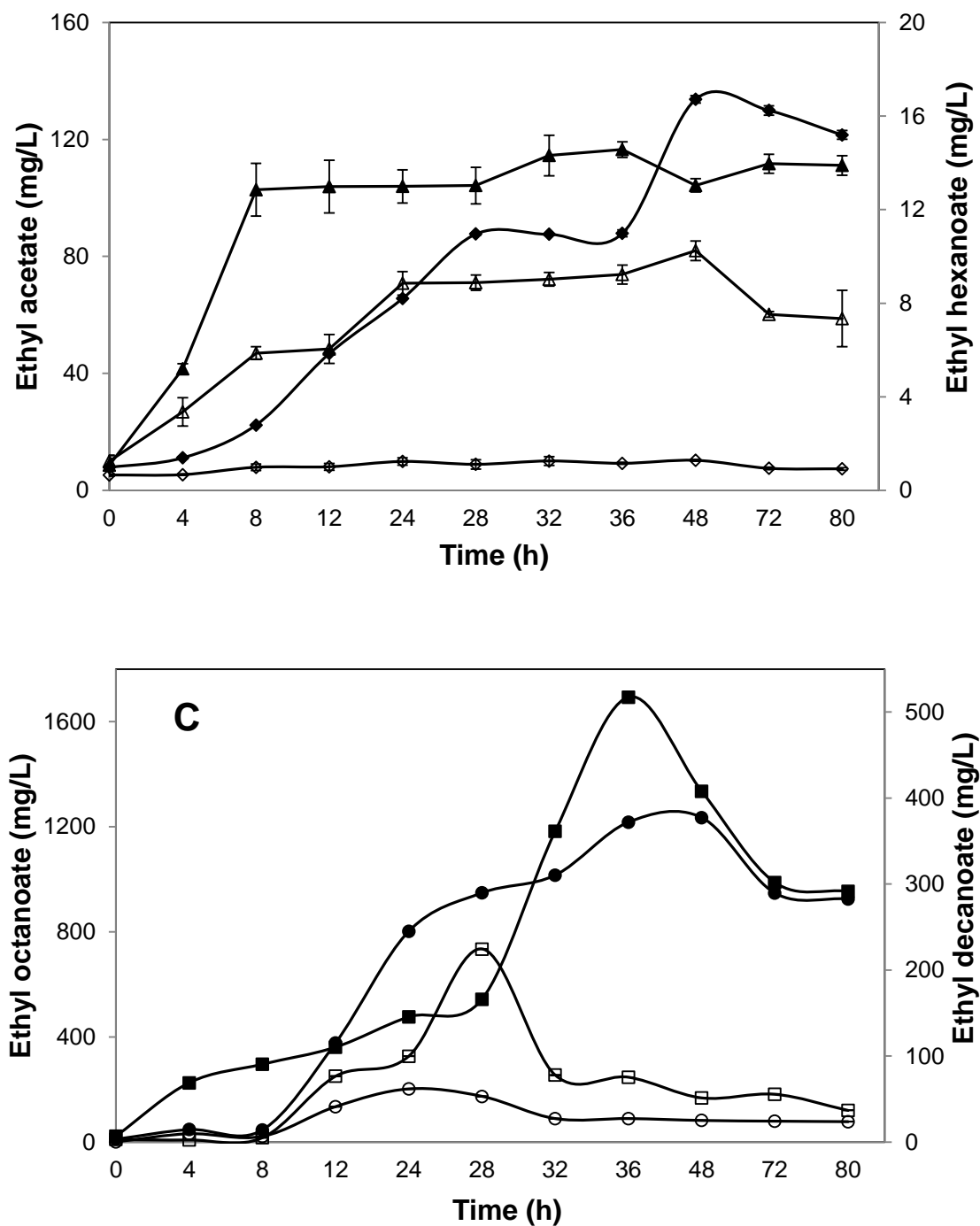
**Table 5:** Metabolism of *Z. bailii* BCV 08 during cultivation in bioreactor using grape must at pH 3.5 and 5.0, temperature of 28 °C.

Parameter	pH 3.5	pH 5.0
Initial biomass concentration (g/L)	0.53	0.44
Final biomass concentration (g/L)	7.63	5.34
Growth yield, $Y_{X/S}$ (g/g)	0.086	0.036
Sugar consumption (g/h)	1.52	1.15
Maximum ethanol production (% vol/vol)	3.51	3.17
Maximum ethyl acetate production (mg/L)	133.74	49.16
Maximum ethyl hexanoate production (mg/L)	14.57	10.24
Maximum ethyl octanoate production (mg/L)	1693.86	734.6
Maximum ethyl decanoate production (mg/L)	377.25	201.98
Yield of ethyl acetate, $Y_{P/S}$ (mg/g)	0.70	0.34
Yield of ethyl hexanoate, $Y_{P/S}$ (mg/g)	0.09	0.07
Yield of ethyl octanoate, $Y_{P/S}$ (mg/g)	12.98	4.69
Yield of ethyl decanoate, $Y_{P/S}$ (mg/g)	2.33	1.70

The yeast growth and ester production in the bioreactor can be seen in Figure 3. The yeast had a phase of high consumption of sugars up to 10 hours, and entered at logarithmic phase of growth just afterwards. As soon as the yeast achieved the stationary phase, the uptake of sugars remained constant until the end of cultivation (80 hours), with a final consumption of 203.45 g/L of reducing sugars at pH 3.5 and 165.5 g/L at pH 5.0 (Figure 3A). The maximum biomass accumulation (7.68 g/L) was observed at 72 hours at pH 3.5, and 48 hours at pH 5.0 (5.35 g/L) (Figure 3A).

The production of the esters at pH 3.5 and biomass accumulation in the medium (Figures 3A, 3B, 3C) seemed to correlate with the peak of sugars consumption. The biochemical pathways for acetate esters formation are different from the ethyl esters (Saerens et al., 2008). The tendencies for esters production at pH 5.0 were not clear, but ethyl acetate accumulation seemed to be biomass-independent, and the others seemed to be biomass-dependent (Figures 3A, 3B, 3C).





**Figure 3:** Kinetic of esters production by *Z. bailii* BCV 08 in bioreactor cultures under different pH values, pH 3.5 (closed symbols) and pH 5.0 (open symbols). The error bars indicate the standard deviation for three repeats. A: biomass (circles) and reducing sugars (squares). B: ethyl acetate (diamonds), ethyl hexanoate (up triangles). C: ethyl octanoate (squares), ethyl decanoate (circles).

Maximum yield of ethyl acetate was 0.70 mg/g and the maximum production was 133.74 mg/L (Table 5). These values were reached after 48 hours and, compared with pH 5.0, the yield was increased around 50%; and the ethyl acetate production was enhanced around 60% at pH 3.5. Therefore, the pH proved to be a significant parameter for improvement of esters production by *Z. bailii* BCV 08. Variation in the activity of the enzyme alcohol acetyltransferase with pH has already been reported and may be the cause for the differential ester production, although during the brewing process the production of esters was related with a pH increase (Hiralal et al., 2014). *Z. bailii* BCV 08 was isolated from Brazilian red wine, that presents typical pH ranges from 2.8 to 3.6 (Miele et al. 2010), may explain its adaptation to low pH values.

*S. cerevisiae* produced 0.6 mg/L ethyl octanoate and 0.3 mg/L ethyl decanoate in grape must without agitation (Viana et al., 2009). Under slightly aerobic cultures, the strain *S. cerevisiae* T<sub>73</sub> produced 0.22 mg/L ethyl octanoate and 0.77 mg/L ethyl decanoate (Rojas et al. 2001). In summary, *Z. bailii* BCV 08 produced high amounts of esters at pH 3.5 and no oxygenation. These amounts are much higher than the ones reported in the literature for *S. cerevisiae* and other non-*Saccharomyces* yeasts.

#### **4. Conclusions**

Grape must, which is a cheap agricultural product, was demonstrated to be an excellent natural medium for the production of esters. The production was optimized by means of central composite design and response surface methodology, optimizing the esters production by the yeast screened. The stirring speed, temperature and carbon sources were important factors for increasing the production of esters. Esters production was further increased in bioreactor experiments, principally at pH of 3.5, which was maintained constant during batch culture.

*Z. bailii* BCV 08 can be applied in an industrial beverage fermentation procedure to produce esters; moreover, this yeast strain could be used for grape must fermentation in mixed cultures with *S. cerevisiae* to enhance the flavor complexity of wine.

#### **5. Acknowledgements**

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - UFRGS (PPGBCM-UFRGS) for financial support.

## 6. References

Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153, 243-259.

Barnett J.A., 2000. *Yeasts, Characteristics and Identification*, fourth ed. University Press, Cambridge.

Berthels N.J., Cordero O.R.R., Bauer F.F., Thevelein J.M., Pretorius I.S., 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research* 4, 683-689.

Dang T.D.T., Mertens L., Vermeulen A., Geeraerd A.H., Van I.J.F., Debevere J., Devlieghere F., 2010. Modelling the growth/no growth boundary of *Zygosaccharomyces bailii* in acidic conditions: a contribution to the alternative method to preserve foods without using chemical preservatives. *International Journal of Food Microbiology* 137, 1-12.

Hiralal L., Olaniran A.O., Pillay B., 2014. Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117, 57-64.

James S.A., Stratford M., 2011. *Zygosaccharomyces* Barker (1901). In: Kurtzman, C.P., Fell J.W., Boekhout T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Elsevier, Philadelphia, pp. 937-948.

Kurtzman C.P., Robnett C.J., 1998. Three new insect-associated species of the yeast genus *Candida*. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 965-973.

Leandro M.J., Sychrová H., Prista C., Loureiro-Dias M.C., 2011. The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasma-membrane fructose

uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. *Microbiology* 157, 601-608.

Leyva J.S., Manrique M., Prats L., Loureiro-Dias M.C., Peinado J.M., 1999. Regulation of fermentative CO<sub>2</sub> production by the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Enzyme Microbial Technology* 24, 270-275.

Lilly M., Bauer F.F., Lambrechts M.G., Swiegers J.H., Cozzolino D., Pretorius I.S., 2006. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* 23, 641-659.

Löser C., Urit T., Stukert A., Bley T., 2013. Formation of ethyl acetate from whey by *Kluyveromyces marxianus* on a pilot scale. *Journal of Biotechnology* 163, 17-23.

Malcorps P., Dufour J.P., 1992. Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 210, 1015-1022.

Mateos J.A.R., Preze-Nevado F., Fernández M.R., 2006. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 151-157.

Mauriello G., Capece A., D'Auria M., Garde-Cerdán T., Romano, P., 2009. SPME-GC Method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiology* 26, 246-252.

Miele A., Rizzon L.A., Zanus M.C., 2010. Discrimination of Brazilian red wines according to the viticultural region, varietal, and winery origin. *Food Science and Technology* 30, 268-275.

Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 3, 426- 427.

Molina A.M., Swiegers J.H., Varela C., Pretorius I.S., Agosin E., 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 675-87.

Neugnot V., Moulin G., Dubreucq E., Bigey F., 2002. The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *European Journal of Biochemistry* 269, 1734-1745.

Park Y.C., Shaffer C.E.H., Bennett G.N., 2009. Microbial formation of esters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 13-25.

Plata C., Mauricio J.C., Ortega J.M., Mill C., 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology* 20, 217-224.

Plata C., Mauricio J.C., Millán C., Ortega J.M., 2005. Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate and isoamyl acetate by a *Saccharomyces cerevisiae* strain during alcoholic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 115-121.

Rodriguez F., Zeeman A.M., Cardoso H., Souza M.J., Steensama H.Y., Corte-Real M., Leão C., 2004. Isolation of an acetyl-CoA synthetase gene (ZbACS2) from *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast* 21, 325-331.

Rojas V., Gil J.V., Piñaga F., Manzanares P., 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 70, 283-289.

Rojas V., Gil J.V., Piñaga F., Manzanares P., 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 86, 181-188.

Saerens S.M.G., Delvaux F., Verstrepen K.J., Van Dijck P., Thevelein J.M., Delvaux F.R., 2008. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 454-461.

Saerens, S.M.G., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M., 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology* 3, 165-177.

Sumby K.M., Grbin P.R., Jiranek V., 2010. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chemistry* 121, 1-16.



Tronchoni J., Gamero A., Arroyo-López F.N., Barrio E., Querol A., 2009. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 134, 237-243.

Urit T., Stukert A., Bley T., Löser C., 2012. Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey during aerobic batch cultivation at specific trace element limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96, 1313-1323.

Verbelen P.J., Saerens S.M.G., Van Mulders S.E., Delvaux F.R., 2009. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 1143-1156.

Verstrepen K.J., Laere S.D.M.V., Vanderhaegen B.M.P., Derdelinckx G., Dufour J., Pretorius I.S., Winderickx J., Thevelein J.M., Delvaux F.R., 2003. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 5228-5237.

Viana F., Gil J.V., Genovés S., Vallés S., Manzanares P., 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25, 778-785.

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*. *International Journal of Food Microbiology* 135, 68-74.

Wrent P., Rivas E.M., Peinado J.M., Silóniz M.I., 2010. Strain typing of *Zygosaccharomyces* yeast species using a single molecular method based on polymorphism of the intergenic spacer region (IGS). *International Journal of Food Microbiology* 142, 89-96.

## 8. Discussão

A produção de ésteres por micro-organismos vem sendo cada vez mais desenvolvida, isso porque estes compostos podem ser utilizados em distintas aplicações industriais. Existem dois grupos principais de ésteres que despertam interesse industrial: os acetil ésteres e os etil ésteres (Sumby et al., 2010). Mas, os acetil ésteres têm recebido maior atenção no passado, não somente porque são mais importantes, mas porque são produzidos em maiores quantidades e são facilmente mensuráveis (Saerens et al., 2010).

Inúmeros micro-organismos são capazes de produzir ésteres durante seu crescimento em distintos meios de cultura e partir de várias fontes de carbono (Park et al., 2009). Além disso, ésteres produzidos por via biotecnológica são classificados como naturais, uma vantagem, principalmente para sua utilização com insumo na indústria de alimentos. Neste contexto, micro-organismos não patogênicos possuem maior aplicabilidade, principalmente se forem considerados GRAS (*generally recognized as safe*). Principalmente leveduras são cultivadas, isto porque produzem ésteres durante seu metabolismo fermentativo, se desenvolvem rapidamente e produzem inúmeros compostos.

Ésteres ativos são formados intracelularmente nas células de leveduras em processo fermentativo, e como são lipossolúveis, difundem-se através da membrana plasmática, acumulando-se no meio de cultura (Saerens et al., 2010). Ao contrário da difusão de acetil ésteres, que é rápida e completa, a transferência de etil ésteres para o meio de fermentação é dependente de sua composição (Verstrepen et al., 2003).

A produção de acetil ésteres é mais explorada e possui maiores aplicações como componentes isolados ou na composição aromática de bebidas e alimentos obtidos por fermentação. Neste contexto, o acetato de etila é um dos ésteres bastante produzido por distintas leveduras e seu acúmulo no meio é bastante facilitado, bem como, possui grande aplicação. O acetato de etila possui um aroma descrito como frutado (Saerens et al., 2010; Rojas et al., 2003; Verstrepen et al., 2003) e pode ser encontrado em vinhos (Saerens et al., 2010; Sumby et al., 2010; Welke et al., 2012), cervejas (Verstrepen et

al., 2003; Hiralal et al., 2013), cidra (Roza et al., 2003) e outras bebidas alcoólicas (Lilly et al., 2006).

Principalmente leveduras isoladas de vinhos possuem capacidade de acumular ésteres durante o processo fermentativo (Barata et al., 2012). Além de possuírem a capacidade de produzir ésteres, leveduras possuem vantagem por terem um metabolismo fácil de controlar e desenvolvem uma fermentação mais homogênea. Inúmeros estudos assinalam a influência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de subprodutos da fermentação, mas cepas chamadas de não-*Saccharomyces* e de origem enológica (*Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schzosaccharomyces*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces*) produzem altas concentrações de ésteres durante a fermentação (Rojas et al., 2001).

Leveduras enológicas possuem a capacidade de produzir alta quantidade de ésteres, incluindo acetato de etila (Löser et al., 2013). A produção de acetato de etila, bem como outros ésteres, é bastante dependente da cepa de levedura utilizada na bioconversão (Urit et al., 2012). Desta forma, estudos de *screening* de cepas de leveduras produtoras de ésteres podem representar uma estratégia para seleção de uma levedura boa produtora de ésteres e com alto rendimento a partir de substratos simples. O *screening* desenvolvido foi realizado com número reduzido de cepas (34), sendo estas isoladas a partir de vinhos tintos elaborados na região da Serra Gaúcha (RS), que estavam em barris de carvalho, e de queijos artesanais produzidos na região litorânea do Rio Grande do Sul (Landell et al., 2006).

A preponderância de cepas selecionadas como boas produtoras de ésteres e identificadas (sequenciamento do domínio D1/D2 do rDNA) em vinhos foi de leveduras *Zygosaccharomyces bailii* e, em queijos, *Candida parapsilosis*. Ambos gêneros já foram descritos anteriormente como produtores de ésteres (Rojas et al., 2001; Saerens et al., 2010; Sumbly et al., 2010; Park et al., 2009). Leveduras *Zygosaccharomyces* podem produzir inúmeros ésteres, tais como, acetato de etila, octanoato e decanoato de etila, bem como butirato de etila, acetato de isoamila e acetato de feniletila (Dang et al., 2010; Löser et al., 2013; Wrent et al., 2010, Rojas et al., 2001; Plata et al., 2005). Além disso, leveduras *Candida* possuem a capacidade de produzir ésteres, utilizando a enzima álcool acetiltransferase, as quais foram identificadas em *C.parapsilosis* (Neugnot et al., 2002) e *C. albicans* (Roustan et al., 2005).

Com os experimentos de seleção, a cepa que mais acumulou ésteres foi a cepa *Z. bailii* BCV 08, que produziu quantidades variadas dos ésteres avaliados (acetato de etila, acetato de feniletila, octanoato de etila e decanoato de etila). Estes ésteres foram gerados durante seu crescimento em meio rico em glicose e nitrogênio, e durante o processo de fermentação e consumo de açúcares do meio. Nos estudos de seleção, como os ésteres possuem volatilidade elevada, a amostragem e a técnica de preparo das amostras devem diminuir as possíveis perdas geradas. Neste caso, inúmeras técnicas podem ser aplicadas, mas a microextração em fase sólida (SPME) possui inúmeras vantagens na determinação de ésteres.

A SPME é uma técnica de simples aplicação, pode ser automatizada, não utiliza solventes tóxicos, não gera descarte da amostra, além de ser barata (Plutowska e Wardencki, 2008). As fibras de SPME utilizadas dependem do material a ser analisado, pois, em grande parte, a sorção total dos voláteis, seja no método de *headspace* ou *in situ*, está relacionada com o material de revestimento da fibra (Stoppacher et al., 2010). Desta forma, é de extrema importância a realização de testes iniciais para a definição do melhor material de revestimento da fibra de SPME. Para ésteres, fibras com até três camadas demonstram melhores resultados na adsorção utilizando o *headspace* (Mauriello et al., 2009).

Após extração, os ésteres devem ser identificados, sendo que métodos de cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massas (GC/MS) são usualmente empregados (Majcher e Jelén, 2009). Além disso, para uma correta quantificação dos ésteres, métodos de GC e com detecção usado detector de ionização de chama (FID) podem ser aplicados.

O uso de métodos de SPME e GG/MS ou GC/FID acoplados são bastante utilizados para determinação de ésteres (Stoppacher et al., 2010; Mauriello et al. 2009; Antalick et al. 2008). Poucos estudos utilizam estas metodologias propostas para quantificação de ésteres, principalmente, com a utilização do *headspace* em meio sólido para a produção de ésteres. Como ferramenta de análise de ésteres e para *screening* das leveduras selecionadas, foi desenvolvido e validado um método de avaliação da produção de acetil ésteres e etila utilizando SPME, GC/MS e GC/FID, sendo que as leveduras foram semeadas diretamente nos frascos de extração, na superfície do ágar inclinado.

Desta forma, os ésteres produzidos foram concentrados no *headspace* e depois volatilizados (aquecimento a 80 °C por 20 minutos) para adsorção na fibra de SPME (10 minutos). As melhores condições de extração dos ésteres foram as seguintes: fibra de SPME de PDMS/DVB/CAR, temperatura de 80 °C para volatilização, 20 minutos de aquecimento da amostra, adsorção por 10 minutos, 10 mL de meio nos frascos de extração. Após, a fibra foi inserida diretamente no equipamento de GC e foi feita dessorção dos ésteres adsorvidos na fibra no bico de injeção do GC (10 minutos).

Com o método desenvolvido, foi possível quantificar os ésteres produzidos por cada cepa de levedura testada. Além disso, as perdas por evaporação foram diminuídas, sendo que a extração foi realizada diretamente no frasco de extração; a extração foi realizada de maneira facilitada, visto que em apenas um passo (*step*) foi realizado durante o processo. Este método pode ser facilmente aplicado, pois é rápido e fácil de ser realizado. O método desenvolvido também pode facilitar a seleção de novas cepas para a produção de ésteres, facilitando o desenvolvimento de um processo industrial de bioconversão a partir de glicose ou outro substrato.

O uso de SPME para extração de compostos voláteis, incluindo ésteres, é um método adequado e de fácil aplicação, pois pode diferenciar as potencialidades de inúmeras leveduras (Mauriello et al., 2009). A combinação de SPME e GC/MS ou GC/FID pode ser utilizada para a determinação de etil ésteres, com alta precisão e simples preparação da amostra, sendo um método para rotina de análise em laboratórios de pesquisa ou em indústrias (Plutowska e Wardencki, 2008). O método de *headspace*-SPME e GC/MS pode ser utilizado para extrair e identificar vários componentes voláteis produzidos por fungos, incluindo ésteres (Stoppacher et al., 2010).

Sendo assim, a SPME pode ser uma boa ferramenta de preparação de amostras para a determinação de ésteres e assim, pode ser utilizada no *screening* de cepas de leveduras produtoras, bem como, na determinação da produção de acetil ésteres e etila. O uso do SPME, além de facilitar os experimentos de seleção de cepas produtoras, foi utilizado na extração dos ésteres produzidos e por isso, foi utilizada na otimização da produção de acetato de etila pela cepa *Z. bailii* BCV 08 (Capítulo I).

A otimização das condições de cultivo pode levar a um aumento na produção de ésteres. A otimização refere-se a um aumento na performance de um sistema, um

processo ou produto, obtendo-se o máximo benefício do mesmo (Bezerra et al., 2008). O termo otimização é comumente aplicado quando se busca a melhor resposta possível do processo a ser desenvolvido (Bezerra et al., 2008), neste caso, a produção de acetato de etila. Com a metodologia de superfície e resposta foi possível otimizar a produção de acetato de etila, pois comparando os resultados obtidos nas condições otimizadas, houve um aumento de 60% na quantidade de acetato de etila produzida pela levedura *Z. bailii* BCV 08.

Foram otimizadas as condições de aeração do cultivo e sua temperatura. Ambas variáveis foram avaliadas porque fortemente influenciam a produção de ésteres por leveduras. Com relação aos ésteres produzidos, como o acetato de etila possui aplicação industrial bastante importante, além de um mercado consumidor já desenvolvido e amplamente explorado, o mesmo foi selecionado como resposta para os experimentos de otimização com a levedura *Z. bailii* BCV 08.

O acetato de etila é produzido por várias leveduras durante seu metabolismo fermentativo, porém, poucos estudos foram conduzidos com cepas de *Z. bailii*. Anualmente, são produzidos em torno de 1,5 mil toneladas de acetato de etila e seu preço é 30% maior que o de etanol (Urit et al., 2012). Além disso, a levedura *Z. bailii* BCV 08 produziu acetato de etila em maior quantidade que as outras cepas testadas e de forma bastante rápida, entre 24 a 36 horas de cultivo (Capítulo II). Esta levedura pode produzir outros ésteres, sendo que foram testados, além de acetato de etila, a produção de acetato de feniletila, octanoato de etila e decanoato de etila.

Os outros ésteres testados são muito utilizados como componente de aroma, em formulações de distintos alimentos, perfumes e cosméticos. De acordo com Saerens et al. (2010), o acetato de feniletila possui aroma de rosas e mel, e o octanoato e decanoato de etila possuem aroma de maçã e frutado. Por suas características voláteis, estes compostos são amplamente utilizados como moléculas flavorizantes, principalmente na indústria de alimentos, de perfumes e cosméticos (Park et al., 2009).

Além disso, a busca por produtos naturais e com baixa utilização de insumos produzidos por via química favorece o desenvolvimento de vias biotecnológicas para obtenção de ésteres e outras moléculas. De acordo com U.S. Food and Drug

Administration (FDA), ésteres podem ser utilizados em alimentos, são GRAS e considerados naturais quando produzidos por via biotecnológica.

Poucos estudos tem sido implementados para a otimização da produção de acetato de etila por leveduras. Através do uso da metodologia de superfície e resposta e análise das curvas de contorno, foi possível definir as condições ótimas de aeração e temperatura para a produção de ésteres pela levedura *Z. bailii* BCV08, ou seja, 0 rpm e 28 °C, respectivamente. Condições de anaerobiose podem facilitar a produção de ésteres por leveduras de origem enológica (Plata et al., 2003). O oxigênio pode diminuir a atividade da enzima éster sintase, principal enzima utilizada para a formação de acetato de etila (Plata et al., 2005). Temperaturas mais baixas, próximas a 25 °C, favorecem a produção de ésteres, inclusive, acetato de etila (Verstrepen et al., 2003).

As fontes de carbono podem interferir diretamente na produção de acetato de etila e outros ésteres por leveduras (Verstrepen et al., 2004). Por isso, foi testada a influência da glicose, da frutose e da mistura de ambas (1:1). Como a levedura selecionada (*Z. bailii* BCV 08) é uma levedura frutofílica (Dang et al., 2010), a mesma produziu mais acetato de etila quando foi utilizada frutose como fonte de carbono, assim como sua mistura com glicose. Em função destes resultados, foi aplicado o mosto de uva, o qual é composto por glicose e frutose em proporções de aproximadamente 1:1 (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Quando utilizado o mosto de uva, foram produzidas 71,11 mg/L de acetato de etila,, enquanto que utilizando a mistura de glicose e frutose (1:1) foram produzidas 18,35 mg/L. O mosto de uva pode ser considerado como um meio complexo, rico em açúcares e nitrogênio, o que favoreceu o desenvolvimento da levedura *Z. bailii* BCV 08 e a produção de acetato de etila. Foi testado, também, o efeito do aumento do volume de cultivo. Para isto foi realizado um cultivo, nas condições otimizadas, em biorreatores com volume de trabalho de 4L.

Os cultivos em biorreator foram realizados com dois pH diferentes (3,5 e 5,0), temperatura de 28 °C, sem aeração do meio e agitação eventual (a cada 04 horas) de 250 rpm. Nestas condições, a pH 3,5, a levedura *Z. bailii* BCV 08 foi capaz de produzir 36,56 mg/L de acetato de etila, o que representa um aumento de aproximadamente 44% na quantidade de acetato de etila produzido. O aumento no volume de cultivo pode levar

ao aumento na densidade de células de leveduras, aumentando a quantidade de acetato de etila e outros ésteres produzidos (Hiralal et al., 2013).

O pH possui forte influência sobre a produção de ésteres (Plata et al., 2005) e como a levedura utilizada foi isolada de vinhos, seu metabolismo está bastante adaptado a pH mais ácido, favorecendo a acumulação de acetato de etila a pH 3,5. O uso de biorreatores para produção de acetato de etila pode favorecer o desenvolvimento de um processo biotecnológico para produção em escala industrial. Além disso, poucos estudos tem sido desenvolvidos para avaliar o efeito de sistema de cultivo em biorreatores para implementar a produção de ésteres por leveduras.



## 9. Conclusões

A produção de ésteres por leveduras sofre influência de distintos fatores, como a composição do meio em fontes de carbono e as condições de cultivo, principalmente temperatura, pH e agitação do meio. Leveduras isoladas a partir de vinhos da Serra Gaúcha e queijos produzidos de maneira artesanal possuem habilidade em produzir ésteres durante cultivo em meio rico em glicose e nitrogênio. As leveduras isoladas de vinhos foram capazes de acumular maior quantidade de ésteres durante o cultivo, maior quantidade de biomassa e metabolizaram maior quantidade de glicose.

Dentre as cepas testadas (34 cepas), 06 isolados foram selecionados por produzirem alta quantidade de ésteres. Utilizando a técnica de sequenciamento do domínio D1/D2 do rDNA, foi possível identificar os isolados. O isolado BCV 08, identificado como *Zygosaccharomyces bailii*, foi selecionado como melhor produtor de ésteres, produzindo acetato de etila (4,91 mg/L), acetato de feniletila (120,97 mg/L), octanoato de etila (29,16 mg/L) e decanoato de etila (17,3 mg/L), em meio GYMP (Capítulo I), 120 rev/min de agitação e a 28 °C.

O uso da SPME no *headspace* das amostras, seguida por injeção em GC/MS ou GC/FID demonstrou ser um bom método de determinação de acetil e etil ésteres a partir de meio sólido e após otimização das condições. Para o procedimento de SPME, as melhores condições foram as seguintes: fibra de PDMS/DVB/CAR, 20 minutos de equilíbrio, temperatura de equilíbrio de 80 °C, 10 minutos de exposição da fibra no frasco de extração e 10 minutos de dessorção no GC. Com o método desenvolvido e validado, foi possível identificar e quantificar os ésteres produzidos, principalmente, acetato de etila, acetato de feniletila, octanoato de etila e decanoato de etila.

A metodologia de superfície e resposta foi aplicada para otimização das condições de agitação e temperatura do cultivo para a produção de ésteres pela levedura *Z. bailii* BCV 08. Com as condições otimizadas (temperatura de 28 °C e velocidade de agitação de 0 rpm) houve um aumento de aproximadamente 60% na produção de acetato de etila. A análise de variância (teste *F*) demonstrou que o modelo de segunda ordem foi ajustado aos dados obtidos (*F* calculado de 4,88, maior que o valor tabelado),

a um nível de significância de 95%. O  $R^2$  do modelo foi 0,9077. O modelo foi validado, utilizando as condições otimizadas e o valor predito foi de 28,63 mg/L de acetato de etila e experimentalmente o valor obtido foi de 28,26 mg/l, o que demonstra que o modelo foi ajustado aos dados experimentais obtidos.

Com a otimização das condições, a mistura de glicose e frutose (1:1) foi a melhor condição, aumentando a produção de acetato de etila pela levedura *Z. bailii* BCV 08. Além disso, foi testado o efeito do mosto de uva Chardonnay, o qual demonstrou melhores resultados. Nos experimentos em biorreator de 4L de volume, houve um aumento na produção de acetato de etila, sendo que o pH 3,5 foi melhor que o pH 5,0. No biorreator, a produção máxima de acetato de etila foi de 133,74 mg/L, o que representou um aumento de 46% na produção de acetato de etila.

No cultivo em biorreatores, foi possível um aumento considerável na produção de acetil e etil ésteres pela levedura *Z. bailii*. O pH 3,5 favoreceu este acúmulo, assim como, a utilização de mosto de uva, um meio com alta relação C/N (40:1, aproximadamente). Além de acetato de etila, a cepa *Z. bailii* BCV 08 produziu 14,57 mg/L de hexanoato de etila, 4.093,74 mg/L de octanoato de etila e 3.775,28 mg/L de decanoato de etila.

## 10. Perspectivas

Os resultados obtidos demonstram que a produção de acetato de etila por levedura é bastante dependente de inúmeros fatores e nem todos foram testados. Neste contexto, inúmeras leveduras produzem acetato de etila, mas os estudos concentram-se em cepas de *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e *C. utilis*. Estudos do metabolismo de produção de acetato de etila por *Z. bailii* são escassos e novos experimentos mais amplos se fazem necessários.

Sendo assim, o metabolismo e enzimas envolvidas na produção de ésteres por leveduras *S. cerevisiae* já foram bastante estudados, porém, pouco foi investigado em outras cepas de leveduras não-*Saccharomyces*. Para tal, novos trabalhos para conhecimento das enzimas envolvidas e sua atividade são importantes para melhorar a produção de ésteres por leveduras *Z. bailii*.

## 11. Referências Bibliográficas

ANTALICK, G.; PERELLO, M.C.; DE REVEL, G. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace- solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* 12: 1236-1245, 2010.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62: 2145-2148, 1990.

BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal Food Microbiology* 153: 243-59, 2012.

BENE, A.; FORNAGEA, A.; LUISIERA, J.L.; PICHLERB, P.; VILLETIAZ, J.C. A new method for the rapid determination of volatile substances: the SPME-direct method. Part I: Apparatus and working conditions. *Sensors and Actuators B* 72: 184-187, 2001.

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76: 965-977, 2008.

BRÁNYIK, T.; VICENTE, A.A.; DOSTÁLEK, P.; TEIXEIRA, J.A. A Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing* 114(1): 3-13, 2008.

CLARKE, R.J.; BAKKER, J. *Wine Flavour Chemistry*. UK, Blackwell Publishing, Cap 4, p. 120-188, 2004.

CORDENTE, A.G.; CURTIN, .CD.; VARELA, C.; PRETORIUS, I.S. Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96:601-618, 2012.

CVJETKO, M.; FURAC, J.F.; PLAZL, P.Z. Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. *Process Biochemistry* 47: 1344-1350, 2012.

DANG, T.D.T.; MERTENS, L.; VERMEULEN, A; GEERAERD, A H.; VAN IMPE, J.F.; DEBEVERE, J.; DEVLIEGHERE, F. Modelling the growth/no growth boundary of *Zygosaccharomyces bailii* in acidic conditions: a contribution to the alternative method to preserve foods without using chemical preservatives. *International Journal of Food Microbiology* 137: 1-12, 2010.

FUKUDA, K; YAMAMOTO, N.; WAKAI, Y.; YANAGIUCHI, T.; KITAMOTO, H.; KIMURA, A.; KIYOKAWA, Y. balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (10): 4076-4078, 1998.

FUMIYOSHI, A.; HORIKOSHI, K. Enhanced production of isoamyl alcohol and isoamyl acetate by ubiquitination-deficient *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10: 383-388, 2005.

HIRALAL, L.; OLANIRAN, A.O.; PILLAY, B. Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (no prelo) 1-8, 2013.

HORSTED, M.W.; DEY, E.S.; HOLMBERG, S.; BRANDT, M.C.K. A Novel Esterase from *Saccharomyces carlsbergensis*, a possible function for the yeast TIP1 Gene. *Yeast* 14: 793-803, 1998.

KOLE, P.R.; VENKATESH, G.; KOTECHA, J.; SHESHALAD, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical chromatography: BMC* 25: 199-217, 2011.

LANDELL, M.F., HARTFELDER, C., VALENTE, P. Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*: 34 49-55, 2006.

LILLY, M., BAUER, F.F., LAMBRECHTS, M.G., SWIEGERS, J.H., COZZOLINO, D., PRETORIUS, I.S. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* 641-659, 2006.

LIU, S.Q.; HOLLAND, R.; CROW, V.L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal* 14: 923-945, 2004.

LÖSER, C.; URIT, T.; STUKERT, A.; BLEY, T. Formation of ethyl acetate from whey by *Kluyveromyces marxianus* on a pilot scale. *Journal of Biotechnology* 163: 17-23, 2013.

MAJCHER, M.; JELÉN, H.H. Comparison of suitability of SPME, SAFE and SDE methods for isolation of flavor compounds from extruded potato snacks. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 606-612, 2009.

MAURIELLO, G.; CAPECE, A.; D'AURIA, M.; GARDE-CERDÁN, T.; ROMANO, P. SPME-GC method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiology* 26: 246-252, 2009.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 3: 426-427, 1959.

MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMENEZ, J.M.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, S.; HERAS-VAZQUEZ, F.J. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 297-304, 2003.

PARK, Y.C.; SHAFFER, C.E.H.; BENNETT, G.N. Microbial formation of esters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:13-25, 2009.

PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.A.; SCHNURER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Res* 6: 3-13, 2006.

PINO, J.A.; QUERIS, O. Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques. *Food Chemistry* 122: 1241-1246, 2010.

PLATA, C.; MAURICIO, J.C.; MILLÁN, C.; ORTEGA, J.M. Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate and isoamyl acetate by a *Saccharomyces cerevisiae* strain during alcoholic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 115-121, 2005.

PLATA, C.; MAURICIO, J.C.; MILLAN, C.; ORTEGA, J.M. Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate by a *Saccharomyces cerevisiae* strain during alcoholic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:115-21, 2004.

PLATA, C.; MILLAN, C.; MAURICIO, J.C.; ORTEGA, J.M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology* 20: 217-224, 2003.

PLUTOWSKA, B.; WARDENCKI, W. Determination of volatile fatty acid ethyl esters in raw spirits using solid-phase micro extraction and gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* 613: 64-73, 2008.

RIBEREAU-GAYON, P.; *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2a ed., Vol 1, Cap. 2, p. 53-78, 2006.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J.A.; ESCALONA-BUENDÍA, H.B.D; CONTRERAS-RAMOS, S.M.C.; OROZCO-AVILA, B.I.; JARAMILLO-FLORES, A.E.; LUGO-CERVANTES, E. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry* 132: 277-288, 2012.

ROJAS, V.; GIL, J.V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 86: 181-188, 2003.

ROJAS, V.; GIL, J.V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 70: 283-289, 2001.

ROUSTAN, J.L.; CHU, A.R.; MOULIN, G.; BIGEY, F. A novel lipase/acyltransferase from the yeast *Candida albicans*: expression and characterisation of the recombinant enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 203-212, 2005.

ROZA, C.L.; LACA, A.; GARCÍA, L.A.; DIAZ, M. Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Process Biochemistry* 38: 1451-1456, 2003.

SAERENS, S.M.G.; DELVAUX, F.R.; VERSTREPEN, K.J.; THEVELEIN, J.V. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology* 3(2): 165-177, 2010.

SAGRATINI, G.; MAGGI, F.; CAPRIOLI, G.; CRISTALLI, G.; RICCIUTELLI, M.; TORREGIANI, E.; VITTORI, S. Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from the Marche and Abruzzo regions of Italy using HS-SPME-GC-MS and HPLC-MS. *Food Chemistry* 132: 1592-1599, 2012.

SCHREIER, P. Enzymes and Flavour Biotechnology. In: BERGER, R.G. *Biotechnology of Aroma Compounds*. Berlin, Springer-Verlag, Cap 2, p. 50-72, 1997.

SINGH, R.; VADLANI, V.P.; HARRISON, M.L.; BENNETT, G.N.; SAN, K.Y. Aerobic production of isoamyl acetate by overexpression of the yeast alcohol acetyltransferases AFT1 and AFT2 in *Escherichia coli* and using low-cost fermentation ingredients. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31: 299-306, 2008.

STOPPACHER, N.; KLUGER, B.; ZEILINGER, S.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods* 81: 187-193, 2010.

SUMBY, K.M.; GRBIN, P.R.; JIRANEK, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry* 121: 1-16, 2010.

TORREA, D.; FRAILE, P.; GARDE, T.; ANCÍN, C. Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control* 14: 565-571, 2003.

URIT, T.; LÖSER, C.; WUNDERLICH, M.; BLEY, T. Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey: studies of the ester stripping. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34, 547-559, 2011.



URIT, T.; STUKERT, A.; BLEY, T.; LÖSER, C. Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey during aerobic batch cultivation at specific trace element limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96: 1313-1323, 2012.

VAN LAERE, S.D.M.; SAERENS, S.M.G.; VERSTREPEN, K.J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.M.; DELVAUX, F.R. Flavour formation in fungi: characterization of KlAtf, the *Kluyveromyces lactis* orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferases Atf1 and Atf2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 783-792, 2008.

VANDAMME, E.J.; SOETAERT, W. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77: 1323-1332, 2002.

VERBELEN, P.J.; SAERENS, S.M.; VAN MULDER, S.E.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F.R. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82:1143-1156, 2009.

VERMEULEN, A.; DANG, T.D.T.; GEERAERD, A.H.; BERNAERTS, K.; DEBEVERE, J. IMPE, J.V.; DEVLIEGHERE, F. Modelling the unexpected effect of acetic and lactic acid in combination with pH and  $a_w$  on the growth/no growth interface of *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology* 124: 79-90, 2008.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.P.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M.; PRETORIUS, I.S.; DELVAUX, F.R. Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96 (2): 110-118, 2003.

VERSTREPEN, K.J.; VAN LAERE, S.D.M.; VERCAMMEN, J.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.P.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M.; PRETORIUS, I.S.; DELVAUX, F.R. The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase Atf1p is localized in lipid particles. *Yeast* 21: 367-377, 2004.

VIANA, A.F.; GIL, J.V.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 135: 68-74, 2009.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25: 778-785, 2008.

VOILLEY, A; ETIEVANT, P. *Flavour in food*. Cambridge, Woodhead Publishing Limited, p. 451, 2006.

WATKINS, P.J.; ROSE, G.; WARNER, R.D.; DUNSHEA, F.R.; PETHICK, D.W. A comparison of solid-phase microextraction (SPME) with simultaneous distillation–extraction (SDE) for the analysis of volatile compounds in heated beef and sheep fats. *Meat Science* 91: 99-107, 2012.

WELKE, J.E.; MANFROI, V.; ZANUS, M.; LAZAROTTO, M.; ZINI, C.A. Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1226: 124-139, 2012.

WRENT,P.; RIVAS, E.M.; PEINADO, J.M.; SILÓNIZ, M.I. Strain typing of *Zygosaccharomyces* yeast species using a single molecular method based on polymorphism of the intergenic spacer region (IGS). *International Journal of Food Microbiology* 142: 89-96, 2010.

YOSHIMOTO, H.; FUJIWARA, D.; MOMMA, T.; TANAKA, K.; SONE, H.; NAGASAWA, N.; TAMAI, Y. Isolation and Characterization of the ATF2 Gene Encoding Alcohol Acetyltransferase II in the Bottom Fermenting Yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* 15: 409-417, 1999.

ZAMBONELLI, C. *Microbiologia e Biotecnologia del Vino*. Bologna, Edagricole, p. 250, 1998.

ZINI, C.A. Estudo dos compostos voláteis de algumas espécies de eucalipto através do uso de microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

## 12. Curriculum Vitae

### Juliano Garavaglia

Curriculum Vitae

---

#### Dados pessoais

**Nome** Juliano Garavaglia  
**Filiação** Mario Antonio Garavaglia e Lourdes Silvestrin Garavaglia  
**Nascimento** 22/12/1980 - Farroupilha/RS - Brasil  
**Endereço profissional** Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,  
Departamento de Nutrição  
Av. Sarmiento Leite, 245, sala 208  
Centro - Porto Alegre  
90050-170, RS - Brasil  
Telefone: 51 33038830

#### Endereço eletrônico

E-mail para contato : julianogr@ufcspa.edu.br  
e-mail alternativo : julianogaravaglia@gmail.com

---

#### Formação acadêmica/titulação

**2010** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Produção de ésteres e avaliação da expressão das enzimas esterase e álcool acetil transferase em leveduras de origem ambiental e enológicas\_  
Orientador: Dra. Patricia Valente

**2004 - 2006** Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Bioconversão de L-fenilalanina em 2-feniletanol por *Kluyveromyces marxianus* em mosto de uva, Ano de obtenção: 2006  
Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**2000 - 2003** Graduação em Tecnologia em Viticultura e Enologia.  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Bento Goncalves, Brasil  
Título: Avaliação da utilização de chips e barricas de carvalho francês em vinho Cabernet Sauvignon

Orientador: Larissa Dias de Ávila

### **Formação complementar**

**2005 - 2005** Extensão universitária em Planejamento Experimental e Otimização de Processo.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

### **Atuação profissional**

#### **1. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA**

##### **Vínculo institucional**

**2012 - Atual** Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor 3º Grau , Carga horária: 40, Regime: Integral

##### **Atividades**

**10/2012 - Atual** Conselhos, Comissões e Consultoria, Departamento de Nutrição  
Especificação:  
Membro da COMGRAD do curso de Tecnologia em Gastronomia

**06/2012 - Atual** Extensão Universitária, Departamento de Nutrição  
Especificação:  
Comissão Organizadora do Cine Gastronomia (sessão de cinema e discussão de temas ligados à Gastronomia)

**04/2012 - Atual** Graduação, Gastronomia  
Disciplinas ministradas:  
Enologia e Bebidas, Análise Sensorial na Gastronomia e Microbiologia de Alimentos

**10/2012 - 10/2012** Extensão Universitária, Departamento de Nutrição  
Especificação:  
Membro da Comissão Organizadora da I Semana Acadêmica da UFCSPA

#### **2. Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS**

##### **Vínculo institucional**

**2006 - 2009** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor Assistente ,

Carga horária: 20, Regime: Parcial

---

**Atividades**

**08/2006 - 06/2009** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências da Saúde  
Linhas de pesquisa:  
Enologia

**08/2006 - 06/2009** Graduação, Tecnologia em Gastronomia  
Disciplinas ministradas:  
Enogastronomia Aplicada , Enografia , Enologia

**3. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS**

---

**Vínculo institucional**

**2010 - Atual** Vínculo: Aluno de Doutorado , Enquadramento funcional:  
Doutorando , Carga horária: 20, Regime: Parcial

**4. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - IFRS**

---

**Vínculo institucional**

**2008 - 2012** Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor  
Ensino Básico, Téc. e Tecnológico , Carga horária: 40, Regime:  
Dedicação exclusiva

---

**Atividades**

**03/2011 - 03/2012** Pesquisa e Desenvolvimento, Campus Bento Gonçalves  
Linhas de pesquisa:  
Microbiologia Enológica , Qualidade dos Vinhos

**03/2011 - 03/2012** Conselhos, Comissões e Consultoria, Campus Bento Gonçalves  
Especificação:  
Presidente do Colegiado do Curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia

- 01/2011 - Atual** Outra atividade técnico-científica, Campus Bento Gonçalves  
Especificação:  
Líder do Grupo de Pesquisa Viticultura e Enologia
- 12/2010 - 03/2012** Conselhos, Comissões e Consultoria, Campus Bento Gonçalves  
Especificação:  
Presidente do Núcleo Docente Estruturante do Curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia
- 04/2010 - 03/2012** Direção e Administração, Campus Bento Gonçalves  
Cargos ocupados:  
Coordenador de Curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia
- 08/2008 - 03/2012** Graduação, Tecnologia em Viticultura e Enologia  
Disciplinas ministradas:  
Vinificações, Laboratório de Práticas Enológicas, Microbiologia Geral, Microbiologia Enológica e Análise Sensorial I

## 5. Centro Federal de Educacao Tecnologica de Bento Goncalves - CEFET/BG

---

### Vínculo institucional

- 2003 - 2003** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Tecnico de Laboratorio , Carga horária: 20, Regime: Parcial

### Atividades

- 04/2003 - 12/2003** Graduação, Tecnologia em Viticultura e Enologia  
Disciplinas ministradas:  
Aulas praticas da disciplina de Microbiologia , Aulas praticas da disciplina de Enologia II

## 6. Cooperativa Vinicola Aurora - CVA

---

### Vínculo institucional

- 2002 - 2003** Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Estagiario , Carga horária: 20, Regime: Parcial

### Atividades

- 01/2002 - 03/2002** Estágio, Enologia, Tecnicos

Estágio:  
Cantina e Laboratorio

## 7. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

---

### Vínculo institucional

**2000 - 2001** Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Estagiario , Carga horária: 20, Regime: Parcial

---

### Atividades

**05/2000 - 01/2001** Estágio, Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho  
Estágio:  
Pos-colheita

## 8. Vinhos Salton S A - SALTON

---

### Vínculo institucional

**2001 - 2001** Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Estagiario , Carga horária: 20, Regime: Parcial

---

### Atividades

**01/2001 - 03/2001** Estágio, Cantina  
Estágio:  
Cantina e Laboratorio

---

## Linhas de pesquisa

1. Enologia  
Objetivos:Desenvolver a funcionalidade do suco de uva e do vinho produzidos na Serra Gaúcha
2. Microbiologia Enológica  
Objetivos:Identificar e isolar microrganismos do vinho e ou vinhedos da Serra Gaúcha, buscando desenvolver leveduras que possam ser utilizadas como culturas starter na vinificação.
3. Qualidade dos Vinhos

Objetivos: Analisar a composição do vinho e desenvolver metodologias de análise, buscando implementar a qualidade de vinhos elaborados na serra Gaúcha.

---

### Áreas de atuação

1. Microbiologia Industrial e de Fermentação
  2. Microbiologia Agrícola
  3. Tecnologia das Bebidas
- 

### Projetos

**2011 - 2012** Efeito da suplementação em nitrogênio do mosto na cinética fermentativa e qualidade do vinho Chardonnay

Descrição: O mosto de uva é um meio complexo e possui todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento das leveduras e outros microrganismos, porém, sua composição é muito variável. A quantidade de nitrogênio do mosto possui extrema importância para o bom andamento da Fermentação Alcoólica durante o processo de vinificação. Porém, quando a concentração de nitrogênio não é suficiente para o desenvolvimento da levedura no mosto, o mesmo deve ser suplementado. No Brasil, inúmeros componentes podem ser utilizados, tais como, fosfato de amônia ou ativantes complexos (amônia, fatores de sobrevivência e fatores de crescimento). A suplementação do mosto com nitrogênio é uma operação comum nas vinícolas brasileiras. Esta operação busca um correto prosseguimento na fermentação, bem como, sua regularidade e rapidez. Atualmente, pode ser considerada como uma atividade comum e seu efeito sobre a cinética fermentativa deve ser avaliada para se obter vinhos brancos de qualidade e sem defeitos aromáticos decorridos de uma fermentação irregular. Uma correta quantidade de nitrogênio no mosto leva ao aumento da qualidade do vinho, pois, gera maior regularidade na fermentação e defeitos aromáticos graves podem ser evitados nesta fase. Sendo assim, faz-se necessário um estudo aprofundado no efeito da adição de nitrogênio na cinética fermentativa nas condições adotadas na vinificação em branco.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Juliano Garavaglia (Responsável); ; Marlova Benedetti; Jose Ricardo Machado dos Santos

Número de orientações: 1;

**2011 - 2014** Produção de ésteres e expressão das enzimas ester sintase e álcool acetil transferase em leveduras de origem ambiental e enológicas

Descrição: A fermentação leva à formação de uma mistura complexa de produtos que enriquecem o aroma e sabor, tanto de alimentos, quanto de bebidas obtidas por via fermentativa. O desenvolvimento do processo fermentativo, tradicionalmente, possui um papel muito importante para a qualidade e quantidade de aromas desenvolvidos em bebidas. Desta forma, pode-se destacar a importância sensorial dos ésteres, responsáveis por aromas frutados encontrados nos vinhos e cervejas. A produção dos ésteres ocorre,



principalmente, durante o processo fermentativo e podem ser produzidos por diversos microrganismos, tais como, fungos filamentosos e leveduras. Em condições ótimas, estes componentes podem ser obtidos sem que ocorram perdas no crescimento e no metabolismo de tais microrganismos. Inúmeras espécies de leveduras podem produzir ésteres, destacando-se as espécies do gênero *Saccharomyces*, bem como, do gênero *Pichia*. Os compostos que possuem maior importância são os acetil ésteres, produzidos a partir dos alcoóis superiores e em altas concentrações durante o processo de fermentação na elaboração de vinhos e de cerveja. Acredita-se que estes compostos sejam responsáveis por notas frutadas, adocicadas e florais. Sendo assim, o aroma frutado dos vinhos após a fermentação é dado por uma mistura complexa de acetato de hexila, caprilato de etila e caproato de etila (compostos que apresentam aroma de maçã), acetato de isoamila (aroma de banana) e acetato de 2-feniletila (aroma de rosas). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a produção de acetil ésteres ocorre através da expressão de duas enzimas, a enzima álcool acetil transferase (ATF1) e a enzima éster sintase, e o produto do gene EST2, uma enzima esterase que diminui a quantidade de ésteres acumulados no meio fermentativo. A expressão destas enzimas acontece em outras leveduras, inclusive, em isolados de ecossistemas naturais como a Mata Atlântica e de vinhedos experimentais. Porém, estudos devem ser realizados para a caracterização e expressão.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1);

Integrantes: Juliano Garavaglia (Responsável); ; Andressa Habekost; Patricia Valente; Rosana de Cassia de Souza Schneider; Marilene Henning Vainstein

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Número de produções C,T & A: 2/ Número de orientações: 1;

Projetos de desenvolvimento tecnológico

### **2008 - 2013**            **NUTRITECH**

Descrição: O projeto está alicerçado no desenvolvimento de um Pólo de Alimentos para a Saúde no RS, com base na implantação do Instituto de Ciência, Tecnologia e Inovação na área de Alimentos para a Saúde, Nutrição e Nutracêutica, denominado NUTRITECH, que terá como expertise, além da P&DI, a prestação de serviços de análise e conformação de alimentos com acreditação nacional e internacional e também um núcleo de empreendedorismo que abrigará as empresas Startups e Consolidadas. Além disso, serão oferecidos aos profissionais da área, programas de capacitação (Mestrados e Cursos de Educação Continuada) com características de aplicação do conhecimento e desenvolvimento tecnológico. A base científica e tecnológica do NUTRITECH será desenvolvida numa proposta multidisciplinar, com programas de pesquisa voltados a descoberta de novos compostos bioativos, o desenvolvimento de ingredientes ou alimentos que promovam a saúde humana, identificação de rotas metabólicas para produção de biomoléculas (aromas, enzimas, etc.) e o estudo da nanotecnologia aplicada a alimentos. Além disso, abriremos um espaço para pesquisa e desenvolvimento na área de gastronomia, que tem um papel fundamental na relação da nutrição e da saúde humana. Atualmente o Brasil esta muito atrasado no que tange ao estudo da gastronomia, tendência importante que permeia a ciência de alimentos e desenha o seu futuro. Na área de prestação de serviços serão oferecidas ao mercado diversas análises de alimentos, desde as mais simples, como rotulagem, por exemplo, até aquelas voltadas para a avaliação de

conformidade e especificação técnica de alimentos para o setor exportador, que aferem a segurança alimentar exigida nos diferentes nichos do comércio internacional. Neste quesito o RS encontra-se absolutamente carente de espaços de serviços acreditados e normatizados de acordo com os padrões de exigência da OMC/TBT Agreement e do novo Codex Alimentarius FAO/OMS, trazendo assim, ao Estado, uma imensa vulnerabilidade.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de desenvolvimento tecnológico

Alunos envolvidos: Graduação (3); Doutorado (2);

Integrantes: Juliano Garavaglia; Denize Ziegler (Responsável); Renata Ramos; Daiana de Souza; Juliana de Castilhos; Rochele Rossi; Lidia Fiuza

Financiador(es): Financiadora de Estudos e Projetos-FINEP

## Idiomas

<b>Inglês</b>	Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem
<b>Espanhol</b>	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
<b>Francês</b>	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Razoavelmente , Lê Bem
<b>Italiano</b>	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

## Produção

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. GARAVAGLIA, Juliano, FLORES, S. H., PIZZOLATO, T. M., PERALBA, M. C. R., AYUB, M. A. Z. Bioconversion of l -phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* , v.23, p.1273 - 1279, 2007.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. HABEKOST, A., GARAVAGLIA, Juliano, SCHNEIDER, R.C.S., VALENTE, P., LEITE, B., RAMIREZ, M.

Otimização do método direto de micro-extração em fase sólida (SPME) para a determinação da produção de acetil ésteres e etila por leveduras In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012, Santos.

**Livro de Resumos do XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).** , 2012.

2. HABEKOST, A., BJERK, T., GARAVAGLIA, Juliano, VALENTE, P., SCHNEIDER, R.C.S.

Análise de ésteres produzidos por leveduras empregando cromatografia In: 16 Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão.

**Anais do 16 ENQA.** , 2011.

3. GARAVAGLIA, Juliano, BJERK, T., HABEKOST, A., VALENTE, P., SCHNEIDER, R.C.S.

Otimização da SPME para a análise direta de voláteis produzidos por leveduras In: 34 Reunião Anual da

Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

**34 Reunião Anual SBQ**, 2011.

4. **GARAVAGLIA, Juliano**, HABEKOST, A., SCHNEIDER, R.C.S., VAINSTEIN, M. H., VALENTE, P. Produção de acetil ésteres e etila por leveduras de origem ambiental e enológicas In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre.

**Livro de Resumos**, 2011.

5. **GARAVAGLIA, Juliano**, VALENTE, P.

Avaliação da produção de acetil ésteres e etila em leveduras de origem ambiental e enológicas In: XII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre.

**Livro de Resumos**, 2010.

6. **GARAVAGLIA, Juliano**, AVILA, Larissa Dias de

Avaliação da utilização de chips e barricas de carvalho francês em vinho Cabernet Sauvignon In: X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 2003, Bento Goncalves.

**Anais do X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**, 2003.

#### **Apresentação de trabalho e palestra**

1. **GARAVAGLIA, Juliano**

**Ciência e Biotecnologia do Vinho**, 2012. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

#### **Produção técnica**

**Demais produções técnicas**

1. **GARAVAGLIA, Juliano**

**Palestra Enologia, vinhos e algo mais**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. **GARAVAGLIA, Juliano**, MACHADO, I. C. K.

**Palestra Tendências em Nutrição e Gastronomia**, 2012. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

3. **GARAVAGLIA, Juliano**

**Minicurso Enologia: da Uva ao Vinho**, 2011. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

4. **GARAVAGLIA, Juliano**

**Curso de Vinhos**, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

5. GUERRA, C. C., BEN, R. L., FORNASIER, V. C., SOUZA, G. R., ROSSATO, S. B., **GARAVAGLIA, Juliano**, FICAGNA, E.

**Curso de Formação de Multiplicadores em Enologia Centro Mesorregional de Vitivinicultura**, 2008. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

6. SANTOS, A. P., CALLEGARI, A. B., KLOSS, M. V., **GARAVAGLIA, Juliano**, FICAGNA, E.

**Curso Básico de Sommelier**, 2007. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

#### **Orientações e Supervisões**

**Trabalhos de conclusão de curso de graduação**

1. Roberto Cainelli Júnior. **Influência da variedade uva Pinot Noir e variedade de uva branca Chardonnay na composição e formação do perlage de vinho espumante elaborado pelo método tradicional.** 2012. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
2. Lucy Meire Moura Lombardi. **Manejo e maturação de uva Tempranillo sobre a concentração de polifenóis no vinho da região de Jerez, Espanha.** 2012. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
3. Juliana Toniolo Rossato. **Relatório de estágio das atividades desenvolvidas durante a safra de 2012 na Cooperativa Vinícola Aurora.** 2012. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
4. Isaias Boff. **Avaliação a utilização de diferentes doses de nitrogênio facilmente assimilável na segunda fermentação em vinho espumantes elaborados a partir do método Tradicional.** 2011. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
5. Luiz Renato de Oliveira Pozza. **Influência de diferentes doses de anidrido sulfuroso na maceração pré-fermentativa a frio do mosto da cultivar Merlot (Vitis vinifera L.).** 2011. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
6. Isabelle de Azevedo Castro. **Processo de vinificação integral de vinhos tintos elaborados na região da Campanha do Rio Grande do Sul.** 2011. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
7. Kátia de França Lopes. **Tributos incidentes na produção e comercialização de vinho de mesa tinto comum proveniente da Serra Gaúcha.** 2011. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
8. Gabriela Zenatto Jornada. **Análise do mercado do Reino Unido e estratégias de incremento nas exportações de vinhos finos para o país.** 2010. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
9. Marcela Mariani Pires de Campos. **Avaliação de três métodos de vinificação da cultivar de uva Merlot na safra 2010.** 2010. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
10. Caroline Wojciechowski. **Enoturismo.** 2010. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
11. Lucas Dal Magro. **Influência da turbidez do mosto de uva Chardonnay sobre a qualidade do vinho proveniente de uvas com maturação deficiente.** 2010. Curso (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

#### **Iniciação científica**

1. José Ricardo Machado dos Santos. **Efeito da suplementação em nitrogênio do mosto na cinética fermentativa e qualidade do vinho Chardonnay.** 2011. Iniciação científica (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
2. Andressa Habekost. **Produção de ésteres e avaliação da expressão das enzimas ester sintase e**

**acetiltransferase em leveduras de origem enológicas.** 2011. Iniciação científica (Química Industrial) - Universidade de Santa Cruz do Sul

3. Lucy Meire Moura Lombardi. **Avaliação da cinética de crescimento, produção de ésteres e degradação de açúcares por leveduras não-Saccharomyces.** 2010. Iniciação científica (Tecnologia em Viticultura e Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

#### **Orientação de outra natureza**

1. Alunos Curso Técnico em Enologia. **Atividades Práticas Profissionais na Cantina de Vinificação do Campus Bento Gonçalves - IFRS.** 2009. Orientação de outra natureza (Técnico em Enologia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

### **Eventos**

#### **Participação em eventos**

1. Avaliador no(a) **10 Concurso Melhores Vinhos de Flores da Cunha**, 2011. (Encontro)  
Avaliador e degustador do Concurso Melhores Vinhos de Flores da Cunha.
2. **Jornada Acadêmica do Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia**, 2011. (Simpósio)
3. **Palestra técnica Embrapa Uva e Vinho - Avaliação da genotoxicidade em trabalhadores da vitivinicultura expostos a agrotóxicos**, 2011. (Encontro)
4. **Congresso Latinoamericano de Enoturismo**, 2010. (Congresso)
5. **Curso de Capacitación Avanzada Políticas y modelos de desarrollo territorial: el caso Veneto**, 2010. (Outra)
6. **I Reunião de Trabalho do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul**, 2009. (Encontro)
7. Apresentação (Outras Formas) no(a) **IV Concurso Internacional de Vinhos do Brasil**, 2008. (Outra)  
Presidente de Mesa.
8. **XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia**, 2008. (Congresso)
9. **Fórum Internacional de Viticultura e Enologia**, 2006. (Simpósio)

#### **Organização de evento**

1. **GARAVAGLIA, Juliano**  
**Avaliação Nacional de Vinhos, edição 19, Safra 2011**, 2011. (Concurso, Organização de evento)
2. **GARAVAGLIA, Juliano**  
**X Semana Acadêmica do curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia**, 2011. (Outro, Organização de evento)
3. **GARAVAGLIA, Juliano**  
**II Salão de Iniciação Científica do Campus Bento Gonçalves - IFRS**, 2010. (Congresso, Organização de evento)
4. **GARAVAGLIA, Juliano**

**Avaliação Nacional de Vinhos, Edição 16, Safra 2008**, 2008. (Outro, Organização de evento)

## **Bancas**

### **Participação em banca de trabalhos de conclusão**

#### **Graduação**

1. **GARAVAGLIA, Juliano**, AVILA, Larissa Dias de, ROSSATO, S. B.

Participação em banca de Sandi Marina Corso. **Determinação de ocratoxina A em uvas e vinhos da variedade Pinot Noir em diferentes épocas de colheita**, 2012

(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

2. **GARAVAGLIA, Juliano**, FICAGNA, E., AVILA, Larissa Dias de

Participação em banca de Maciel Ampese. **Análise do uso de diferentes madeiras locais em vinhos tintos**, 2011

(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

3. **GARAVAGLIA, Juliano**, FICAGNA, E., ROSSATO, S. B.

Participação em banca de Daiane Angela Badalotti. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de sucos de uva Bordô, Concord e Isabel elaborados com uvas produzidas pelo sistema orgânico**, 2011

(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

4. **GARAVAGLIA, Juliano**, ROSSATO, S. B., MENEGUZZO, J.

Participação em banca de Ângela Rossi Marcon. **Determinação de Furaneol**, 2011

(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

5. **GARAVAGLIA, Juliano**, MENEGUZZO, J., FICAGNA, E.

Participação em banca de Vinícius Bortolini Cercato. **Estudo das modificações sensoriais em vinhos brancos espumantes produzidos com substituição total e parcial do açúcar de cana por mosto de uva no licor de tirage**, 2011

(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

6. **GARAVAGLIA, Juliano**, ROSSATO, S. B., MENEGUZZO, J.

Participação em banca de Michele Zortéa. **Influência da filtração sobre terras de diatomácea na cor, turbidez e presença de leveduras em vinhos tintos**, 2011

(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

7. **GARAVAGLIA, Juliano**, MENEGUZZO, J., ROSSATO, S. B.

Participação em banca de Diógenes Maciocsik. **Relatório de Estágio - Vinícola Salton S/A**, 2011

(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

8. **GARAVAGLIA, Juliano**, FICAGNA, E., MENEGUZZO, J.

- Participação em banca de Felipe Bebber. **Vinificação em rose da variedade de uva Bordô**, 2011  
(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
9. MENEGUZZO, J., ROSSATO, S. B., **GARAVAGLIA, Juliano**  
Participação em banca de Tamiris Sellmer Nilson. **Comparação de dois métodos analíticos de determinação da acidez total em diferentes amostras**, 2010  
(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
10. FICAGNA, E., ROSSATO, S. B., **GARAVAGLIA, Juliano**  
Participação em banca de Aline Maria Carbonera. **Elaboração de vinhos, espumantes e suco de uva na vinícola Wine Park**, 2010  
(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
11. **GARAVAGLIA, Juliano**, FICAGNA, E., COSTA, C. S.  
Participação em banca de Bruno Teres Onsi. **Estabilidade microbiológica de vinho tinto seco comum em embalagem PET**, 2010  
(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
12. **GARAVAGLIA, Juliano**, FICAGNA, E., MANFROI, L.  
Participação em banca de Igor Benedetti. **Influência da utilização de uva tecnologicamente deficientes nas características físico-químicas e sensoriais de vinho Cabernet Sauvignon**, 2010  
(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
13. ROSSATO, S. B., **GARAVAGLIA, Juliano**, FICAGNA, E.  
Participação em banca de Arley Firmino Pereira. **Vinificação em tinto em barris de carvalho - Vinificação Integral**, 2010  
(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
14. GIOVANNINI, E., **GARAVAGLIA, Juliano**  
Participação em banca de André Peres Júnior. **A estabilidade de cor como fator determinante na comercialização de vinhos tintos de mesa**, 2009  
(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
15. **GARAVAGLIA, Juliano**, ROSSATO, S. B.  
Participação em banca de Mauricio Marini Dutra. **Chateau Dillon - Safra e vinificacao 2008**, 2009  
(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul
16. **GARAVAGLIA, Juliano**, ROSSATO, S. B., GIOVANNINI, E.  
Participação em banca de Sandro Marcelo Saul. **História da vitivinicultura em Entre-Rios, província da Argentina**, 2009

(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

17. **GARAVAGLIA, Juliano**, COSTA, C. S., FICAGNA, E.

Participação em banca de Juan Marcel Frighetto. **Isolamento e caracterização de bactérias lácticas associadas à Vinificação**, 2009

(Tecnologia em Alimentos) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

18. **GARAVAGLIA, Juliano**, ROSSATO, S. B.

Participação em banca de Yuri Bernard Borges Brandão. **Processos de elaboração dos vinhos Late Harvest, Sauternes e Tokaji**, 2009

(Tecnologia em Viticultura e Enologia) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

#### **Participação em banca de comissões julgadoras**

##### **Concurso público**

1. **Banca Examinadora da Área de Gastronomia**, 2010

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

##### **Outra**

1. **Banca Avaliadora de projetos do I Salão de Iniciação Científica do IFRS**, 2009

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

---



