



**JAMILY DE ALMEIDA NASCIMENTO SILVA**

**PHYSIOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT  
SOURCES FOR PRODUCTION OF FERMENTED CEREAL-BEVERAGES**

**Lavras - MG**

**2018**

**JAMILY DE ALMEIDA NASCIMENTO SILVA**

**PHYSIOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT  
SOURCES FOR PRODUCTION OF FERMENTED CEREAL-BEVERAGES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, área de  
concentração em Microbiologia  
Agrícola, para a obtenção do título  
de Mestre.

**Orientadora:**

Dr.<sup>a</sup> Rosane Freitas Schwan

**Coorientadores:**

Dr. Leonardo de Figueiredo Vilela

Dr.<sup>a</sup> Cintia Lacerda Ramos

**LAVRAS - MG**

**2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Family de Almeida Nascimento.

Physiological and genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different sources for production of fermented cereal-beverages / Family de Almeida Nascimento Silva.  
- 2018.

79 p.

Orientador(a): Rosane Freitas Schwan.

Coorientador(a): Leonardo de Figueiredo Vilela, Cíntia  
Lacerda Ramos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Caracterização fisiológica e  
genética. 3. Atividade de fitase. I. Schwan, Rosane Freitas. II.

**JAMILY DE ALMEIDA NASCIMENTO SILVA**

**PHYSIOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF *SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE* STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCES FOR  
PRODUCTION OF FERMENTED CEREAL-BEVERAGES**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E GENÉTICA DE CEPAS DE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ISOLADAS DE DIFERENTES SUBSTRATOS PARA  
A PRODUÇÃO DE BEBIDAS FERMENTADAS A BASE DE CEREAIS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, área de  
concentração em Microbiologia  
Agrícola, para a obtenção do título  
de Mestre.

Aprovada em 08 de março de 2018.

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Sandra Regina Ceccato Antonini

UFSCar

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

UFLA

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Rosane Freitas Schwan - UFLA

Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2018**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por renovar a minha fé nos momentos mais necessários.

Aos meus pais, Cléia e Roberto, por todo o apoio. Obrigada por acreditarem em mim e se fazerem sempre presentes. *Amo vocês.*

À professora Dra. Rosane F. Schwan, pela orientação e influência em minha jornada científica. Obrigada pelo exemplo de profissional, pela confiança e pelas oportunidades junto ao seu grupo de pesquisa.

Ao Dr. Leonardo F. Vilela, parceiro nessa e em outras (futuras e diárias) jornadas. Obrigada pela coorientação e profissionalismo. Pela cumplicidade, incentivos, sonhos e *presença* durante essa caminhada. Obrigada por fazer parte da minha vida, e permitir que eu seja parte da sua. *Te amo.*

À professora Dra. Cintia L. Ramos, pela coorientação, pelas ideias, paciência e disponibilidade. Obrigada por todo o suporte, mesmo que distante.

À Aline Galvão, por ter sido meu primeiro contato no Laboratório de Fermentações e por ter permanecido até o final como um rosto amigo. Obrigada pela paciência, espontaneidade e momentos de descontração.

À amiga sempre presente, Jéssica Marques. Obrigada por estar sempre lá... nos bons e maus momentos desta caminhada. Obrigada pela amizade, pelas conversas e pelos nossos cafés. *Sentirei saudades.*

Às pós-doutorandas, Dra. Maria Gabriela, Dra. Angélica Cristina, Dra. Beatriz Carvalho e Dra. Suzana Reis. Obrigada pela excelência profissional e pelas conversas sempre produtivas.

A todos os colegas do Laboratório de Fermentações e do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, técnicos e funcionários, dispostos a ajudar e fazer os dias mais leves. Obrigada a todos.

Ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

*"porque todo que é nascido de Deus vence o mundo;  
e esta é a vitória que vence o mundo: a nossa fé"*

(1 João 5:4)

## RESUMO

Diferentes cepas de leveduras, mesmo pertencentes à mesma espécie, podem apresentar características fisiológicas e genéticas distintas, o que tornam esses microrganismos importantes industrialmente. A utilização de leveduras isoladas de substratos naturais e de diversos processos fermentativos pode contribuir para o desenvolvimento e melhoramento de alimentos e bebidas fermentados, aumentando o uso e a diversificação desses microrganismos em diversos processos. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar, fisiologicamente e geneticamente, diferentes cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de diferentes substratos, e direcionar essas cepas notáveis para seu uso e melhoria na produção industrial de bebidas fermentadas à base de cereais. Inicialmente, foram avaliadas 81 cepas indígenas de *S. cerevisiae*, isoladas do *caxiri*, *kefir*, destilarias, mandioca, maçã, fruto e fermentação do cacau. Com relação às análises enzimáticas, para a produção de amilase, dentre todas as cepas analisadas, apenas a CCMA 0708, isolada do *caxiri*, apresentou atividade para a enzima amilase. Quanto a fitase, as cepas analisadas apresentaram diferenças significativas para a produção da enzima fitase, uma importante característica para sua aplicação na produção de bebidas a base de cereais, visto o fitato (ou ácido fítico) corresponder a um fator antinutricional. Vinte e oito cepas positivas selecionadas no teste de fitase apresentaram diferenças fisiológicas, quando submetidas à diferentes condições de estresse, como elevadas temperaturas, variações de pH e diferentes osmolaridades. Com relação aos testes genéticos, quando avaliadas quanto aos polimorfismos utilizando as técnicas de Rep-PCR e RAPD-PCR, as cepas apresentaram diferenças no perfil genético e de bandas em ambos os testes. Além disso, as análises cromatográficas sugerem pequenas diferenças no perfil de compostos voláteis e não-voláteis produzidos pelas cepas em um meio de fermentação a base de milho, com 24 horas de fermentação. Portanto, as 12 cepas selecionadas ao final desse estudo, apresentaram potencial uso na produção de bebidas não-alcoólicas a base de cereais.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*. Caracterização fisiológica e genética. Atividade de fitase.

## ABSTRACT

Different yeast strains, even belonging to the same species, may have different physiological and genetic characteristics, which make these microorganisms important industrially. The use of yeasts isolated from natural substrates and various fermentation processes can contribute to the development and improvement of fermented foods and beverages, increasing the use and diversification of these microorganisms in several processes. Thus, the objective of the present study was to characterize, physiologically and genetically, different *Saccharomyces cerevisiae* strains, isolated from different sources, and direct these remarkable strains for their use and improvement in the industrial production of fermented cereal-beverages. Initially, 81 indigenous *S. cerevisiae* strains isolated from *caxiri*, *kefir*, distilleries, cassava, apple fruit, fruit and cocoa fermentation were evaluated. Regarding the enzymatic analyzes, for amylase production, only CCMA 0708, isolated from *caxiri*, showed low activity for the amylase enzyme. For phytase, the strains analyzed presented significant differences for phytase production, an important characteristic for their application in the cereals beverages production, since phytate (or phytic acid) corresponds to an antinutrient compound. Twenty-eight positive strains selected in the phytase test presented physiological differences when submitted to different stress conditions, such as high temperatures, different pH variations and osmolarities. Regarding genetic tests, evaluated for polymorphisms using Rep-PCR and RAPD-PCR techniques, the strains showed differences in the genetic profile and bands in both tests. In addition, the chromatographic analyzes suggest small differences in the profile of volatile and non-volatile compounds produced by the strains in a maize-based medium with 24 hours of fermentation. Therefore, the 12 strains selected at the end of this study had potential use in the production of non-alcoholic beverages based on cereals.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*. Physiological and genetic characterization. Phytase activity.



## LISTA DE FIGURAS

Segunda Parte:

Artigo

Fig 1: Screening for potential hydrolyzing phytase in *Saccharomyces cerevisiae* strains in solid media with translucent halo of hydrolysis originated by phytase production.....53

Fig. 2: Intraespecific characterization of 28 strains of *Saccharomyces cerevisiae* assess by Rep-PCR profiles. Dendrogram generated after cluster analysis of the digitized Rep-PCR fingerprints of the strains. The clusters are indicated by numbers (1 to 6). Strain codes are reported.....58

Fig. 3: Intraespecific characterization of 28 strains of *Saccharomyces cerevisiae* assess by RAPD-PCR profiles. Dendrogram generated after cluster analysis of the digitized RAPD-PCR fingerprints of the strains. The clusters are indicated by numbers (1 to 5). Strain codes are reported.....60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bebidas fermentadas tradicionais produzidas em diferentes regiões do mundo.....	21
---	----

### Segunda Parte:

#### Artigo

Table 1: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains studied and their respective sources.....	74
--	----

Table 2: Phytase production and phytate hydrolysis in 24 h at 28 °C and the source of the strains.....	54
--	----

Table 3: Stressful conditions evaluated in this study: temperature, osmolarity and pH for all the 28 phytase positive strains.....	56
--	----

Table 4: Glucose and fructose consumption ( $\text{g L}^{-1}$ ) for the strains in 24 and 48 hours of fermentation.....	61
---	----

Table 5: Glycerol and ethanol production ( $\text{g L}^{-1}$ ) for the strains in 24 and 48 hours of fermentation.....	62
--	----

Table 6: Concentration ( $\text{g L}^{-1}$ ) of organic compounds for the 12 <i>S. cerevisiae</i> strains analyzed in this study, as determined by HPLC.....	75
--	----

Table 7: Concentration of volatile compounds obtained by GC–MS analysis for <i>S. cerevisiae</i> strains in different assays investigated in this study.....	77
--	----

# SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
2.1. A LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	15
2.2. O PROCESSO FERMENTATIVO .....	15
2.2.1. <i>O processo fermentativo em leveduras</i> .....	16
2.3. A FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS E BEBIDAS .....	18
2.3.1. <i>Alimentos fermentados</i> .....	18
2.3.2. <i>Bebidas tradicionais fermentadas</i> .....	19
2.3.2.1. <i>Alimentos e bebidas à base de cereais</i> .....	22
2.3.2.1.1. <i>A enzima fitase</i> .....	22
2.3.2.2. <i>Os cereais e os processos fermentativos</i> .....	23
2.4. TÉCNICAS MOLECULARES EMPREGADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS .....	25
<b>3. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>
<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	<b>43</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>45</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>46</b>
2.1. YEAST STRAINS .....	46
2.2. $\alpha$ -AMYLASE PRODUCTION ASSAY .....	47
2.3. PHYTASE ACTIVITY ASSAY .....	47
2.4. SCREENING ON AGAR PLATES FOR STRESSFUL CONDITIONS .....	48
2.4.1. <i>Thermotolerance</i> .....	48
2.4.2. <i>Survival at different pH values</i> .....	48
2.4.3. <i>Osmolarity</i> .....	49
2.5. ASSESSING GENETIC INTRAESPECIFIC DIVERSITY .....	49
2.5.1. <i>Rep - PCR analysis</i> .....	49
2.5.2. <i>RAPD - PCR analysis</i> .....	50
2.6. FERMENTATION SUBSTRATE FOR A CEREAL-BASED MEDIUM RESEMBLING A MAIZE FERMENTED-BEVERAGE .....	50
2.7. FERMENTATION ASSAY AND SAMPLING .....	51
2.8. SUBSTRATES AND METABOLITES ANALYSIS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) .....	51
2.9. VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROPHOTOMETRY (GC-MS) ANALYSIS .....	51
2.10. STATISTICAL ANALYSIS .....	52
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>52</b>
<b>4. CONCLUSION</b> .....	<b>64</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>65</b>
<b>SUPPLEMENTARY MATERIAL</b> .....	<b>73</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido extensivamente utilizada como organismo modelo em estudos eucarióticos, correspondendo ao primeiro eucarioto a ter o seu genoma totalmente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996). A facilidade de manipulação e propagação conduziram esse microrganismo a ser empregado em diversas áreas de pesquisa (CROMIE et al., 2013). No entanto, a maior parte das cepas de levedura *S. cerevisiae* estudadas concentram-se em um pequeno número de cepas laboratoriais. Dessa forma, nos últimos anos, houve crescente interesse nas características dos isolados naturais. Esses últimos, muitas vezes, podem apresentar propriedades biotecnológicas mais vantajosas quando comparados com os isolados laboratoriais (CROMIE et al., 2013) e industriais (STEENSELS et al., 2014).

A diversidade de microrganismos associados a processos fermentativos espontâneos e rudimentares, constitui uma importante fonte de isolados microbianos com características de interesse industrial (MUSSATTO et al., 2010). *S. cerevisiae* tem sido, há milhares de anos, muito utilizada na elaboração de produtos alimentares e bebidas, associados principalmente, aos processos de fermentação (BEATO et al., 2016). Dentre outras funções, a fermentação é realizada para melhorar a palatabilidade, o aroma, a vida útil, a textura e o valor nutritivo dos alimentos (CAMPBELL-PLATT, 1994; NOUNT & MORTARJEMI, 1997; NOUT, 2009).

Alimentos e bebidas fermentados podem ser produzidos a partir de diversos substratos, microrganismos e técnicas, sendo muitos deles preparados de forma artesanal ou em indústrias de pequena escala (BLANDINO et al., 2003; AIDOO et al., 2006). A produção de alimentos fermentados de boa qualidade depende da presença, do crescimento e do metabolismo de diferentes microrganismos. Dessa forma, os microrganismos conferem características diferenciadas ao alimento através de produtos oriundos de seu próprio metabolismo (HUTKINS, 2006). Dentre os microrganismos utilizados, a levedura do gênero *Saccharomyces*, particularmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, está estreitamente associada com a produção de alimentos e bebidas fermentados para o consumo humano, como o pão, o chocolate, o vinho e a cerveja (SCOTT & SULLIVAN, 2008; FARIA-OLIVEIRA et al., 2013).

Alimentos e bebidas fermentados tradicionais são produzidos por diversos países africanos, asiáticos e da América do Sul a partir do milho, trigo, mandioca, arroz, feijão, soja e frutas (HARUTA et al., 2006; FAGBEMI & IJAH, 2006; ALMEIDA et al., 2007; NIELSEN et al., 2007; SCHWAN et al., 2007). Especificamente na América do Sul, existem diversas bebidas fermentadas produzidas principalmente pelo processo de fermentação de cereais, legumes e tubérculos. Dentre as bebidas tradicionais, podem ser citados o *cauim* e o *caxiri*, ambos produzidos por nativos brasileiros (ALMEIDA et al., 2007), a *chicha* e o *champús*, bebidas alcoólicas típicas dos Andes (OSORIO-CADAVID et al., 2008).

Cereais, de modo geral, são utilizados como alimentos básicos da dieta de diferentes populações e uma grande porção desses alimentos é fermentada antes do consumo, visando a melhoria do sabor, textura, maior vida útil e digestibilidade do produto final (NOUT, 2009). Além disso, os cereais são considerados como uma das mais importantes fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras da dieta alimentar de indivíduos ao redor do mundo (POUTANEN, 2012).

Na América Latina, os principais produtos da alimentação diária da população são representados por cereais. O milho, por exemplo, é um cereal bastante consumido em vários países, sendo uma excelente fonte de energia, entretanto, apresenta baixo teor de proteínas. Além disso, contém fatores antinutricionais, tais como fitatos, taninos e os inibidores de tripsina, bem como lectinas (EJIGUI et al., 2005). Esses fatores podem interferir na digestibilidade, absorção e na utilização de nutrientes, podendo reduzir o valor nutritivo de diversos alimentos a base de cereais (GRIFFITHS et al., 1998; SINGH et al., 2014).

Os processos fermentativos têm sido empregados para melhorar as possibilidades de armazenamento, aumentar o valor econômico e nutritivo de produtos finais derivados de cereais, aumentando o teor de nutrientes como vitaminas e aminoácidos (STEINKRAUS, 1997; CHELULE et al., 2010). Além disso, a fermentação tem sido atribuída como via potencial para reduzir o risco de deficiência de minerais entre as populações, especialmente nos países em desenvolvimento (KUMAR et al., 2010).

As leveduras, principalmente a espécie *S. cerevisiae*, são microrganismos estáveis na fermentação de produtos a base de cereais (CHAVES-LÓPEZ et al., 2014), podendo ser empregadas sob muitas formas em diferentes condições de fermentação. Estudos aprofundados sobre a fisiologia e genética de diferentes cepas de *S. cerevisiae*

são de grande importância, já que cepas de mesma espécie podem apresentar características fisiológicas e genéticas distintas. Este trabalho é base para uma futura seleção e utilização de culturas de microrganismos com melhor desempenho em produtos alimentícios, incluindo aqueles produzidos a base de cereais.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. A levedura *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido, há milhares de anos, um microrganismo extensivamente utilizado por seres humanos na elaboração de produtos alimentares e bebidas associados, principalmente, aos processos de fermentação (BEATO et al., 2016). Nas últimas décadas, *S. cerevisiae* também demonstrou ser um organismo modelo utilizado em estudos eucarióticos (CROMIE et al., 2013), correspondendo ao primeiro eucarioto a ter o seu genoma completamente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996).

Muitos processos celulares são altamente conservados de leveduras a eucariotos superiores. Essa característica, associada à facilidade de manipulação e de propagação, tem conduzido à utilização deste organismo unicelular a uma ampla variedade de áreas de pesquisa (CROMIE et al., 2013), incluindo a genética (AMBERG & BURKE, 2016). E mais recentemente, no uso de ferramentas mais modernas para o estudo do genoma (ZHU et al., 2017).

Pesquisas utilizando *S. cerevisiae* tem se concentrado, tradicionalmente, em um pequeno número de cepas laboratoriais bem estudadas. Tais cepas, muitas vezes, apresentam uma estrutura genética menos complexa quando comparadas às cepas industriais, o que torna esses microrganismos de uso preferencial em laboratórios (STEENSELS et al., 2014).

No entanto, nos últimos anos, houve um crescente interesse em cepas isoladas de ambientes naturais, incluindo as provenientes de processos industriais e da indústria alimentícia (CROMIE et al., 2013). Essas cepas indígenas podem apresentar algumas propriedades que as tornam mais vantajosas que as cepas laboratoriais e industriais, como por exemplo, a capacidade de várias cepas isoladas do vinho em fermentar a xilose (WENGER et al., 2010) ou o melhor desempenho de cepas de *S. cerevisiae*, isoladas de bebidas indígenas, na fermentação industrial de bebidas fermentadas (SILVA-FILHO et al., 2005; BASSO et al., 2008).

### **2.2. O processo fermentativo**

A palavra fermentação (do latim "fervere"), foi definida por Louis Pasteur como "la vie sans l'air" ("a vida sem ar") (BOURDICHON et al., 2012). Segundo Tortora e colaboradores (2012), a fermentação é definida como um processo metabólico que libera energia (catabolismo) a partir de açúcares ou outras moléculas orgânicas. É, portanto, um processo que utiliza uma molécula orgânica comoceptor final de elétrons, ocorre na ausência de oxigênio e tem como objetivo a produção de energia e sua conservação na forma de ATP (adenosina trifosfato). Dessa forma, a energia gerada durante o processo e armazenada na forma de ATP, pode ser empregada pelos microrganismos na realização de diversas atividades fisiológicas, como absorção, excreção, biossíntese, crescimento e multiplicação, preservando e perpetuando, assim, a espécie (LIMA et al., 2001).

Durante a fermentação, os microrganismos presentes nos alimentos convertem quimicamente a composição desses produtos, o que favorece o enriquecimento nutricional dos mesmos, concedendo assim, benefícios à saúde dos indivíduos que os consomem (STEINKRAUS, 2002; FARHAD et al., 2010; TAMANG, 2015a). Do ponto de vista bioquímico, o termo fermentação refere-se à geração de energia com o catabolismo de compostos orgânicos (BOURDICHON et al., 2012). Entretanto, industrialmente é empregado de forma mais ampla (STANBURY, 1995), onde ocorre a conversão do substrato em metabólitos de interesse (WALKER, 1998).

### **2.2.1. O processo fermentativo em leveduras**

Dentre os microrganismos que realizam a fermentação, as leveduras constituem o grupo de maior importância, devido à sua grande exploração comercial (WALKER, 1998; ROMANO et al., 2006). As leveduras, portanto, apresentam algumas particularidades que permitiram seu uso de forma expressiva na indústria alimentícia e farmacêutica, desempenhando papel importante na produção de alimentos, bebidas alcoólicas e metabólitos secundários, como antibióticos e vitaminas (HIERRO et al., 2004; MAYORAL et al., 2005; STANLEY et al., 2010; HOU et al., 2012).

O processo de fermentação da glicose em etanol e gás carbônico (dióxido de carbono - CO<sub>2</sub>) por esses microrganismos vem sendo explorado na produção de alimentos e bebidas, como o pão e o vinho, ao longo de milhares de anos (PANEK, 1993; WEBSTER & WEBER, 2007). Durante a via glicolítica (ou via de Embden-Meyerhof-Parnas), a molécula de glicose é clivada em uma série de reações catalisadas



por 10 enzimas, liberando ao final do processo dois ATPs e duas moléculas de piruvato (LEHNINGER, 2006). Em condições anaeróbicas, as leveduras produzem etanol a partir de duas reações. Na primeira reação, o piruvato formado durante a glicólise é descarboxilado, produzindo acetaldeído e liberando CO<sub>2</sub>. Em uma segunda reação, o acetaldeído é reduzido para produzir o etanol, sendo esse processo denominado fermentação alcoólica (LIMA et al., 2001; LEHNINGER, 2006).

Desse modo, uma grande porcentagem da glicose catabolizada pelas leveduras é convertida em etanol e CO<sub>2</sub> ao final da via glicolítica, enquanto uma pequena quantidade de compostos secundários como o glicerol, alcoóis superiores e ácidos orgânicos são formados (REED & PEPLER, 1973; HASHIZUME, 2001; PAPALEXANDRATOU et al., 2013). Os ácidos orgânicos, por exemplo, tais como o ácido láctico, ácido acético, ácido málico e ácido propiônico, ocorrem em produtos fermentados como resultado da hidrólise, do metabolismo bioquímico e da atividade microbiana (SHUKLA et al., 2010). Assim, a determinação quantitativa de ácidos orgânicos é de suma importância na produção de alimentos e bebidas fermentados, pois mesmo quando presentes em menores quantidades, podem desempenhar papel importante no desenvolvimento celular e nas características dos produtos fermentados, como por exemplo, a melhoria do valor nutricional e o sabor característico presente em diversas bebidas (URBANO et al., 2011).

A microbiota presente nos processos fermentativos tradicionais e industriais constitui uma importante fonte de isolados microbianos com características de interesse industrial (MUSSATTO et al., 2010). Especificamente para leveduras, podem ser encontradas cepas tolerantes ao estresse durante a fermentação alcoólica, processo no qual a levedura é submetida à diferentes condições de estresse, como o osmótico e a concentração de etanol (BASSO et al., 2008). Ainda, tais isolados podem também ser empregados com sucesso em estudos de engenharia genética e metabólica (NIELSEN, 2001; NEVOIGT, 2008; MUSSATTO et al., 2010).

Dentre as espécies de leveduras conhecidas, o gênero *Saccharomyces* inclui linhagens comumente utilizadas na indústria de fermentação, bem como espécies de importância científica (RAINIERI et al., 2003). *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada em processos fermentativos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007), sendo essa espécie pertencente ao filo Ascomycota. *S. cerevisiae* apresenta boa capacidade fermentativa, tolerância ao etanol (ANTONI et al., 2007; COT et al., 2007), ao baixo pH (CZERUCKA et al., 2007); fermentam rapidamente sob condições anaeróbicas e, dessa

forma, não promovem problemas quanto a oxigenação de grandes volumes na indústria fermentativa (SNOEK & STEENSMA, 2007). As fermentações industriais com leveduras contribuem atualmente de forma significativa para a economia de diversos países (HATOUM et al., 2012).

A fermentação, como mecanismo de modificações bioquímicas desejáveis, constitui-se na conversão de açúcares em produtos como alcoóis, ácidos orgânicos, CO<sub>2</sub> e compostos flavorizantes, sendo esse processo mediado majoritariamente pelas leveduras e suas enzimas (NOUT & MOTARJEMI, 1997). As leveduras, portanto, atuam sobre diversos substratos orgânicos de forma a alterá-los e originarem novas substâncias com qualidade e quantidade variáveis de acordo com a seleção das leveduras utilizadas (SILVA, 1994; BASSI, 2011). Dentre outras funções, a fermentação é realizada para controlar o crescimento microbiano, para melhorar o gosto, o aroma, a vida útil, a textura, o valor nutritivo dos alimentos, dentre outras propriedades atraentes dos mesmos (CAMPBELL-PLATT, 1994; NOUT & MORTARJEMI, 1997; NOUT, 2009).

### **2.3. A fermentação na produção de alimentos e bebidas**

Alimentos e bebidas fermentados constituem uma herança cultural em muitas civilizações (TAMANG et al., 2010b), podendo ser produzidos a partir de diversos substratos, microrganismos e técnicas, sendo muitos deles preparados de forma artesanal ou em indústrias de pequena escala (BLANDINO et al., 2003; AIDOO et al., 2006). Estima-se que possam haver mais de 5.000 variedades comuns de alimentos e bebidas fermentados sendo consumidos no mundo, por bilhões de pessoas (TAMANG, 2010b; TAMANG et al., 2016).

#### **2.3.1. Alimentos fermentados**

Sociedades de todo o mundo descobriram de forma independente o valor de fermentar alimentos como um meio acessível de preservação, de melhoramento da qualidade nutricional e das características sensoriais dos mesmos (MARSH et al., 2014). Os alimentos tradicionais, principalmente aqueles produzidos por fermentação espontânea, estão presentes no cotidiano da população e desempenham importante papel na identidade cultural de diferentes comunidades (ALMEIDA et al., 2007). As

fermentações espontâneas são aquelas produzidas de maneira natural, sem nenhum tipo de inoculação (TORIJA, 2001).

A produção de alimentos fermentados de boa qualidade depende da presença, do crescimento e do metabolismo de microrganismos específicos. Dessa forma, os microrganismos conferem características organolépticas diferenciadas ao alimento através de produtos oriundos de seu próprio metabolismo (HUTKINS, 2006). A produção de ácidos orgânicos, alcoóis e compostos voláteis está diretamente relacionada às características do produto final (DJENI et al. 2011). Além disso, a atividade biológica dos microrganismos durante o processo resulta na produção de diversos metabólitos capazes de suprimir o crescimento e a sobrevivência de microrganismos indesejáveis (ROSS et al., 2002).

O processo de fermentação pode levar à desintoxicação e destruição de componentes indesejáveis presentes em alimentos crus, tais como fitatos, taninos e polifenóis (BLANDINO et al., 2003), além de remoção da lactose (FOX & THOMPSON, 2007; SCHAAFSMA, 2008). Os grãos de cacau, por exemplo, não são comestíveis devido ao seu caráter amargo e sabor adstringente. No entanto, após serem fermentados, tornam-se a matéria-prima básica para a produção do chocolate (SCHWAN & WHEALS, 2003; PEREIRA et al., 2016).

As leveduras têm sido descritas em alimentos fermentados originados de diferentes regiões do mundo, estando relacionadas à produção de compostos alcoólicos e aromáticos, além da melhoria do valor nutritivo (JESPERSEN, 2003; KAMDA et al., 2015). O gênero *Saccharomyces*, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, está fortemente associado com a produção de alimentos e bebidas fermentados para o consumo humano, como o pão, o chocolate, o vinho e a cerveja (SCOTT & SULLIVAN, 2008; FARIA-OLIVEIRA et al., 2015).

### **2.3.2. Bebidas tradicionais fermentadas**

Muitos alimentos e bebidas fermentados são produzidos nos países africanos, asiáticos e da América do Sul. Esses alimentos são produzidos a partir, principalmente, do milho, trigo, mandioca, arroz, feijão, soja e frutas (ALMEIDA et al., 2007), entre outros. Na maioria das vezes, a produção dessas bebidas é baseada no conhecimento empírico transferido de geração para geração dentro das comunidades (MELATTI, 1983). O processo de fermentação para a elaboração de bebidas fermentadas depende da

atuação de microrganismos, dentre eles as leveduras, para converter o açúcar em alcoóis, ésteres e outros compostos voláteis e não voláteis (DUARTE et al., 2009). Em muitas regiões, as bebidas fermentadas tornaram-se também conhecidas por seus atributos de promoção da saúde (MARSH et al., 2014). A Tabela 1 apresenta alguns exemplos e características de bebidas fermentadas tradicionais produzidas e consumidas em diferentes regiões ao redor do mundo.

**Tabela 1:** Bebidas fermentadas tradicionais produzidas em diferentes regiões do mundo.

Bebida	Substrato	Microrganismo	País de origem	Referência
<i>Cachaça</i>	Cana-de-açúcar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , LAB e outras leveduras	Brasil	Faria-Oliveira (2015)
<i>Cauim</i>	Arroz e mandioca	Bactérias do ácido láctico (LAB), <i>Corynebacterium</i> ; <i>Paenibacillus</i> ; <i>Saccharomyces</i> ; <i>Candida</i> ; <i>Pichia</i> ; <i>Debaryomyces</i>	Brasil	Almeida et al (2007); Schwan et al (2007)
<i>Caxiri</i>	Mandioca e batata doce	<i>Bacillus</i> ; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Enterobacter</i> ; <i>Pediococcus</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ; <i>Pichia membranifaciens</i> ; <i>P. guilliermondii</i> ; <i>Cryptococcus luteolus</i>	Brasil	Santos et al (2012)
<i>Calugi</i>	Mandioca, milho e arroz	<i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ; <i>Streptococcus parasanguis</i> ; <i>Weissella confuse</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Bacillus sp.</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Pichia fermentans</i> ; <i>Candida sp.</i>	Brasil	Miguel et al (2012)
<i>Yakupa</i>	Mandioca	<i>Lactobacillus fermentum</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>Weissella cibaria</i> ; <i>W. confuse</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Pichia kudriavzevii</i>	Brasil	Freire et al (2013)
<i>Champús</i>	Milho	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> ; <i>Pichia fermentans</i> ; <i>Pichia kluyveri</i> var. <i>kluyveri</i> ; <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> ; <i>Torulospira delbruekii</i> ; <i>Galactomyces geotrichum</i> ; <i>Hanseniaspora sp.</i>	Colômbia	Osorio-Cadavid et al (2008)
<i>Chicha</i>	Milho	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Andes, Peru	Vallejo et al (2013)
<i>Kombucha</i>	Diferentes tipos de chás	Bactérias ( <i>Gluconacetobacter xylinus</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Lactobacillus</i> ), Leveduras ( <i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Torulospira</i> , <i>Pichia</i> , <i>Dekkera</i> , <i>Saccharomyces</i> )	China e outros países no mundo	Marsh et al (2014)
<i>Togwa</i>	Farinha de milho, malte	<i>Lactobacillus</i> spp. (LAB), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida</i> sp.	Tanzânia, África	Marsh et al (2014)

Na América do Sul, diversas bebidas fermentadas são produzidas principalmente pelo processo de fermentação de cereais, legumes e tubérculos. Dentre as bebidas tradicionais, podem ser citados o *cauim* e o *caxiri*, ambos produzidos por nativos

brasileiros (ALMEIDA et al., 2007), a *chicha* e o *champiús*, bebidas alcoólicas típicas dos Andes (OSORIO-CADAVID et al., 2008). Dentre todos os processos de fermentação envolvendo alimentos, a fermentação com cereais apresenta-se em maior volume, tendo papel significativo para a nutrição humana em todas as partes do mundo nas quais os cereais são produzidos (HAMMES et al., 2005).

### **2.3.2.1. Alimentos e bebidas à base de cereais**

Os cereais são muito utilizados como alimentos básicos da dieta de muitas populações, sendo considerados como uma das mais importantes fontes de nutrientes (como proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras) de pessoas em todo o mundo (POUTANEN, 2012). No entanto, a qualidade nutricional dos cereais e as propriedades sensoriais de seus produtos são, na maioria das vezes, inferiores ou pobres em comparação com o leite e seus derivados (CHAVAN et al., 1989; PEYER et al., 2016). Para esses casos, o baixo conteúdo proteico, a deficiência de aminoácidos essenciais (como por exemplo, a lisina), a baixa disponibilidade de amido e a presença de fatores antinutricionais (como o ácido fítico ou fitato, taninos e polifenóis), além da natureza dos grãos grosseiros, são fatores que influenciam e direcionam a menor qualidade de produtos derivados de cereais quando comparados aos outros produtos (CHAVAN et al., 1989a; SINGH et al., 2013).

O fitato, em particular, representa uma classe complexa de componentes naturais que ocorrem principalmente em cereais e leguminosas e que podem influenciar suas propriedades funcionais e nutricionais. Nutricionalmente, apenas animais que possuem fitases intestinais ou populações microbianas capazes de degradá-lo podem utilizar o fósforo nesta forma (HOLM et al., 2002). Dessa forma, a presença de fitato é desfavorável, pois ocasiona a formação de complexos insolúveis com minerais (como o zinco, cálcio e magnésio) e proteínas (participando da inibição de enzimas digestivas, como a  $\alpha$ -amilase, pepsina e pancreatina), diminuindo assim, a biodisponibilidade desses importantes nutrientes no intestino humano (MAGA, 1982; HOWSON & DAVIS, 1983; TORREZAN et al., 2010; REBELLATO et al., 2017). Assim, a degradação do fitato é um importante processo metabólico em muitos sistemas biológicos (PANDEY et al., 2011).

#### **2.3.2.1.1. A enzima fitase**

A fitase (mioinositol-hexafosfato fosfohidrolase) é uma enzima éster hidrolase amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada em animais, plantas e microrganismos, sendo capaz de reconhecer o fitato como substrato a ser utilizado. Essa enzima é responsável pela hidrólise do fitato em mioinositol pentaquisfosfato e ortofosfato, melhorando assim, a digestibilidade de proteínas e aumentando a disponibilidade de fósforo e outros minerais, antes quelados pelo ácido fítico (KONIETZNY & GREINER, 2002).

Nesse contexto, a levedura *S. cerevisiae* possui propriedades pertinentes para a sua utilização em diversas aplicações biotecnológicas: como resistência a altas concentrações de açúcar e álcool (JUNG et al., 2008) e bom crescimento em elevadas temperaturas (KIM et al., 2013). Além disso, a fitase produzida por *S. cerevisiae* é reconhecida como segura (possui o status GRAS- "Generally Recognized as Safe", conforme definido pela US Food and Drug Administration) para a produção de alimentos. Dessa forma, a fitase produzida pela levedura *S. cerevisiae* pode atuar nos alimentos de forma a melhorar a biodisponibilidade de nutrientes nos mesmos (VEIDE & ANDLID, 2006).

### **2.3.2.2. Os cereais e os processos fermentativos**

Diferentes tecnologias para o processamento de cereais vêm sendo empregadas no melhoramento de suas propriedades nutricionais. Dentre elas, a fermentação é o método de maior interesse e relevância (SINGH et al., 2014). A melhoria do sabor, da textura, a maior vida útil e a melhor digestibilidade, como resultado final do processo fermentativo, são importantes razões para isso. Assim, uma grande porção da produção mundial de cereais é processada por fermentação antes do consumo. (NOUT, 2009).

Diversos estudos têm demonstrado que muitas mudanças bioquímicas ocorrem no substrato durante a fermentação, levando a uma redução dos fatores antinutricionais, favorecendo assim, a qualidade nutricional dos produtos finais (EJIGUI et al., 2005; ZHANG et al., 2012; NIU et al., 2016). Sobretudo, esses produtos fermentados são resultado da atividade enzimática microbiana, que hidrolisa polissacarídeos, proteínas e lipídeos presentes no substrato em produtos não tóxicos, com aroma, sabor e textura agradáveis e atrativos ao consumidor (STEINKRAUS, 1997; BLANDINO et al., 2003; GUPTA et al., 2010).

As alterações das condições que ocorrem durante a fermentação contribuem para a ativação das enzimas presentes e a redução do pH aumenta seletivamente o desempenho de certas enzimas (tais como amilases e fitases), criando, por exemplo, condições adequadas para a degradação enzimática de fitatos (NOUT & MOTARJEMI, 1997). Além disso, durante o processo fermentativo de cereais muitos compostos voláteis são formados (como por exemplo, alguns ácidos orgânicos, compostos carbonílicos, alcoóis, acetatos e ésteres), sendo a formação desses metabólitos dependentes da composição físico-química da matéria-prima presente na produção de alimentos e bebidas fermentados. Dessa forma, as alterações fisiológicas induzidas por enzimas, juntamente com os metabólitos produzidos pelos microrganismos, produzem os efeitos biotecnológicos e nutricionais desejáveis nos alimentos e bebidas fermentados a base de cereais (POUTANEN et al., 2009), o que tornam esses produtos de grande interesse e aceitação pelo consumidor final (BLANDINO et al., 2003).

Visando a melhoria da qualidade, armazenamento e aumento do valor comercial do produto, a seleção de cepas de leveduras com características desejáveis ao processo e ao produto final tornou-se fator de grande relevância para os diversos processos fermentativos. A fermentação melhora o valor nutricional de produtos derivados de cereais, aumentando a disponibilidade de nutrientes vitaminas e aminoácidos, antes deficientes nesses produtos (STEINKRAUS, 1997; RIBEIRO et al., 1999; CHELULE et al., 2010). A fermentação também tem sido atribuída como via potencial para reduzir o risco de deficiência de minerais entre populações, especialmente nos países em desenvolvimento, onde os cereais não refinados são altamente consumidos (KUMAR et al., 2010).

As leveduras são, portanto, microrganismos estáveis na fermentação de produtos a base de cereais (CHAVES-L'ÓPEZ et al., 2014), podendo ser empregadas sob muitas formas em diferentes condições de fermentação. Dentre diversas espécies, a levedura *S. cerevisiae* é a de maior destaque quando associada aos processos fermentativos (MOREIRA et al., 2013). No entanto, para preservar as características organolépticas, típicas dos alimentos e bebidas fermentados, é essencial selecionar cepas que confirmam sabor e características sensoriais e aromáticas para o produto fermentado em estudo. Assim, a caracterização dessas cepas demanda o acesso a sua diversidade (fisiológica e genética) a fim de se obter cepas com melhor desempenho para uma maior qualidade do produto a nível comercial (KESHANI et al., 2015) ou para seu uso como organismo modelo em pesquisas científicas (CROMIE et al., 2013).



## 2.4. Técnicas moleculares empregadas na caracterização de leveduras

As leveduras representam um grupo muito diversificado de organismos, e mesmo cepas que são classificadas dentro da mesma espécie muitas vezes mostram um alto nível de divergência genética. A diversidade natural de leveduras (intra e interespecífica) tornou-se muito claro com o advento de tecnologias que permitiram a caracterização em profundidade da variação genética (DUJON et al., 2004; LITI et al., 2009; BORNEMAN et al., 2011; WANG et al., 2012b; BORNEMAN et al., 2012; STEENSELS et al., 2014; VUYST & WECKX, 2016).

Na última década, a aplicação de tecnologias moleculares para caracterizar a comunidade microbiana em complemento aos estudos dependentes de cultivo (técnicas tradicionais) tem facilitado o monitoramento dos processos fermentativos e a caracterização de espécies microbianas presentes durante estes processos (VAN HIJUM et al., 2013). Entretanto, técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas como alternativas às técnicas tradicionais de identificação e caracterização de leveduras. Essas técnicas oferecem algumas vantagens quando comparadas às técnicas tradicionais, como a identificação de linhagens por suas características genéticas e não por seu perfil fisiológico (CANAS, et al., 1997), e a eliminação de ambiguidades taxonômicas, simplificando a identificação de diferentes microrganismos (FERNÁNDEZ, et al., 1999). Dessa forma, as técnicas que utilizam DNA são independentes da expressão do gene, não sendo influenciadas pelas condições de cultivo (CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2004; SANZ et al., 2005) ou pela linhagem dos microrganismos (MOZINA et al., 1997).

Os marcadores moleculares surgiram com o advento das técnicas de biologia molecular, correspondendo a uma ferramenta rápida e eficaz para estudos genômicos, uma vez que detectam polimorfismos genéticos diretamente ao nível do DNA (ácido desoxirribonucleico) e não sofrem qualquer tipo de influência ambiental, superando as dificuldades encontradas nas caracterizações morfológicas, fenotípicas e organolépticas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SOUZA, 2001; CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2004; SANZ et al., 2005). Desde então, esses marcadores têm acompanhado os avanços da era genômica, beneficiando-se do grande volume de informações de sequências de DNA disponível (GUIMARÃES et al., 2009).

Os marcadores moleculares do tipo RAPD (do inglês, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), RFLP (do inglês, polimorfismo do comprimento do fragmento

de restrição) e AFLP (do inglês, polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) foram os marcadores de DNA mais utilizados nas décadas de 80 e 90, sendo ainda aplicados em diversos estudos genéticos, incluindo estudos de diversidade genética (GUIMARÃES et al, 2009). A reação em cadeia da polimerase de sequências repetidas do genoma (rep-PCR) pode também consistir em uma ferramenta genotípica promissora, rápida, com baixo custo e confiável para a diferenciação intraespecífica de diferentes linhagens de leveduras (GEVERS et al., 2001; PEREIRA et al., 2017). Contudo, cada ferramenta citada apresenta vantagens e limitações, cobrindo um amplo espectro de aplicações (GUIMARÃES et al, 2009).

Assim, os métodos moleculares baseados no polimorfismo dos ácidos nucleicos são a melhor alternativa aos métodos tradicionais, uma vez que não dependem do estado fisiológico da célula e, conseqüentemente, são mais reprodutíveis. Além disso, apresentam outras vantagens, como a alta precisão e discriminação, bem como a rapidez e simplicidade durante a realização da técnica (GUEROLA, 2006). Além das vantagens atribuídas à esses marcadores, as tecnologias existentes fornecem um número praticamente ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma, de forma automatizada e a custos cada vez mais reduzidos (GUIMARÃES et al., 2009).

Portanto, as regiões do DNA com diferentes graus de variabilidade podem ser utilizadas para a identificação dos grupos de microrganismos ou linhagens dentro de espécies (SANZ et al., 2005). A diversidade de linhagens de leveduras tem sido extensivamente estudada em diferentes regiões produtoras de bebidas fermentadas, revelando a existência de grande polimorfismo entre linhagens de leveduras isoladas em diferentes áreas e dentro de áreas específicas (BLANCO et al., 2006; LEGRAS et al., 2007; DUNN & SHERLOCK, 2008; LITI et al., 2009; SCHACHERER et al., 2009; STEENSELS et al., 2014). A caracterização de leveduras é, portanto, de grande importância para os processos fermentativos, uma vez que a qualidade das bebidas depende da composição, da dinâmica e da frequência dos microrganismos presentes nas mesmas (GUERRA et al., 2001).

Cepas microbianas são subdivisões dentro de uma espécie que são distinguidas por características genotípicas e/ou fenotípicas semelhantes. A diferenciação entre elas ocorre quando as espécies sofrem mutações significativas geradas por processos naturais, como a própria reprodução sexual, mudanças na ploidia, processos de recombinação genética ou transferência horizontal de genes (STEENSELS et al., 2014).

Nesse sentido, as mutações naturais podem originar novas cepas com características fermentativas importantes, que podem ser exploradas com sucesso na seleção de culturas iniciadoras apropriadas para diversos processos fermentativos (PEREIRA et al., 2017).

### 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Há milhares de anos, os alimentos e bebidas fermentados estão presentes no cotidiano da população humana. Esses produtos são resultado da ação conjunta de diferentes microrganismos, principalmente leveduras, atuantes nesses substratos durante toda a fermentação. Durante esse processo, as células de leveduras são submetidas a diversos fatores de estresse (como altas temperaturas, elevada pressão osmótica, altas concentrações de etanol, limitação de nutrientes, dentre outros) que podem direcionar a formação de produtos finais com propriedades biotecnológicas promissoras.

Diferentes cepas de leveduras, mesmo pertencentes à mesma espécie, podem apresentar características fisiológicas e genéticas distintas, o que tornam esses microrganismos importantes industrialmente. Dessa forma, a utilização de microrganismos isolados a partir de substratos naturais e de diversos processos fermentativos, também pode contribuir para o desenvolvimento e melhoramento de alimentos e bebidas fermentados, além de aumentar o uso e a diversificação desses microrganismos em processos industriais.

No presente estudo, foram avaliadas diversas cepas indígenas de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de diferentes substratos (*caxiri*, *kefir*, destilaria, mandioca, maçã, fruto e fermentação do cacau). Com relação às análises enzimáticas, as cepas analisadas apresentaram diferenças significativas para a produção da enzima fitase, uma importante característica para sua aplicação na produção de bebidas a base de cereais. Tais cepas apresentaram poucas diferenças fisiológicas entre si, quando submetidas à diferentes condições de estresse. Em relação aos testes genéticos, quando avaliadas quanto aos polimorfismos utilizando as técnicas de Rep-PCR e RAPD-PCR, as cepas apresentaram diferenças no perfil genético e de bandas em ambos os testes. As análises cromatográficas também sugerem uma diferença no perfil de compostos voláteis e não-voláteis produzidos pelas cepas em um meio de fermentação a base de milho, em 24 horas de fermentação. Portanto, as cepas selecionadas ao final desse estudo, apresentaram potencial uso para a produção de bebidas fermentadas a base de cereais de qualidade superior.

## REFERÊNCIAS

- AIDOO, K. E.; NOUT, M. J.; SARKAR, P. K. Occurrence and function of yeast in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**. 6:30–39. 2006.
- ALMEIDA, E. G.; RACHID, C. C.; SCHWAN, R. F. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Amerindians. **International Journal of Food Microbiology**. 120:146–151. 2007.
- AMBERG, D. C.; BURKE, D. J. Classical Genetics with *Saccharomyces cerevisiae*. **Cold Spring Harbor Protocols**. 413-421. 2016.
- ANTONI, D.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Biofuels from microbes. **Applied Microbiology Biotechnology**. 77:23–35. 2007.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. ; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**. 8 (7), 11155-63. 2008.
- BASSI, A. P. G. Tolerância ao estresse e características fermentativas de leveduras *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba. 2011.
- BEATO, F. B.; BERGDAHL, B.; ROSA, C. A.; FOSTER, J. GOMBERT, A. K. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: new insights into biodiversity and industrial applications. **FEMS Yeast Research**. 16(7). 2016.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M.; PANDIELLA, S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**. 36:527–543. 2003.
- BORNEMAN, A. R.; DESANY, B. A.; RICHES, D.; AFFOURTIT, J. P.; FORGAN, A. H.; PRETORIUS, I. S.; EGHOLM, M.; CHAMBERS, P. J. The genome sequence of

the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins. *FEMS Yeast Res.* 12 88–96. 2012.

BORNEMAN, A. R.; DESANY, B. A.; RICHES, D.; AFFOURTIT, J. P.; FORGAN, A. H.; PRETORIUS, I. S.; EGHOLM, M.; CHAMBERS, P. J. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics.** 7:e1001287. 2011.

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L. HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; TER SCHURE, E.; VAN BOVEN, A.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E. B. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology.** Mar 15; 154 (3): 87-97. 2012.

CAMPBELL-PLATT, G. Fermented foods - a world perspective. **Food Research International.** 27: 253. 1994.

CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S.; BEUCHAT, L. R. Nutritional improvement of cereals by fermentation. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 349-400. 1989.

CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; GRANDE-TOVAR, C.; CUERVO-MULLET, R.; DELGADO-OSPINA, J.; PAPARELLA, A. Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: The colombian heritage. **Comprehensive reviews in food science and food safety.** vol. 13. 2014.

CHELULE, P. K.; MOKOENA, M. P.; GQALENI, N. Advantages of traditional lactic acid bacteria fermentation of food in Africa. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**, v. 2, p. 1160-1167. 2010.

COT, M.; LORET, M. O.; FRANCOIS, J.; BENBADIS, L. Physiological behaviour of

*Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. **FEMS Yeast Research**. 7:22–32. 2007.

CROMIE, G. A.; HYMA, K. E.; LUDLOW, C. L.; GARMENDIA-TORRES, C. GILBERT, T. L.; MAY, P.; HUANG, A. A.; DUDLEY, A. M.; Fay, J. C. Genomic sequence diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* assessed by RAD-seq. **G3: Genes|Genomes|Genetics**. 3(12), 2163–2171. 2013.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.26, p. 767–778. 2007.

DE VUYST, L.; WECKX, S. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. **Journal of Applied Microbiology**. 121,5–17. 2016.

DJENI, N. T.; N' GUESSAN, K. F.; TOKA, D. M.; KOUAME, K. A.; DJE, K. M. Quality of attieke (a fermented cassava product) from the three main processing zones in Côte s'Ivoire. **Food Research International**. 44. 410-416. 2011.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabirola (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 36, 557–569. 2009.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G.; DURRENS, P.; CASAREGOLA, S.; LAFONTAINE, I.; et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**. 430 35–44. 2004.

EJIGUI, J.; SAVOIE, L.; MARIN, J.; DESROSIERS, T. Beneficial changes and drawbacks of a traditional fermentation process on chemical composition and antinutritional factors of yellow maize (*Zea mays*). **Journal os Biological Sciences**. 5: 590-596. 2005.

FARHAD, M.; KAILASAPATHY, K.; TAMANG, J. P. Health aspects of fermented foods. **Fermented Foods and Beverages of the World**, eds J.P. Tamang and K. Kailasapathy (New York, NY: CRC Press, Taylor and Francis Group), 391–414. 2010.

FARIA-OLIVEIRA, F.; DINIZ, R. H. S.; SANTOS, F. G.; PILÓ, F. B.; MEZADRI, H.; CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America. **Food Production and Industry**, Prof. Ayman Amer Eissa (Ed.), InTech. Capítulo 4. 2015.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p. 1998.

FOX, A. T.; THOMSON, M. Adverse reactions to cow's milk. **Paediatrics and Child Health**, 17(7), 288–294. 2007.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; DE ALMEIDA, E. G.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of yakupa, an indigenous beverage produced by Brazilian Amerindians. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 30:567-77. 2013.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**. 205: 31-36. 2001.

GOFFEAU, A.; BARREL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**. 274: 546, 563–567. 1996.

GRIFFITHS, D. W.; BIRCH, A. N. E.; HILLMAN, J. R. Antinutritional compounds in the *Brassicaceae*: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Invergowrie, v. 73, n. 1, p. 1-18. 1998.



GUEROLA, P. M. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. **Tesi Doctoral** (Doctor em Ciências Biológicas). Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Departamento de Biotecnología, Universitat de Valencia, Valencia. 190 p. 2006.

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

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.30, n.253, p.24-33. nov./dez. 2009.

GUPTA, S.; COX, S.; ABU-GHANNAM, N. Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats. **Biochemical Engineering Journal**. 52: 199-204. 2010.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA- GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 74:937-953. 2007.

HAMMES, W. P.; BRANDT, M. J.; FRANCIS, K. L.; SEITTER, R. F. H.; VOGELMANN, S. A. Microbial ecology of cereal fermentation. **Trends in Foods Science and Technology**. 16: 4-11. 2005.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E.; BORZANE, W.; SCHEMEDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. v.4. 523p. 2001.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications. **Frontiers in Microbiology**, 3, 421. 2012.

HIERRO, N.; GONZÁLEZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. New PCR based methods for yeast identification. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.792-801. 2004.

HOLM, P. B.; KRISTIANSEN, K. N.; PEDERSEN, H. B. Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. **The Journal of Nutrition**. 132:514S–516S. 2002.

HOU, J.; TYO, K. E.; LIU, Z.; PETRANOVIC, D.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**. 12(5), 491-510. 2012.

HOWSON, S. J.; DAVIS, R. P. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 5, p. 377-382, 1983.

HUTKINS, R. W. Microbiology and Technology of Fermented Foods. **Blackwell Publishing Ltd.**, U.S. 3–14. 2006.

JESPERSEN, L. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. **FEMS Yeast Research**. v. 3, n. 2, p. 191-200, 2003.

KAMDA, A. G. S.; RAMOS, C. L.; FOKOU, E.; DUARTE, W. F.; MERCY, A.; GERMAIN, K.; SCHWAN, R. F. In vitro determination of volatile compound development during starter culture-controlled fermentation of Cucurbitaceae cotyledons. **International Journal of Food Microbiology**. 192: 58-65. 2015.

KESHANI S, P. N.; SHARMA, K. D.; KANWAR, S. S. Molecular and functional diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains of traditional fermented foods of the North-Western Himalayas. **Annals of Microbiology**. 65: 2265–2275. 2015.

KIM, I. S.; KIM, Y. S.; KIM, H.; JIN, I.; YOON, H. S. *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 stress response during high-temperature ethanol fermentation. **Molecules and cells**. 35(3), 210-218. 2013.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food Science and Technology**. 37, 791–812. 2002.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945-959, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. *Princípios de Bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Coord). *Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*, v. 3. Cap. 1, São Paulo: **Editora Edgard Blucher**, p.1-40. 2001.

LITI, G.; CARTER, D. M.; MOSES, A. M.; WARRINGER, J.; PARTS, L.; JAMES, S. A.; DAVEY, R. P.; ROBERTS, I. N.; BURT, A.; KOUFOPANOU, V.; TSAI, I. J.; BERGMAN, C. M.; BENSASSON, D.; O'KELLY, M. J.; van OUDENAARDEN, A.; BARTON, D. B.; BAILES, E.; NGUYEN, A. N.; JONES, M.; QUAIL, M. A. GOODHEAD, I.; SIMS, S.; SMITH, F.; BLOMBERG, A.; DURBIN, R.; LOUIS, E. J. Population genomics of domestic and wild yeasts. **Nature**. 458 337–341. 2009.

MAGA, J. A. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, n. 1, p. 1-9. 1982.

MARSH, A. J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**. 38: 113-124. 2014.

MAYORAL, M. B.; MARTÍN, R.; SANZ, A.; HERNÁNDEZ, P. E.; GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, T. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in

yoghurt using a PCR-culture technique. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.27-34. 2005.

MELATTI, J. C. Índios do Brasil. Editora Hucitec, 48th edition. Hucitec, São Paulo, Brazil. 1983.

MIGUEL, M. G. D. C. P.; SANTOS, M. R. R. M.; DUARTE, W. F.; DE ALMEIDA, E. G.; SCHWAN, R. F. Physico-chemical and microbiological characterization of corn and rice ‘calugi’ produced by Brazilian Amerindian people. **Food Research International**. 49, 524–532. 2012.

MOREIRA, I. M.; MIGUEL, M. G.; DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. **Food Research International**. 54, 9–17. 2013.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CAMEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**. New York. v. 28, n. 6, p. 817-830. 2010.

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. 72:379–412. 2008.

NIELSEN, J. Metabolic engineering. **Applied Microbiology Biotechnology**. 55:263–83. 2001.

NIU, Y.; WAN, X. L.; ZHANG, X. H.; ZHAO, L. G.; HE, J. T.; ZHANG, J. F.; ZHANG, L. L.; WANG, T. Effect of supplemental fermented *Ginkgo biloba* leaves at different levels on growth performance, meat quality, and antioxidant status of breast and thigh muscles in broiler chickens. **Poult Science**. pew313. 2016.

NOUT, M. J. R.; MOTARJEMI, Y. Assessment of fermentation as a household

technology for improving food safety: a joint FAO / WHO workshop. **Food Control**. 8(5/6), 221–226. 1997.

NOUT, M. J. R. Rich nutrition from the poorest—Cereal fermentations in Africa and Asia. **Food Microbiology**. Elsevier. 685–692. 2009.

OSORIO-CADAVID, E.; CHAVES-LOPEZ, C.; TOFALO, R.; PAPARELLA, A.; SUZZI, G. Detection and identification of wild yeast in Champús, a fermented Colombian maize beverage. **Food Microbiology**. 25:771–777. 2008.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SOCCOL, V. T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**. 77(3):203–214. 2001.

PANEK, A. D. Yeast--100 years of contribution to biochemistry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 26(4):337-41. 1993.

PAPALEXANDRATOU, Z.; LEFEBER, T.; BAHRIM, B.; LEE, O. S.; DANIEL, H. M.; DE VUYST, L. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during wellperformed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. **Food Microbiology**. 35, 73–85. 2013.

PEREIRA, G. V.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Current state of research on cocoa and coffee fermentations. **Current Opinion in Food Science**. 7, 50–57. 2016.

PEYER, L. C.; ZANINI, E.; ARENDT, K. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based Beverages. **Trends in Food Science & Technology**. 2016.

POUTANEN, K.; FLANDER, L.; KATINA, K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. **Food microbiology**. v. 26, n. 7, p. 693-699, 2009.

POUTANEN, K. Past and future of cereal grains as food for health. **Trends in Food Science & Technology**, 25(2), 58–62. 2012.

RAINIERI, S.; ZAMBONELLI, C.; KANEKO, Y. *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, genetic diversity and evolution. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 96: 1–9. 2003.

REBELLATO, A. P.; BUSSI, J.; SILVA, J. G. S.; GREINER, R.; STEEL, C. J.; PALLONE, J. A. L. Effect of different iron compounds on rheological and technological parameters as well as bioaccessibility of minerals in whole wheat bread. **Food Research International**. 94, 65-71. 2017.

REED, G.; PEPLER, H. J. *Yeast Technology*. **Westport: The Avi**. 378p. 1973.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia agrícola**. Piracicaba, v. 56. n. 2. p. 255-263. ago. 1999.

ROMANO, P.; CAPECE, A.; JESPERSEN, L. Taxonomic and ecological diversity of food and beverages yeast. In: QUEROL, A.; FLEET, H. (Ed.) **Yeast in Food and Beverages**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. cap. 2. 40p. 2006.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**. Nov 15;79(1-2):3-16. 2002.

SANTOS, C. C. A. A.; ALMEIDA, E. G.; MELO, V. P.; SCHWAN, R. F. Microbiological and physicochemical characterisation of caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Juruna people of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. 156, 112–121. 2012.

SCHAASFSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **International Dairy Science**. 18(5), 458–465. 2008.

SCHWAN, R. F.; ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice–cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**. 7, 966–972. 2007.

SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In: Boekhout, T.; Robert, V. (Ed.). **Yeasts in Food**. Hamburg: Behr's Verlag. p. 426-459. 2003.

SCOTT, R.; SULLIVAN, W. C. Ecology os fermented foods. **Human Ecology Review**. v. 15. n. 1. 2008.

SHUKLA, S.; CHOI, T. B.; PARK, H. -K.; KIM, M.; LEE, I. K.; KIM, J. -K. Determination of non-volatile and volatile organic acids in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). **Food and Chemical Toxicology**, 48, 2005–2010.

SILVA-FILHO, E. A.; DOS SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; DE MORAES J. O. F.; MORAIS, J. R. M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenkoek** 88: 13–23. 2005.

SILVA, R. B. O. Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)** - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 145p. Rio Claro. 1994.

SINGH, A. K.; REHAL, J.; KAUR, A.; JYOT, G. Enhancement of attributes of Cereals by Germination and Fermentation: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 55, n. 11, p. 1575-1589. 2015.

SNOEK, I. S.; STEENSMA, H. Y. Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. 24:1-10. 2007.

STANBURY, P. F. Principles of fermentation technology. **Oxford: Butterwort Heinemann**. 356 p. 1995.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J. STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**. 109: 13-24. 2010.

STEENSELS, J.; SNOEK, T.; MEERSMAN, E.; NICOLINO, M. P.; OORDECKERS, K.; VERSTREPEN, K. J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**. 38(5):947-95. 2014.

STEINKRAUS, K. H. Fermentations in world food processing. *Comprehensive Rev. Food Science Food Safety* 1,23–32. 2002.

STEINKRAUS, K. H. Handbook of indigenous fermented foods. New York: Marcel Dekker. 1996.

TAMANG J. P. Diversity of fermented foods, In: Tamang JP, Kailasapathy K., editors. (Eds.) *Fermented Foods and Beverages of the World*, **CRC Press**, Taylor and Francis Group, New York, 41–84. 2010b.

TAMANG, J. P. *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages*. New York, NY: **CRC Press**, Taylorand Francis Group. 2015a.

TAMANG, J. P.; SHIN, D. -H.; JUNG, S. -J.; CHAE, S. -W. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. **Frontiers in Microbiology**, 7, 578. 2016.

TORIJA, M. J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILAMÓN, J. M.; MAS, A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. **Antonie van Leeuwenhoek**. 79 (3-4), 345-352. 2001.

TORREZAN, R.; FRAZIER, R. A.; CRISTIANINI, M. Efeito do tratamento sob alta pressão isostática sobre os teores de fitato e inibidor de tripsina de soja. **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. 28 (2): 179-86. 2010.



TORTORA, G; FUNKE, B. R; CASE, C. L. Microbiologia. 10ª. Ed. Porto Alegre: **Artmed**. 2012.

URBANO, L. H.; PINTO, P. H. M.; CABELO, C. Fermentação alcoólica com *Saccharomyces cerevisiae* em mosto aerado de hidrolisados de amido de mandioca. **Revista de Tecnologia**. Fatec-Ourinhos, v.4, n.1, p.122-141, jan./jun. 2011.

VALLEJO, J. A.; MIRANDA, P.; FLORES-FÉLIX, J. D.; SÁNCHEZ-JUANES, J. M.; GONZÁLES-BUITRAGO, J. M.; VELÁSQUEZ, E.; VILLA, T. G. Atypical yeasts identified as *Saccharomyces cerevisiae* by MALDI TOF MS and gene sequencing are the main responsible of fermentation of chicha, a traditional beverage from Peru. **Systematic Applied Microbiology**. 36:560-564. 2013.

VEIDE, J.; ANDLID, T. Improved extracellular phytase activity in *Saccharomyces cerevisiae* by modifications in the PHO system. **International Journal of Food Microbiology**. 108. 60: 67. 2006.

WALKER, G. M. Yeast physiology and biotechnology. London. **John Wiley and Sons Publishers**. p.250. 1998.

WANG, Q. M.; LIU, W. Q.; LITI, G.; WANG, S. A.; BAI, F. Y. Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. **Molecular Ecology** 21: 5404–5417. 2012b.

WEBSTER, J.; WEBER, R. Introduction to fungi. **Cambridge University Press**, New York. P 226-247. 2007.

WENGER, J. W.; SCHWARTZ, K.; SHERLOCK, G. Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**. 6: e1000942. 2010.

YEH-JIN, A.; LIN-WOO, K. A. Novel Approach to Investigating Protein/Protein Interactions and Their Functions by TAP-Tagged Yeast Strains and its Application to

Examine Yeast Transcription Machinery. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 18(4), 631–638. 2008.

ZHANG, X. H.; CAO, F. L.; SUN, Z. Y.; YU, W. W.; ZHAO, L.G.; WANG, G. B.; WANG, T. Effect of feeding *Aspergillus niger* fermented *Ginkgo biloba*-leaves on growth, small intestinal structure and function of broiler chicks. **Livestock Science**. 147:170–180. 2012.

ZHU, Y. O.; SHERLOCK, G.; PETROV, D. A. Extremely rare polymorfism in *Saccharomyces cerevisiae* allow inference of the mutational spectrum. **PLOS Genetics**. 13 (1). 2017.

**SEGUNDA PARTE**

**PHYSIOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION OF  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND SCREENING OF POTENTIAL  
STRAINS TO DEVELOP AN IMPROVEMENT FERMENTED CEREAL-  
BEVERAGE**

(O Capítulo 1 encontra-se nas normas da revista "Food Microbiology")

### Abstract

Different yeast strains, even belonging to the same species, may have different physiological and genetic characteristics, which make these microorganisms important industrially. The use of yeasts isolated from natural substrates and various fermentation processes can contribute to the development and improvement of fermented foods and beverages, increasing the use and diversification of these microorganisms in several processes. Thus, the objective of the present study was to characterize, physiologically and genetically, different *Saccharomyces cerevisiae* strains, isolated from different sources, and direct these remarkable strains for their use and improvement in the industrial production of fermented cereal-beverages. Initially, 81 indigenous *S. cerevisiae* strains isolated from *caxiri*, *kefir*, distilleries, cassava, apple fruit, fruit and cocoa fermentation were evaluated. Regarding the enzymatic analyzes, for amylase production, only CCMA 0708, isolated from *caxiri*, showed low activity for the amylase enzyme. For phytase, the strains analyzed presented differences for phytase production, an important characteristic for their application in the cereals beverages production, since phytate (or phytic acid) corresponds to an antinutrient compound. Twenty-eight positive strains selected in the phytase test presented few physiological differences between them when submitted to different stress conditions, such as high temperatures, different pH variations and osmolarities. Regarding genetic tests, evaluated for polymorphisms using Rep-PCR and RAPD-PCR techniques, the strains showed differences in the genetic profile and bands in both tests. In addition, the chromatographic analyzes suggest a difference in the profile of volatile and non-volatile compounds produced by the strains in a maize-based medium with 24 hours of fermentation. Therefore, the 12 strains selected at the end of this study had potential use in the production of non-alcoholic beverages based on cereals.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization. Phytase. rep-PCR. RAPD-PCR. Chromatography.

## 1. Introduction

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been extensively used as a model organism in eukaryotic studies, corresponding to the first eukaryote to have its genome fully sequenced (Goffeau et al., 1996). The easiness of manipulation and propagation led this microorganism to be used in several research areas. However, most of the *S. cerevisiae* yeast strains studied are concentrated in a small number of laboratory strains. Thus, in recent years, there has been increasing interest in the characteristics of natural isolates. The latter, can often have more advantageous biotechnological properties when compared to laboratory isolates (Cromie et al., 2013) and industrial isolates (Steensels et al., 2014).

The microorganism diversity associated with spontaneous and rudimentary fermentative processes constitutes an important source of microbial isolates with characteristics of industrial interest (Mussatto et al., 2010). *S. cerevisiae* has been used for many years in the elaboration of food and beverage products, mainly associated with fermentation processes (Beato et al., 2016). Among other functions, fermentation is carried out to improve the flavour, shelf life, texture and nutritional value of foods (Campbell-Platt, 1994; Nout & Mortarjemi, 1997; Nout, 2009).

The production of good quality fermented foods depends on the presence, growth and metabolism of different microorganisms. Thus, microorganisms confer differentiated characteristics on food through products derived from their own metabolism (Hutkins, 2006). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is closely associated with the food and fermented beverages production for human consumption, such as bread, chocolate, wine and beer (Scott & Sullivan, 2008; Faria-Oliveira et al., 2013).

Fermented foods and beverages can be produced from a variety of substrates, microorganisms and techniques (Aandoo et al., 2006). Cereals, in general, are used as dietary staples of different populations and a large portion of these foods is fermented prior to consumption, aiming at improving *flavor*, texture and longer shelf life and digestibility of the final product (Nout, 2009). In addition, cereals are considered as one of the most important sources of protein, carbohydrates, vitamins, minerals and dietary fiber fibers in the world (Poutanen, 2012).

In Latin America, the main products used in daily diet of the population are represented by cereals. Maize (*Zea mays*), for example, is a widely consumed cereal in

several countries, being an excellent energy source. However, this cereal can contain antinutritional factors, such as phytates and  $\alpha$ -amylase and trypsin inhibitors (Ejigui et al., 2005). These factors may interfere with the digestibility, absorption and nutrient utilization, and may reduce the nutritional value of various cereal-based foods (Griffiths et al., 1998; Singh et al., 2014).

The fermentative processes have been used to improve storage possibilities, increase the economic and nutritional value of final products derived from cereals, increasing the nutrients content as vitamins and amino acids (Steiner et al., 1997). In addition, fermentation has been attributed as a potential pathway to reduce the risk of mineral deficiency among populations, especially in developing countries (Kumar et al., 2010).

The yeasts, mainly the *S. cerevisiae* species, are stable microorganisms in the fermentation of cereal-based products (Chaves-L'opez et al., 2014), and can be used in many forms under different fermentation conditions. Further studies concerning on the physiology and genetics characterization of different *S. cerevisiae* strains are of great relevance, since strains of the same species may have different physiological and genetic characteristics (Beato et al., 2016). This present study is basis for the future selection and use of microorganism cultures with better performance in food products, including those produced from cereals. Thus, the objective of this study was to characterize, physiologically and genetically, strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, isolated from different sources, to obtain remarkable strains for their use and improvement in industrial fermented cereal-based beverages production.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Yeast strains**

The 81 indigenous *S. cerevisiae* strains used in this study were isolated from different sources, as summarized in Table 1 (Suppl. material). For this study, three commercial strains were used as reference: CCMA 0188 (PE-2), CCMA 0189 (CAT-1) and CCMA 0200 (UFLA CA-11). These strains belonging to the Culture Collection of Agriculture Microbiology (CCMA) of the Federal University of Lavras (Brazil) and were stored at -80 °C with 20% (v/v) glycerol.

Cells from the different strains were received in YPD medium plates (20 g L<sup>-1</sup> glucose, 10 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 20 g L<sup>-1</sup> peptone and 20 g L<sup>-1</sup> agar), propagated in liquid YPD medium at 28 °C until growth was observed. Cells were then stored at -20 °C in aliquots containing a final glycerol concentration of 20% (v/v) and in YPD medium plates. All experiments were started by transferring an aliquot directly from the YPD medium plates onto the surface of new solid YPD plates, which were incubated at 28 °C for 24h.

## 2.2. $\alpha$ -Amylase production assay

The purified cultures of the 81 strains of *S. cerevisiae* were streaked on YP agar plates containing 2,0% (w/v) of soluble starch as the only carbon source, as described in Ramos et al. (2015), with minor modifications. After incubation for 3 days at 28°C, the plates were flooded with iodine solution; the appearance of a clear zone around the colonies indicated enzyme secretion while the rest of the plate was stained blue-black. The assay was performed in triplicate. The positive strain (s) was selected and used for further tests. Two lactic acid bacteria (LAB) *Lactobacillus plantarum* CCMA 0743 and CCMA 0744, isolated from a fermented beverage "*caium*", were used as a positive control (Freire et al., 2017).

## 2.3. Phytase activity assay

Prior to the beginning of the phytase assay, the strains were carried out by modified YPD broth, with 0.5 g L<sup>-1</sup> of sodium phytate and the contents of glucose, yeast extract and peptone were reduced to 10, 2 and 4 g L<sup>-1</sup>, respectively to reduce the final phosphate content and to promote the enzyme synthesis, as described in Raghavendra and Halami (2009), with minor modifications. The cells were incubated for 24 h at 28 °C.

After the adaptation time, the total of 81 yeast strains isolated from different sources were tested for phytase production in solid medium as described in Ries e Macedo (2009), with modifications. The screening was carried out on agar plates containing sodium phytate as the sole phosphorus source. The culture medium was composed of (g L<sup>-1</sup>): glucose, 15; sodium phytate 0.5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3.0; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.5; KCl, 0.5; FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.001; MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 0.001; CaCl<sub>2</sub> 2.0 and agar 15, the pH

was adjusted to 4.5 and autoclaved at 121°C and 1 atm for 15 min. The inoculated plates were incubated at 28 °C for 24 h. Sodium phytate was acquired from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

After the incubation time, the colonies were washed from the agar surface using double distilled water and the petri plates were flooded with 2% (w/v) aqueous cobalt chloride solution (Bae et al., 1999). After 5 min of incubation at room temperature the cobalt chloride solution was replaced with a freshly prepared solution containing equal volumes of a 6.25% (w/v) aqueous ammonium molybdate solution and 0.42% (w/v) ammonium meta vanadate solution. Lastly, after more 5 min incubation, the ammonium molybdate/ammonium vanadate solution was removed, and the plates were examined for zone of phytate hydrolysis. The assay was performed in triplicate and phytase positive strains were selected for the following tests of this study.

## **2.4. Screening on agar plates for stressful conditions**

### *2.4.1. Thermotolerance*

The temperature tolerance test was performed according to Breisha (2010), with minor modifications, at 28 (control), 37 and 45 °C. Thermotolerance was determined by a qualitative test in solid media. Approximately  $10^7$  -  $10^8$  CFU ml L<sup>-1</sup> of the yeast strains were inoculated on YW medium plates (10 g L<sup>-1</sup> glucose, 3,0 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 5,0 g L<sup>-1</sup> peptone, 3,0 g L<sup>-1</sup> malte extract and 20 g L<sup>-1</sup> agar) for 3 days. The strains were considered thermotolerant when colonies were observed in the control plates and in the respective temperature with colony diameter equal to or greater than 0.5 mm. The assay was performed in triplicate.

### *2.4.2. Survival at different pH values*

*S. cerevisiae* strains were subjected to pH 2.0, 3.0, 5.0 and 6,5 (as control) for tolerance assay to select the resistant strains according to methodology described by Ramos et al., (2013), with modifications. Yeast cells cultivated in YPD broth at 28 °C for 24 h were centrifuged (8000 rpm for 10 min at 4 °C) and washed two times in 0.9% (w/v) saline solution pH 7.0. The cell cultures in saline solution, corresponding to approximately  $10^7$  -  $10^8$  CFU ml L<sup>-1</sup>, were centrifuged and resuspended in YPD broth



with pH adjusted to 2.0, 3.0 and 5.0, using 1N HCl and incubated for 24 h at 28 °C. The strains were subsequently inoculated on neutral pH YPD agar plates for 24 h at 28 °C to observe their growth (colony diameter equal to or greater than 0.5 mm). The assay was performed in triplicate.

#### 2.4.3. Osmolarity

The analysis of tolerance to glucose was performing according to Pereira et al., (2012), with minor modifications. Approximately  $10^7$  -  $10^8$  CFU ml L<sup>-1</sup> of the yeast was plated on basal medium (0,67 g L<sup>-1</sup> YNB and 20 g L<sup>-1</sup> agar), supplemented with 5, 15 and 30% glucose (wt/wt). A medium without a carbon source was used as a control. Growth was observed after 7 days at 28°C. Following the tolerance test to hypertonic solutions,  $10^7$  -  $10^8$  CFU ml L<sup>-1</sup> of the yeast was plated in YPD medium plate, supplemented with 0.5, 0.7 e 1.0 mol L<sup>-1</sup> of sodium chloride (NaCl), according to Rep et al., (2000), with modifications. Growth was observed after 3 days at 28 °C. The strain (s) was considered positive when the colony diameter was equal to or greater than 0.5 mm. A medium without supplementation of sodium chloride was used as a control. The both assays were performed in triplicate.

### 2.5. Assessing genetic intraespecific diversity

#### 2.5.1. Rep - PCR analysis

One hundred micrograms (µg) of genomic DNA extracted from the pure cultures of the selected phytase positive *Saccharomyces cerevisiae* strains were typed, firstly, at strain level using repetitive extragenic palindromic (Rep-PCR) technique using a (GTG)<sub>5</sub> primer (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') as described in Versalovic et al. (1994), with modifications. Amplifications were performed in a final volume of 25 µL containing 12.5 µL of TopTaqMaster Mix® Taq DNA polymerase (Qiagen), 1.5 µL of (GTG)<sub>5</sub> primer (20 pmol), 10.5 µL Milli-Q water and 0.5 µL of DNA. The PCR reactions were repeated three times to confirm the generated fingerprints. The PCR protocol was as follows: initial denaturation at 94 °C for 4 min, 31 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 45 °C for 1 min and primer

elongation at 65 °C for 8 min. The final elongation step was performed at 65 °C for 16 min, after which the samples were cooled to 4°C. PCR products were electrophoresed in 2.0% (w/v) agarose gels in 1X TAE at 80 V for 3 h. DNA markers GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) were run along with the samples as a reference. The rep-PCR profiles were normalized, and cluster analysis was performed using Bionumerics 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

### 2.5.2. RAPD - PCR analysis

Regarding the RAPD- PCR analysis, 15 decamer oligonucleotides were employed based on previous studies. These primers were screened on a subset of 3 yeast strains to select the most discriminative and reliable RAPD primers. One primer, OPL 07, resulting in distinct, reproducible polymorphic bands and was selected for further analysis. RAPD- PCR analysis was performed as describe in Silva et al. (1995), with modifications. For RAPD analysis, amplification reactions were prepared as above contained a final volume of 25 µL containing 12.5 µL of TopTaqMaster Mix® Taq DNA polymerase (Qiagen), 1.5 µ L of (GTG)<sup>5</sup> primer (20 p mol<sup>-1</sup>), 10.5 µL Milli-Q water and 0.5 µL of DNA.

For the PCR, an initial template denaturation at 94°C for 1 min was followed by 40 cycles of denaturation at 93°C for 45 seconds, primer annealing at 35°C for 1 min, and primer elongation at 74°C for 3 min. The final elongation step was increased to 10 min, after which the samples were cooled to 4°C. PCR products were electrophoresed in 1.5% (w/v) agarose gels in 1X TAE at 80 V for 2 h. DNA markers GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) were run along with the samples as a reference. The RAPD-PCR profiles were normalized, and cluster analysis was performed using Bionumerics 6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

## 2.6. Fermentation substrate for a cereal-based medium resembling a maize fermented-beverage

The substrate for controlled fermentation assays was prepared based on the Brazilian indigenous beverage *calugi* (Miguel et al., 2012), with some modifications. One substrate, containing only maize, was prepared with approximately 700 g of dried maize (*Zea mays*). First, maize grains were soaked in water for 30 min and then

macerated to a flour. The resulting maize flour was mixed with 3 L of filtered water and sieved to remove the peel. The mixture was placed in a stainless-steel pan to be cooked for approximately 1 h after boiling; the mixture was stirred every 10 min until it reached the texture like a watery porridge. When the porridge had cooled, the inoculum was added and allowed to ferment at 28 °C for 48 h. The maize was purchased from a local market in Lavras, Minas Gerais, Brazil.

## **2.7. Fermentation assay and sampling**

For all phytase positive strains, the fermentation assay was performed using a 500-mL Erlenmeyer flask containing 150 mL of the maize-based medium substrate, inoculated with the respective strain (population of  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) and be allowed to ferment at 28 °C for 48 h. A control assay was performed without inoculation. Samples (5 mL) were taken at 0 (zero), 24 e 48 h of fermentation and were maintained at -20 °C for subsequent analysis. The fermentation assay was performed in duplicate.

## **2.8. Substrates and metabolites analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC)**

Organic acids (oxalic, citric, tartaric, malic, succinic, lactic, acetic, propionic, butiric and isobutiric acids), alcohol (ethanol and glycerol) and carbohydrates (glucose and fructose) analysis was performed as described by Duarte et al. (2010), with modifications. A Shimadzu liquid chromatography system (Shimadzu Corp., Japan), equipped with a dual detection system consisting of a UV–Vis detector (SPD 10Ai) (for acids) and a refractive index detector (RID-10Ai) (for alcohol and carbohydrates) was used. A Shimadzu ion exclusion column, Shim-pack SCR-101 H (300 mm× 7.9 mm i. d, 10 µm) made by a combination of gel filtration and ligand exchange was used at an operating temperature of 30 °C for alcohol and carbohydrates and 50 °C for acids, with a mobile phase of perchloric acid (pH 2.1.) at flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup>. All samples were analyzed in triplicate.

## **2.9. Volatile organic compounds extraction and gas chromatography coupled to mass spectrophotometry (GC-MS) analysis**

Before GC-MS analysis, the volatile compounds of the samples were extracted using the HS-SPME technique, as described in Duarte et al., (2010), with minor modifications. Briefly, the fermented samples (2.0 mL) from the beginning and final of fermentation (0h and 24h) were analyzed. The divinylbenzene /carboxen/ polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30 mm SPME fiber (Supelco Co., Bellefonte, PA, U.S.A.) was used to extract volatile constituents from the samples headspace. The fiber was balanced for 15 min at 60 °C and then exposed to the samples (0h and 24h) for 30 min at the same temperature.

The equipment used was Shimadzu GC model QP2010 equipped with a mass spectrometry (MS) and a capillary column of silica CarboWax (25 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm). The temperature program began with 5 min at 50 °C, followed by a gradient of 50 °C to 200 °C at 10 °C/min; the temperature was then maintained at 200 °C for 10 min. The injector and detector temperatures were maintained at 230 °C.

The carrier gas (helium) was used at a flow rate of 2.04 mL/min. The fibers were exposed for 2 min. Volatile compounds were identified by comparing the mass spectra of the compounds in the samples with the database (NIST library) and the retention time with literature data using the n-Alkane index. All samples were examined in duplicate.

## **2.10. Statistical analysis**

Data obtained from all analysis were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Tukey's test. Differences in values were considered significant when the *p* value was <0.05. The statistical analyses were performed using the Sisvar 5.3 software (Federal University of Lavras, Department of Statistic, Lavras, MG, Brazil).

## **3. Results and discussion**

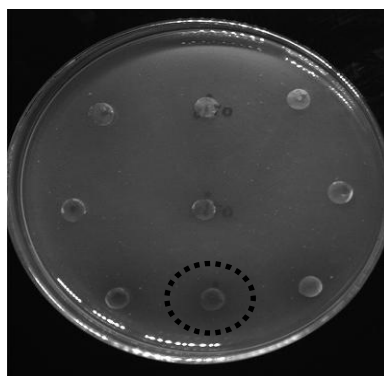
### **3.1. Enzymes activities**

Amylolytic activity was qualitatively determined for all the 81 *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different sources (*caxiri*, cauim, kefir, apple fruit, cassava, distilleries and cocoa fruit and cocoa fermentation). The yeast strain CCMA 0708, isolated from the indigenous fermented-beverage *caxiri*, was the only one to show

positive amylase activity in the medium tested, with halo formation about 2 mm (data not shown). The amylolytic capacity of this yeast strain suggest its role in breaking down of maize starch to simple sugars for their use in fermentation process (Omemu et al., 2007).

Commonly, *S. cerevisiae* is known to have no activity of the amylase enzyme (Birol et al., 1998; Cripwell et al., 2017). Meanwhile, Omemu et al. (2007) reported amylase activity for 2.60% of *S. cerevisiae* strains (77 isolated) isolated from *ogi*, a fermented-beverage made from maize. Also, Medonza et al. (2017), in their study of yeast diversity during the fermentation of *chicha*, an alcoholic indigenous fermented-beverage, found amylase positive activity for 28% of *S. cerevisiae* strains isolated of the study (about 359 isolated). From this current study, the positive amylase strain was provided from an indigenous fermented-beverage, which can helps to support that yeasts isolated from natural environments can present advantageous properties for their promising future use in industry (Cromie et al., 2013).

Eighty-one yeasts of *S. cerevisiae* strains isolated from different sources were also screened for their phytate degradability using a medium with sodium phytate supplemented with calcium chlorid. Phytase production in solid media can be visualized in Fig.1, showing a soft clear halo of phytate hidrolisis around the zone of growth, after 24 h of incubation.



**Fig 1:** Screening for potential hydrolyzing phytase in *Saccharomyces cerevisiae* strains in solid media with translucent halo of hydrolysis originated by phytase production.

The initial screening for phytase activity revealed some differences between the strains tested. For all of them, a feature analyzed was the phytate hydrolysis intensity as the evidenced by the dimension of the transparent halo produced, and a possible relationship with enzyme concentration (Ries and Macedo, 2009). Table 2 shows the intensity of the hydrolysis produced by the strains in 24 h at 28 °C, being indicated by

signs going from (-) to (++) , representing the absence of hydrolysis and hydrolysis between 1.0 and 2.0 cm, respectively. None of the strains isolated from cocoa fruit and cocoa fermentation showed any phytase capacity in the medium tested.

All *S. cerevisiae* strains presented particularly vigorous growth on solid medium containing phytate, and a vigorous capacity for phytate hydrolysis. Thereby, 25 strains (about 31%) showed some phytase activity, these strains were isolated from indigenous fermented-beverage *caxiri* and *kefir*, apple fruit, cassava and distillery (an ethanol production unit). Of these, 16 strains (about 19%) displayed a translucent zone whose diameter was narrower than 1.0 cm and only 9 strains (about 11%) showed greater hydrolytic capacity, with a translucent zone between 1.0 and 2.0 cm.

**Table 2:** Phytase production and phytate hydrolysis in 24 h at 28 °C and the source of the strains.

STRAIN	SOURCE	PHYTASE ACTIVITY
CCMA 0708	<i>Caxiri</i>	-* <sup>1</sup>
CCMA 0188	Distillery	-*
CCMA 0200	Distillery	-*
CCMA 0706	<i>Caxiri</i>	++
CCMA 0707	<i>Caxiri</i>	++
CCMA 0711	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0712	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0714	<i>Caxiri</i>	++
CCMA 0718	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0720	<i>Caxiri</i>	++
CCMA 0721	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0722	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0723	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0724	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0725	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0726	<i>Caxiri</i>	++
CCMA 0730	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0731	<i>Caxiri</i>	++
CCMA 0732	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0230	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0231	<i>Caxiri</i>	+
CCMA 0494	<i>Kefir</i>	++
CCMA 0501	<i>Kefir</i>	+
CCMA 0503	<i>Kefir</i>	+
CCMA 0508	<i>Kefir</i>	+
CCMA 0525	Apple fruit	++
CCMA 0189	Distillery	++
CCMA 0228	Cassava	+

-\*: absence of hydrolysis, used in this study as reference strains; -\*<sup>1</sup>: used in this study as reference strain because it was the only strain that presented some activity for amylase; +: hydrolysis diameter  $\leq$  1.0 cm, ++: 1.0 cm < hydrolysis diameter < 2.0 cm.

In this study, phytase activity was estimated by the relative extension of the translucent halo produced by the sodium phytate hydrolysis process. This process was related to phytase enzyme activity by the strains. Sano et al. (1999) and Ries and

Macedo (2009) had already established a similar relationship for phytase production by yeasts. Thus, selection of suitable phytase-active strains with high constitutive phytase activity for cereal fermentation will adequately degrade phytate and may potentially improve the bioavailability of iron, zinc and other metals in, for instance, cereal-based foods and beverages (Hellström et al., 2010; Ogunremi et al., 2017). In particular, strains like this might be valuable in countries with the widely occurrence of indigenous *S. cerevisiae* in fermented foods and beverages (Andlid et al., 2004). In this study, such strains were used as selection criteria for the following tests. The sole amyolytic positive strain CCMA 0708, was the only strain that presented some activity for amylase, so it was stated to direct this strain until the last analysis of this study, even though it was negative for phytase enzyme activity.

### **3.2. Tolerance of *S. cerevisiae* strains to different stress factors**

*Saccharomyces cerevisiae* has been chosen for industry over the centuries because it is physiologically adapted to unfavorable conditions (Attfield, 1997). Table 3 shows the list of strains according to their behavior under different growth conditions, such as different temperatures (28, 37 and 42 °C), different pH range (2.0, 3.0, 5.0 and 6.5), glucose concentrations (5, 15 and 30%) and NaCl concentrations (0.5, 0.7 and 1 mol L<sup>-1</sup>).

**Table 3:** Stressful conditions evaluated in this study: temperature, pH and osmolarity for all the 28 phytase positive strains.

STRAIN	TEMPERATURE (°C)			GLUCOSE (%)			NACL (mol L <sup>-1</sup> )			pH		
	28	37	42	5	15	30	0.5	0.7	1.0	2.0	3.0	5.0
CCMA 0706	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
CCMA 0707	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
CCMA 0708	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0711	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
CCMA 0712	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0714	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0718	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0720	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
CCMA 0721	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
CCMA 0722	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0723	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0724	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0725	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
CCMA 0726	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
CCMA 0730	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
CCMA 0731	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CCMA 0732	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0228	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0230	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0231	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
CCMA 0188	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CCMA 0189	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CCMA 0200	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CCMA 0494	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CCMA 0501	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CCMA 0503	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CCMA 0508	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CCMA 0525	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

For all the 81 *S. cerevisiae* strains the maximum growth temperature was 28 and 37°C, none strain analyzed could growth at 42 °C. Instead was observed for pH, all the strains analyzed were able to grow in the three pH ranges. It means that the strains tolerated the pH ranges of a typical fermented-beverage fermentation process (from pH 2.0 to pH 5.0). All the isolates exhibited a remarkable ability to grow in the presence of 5%, 15 and 30% of glucose. For NaCl, CCMA 0731 (from *caxiri*); CCMA 0189 and CCMA 0200 (both from distillery); CCMA 0494, CCMA 0501, CCMA 0503 and CCMA 0508 (all of them from *kefir*) and CCMA 0525 (from apple fruit) presented an efficient growth in up to 1.0 mol L<sup>-1</sup> of sodium chloride. The ability to adapt to changes



in the osmolarity of the surrounding medium is fundamental to life, and the accumulation of compatible solutes to decrease intracellular water potential is an adaptation strategy employed by all cell types (Rep et al., 2000).

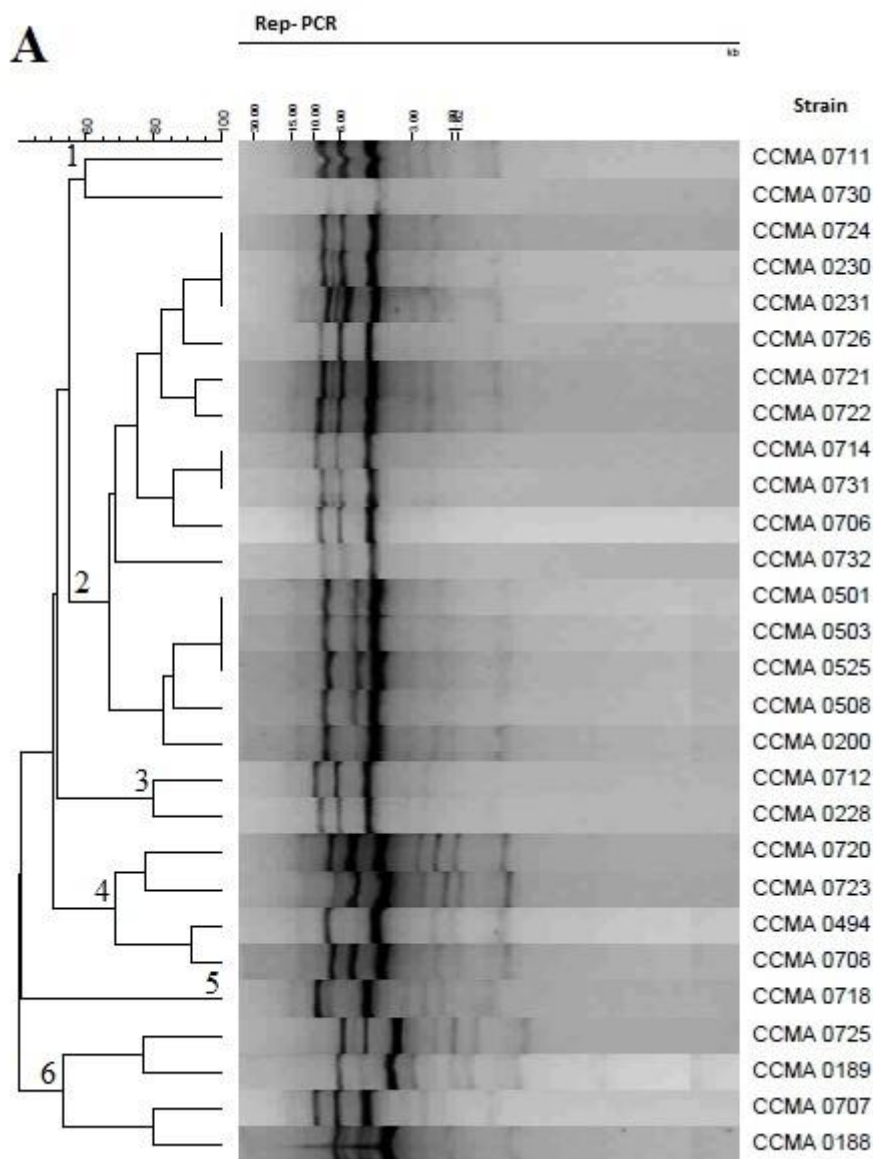
After all these stressful conditions that the strains were submitted, we observed that most of them could grow in a good temperature range required for a fermentative process. In addition, all strains tested were able to grow at high glucose concentrations and at a wide range of pH change. For NaCl, 8 phytase positive strains could grow in high salt concentrations (about 28.5% of the strains). These results suggest that these strains were well adapted to adverse conditions.

Industrial fermentation processes demand multiple stressful conditions (*e.g.*, temperature, ethanol concentration and osmotic pressure) on yeast that affect its performance and kinetics during fermentation process (Fleet, 2008). Therefore, suitable yeast strains are an important factor to obtain success in productivity. Stressful conditions affect yeast cell metabolism, leading to loss of cell viability and fermentation ability. Furthermore, the resistance to stress conditions is strain-dependent (Ramos et al., 2013).

### **3.3. Assessing intraespecific genetic biodiversity of the indigenous yeasts**

*S. cerevisiae* phytase positive strains (25 strains), one amylase strain (CCMA 0708) and two reference strains, CCMA 0188 and CCMA 0200, were further investigated. Six clusters were identified for *S. cerevisiae* for rep-PCR analysis, with a relatively low homology (Fig. 2). This indicates an overall biodiversity among the different strains of this specie. The strains could generally group according to the type of source they were isolated from. Cluster 1 and 5 were predominantly composed of strains isolated exclusively from *caxiri*, while the other clusters were mainly composed by strains isolated from *caxiri* and the other sources (Fig. 2). Clusters 3, 4 and 5 contained strains isolated from *caxiri* and cassava, kefir and distillery, respectively. Cluster 2, most diverse group, contains strains isolated from several substrates, in descending order: *caxiri* (about 53%), *kefir* (about 20%), cassava (about 13%), apple fruit and distillery (both 7% each). None of the identified clusters grouped strains isolated only from one single substrate, except cluster 5, with a single representative member CCMA 0718, isolated from *caxiri*. Rep-PCR using (GTG)<sub>5</sub> primer was successfully used for identification and characterization of different yeasts, including *S.*

*cerevisiae* (Nielsen et al., 2007; Crauwels et al., 2014; Ramírez-Castrillón et al., 2014; Pereira et al., 2017).

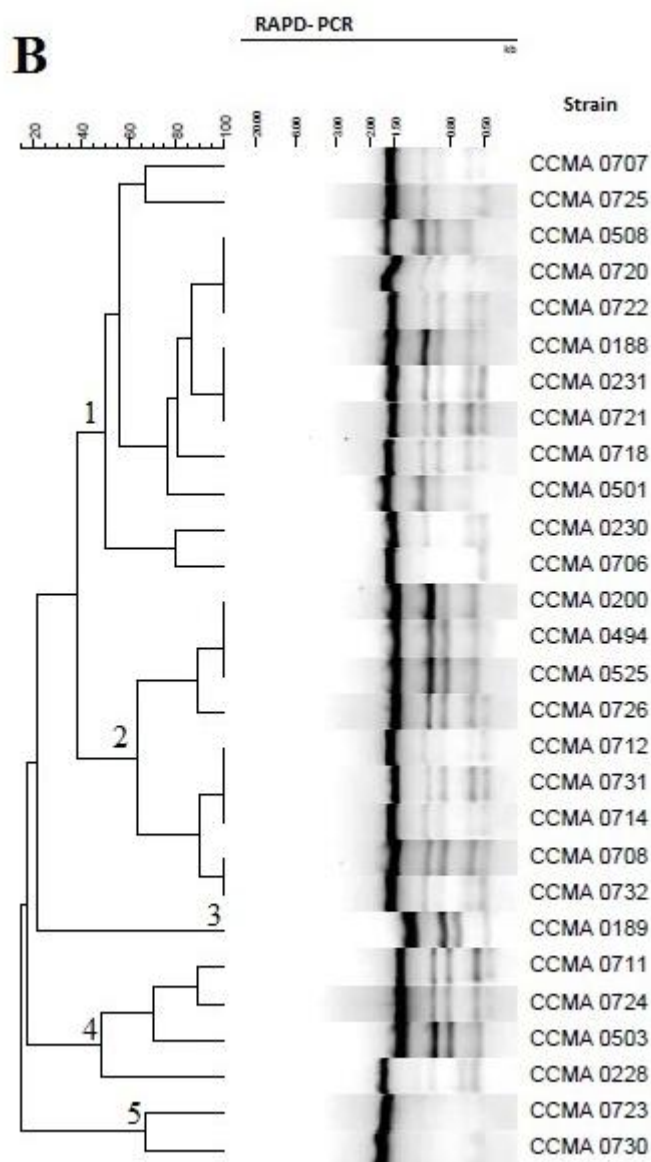


**Fig. 2:** Intra-specific characterization of 28 strains of *Saccharomyces cerevisiae* assessed by Rep-PCR profiles. Dendrogram generated after cluster analysis of the digitized Rep-PCR fingerprints of the strains. The clusters are indicated by numbers (1 to 6). Strain codes are reported.

In relation to RAPD-PCR analysis, from the 15 primers tested initially, only 2 showed polymorphic bands: OPM 04 and OPL 07. However, the latter one presented a greater number of bands, and was the chosen one used for the subsequent analysis. The other primers did not amplify probably due to the lack of homology (data not shown).

The protocol used for RAPD-PCR technique revealed that all yeast strains assayed were a little unlike each other. As can be seen in Fig. 3, 5 clusters could be identified for *S. cerevisiae*. Cluster 3 and 5 were composed for strains isolated exclusively from the distillery and *caxiri* source, respectively. Strains isolated from *caxiri* and *kefir* could be observed in clusters 1, 2 and 4. In these last clusters, strains from cassava, apple fruit and distillery were also present. Cluster analysis revealed a clear distinction between *S. cerevisiae* strains. In addition, when the 2 tests were compared, rep-PCR and RAPD-PCR, they did not show any congruence between them.

The results of the molecular characterization highlighted that the fermentation method had an important impact on the biodiversity of *S. cerevisiae*. Furthermore, the intraspecific characterization could be probably correlated to the capability of strains to better adapt to the stress conditions, which characterize the process (Visintin et al., 2016).



**Fig. 3:** Intra-specific characterization of 28 strains of *Saccharomyces cerevisiae* assess by RAPD-PCR profiles. Dendrogram generated after cluster analysis of the digitized RAPD-PCR fingerprints of the strains. The clusters are indicated by numbers (1 to 5). Strain codes are reported.

### 3.4. Chromatographics analysis

The *S. cerevisiae* strains that had better performance in the test of phytase activity (intensity of the hydrolysis produced by the strains indicated by a sign ++) were used for the chromatographic tests. The results of the carbohydrates consumption by HPLC analysis are presented in Table 4. The carbohydrates identified included glucose and fructose.

**Table 4:** Glucose and fructose consumption ( $\text{g L}^{-1}$ ) for the strains in 24 and 48 hours of fermentation.

STRAIN	GLUCOSE		FRUCTOSE	
	24h	48h	24h	48h
CCMA 0706	$0.326 \pm 0.002$	$0.326 \pm 0.03$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0707	$0.370 \pm 0$	$0.370 \pm 0$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0714	$0.370 \pm 0$	$0.370 \pm 0$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0720	$0.358 \pm 0.002$	$0.344 \pm 0$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0726	$0.370 \pm 0$	$0.370 \pm 0$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0731	$0.337 \pm 0$	$0.329 \pm 0.002$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0189	$0.370 \pm 0$	$0.370 \pm 0$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0494	$0.370 \pm 0$	$0.370 \pm 0$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0525	$0.370 \pm 0$	$0.370 \pm 0$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0708	$0.343 \pm 0$	$0.321 \pm 0.001$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0188	$0.370 \pm 0$	$0.370 \pm 0$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$
CCMA 0200	$0.370 \pm 0$	$0.370 \pm 0$	$0.613 \pm 0$	$0.613 \pm 0$

At T0 h, glucose and fructose concentration were 0.370 g/L and 0.613 g/L, respectively. Fructose and glucose were detected at the beginning of fermentation for the 12 *S. cerevisiae* strains but at 24 h fermentation, the amount of glucose and fructose was close to zero or zero, respectively, indicating that they were rapidly consumed by the yeast strains inoculated in the medium.

The alcohols identified by HPLC were glycerol and ethanol (Table 5). Ethanol and glycerol are some of the main fermentation products by yeasts (Swiegrs et al., 2005). For all of strains, glycerol had an increase in their concentration observed up to 24 h. With 48 h of fermentation, for the majority of strains, the glycerol concentration started to decrease, except for CCMA 0189 and CCMA 0494. These strains showed a low increase on glycerol concentration (Table 5). For fermented-beverages, glycerol is a compound produced during normal yeast metabolism or when yeasts are confronted with stress conditions. Furthermore, glycerol may contribute desirable viscosity to fermented beverages (Berry, 1984).

Ethanol was detected in all assays, the strains evaluated were able to produce ethanol from a few fermentable sugars present in the maize-based fermentation medium. CCMA 0706 was the one that produced most ethanol (0.841 g/L). Thus, the alcoholic concentrations for the 12 strains evaluated in this study are below 5 g/L, which suggests that a possible beverage produced by these strains could fit as non-alcoholic beverage

(Brazil, 2009). The ethanol consumption could be observed from 48 h of fermentation for all the strains.

**Table 5:** Glycerol and ethanol production ( $\text{g L}^{-1}$ ) for the strains in 24 and 48 hours of fermentation.

STRAIN	GLYCEROL		ETHANOL	
	24h	48h	24h	48h
CCMA 0706	0.124 ± 0	0.062 ± 0.002	0.841 ± 0.008	0.826 ± 0.009
CCMA 0707	0.096 ± 0.009	0.046 ± 0	0.637 ± 0.005	0.464 ± 0.002
CCMA 0714	0.041 ± 0.001	0.022 ± 0	0.387 ± 0	0.370 ± 0
CCMA 0720	0.067 ± 0.006	0.032 ± 0	0.548 ± 0.002	0.384 ± 0.002
CCMA 0726	0.089 ± 0.001	0.057 ± 0.002	0.603 ± 0.012	0.350 ± 0
CCMA 0731	0.059 ± 0.003	0.072 ± 0.002	0.621 ± 0.004	0.612 ± 0.002
CCMA 0189	0.072 ± 0.006	0.072 ± 0	0.529 ± 0.001	0.590 ± 0.004
CCMA 0494	0.002 ± 0	0.006 ± 0	0.643 ± 0.004	0.580 ± 0
CCMA 0525	0.031 ± 0.001	0.023 ± 0.004	0.488 ± 0.004	0.347 ± 0
CCMA 0708	0.082 ± 0.005	0.064 ± 0	0.585 ± 0.001	0.404 ± 0.002
CCMA 0188	0.038 ± 0	0.015 ± 0.002	0.506 ± 0	0.321 ± 0
CCMA 0200	0.007 ± 0.063	0 ± 0	0.569 ± 0.001	0.231 ± 0.014

The chemical analysis results showed variations of concentration for different compounds during the fermentation processes of the strains selected in this study (Suppl. material Table 7). Oxalic, citric, tartaric, malic, succinic, lactic and acetic acids were measured during the fermentation. These metabolites, even they are produced by yeast in much lower concentrations compared with ethanol and glycerol, they are one of the main important flavours constituents in fermented beverages (Walker and Stewart, 2016). Propionic, butyric and isobutyric acids were evaluated, but were not detected in none of the samples.

Organic acids occur in fermented products as a result of hydrolysis, biochemical metabolism and microbial activity. Thus, the quantitative determination of organic acids in fermented products is important for nutritional, sensorial and microbial reasons (Blandino et al., 2003; Miguel et al., 2012). For all acids analyzed, only tartaric and acetic acids were not present at the beginning of fermentation. These acids were not detected in fermentation for most of the strains. Except for CCMA 0707 and CCMA 0188, tartaric acid were detected in a concentration of  $0.207 \text{ g L}^{-1}$  and  $0.225 \text{ g L}^{-1}$ , respectively. For acetic acid, the production is closely dependent on the initial sugar

level in the medium. The higher amount of sugar content in the fermentation medium, more acetic acid the yeast will produce (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Other acids identified in greater quantity by HPLC in fermentation of the selected strains were citric, malic and lactic acids. The highest concentration of malic and lactic acids measured were 0.080 g L<sup>-1</sup> for CCMA 0731 in 48 h of fermentation and 0.145 g L<sup>-1</sup> for CCMA 0720 in 24 h of fermentation. According to Duarte et al. (2009) high levels of malic acid can influence negatively the sensory quality of the beverages. The small lactic acid concentration increase during fermentation can be related to the present of lactic acid bacteria contaminants in the medium, since the substrate in the present study was cooked therefore not been completely sterilized. This behavior had already been observed in other studies, where lactic acid bacteria are the major contaminants in industrial processes without sterilization (Dorta et al., 2006; Baek et al., 2017). Succinic acid concentrations remained constant and at low concentrations during the fermentation process for all strains. For citric acid, the highest measured was 0.222 g L<sup>-1</sup> for CCMA 0708 in 24 h of fermentation. These compounds contribute in a beneficial way to the astringency of fermented beverages (Walker & Stewart, 2016).

The pH was measured at the beginning (substrate), 24h and 48h of fermentation. At time zero (T0) the pH value was 6.5. At 24 h and 48 h of fermentation, the pH values were between 5.0 - 5.6. In fermentation, the decrease of pH is due to hydrolysis of carbohydrates which is followed by organic acids production (Yao et al., 2009; Roger et al., 2015). In this present study, there was minimal pH variation during the fermentative process, which may have been promoted by low carbohydrate concentration available for the process.

Sixty-five volatile compounds including alcohols, ketones and aldehydes, alkanos, esters, phenolic compounds, acids and other compounds were detected by GC-MS in the fermentation produced with selected *S. cerevisiae* strains (Suppl. material Table 7). Alcohols were the most abundant with 17 compounds, followed by ketonas and aldehydes with 13, alkanes with 9, then esters and phenolic compounds with 6 each, acids with 1 and 13 for other compounds. Important flavor compounds, for instance, alcohols and esters, were detected in all fermented samples.

Yeasts produce long-chain and complex alcohols. These compounds and their derived esters have interesting flavour properties. One of the most relevant aroma-related alcohols is phenylethyl alcohol, which possesses a rose-like odor (Longo & Sanróman, 2006; Freire et al., 2017). In general, esters are correlated to fruity and floral

flavors, while acids are considered undesirable compounds which can confer unpleasant odors (*e.g.* fatty, rancid flavors, sweat and pungent) (Luna et al., 2002; Frauendorfer et al., 2008). The ketones, as 2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione and isophorone, detected in all samples, are aromas used in a wide range of flavoring applications, particularly those associated with floral and fruit flavors (Hagedorn & Kaphammer, 1994).

All 12 *S. cerevisiae* strains analyzed generated a similar and interesting pattern of volatile compounds. Interestingly, in the present study it could be observed that, independently of the sources and the physiological and genetic characteristics observed, the performance in the fermentation process was similar for the strains (similarities in the consumption of sugars, acid and alcohol production and production of volatile compounds). Among the 81 strains initially used, 9 strains were presented as potentials for the production of non-alcoholic beverages based on cereals.

#### **4. Conclusion**

The results obtained in this study can help to deepen our knowledge about important characteristics of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from various sources and select those with biotechnological potential. The physiological characterization has clearly shown that the strains were either able or not to endure different stress conditions. Besides, additional information about enzymatic activities, carbohydrates consumption, alcohol, acids and volatile compounds production can improve the potential impact of these strains in the fermentation process. Comprehensive studies focused on these parameters should be considered when choosing the superior strains to develop an improved fermented cereal-beverage.

#### **Acknowledgements**

We are grateful for the financial support of this work to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## References

- AIDOO, K. E.; NOUT, M. J.; SARKAR, P. K. Occurrence and function of yeast in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**. 6:30–39. 2006.
- ANDLID, T. A.; VEIDE, J.; SANDBERG, A. S. Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. 97. 157–169. 2004.
- ATTFIELD, P. V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**. 15:1351-1357. 1997.
- BAE, H. D.; YANKE, L. J.; CHENG, K. J.; SELINGER, L. B. A novel staining method for detecting phytase activity. **Journal of Microbiological Methods**. 39, 17–22. 1999.
- BAEK, S. H.; KWON, E. Y.; BAE, S. J.; CHO, B. R.; KIM, S. Y.; HAHN, J. S. Improvement of D-Lactic Acid Production in *Saccharomyces cerevisiae* Under Acidic Conditions by Evolutionary and Rational Metabolic Engineering. **Biotechnology Journal**. 12 (10). 2017.
- BEATO, F. B.; BERGDAHL, B.; ROSA, C. A.; FOSTER, J. GOMBERT, A. K. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: new insights into biodiversity and industrial applications. **FEMS Yeast Research**. 16(7). 2016.
- BERRY, D. R. Physiology and microbiology of Scotch whisky production. **In Progress in Industrial Microbiology**. Bushell, M.E., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. Volume 19, pp. 199–243. 1984.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M.; PANDIELLA, S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**. 36:527–543. 2003.

- BIROL, G.; ÖNSAN, Z. I.; KIRDAR, B.; OLIVER, S. G. Ethanol production and fermentation characteristics of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains grown on starch. **Enzyme and Microbial Technology**. 22:672–677, 1998.
- BRASIL. DECRETO N° 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Legislação Bebidas. Presidência da República. (2009). [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato20072010/2009/Decreto/D6871.htm2010/2009/Decreto/D6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato20072010/2009/Decreto/D6871.htm2010/2009/Decreto/D6871.htm) ./ (web archive link, 20 February 2018). (Accessed 20.02.2018).
- BREISHA G. Z. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. **Biomass Bioenergy**. 34:1243-1249. 2010.
- CAMPBELL-PLATT, G. Fermented foods - a world perspective. **Food Research International**. 27: 253. 1994.
- CHAVES-LÓPES, C.; SERIO, A.; GRANDE-TOVAR, C.; CUERVO-MULLET, R.; DELGADO-OSPINA, J.; PAPARELLA, A. Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: The colombian heritage. **Comprehensive reviews in food science and food safety**. vol. 13. 2014.
- CRAUWELS, S.; ZHU, B.; STEENSELS, J.; BUSSCHAERT, P.; SAMBLANX, G. D.; MARCHAL, K.; WILLEMS, K. A.; VERSTREPEN, K. J.; LIEVENS, B. Assessing Genetic Diversity among *Brettanomyces* Yeasts by DNA Fingerprinting and Whole-Genome Sequencing. **Applied Environmental Microbiology**. 80. 4398-4413. 2014.
- CRIPWELL, R. A.; ROSE, S. H.; van ZYL, W. H. Expression and comparison of codon optimised *Aspergillus tubingensis* amylase variants in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**. 1.17 (4). 2017.

- CROMIE, G. A.; HYMA, K. E.; LUDLOW, C. L.; GARMENDIA-TORRES, C. GILBERT, T. L.; MAY, P.; HUANG, A. A.; DUDLEY, A. M.; Fay, J. C. Genomic sequence diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* assessed by RAD-seq. **G3: Genes|Genomes|Genetics**. 3(12), 2163–2171. 2013.
- DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; de-ABREU-NETO, M. S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. New York: Springer, v. 22, n. 2, p. 177-182, 2006.
- DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; E SILVA, J. B. D. A.; SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabiroba, jaboticaba and umbu. **LWT - Food Science and Technology**. 43(10), 1564-1572. 2010.
- EJIGUI, J.; SAVOIE, L.; MARIN, J.; DESROSIERS, T. Beneficial changes and drawbacks of a traditional fermentation process on chemical composition and antinutritional factors of yellow maize (*Zea mays*). **Journal of Biological Sciences**. 5: 590-596. 2005.
- FARIA-OLIVEIRA, F.; DINIZ, R. H. S.; SANTOS, F. G.; PILÓ, F. B.; MEZADRI, H.; CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America. **Food Production and Industry**. Prof. Ayman Amer Eissa (Ed.), InTech. Capítulo 4. 2015.
- FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**. Volume 8, Issue 7, 1 November. Pages 979–995. 2008.
- FRAUENDORFER, F.; SCHIEBERLE, P. Changes in key aroma compounds of Criollo cocoa beans during roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56(21), 10244-10251. 2008.

- FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Effect of symbiotic interaction between a fructooligosaccharide and probiotic on the kinetic fermentation and chemical profile of maize blended rice beverages. **Food Research International**. 100. 698-707. 2017.
- GOFFEAU, A.; BARREL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**. 274: 546, 563–567. 1996.
- GRIFFITHS, D. W.; BIRCH, A. N. E.; HILLMAN, J. R. Antinutritional compounds in the *Brassicaceae*: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. v. 73, n. 1, p. 1-18. 1998.
- HAGEDORN, S.; KAPHAMMER, B. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. **Annual Reviews in Microbiology**. v. 48, n. 1, p. 773-800. 1994.
- HELLSTRÖM, A. M.; VAZQUES-JUÁREZ, R.; SVANBERG, U.; ANDLID, T. A. Biodiversity and phytase capacity of yeasts isolated from Tanzanian togwa. **International Journal of Food Microbiology**. 136:352-358. 2010.
- HUTKINS, R. W. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. **Blackwell Publishing Ltd**. U.S. 3–14. 2006.
- KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**. v. 120, n. 4, p. 945-959, 2010.
- LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of food aroma compounds. **Food Technology and Biotechnology**. 44, 335–353. 2006.

- LUNA, F.; CROUZILLAT, D.; CIROU, L.; BUCHELI, P. Chemical Composition and Flavor of Ecuadorian Cocoa Liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 3527–3532. 2002.
- MENDOZA, L. M.; NEEF, A.; VIGNOLO, G.; BELLOCH, C. Yeast diversity during the fermentation of Andean *chicha*: A comparison of highthroughput sequencing and culture-dependent approaches. **Food Microbiology**. 67:1-10. 2017.
- MIGUEL, M. G. D. C. P.; SANTOS, M. R. R. M.; DUARTE, W. F.; DE ALMEIDA, E. G.; SCHWAN, R. F. Physico-chemical and microbiological characterization of corn and rice ‘calugi’ produced by Brazilian Amerindian people. **Food Research International**. 49, 524–532. 2012.
- MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CAMEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**. New York. v. 28, n. 6, p. 817-830. 2010.
- NIELSEN, D. S.; TENIOLA, O. D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T. S.; HOLZAPFEL, W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture dependent and culture independent methods. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam. v. 114. n. 2. p. 168-186. 2007.
- NOUT, M. J. R. Rich nutrition from the poorest—Cereal fermentations in Africa and Asia. **Food Microbiology**. Elsevier. 685–692. 2009.
- NOUT, M. J. R.; MOTARJEMI, Y. Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety : a joint FAO / WHO workshop. **Food Control**. 8(5/6), 221–226. 1997.
- OGUNREMI, O. R.; BANWO, K.; SANNI, A. I. Starter-culture to improve the quality of cereal-based fermented foods: trends in selection and application. **Current Opinion in Food Science**. 13. 38-43. 2017.

- OMEMU, A. M.; OYEWOLE, O. B.; BANKOLE, M. O . Significance of yeasts in the fermentation of maize for ogi production. **Food Microbiology**. 24. 571–576. 2007.
- PEREIRA, G. V. D. M.; MIGUEL, M. G. D. C. P.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. **Applied and Environmental Microbiology**. 78, 5395–5405. 2012.
- PEREIRA, G. V. M.; ALVAREZ, J. P.; NETO, D. P. C.; SOCCOL, V. T.; TANOBE, V. O. A.; ROGEZ, H.; GÓES-NETO, A.; SOCCOL, C. R. Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. **LWT - Food Science and Technology**. 84. 290-297. 2017.
- POUTANEN, K. Past and future of cereal grains as food for health. **Trends in Food Science & Technology**, 25(2), 58–62. 2012.
- RAGHAVENDRA, P.; HALAMI, P. M. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. **International Journal of Food Microbiology**. 133. 129–134. 2009.
- RAMIREZ-CASTRILLON, M.; MENDES, S. D. C.; INOSTROZA-PONTA, M.; VALENTE, P. (GTG)<sub>5</sub> MSP-PCR fingerprinting as a technique for discrimination of wine associated yeasts?. **PLoS One**. 9(8):e105870. 2014.
- RAMOS, C. L.; SOUSA, E. S. O. DE; RIBEIRO, J.; ALMEIDA, T. M. M.; SANTOS, C. C. A. DO A.; ABEGG, M. A.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical characteristics of tarubá, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. **Food Microbiology**. 49(0). 182–188. 2015.
- RAMOS, C. R.; THORSEN, L.; SCHWAN, R. F.; JESPERSEN, L. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and

- Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. **Food Microbiology**. 36: 22-29. 2013.
- REP, M.; KRANTZ, M.; THEVELEIN, J. M.; HOHMANN, S. The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock. **Journal of Biological Chemistry**. 275:8290-8300. 2000.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. Metabolism of lactic acid 1417 bacteria. **In Handbook of Enology: The microbiology of wine and vinifications**. 2 ed.; Ribéreau-Gayon, P., Ed. John Wiley & Sons, Ltd.: West Sussex. Vol. 1, pp 150-151. 2006.
- RIES, E. F.; MACEDO, G. A. Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. **Food Science and Biotechnology**. Vol. 18, No 3, pp. 665-660. 2009.
- ROGER, T.; LÉOPOLD, T. N.; FUNTONG, M. M. Nutritional Properties and Antinutritional Factors of Corn Paste (Kutukutu) Fermented by Different Strains of Lactic Acid Bacteria. **International Journal of Food Science**. 2015: 1-14. 2015.
- SCOTT, R.; SULLIVAN, W. C. Ecology of fermented foods. **Human Ecology Review**. v. 15. n. 1. 2008.
- SILVA, W. P. K.; MULTANI, D. S.; DEVERALL, B. J.; LYON, B. R. RFLP and RAPD Analyses in the Identification and Differentiation of Isolates of the Leaf Spot Fungus *Corynespora cassiicola*. **Australian Journal of Botany**. 43. 609-618. 1995.
- SINGH, A. K.; REHAL, J.; KAUR, A.; JYOT, G. Enhancement of attributes of Cereals by Germination and Fermentation: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 55, n. 11, p. 1575-1589. 2015.
- STEENSELS, J.; SNOEK, T.; MEERSMAN, E.; NICOLINO, M. P.; VOORDECKERS, K.; VERSTREPEN, K. J. Improving industrial yeast strains:

exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**. 38. 947–995. 2014.

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

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**. 5:25-40. 1994.

VISINTIN, S.; ALESSANDRIA, V.; VALENTE, A.; DOLCI, P.; COCOLIN, L. Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. **International Journal Food Microbiology**. 4. 216: 69-78. 2016.

WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. **Beverages**. 2.30. 2016.

YAO, A. A.; EGOUNLETY, M.; KOUAME, L. P.; THONART, P. “Les bactéries lactiques dans les aliments ou boissons amylacés et fermentés de l’Afrique de l’Ouest : leur utilisation actuelle,” **Annales de Médecine Vétérinaire**. vol. 153, pp. 54–65, 2009.



**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

**Table 1:** *Saccharomyces cerevisiae* strains studied and their respective sources.

	STRAIN	SOURCE		STRAIN	SOURCE		STRAIN	SOURCE
1	CCMA 0705	<i>Caxiri</i>	33	CCMA 0738	<i>Caxiri</i>	65	CCMA 0231	Cassava
2	CCMA 0706	<i>Caxiri</i>	34	CCMA 0739	<i>Caxiri</i>	66	CCMA 0523	Apple fruit
3	CCMA 0707	<i>Caxiri</i>	35	CCMA 0740	<i>Caxiri</i>	67	CCMA 0524	Apple fruit
4	CCMA 0708	<i>Caxiri</i>	36	CCMA 0741	<i>Caxiri</i>	68	CCMA 0525	Apple fruit
5	CCMA 0710	<i>Caxiri</i>	37	CCMA 0491	<i>Kefir</i>	69	CCMA 0526	Apple fruit
6	CCMA 0711	<i>Caxiri</i>	38	CCMA 0493	<i>Kefir</i>	70	CCMA 0558	Cocoa fruit
7	CCMA 0712	<i>Caxiri</i>	39	CCMA 0494	<i>Kefir</i>	71	CCMA 0598	Cocoa fruit
8	CCMA 0713	<i>Caxiri</i>	40	CCMA 0496	<i>Kefir</i>	72	CCMA 0609	Cocoa fruit
9	CCMA 0714	<i>Caxiri</i>	41	CCMA 0497	<i>Kefir</i>	73	CCMA 0681	Cocoa fruit
10	CCMA 0715	<i>Caxiri</i>	42	CCMA 0498	<i>Kefir</i>	74	CCMA 0240	Cocoa fruit
11	CCMA 0716	<i>Caxiri</i>	43	CCMA 0501	<i>Kefir</i>	75	CCMA 0558	Cocoa fruit
12	CCMA 0717	<i>Caxiri</i>	44	CCMA 0503	<i>Kefir</i>	76	CCMA 0598	Cocoa fruit
13	CCMA 0718	<i>Caxiri</i>	45	CCMA 0508	<i>Kefir</i>	77	CCMA 0609	Cocoa fruit
14	CCMA 0719	<i>Caxiri</i>	46	CCMA 0510	<i>Kefir</i>	78	CCMA 0681	Cocoa fermentation
15	CCMA 0720	<i>Caxiri</i>	47	CCMA 0137	Distillery	79	CCMA 0756	Cocoa fermentation
16	CCMA 0721	<i>Caxiri</i>	48	CCMA 0185	Distillery	80	CCMA 0757	Cocoa fermentation
17	CCMA 0722	<i>Caxiri</i>	49	CCMA 0186	Distillery	81	CCMA 0761	Cocoa fermentation
18	CCMA 0723	<i>Caxiri</i>	50	CCMA 0187	Distillery			
19	CCMA 0724	<i>Caxiri</i>	51	CCMA 0188*	Distillery			
20	CCMA 0725	<i>Caxiri</i>	52	CCMA 0189	Distillery			
21	CCMA 0726	<i>Caxiri</i>	53	CCMA 0190	Distillery			
22	CCMA 0727	<i>Caxiri</i>	54	CCMA 0200*	Distillery			
23	CCMA 0728	<i>Caxiri</i>	55	CCMA 0218	Cassava			
24	CCMA 0729	<i>Caxiri</i>	56	CCMA 0219	Cassava			
25	CCMA 0730	<i>Caxiri</i>	57	CCMA 0220	Cassava			
26	CCMA 0731	<i>Caxiri</i>	58	CCMA 0222	Cassava			
27	CCMA 0732	<i>Caxiri</i>	59	CCMA 0223	Cassava			
28	CCMA 0733	<i>Caxiri</i>	60	CCMA 0225	Cassava			
29	CCMA 0734	<i>Caxiri</i>	61	CCMA 0226	Cassava			
30	CCMA 0735	<i>Caxiri</i>	62	CCMA 0227	Cassava			
31	CCMA 0736	<i>Caxiri</i>	63	CCMA 0228	Cassava			
32	CCMA 0737	<i>Caxiri</i>	64	CCMA 0230	Cassava			

\*: these strains were used in this study as reference strains.

**Table 6:** Concentration (g L<sup>-1</sup>) of organic compounds for the 12 *S. cerevisiae* strains analyzed in this study, as determined by HPLC.

HPLC compounds analyses (g L <sup>-1</sup> )								
Time (hour)	Sample	OXALIC ACID	CITRIC ACID	TARTARIC ACID	MALIC ACID	SUCCINIC ACID	LATIC ACID	ACETIC ACID
<b>T0</b>	Control	0.037 ± 0.001	0.858 ± 0.006	nd	0.268 ± 0.001	0.033 ± 0.001	0.540 ± 0.012	nd
								nd
<b>T24</b>	CCMA 0706	0.038 ± 0.003	0.981 ± 0.035	nd	0.277 ± 0.012	0.071 ± 0.006	0.615 ± 0.015	nd
	CCMA 0707	0.035 ± 0	0.522 ± 0.019	0.207 ± 0.002	0.306 ± 0.020	0.044 ± 0.001	0.670 ± 0.020	nd
	CCMA 0714	0.028 ± 0	0.415 ± 0.030	nd	0.278 ± 0.017	0.040 ± 0.001	0.506 ± 0.008	nd
	CCMA 0720	0.033 ± 0.001	0.500 ± 0.006	nd	0.280 ± 0.001	0.033 ± 0.002	0.685 ± 0.040	nd
	CCMA 0726	0.038 ± 0	0.530 ± 0.003	nd	0.300 ± 0.008	0.041 ± 0	0.656 ± 0.007	nd
	CCMA 0731	0.035 ± 0.003	0.661 ± 0.170	nd	0.320 ± 0.007	0.036 ± 0.003	0.590 ± 0.001	nd
	CCMA 0189	0.034 ± 0.003	0.500 ± 0.044	nd	0.260 ± 0.016	0.030 ± 0	0.583 ± 0.004	nd
	CCMA 0494	0.039 ± 0.003	1.000 ± 0.020	nd	0.323 ± 0.001	0.101 ± 0.008	0.610 ± 0.002	nd
	CCMA 0525	nd	0.907 ± 0.002	nd	0.306 ± 0.002	nd	0.555 ± 0.001	nd
	CCMA0708	nd	1.080 ± 0.009	nd	0.312 ± 0.013	0.037 ± 0.001	0.620 ± 0.022	nd
	CCMA 0188	0.034 ± 0.001	0.451 ± 0.001	0.225 ± 0.007	0.323 ± 0.010	0.020 ± 0.002	0.550 ± 0.003	nd
	CCMA 0200	0.021 ± 0.002	0.940 ± 0.044	nd	0.320 ± 0.006	0.031 ± 0.020	0.604 ± 0.004	0.080 ± 0.006
	<b>T48</b>	CCMA 0706	nd	0.454 ± 0.005	nd	0.290 ± 0.009	0.046 ± 0.002	0.602 ± 0.016
CCMA 0707		nd	0.930 ± 0.012	nd	0.300 ± 0.002	0.040 ± 0.002	0.584 ± 0.016	0.160 ± 0.030
CCMA 0714		nd	0.773 ± 0.018	nd	0.260 ± 0.002	0.045 ± 0.002	0.485 ± 0.002	0.130 ± 0.003
CCMA 0720		nd	0.842 ± 0.005	nd	0.264 ± 0.006	0.040 ± 0	0.602 ± 0.009	Nd
CCMA 0726		0.033 ± 0	0.867 ± 0.003	nd	0.282 ± 0.007	0.040 ± 0.002	0.521 ±	Nd

**Table 6:** Continued.

<b>CCMA 0731</b>	<b>nd</b>	<b>1.014 ± 0.013</b>	<b>nd</b>	<b>0.346 ± 0.006</b>	<b>0.042 ± 0.001</b>	<b>0.612 ± 0.003</b>	<b>nd</b>
CCMA 0189	nd	0.973 ± 0.023	nd	0.344 ± 0.005	0.041 ± 0.003	0.586 ± 0.013	0,202 ± 0.011
CCMA 0494	nd	0.925 ± 0.024	nd	0.351 ± 0	0.156 ± 0.002	0.570 ± 0.003	nd
CCMA 0525	nd	0.830 ± 0.009	nd	0.290 ± 0.004	0.037 ± 0.002	0.480 ± 0.003	0,084 ± 0.005
CCMA 0708	nd	0.803 ± 0.013	nd	0.251 ± 0.004	0.032 ± 0	0.445 ± 0.027	nd
CCMA 0188	nd	0.382 ± 0.006	nd	0.271 ± 0.008	0.020 ± 0.001	0.460 ± 0.001	nd
CCMA 0200	nd	0.446 ± 0.030	nd	0.220 ± 0.005	0,020 ± 0.001	0.325 ± 0.060	0,094 ± 0.022

nd: not detected.

**Table 7:** Profile of volatile compounds obtained by GC–MS analysis for *S. cerevisiae* strains in different assays investigated in this study.

COMPOUNDS	SAMPLE (S)	FLAVOR
<b>Acids</b>		
Octanoic acid	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	Mildly unpleasant odor, and a burning, rancid taste
<b>Alcohol</b>		
1-Butanol, 2-methyl-	9	Cooked, roasted aroma with fruity or alcoholic undertones
1-Butanol, 3-methyl-	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	Fusel oil, whiskey-characteristic, pungent odor
1-Decanol	All	Floral odor resembling orange flowers and a slight, characteristic fatty taste
1-Dodecanol	All	Characteristic fatty odor; fatty, waxy flavor
1-Heptanol	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	Fragrant, woody, heavy, oily, faint, aromatic, fatty odor, and a pungent, spicy taste
1-Hexanol	All	Flavoring ingredient: fruity odor and aromatic flavor
1-Nonanol	All	Fat, Floral, Green, Oil
1-Octanol	All	Fresh, orange-rose odor, that is quite sweet with an oily, sweet, slightly herbaceous taste
1-Propanol, 2-methyl-	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	Flavoring ingredient; disagreeable odor
1-Undecanol	13	
2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	2,13	
2-Furanmethanol	All	
3-Octen-1-ol	4,7,10	Powerful, sweet, earthy odor with strong herbaceous note reminiscent of lavender - lavandin, rose and hay. Sweet, herbaceous taste
Benzenemethanol, 3,5-dimethyl-	All	
Cyclodecanol	6	
Phenylethyl Alcohol	All	Rose-like odor
trans-(2-Ethylcyclopentyl)methanol	5,6,10,11,12,13	
<b>Alkanes</b>		
Heneicosane	9	Waxy
Heptadecane	5,8,12	
Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl-	3,7	

**Table 7:** Continued.

Hexadecane	4	
Nonadecane	6,13	Bland
Octadecane	6	
Pentadecane	13	Waxy
Pentadecane, 7-methyl-	8	
Tetratetracontane	9	
<b>Esters</b>		
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	All	
Benzoic acid, 3,4-dimethyl-, methyl ester	6	Herb, Lettuce, Prune, Violet
Benzyl Benzoate	All	Balsamic, Herb, Oil
Formic acid, heptyl ester	8	Floral
Hexadecanoic acid, ethyl ester	2,3,6,7,8,10,13	Waxy, fruity, creamy and milky with a balsamic nuance
Homosalate	All	
<b>Ketones and aldehydes</b>		
2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione	All	Floral
3-Tetradecene, (Z)-	13	mild pleasant odor
4,8,12-Tetradecatrienal, 5,9,13-trimethyl-	1,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12	
4-Hydroxy-2-methylacetophenone	All	
5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	All	Fruit
5-Hepten-2-one, 6-methyl-	3,4,12,13	Citrus, Mushroom, Pepper, Rubber, Strawberry
Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-	All	Sweet, cherry and vanilla
Benzaldehyde, 2,5-dimethyl-	2,3,5,8,9,10,11,12,13	
Benzophenone	1	Floral
Dodecanal	2	Citrus, Fat, Lily
Isophorone	All	Slight minty odor
Nonanal	4,5,6,8,9,13	Fat, Floral, Green, Lemon

**Table 7:** Continued.

Selina-3,7(11)-diene	1,2,3,4,5,6,7,8,11	
<b>Others</b>		
1,11-Hexadecadiyne	7,8	
2(3H)-Furanone, 5-butyldihydro-	2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	
2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl- 2-methyltetracosane	All 3,5,7,10,11	strong odor of reminiscent coconut and a fatty, peculiar taste
Benzofuran, 2,3-dihydro-	All	
Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8- methylene- Biphenyl	3,4,5,6,7 All	Fried, Spice, Wood Floral
Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1- methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]-	1,2,3,4,5,6,7,8,9,11	
Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4- hexenyl)-, (S)-	2,8	balsamic woody
Naphthalene, 2,6-dimethyl-	1	sweet, honey
Naphthalene, 2-methyl-	1,2,3,5,6,7,8,9,10,11,12	sweet, floral, woody
p-Cresol	All	Phenolic
Silane, cyclohexyldimethoxymethyl-	2,6,7,9,11	
<b>Phenolic compounds</b>		
Phenol	2,4,5,6,9,10,11,12,13	Phenolic
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	All	Phenolic
Phenol, 3-methyl-	1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,12,13	Phenolic
Phenol, 4-ethyl-	1	Powerful woody-phenolic, yet somewhat sweet odor
Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	Phenolic
Phenol, m-tert-butyl-	1,2	Phenolic

**Reference:** Flavor & Extract Manufacturers Association (FEMA) and Freire et al. (2017). **Subtitle:** 1- Substrate (T0); 2 - CCMA 0706; 3- CCMA 0707; 4- CCMA 0714; 5- CCMA 0720; 6- CCMA 0726; 7- CCMA 0731; 8- CCMA 0189; 9- CCMA 0494; 10- CCMA 0525; 11- CCMA 0708; 12- CCMA 0188; 13- CCMA 0200.