

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS

EDUARDO DIAS FENNER

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS POR
LEVEDURAS DA MICROBIOTA DE BESOUROS E ABELHAS

CERRO LARGO - RS

2024

EDUARDO DIAS FENNER

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS POR
LEVEDURAS DA MICROBIOTA DE BESOUROS E ABELHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Liziara da Costa Cabrera

CERRO LARGO

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Fenner, Eduardo Dias

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS
POR LEVEDURAS DA MICROBIOTA DE BESOUCOS E ABELHAS /
Eduardo Dias Fenner. -- 2024.

79 f.:il.

Orientador: Doutor Sérgio Luiz Alves Júnior

Co-orientadora: Doutora Lizziara da Costa Cabrera

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e
Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo, RS, 2024.

1. Insetos. 2. Néctar floral. 3. Prospeção de
leveduras fermentativas. 4. Etanol. 5. Compostos
Orgânicos Voláteis. I. Júnior, Sérgio Luiz Alves,
orient. II. Cabrera, Lizziara da Costa, co-orient. III.
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

EDUARDO DIAS FENNER

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS POR
LEVEDURAS DA MICROBIOTA DE BESOUROS E ABELHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 03/05/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior – UFFS
Orientador

Prof.^a Dr.^a Liziara da Costa Cabrera – UFFS
Coorientadora

Prof.^a Dr.^a Sarita Cândida Rabelo – UNESP
Avaliadora

Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk – UFSC
Avaliador



Documento assinado digitalmente

HELEN TREICHEL

Data: 15/06/2024 08:55:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Helen Treichel – UFFS
Avaliadora

Dedico este trabalho especialmente a minha
querida namorada, avó e avô, tio e tia, irmãos,
primo, sobrinhos e pai, que sempre me incentivaram
a finalizar essa etapa dos meus estudos.

Deixo aqui, uma dedicação exclusiva para minha
querida Mãe, que não está mais entre o mundo dos vivos,
mas me ensinou muito dos valores que carrego.

AGRADECIMENTOS

À minha excelentíssima companheira Jéssica Piovesan Bertolo, pela paciência, confiança, carinho, incentivo e apoio incondicional, tornando meus dias difíceis mais leves. O companheirismo dela foi essencial para que eu percorresse esse caminho da forma mais tranquila possível e atingir o sucesso.

À minha família, especialmente a avó Ana Lourdes do Nascimento e, tio Ademar do Nascimento. Ao meu avô Arcidio da Silva, tia Sheila do Nascimento, irmãos Alessandro do Nascimento, Mauricio Fenner e Nicolas Fenner, pai Jorge Fenner, cunhada Chelsey Becker, sogros cunhados Otaner Bertolo e Rennan Bertolo, concunhadas Munícia Foza e Giovana Peixoto, sobrinhos Enzo's, Geórgia, Henrique e Matteo por todo carinho, amor e incentivo que foram os combustíveis para que eu pudesse finalizar meu mestrado, que por muitas vezes me ajudaram a tomar decisões difíceis que tive nesse período.

A minha falecida mãe Rosani Dias Fenner por ter me gerado e cuidado de mim com muita dedicação, amor e carinho até quando pôde, me ensinando valores essenciais que são cruciais para meu desenvolvimento pessoal e profissional nos dias de hoje.

À orientação do Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e apoio. Além de profissional é uma pessoa excelente, que me ajudou em tudo que eu precisei no decorrer da minha pesquisa, esteve disponível sempre em explicar com muita maestria todas as dúvidas que surgiam.

À coorientação da Prof.^a Dr.^a Liziara da Costa Cabrera, por me auxiliar em etapas importantíssimas para o trabalho e pelo compartilhamento de seus conhecimentos.

À Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS campus Cerro Largo, pelo ensino de qualidade, disponibilidade de infraestrutura, recursos e materiais bem como uma oportunidade de poder realizar uma pós-graduação em um ensino público.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa durante parte do mestrado ativamente.

Ao CNPQ e à FAPESC, que indiretamente contribuíram com recursos para realização desse trabalho.

Ao PPGATS por todo suporte prestado quando solicitado.

A todos os técnicos e terceirizados da UFFS pela paciência e disposição para que o acesso aos materiais, aos laboratórios para realização dos experimentos e para que as análises pudessem ser conduzidas da melhor forma possível.

Aos meus amigos, que compartilharam de momentos importante nessa jornada acadêmica. Especialmente agradeço ao meu amigo Gabriel Minussi que compartilhou de quase as mesmas dificuldades que eu nesse período pelo companheirismo nessa trajetória, ao Timóteo Silva, Lucas Bohnenberger, Maurício Castilhos, Gabriel Maciel e Letícia Fachin. Pessoas incomparáveis, que proporcionaram momentos de conversas e desenvolvimento durante essa jornada, para que houvesse motivação de seguir firme.

A todos os integrantes que compõem o grupo de pesquisa do LabBiolev de Chapecó, que foram fundamentais para que esse trabalho acontecesse, pois sempre estavam dispostos a ajudar, seja em trabalhos laboratoriais ou no fornecimento de informações quando pedido.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigado.

“A humildade é a única base sólida de todas as virtudes”
Confúcio

RESUMO

A produção de etanol por meio da fermentação microbiana é uma prática consolidada no mercado há décadas, representando uma alternativa sustentável e renovável. Na natureza, as leveduras consomem carboidratos como a sacarose, que está presente na cana-de-açúcar e no néctar das flores, e os convertem em etanol e outros Compostos Orgânicos Voláteis (COVs). Embora a *Saccharomyces cerevisiae* seja a levedura mais amplamente utilizada em diversos processos biotecnológicos, ela apresenta algumas limitações na produção de certos metabólitos, exigindo modificações genéticas para atender às demandas. No entanto, como alternativa, as leveduras selvagens presentes em diversos ambientes podem ser exploradas. Por exemplo, as leveduras que habitam os nectários florais consomem os nutrientes do néctar e produzem COVs que desempenham um papel crucial na atração ou repulsão de insetos. Isso impacta diretamente o processo de polinização e pode servir como método de biocontrole contra pragas, protegendo certas plantas. Nesse contexto, este estudo isolou 26 cepas de leveduras, sendo 7 de abelhas sem ferrão e 19 de besouros. Sete dessas cepas foram selecionadas aleatoriamente para testes em meios ricos ou meios simulando o néctar de flores para observar seus perfis de crescimento e produção de compostos voláteis. Dentre essas leveduras, três linhagens (CHAP-242, CHAP-245 e CHAP-248) se destacaram e foram submetidas a um Delineamento Composto Central (DCC) com quatro variáveis: pH e concentração de sacarose, peptona de caseína e extrato de levedura. O consumo de sacarose e a produção de etanol foram analisados por HPLC nessas amostras após 34 e 96 horas de incubação. No DCC, a CHAP-248 obteve os melhores resultados em todas as respostas analisadas, atingindo, em algumas condições, 100% de consumo de sacarose, rendimento fermentativo de até 472,66 mg_{etanol}/g_{sacarose} e produtividade de 1595,96 mg/L*h. Além da produção de etanol, a obtenção dos COVs foi avaliada por extração líquido-líquido e GC-MS ao fim de todos os cultivos. Cinco compostos mostraram-se mais prevalentes. O 2-Feniletanol foi identificado em todas as amostras, enquanto o triptofol foi identificado na CHAP-245 nos meios do *screening* inicial e em algumas condições do DCC. O metionol foi encontrado apenas nos cultivos em meio rico, durante o *screening*, com as cepas CHAP-245 e CHAP-248. O fosfato de trietila foi identificado apenas no meio rico do *screening* em 70% das cepas analisadas, enquanto o 2-ciclohexeno-1,3,5,5-trimetil foi encontrado apenas no néctar sintético em 60% das cepas analisadas.

Palavras-chave: Insetos; Néctar floral; Prospecção de leveduras; Sacarose; Fermentação; COVs; Etanol; Biotecnologia.

ABSTRACT

Ethanol production through microbial fermentation has been a consolidated practice for decades, representing a sustainable and renewable alternative. In nature, yeasts consume carbohydrates such as sucrose, which is present in sugarcane and flower nectar, and convert them into ethanol and other Volatile Organic Compounds (VOCs). Although *Saccharomyces cerevisiae* is the most widely used yeast in various biotechnological processes, it has some limitations in producing specific metabolites, requiring genetic modifications to meet demands. However, wild yeasts present in different environments can be explored as an alternative. For example, yeasts that inhabit floral nectaries consume nectar nutrients and produce VOCs crucial in attracting or repelling insects. This directly impacts pollination and can serve as a biocontrol method against pests, protecting certain plants. In this context, this study isolated 26 yeast strains, 7 from stingless bees and 19 from beetles. Among them, seven were randomly selected for testing in rich media or media simulating flower nectar to observe their growth profiles and volatile compound production. Among these yeasts, three strains (CHAP-242, CHAP-245, and CHAP-248) stood out and were subjected to a Central Composite Design (CCD) with four variables: pH and concentration of sucrose, casein peptone, and yeast extract. Sucrose consumption and ethanol production were analyzed by HPLC in these samples after 34 and 96 hours of incubation. In the DCC, CHAP-248 obtained the best results in all analyzed responses, reaching, in some conditions, 100% sucrose consumption, fermentative yield of up to 472.66 mg_{ethanol}/g_{sucrose} and productivity of 1595.96 mg/L*h. In addition to ethanol production, VOCs production was evaluated by liquid-liquid extraction and GC-MS at the end of all cultures. Five compounds were more prevalent. 2-Phenylethanol was identified in all samples, while tryptophol was identified in CHAP-245 in the initial screening media and some DCC conditions. Methionol was only found in cultures in rich mediums during screening, with strains CHAP-245 and CHAP-248. Triethyl phosphate was only identified in the rich screening medium in 70% of the strains analyzed, while 2-cyclohexen-1,3,5,5-trimethyl was only found in the synthetic nectar in 60% of the strains analyzed.

Keywords: Insects; Floral nectar; Yeast prospecting; Sucrose; Fermentation; VOCs; Ethanol; Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curvas de crescimento das cepas CHAP-223 (A), CHAP-224 (B), CHAP-237 (C), CHAP-239 (D), CHAP-242 (E), CHAP-245 (F) e CHAP-248 (G) em meio rico YPS (curvas azuis) ou néctar sintético (curvas vermelhas).....	48
Figura 2 – Percentual de sacarose consumida em cada experimento do DCC: CHAP-242 (A); CHAP-245 (B); CHAP-248 (C). Tempos de análises: t=34h (barras claras); t=96h (barras escuras).	50
Figura 3 – Rendimento de etanol em cada experimento do DCC: CHAP-242 (A); CHAP-245 (B); CHAP-248 (C). Tempos de análises: t=34h (barras claras); t=96h (barras escuras).	51
Figura 4 – Produtividade de etanol em cada experimento do DCC: CHAP-242 (A); CHAP-245 (B); CHAP-248 (C). Tempos de análises: t=34h (barras claras); t=96h (barras escuras).	52
Figura 5 – Percentual de açúcar consumido: Gráfico de Pareto (t=34h) da CHAP-242. Variáveis: pH (x_1); Sacarose (x_2); Peptona de caseína (x_3); Extrato de levedura (x_4).	54
Figura 6 – Percentual de açúcar consumido: CC (t=34h) da CHAP-242: Peptona de caseína x Extrato de levedura.	54
Figura 7 – Rendimento de etanol: Gráfico de Pareto (t=34h) da CHAP-248. Variáveis: pH (x_1); Sacarose (x_2); Peptona de caseína (x_3); Extrato de levedura (x_4).	56
Figura 8 – Rendimento de etanol: CC (t=34h) da CHAP-248: Sacarose x Extrato de levedura (A); Sacarose x Peptona de Caseína (B).	57
Figura 9 – Produtividade de etanol: Gráficos de Pareto (t=34h): CHAP-242 (A); CHAP-248 (B). Variáveis: pH (x_1); Sacarose (x_2); Peptona de caseína (x_3); Extrato de levedura (x_4).	59
Figura 10 – Produtividade de etanol: CC (t=34h) da Sacarose x Extrato de levedura, CHAP-242 (A); CHAP-248 (B). CC (t=34h) da Sacarose x Peptona de caseína, CHAP-242 (C); CHAP-248 (D).	60
Figura 11 – Análise Quali-Quantitativa da presença dos COVs	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Leveduras isoladas de insetos que foram submetidas ao <i>screening</i>	41
Tabela 2 – Variáveis e valores fixados	42
Tabela 3 – Valores reais do delineamento experimental completo	43
Tabela 4 – Classificação de leveduras isoladas de insetos	46
Tabela 5: COVs identificados por cepas de leveduras selvagens do DCC e do <i>screening</i>	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral	15
1.1.2	Objetivos Específicos.....	16
2	ARTIGO DE REVISÃO: NATURE’S MOST FRUITFUL THREESOME: THE RELATIONSHIP BETWEEN YEASTS, INSECTS, AND ANGIOSPERMS	17
2.1	INTRODUCTION	18
2.2	YEASTS AT WORK: NECTAR FERMENTATION AND VOC PRODUCTION	20
2.2.1	Nectar Composition.....	20
2.2.2	Main Metabolic Routes for Nectar-Based VOC Production.....	21
2.2.2.1	<i>Carbohydrate Metabolism</i>	<i>21</i>
2.2.2.2	<i>What else, Besides Sugar, may Nectaries Offer to Yeast-Based VOC Production?</i>	<i>23</i>
2.3	DOUBLE AGENT YEASTS.....	24
2.4	PROSPECTING YEASTS FOR BIOTECHNOLOGICAL PURPOSES.....	25
2.5	CONCLUSIONS.....	28
3	ARTIGO A SER SUBMETIDO: ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS POR LEVEDURAS DA MICROBIOTA DE BESOUIROS E ABELHAS	37
3.1	INTRODUÇÃO	38
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.2.1	Isolamento de leveduras	40
3.2.2	Screening das leveduras.....	41
3.2.3	Delineamento Composto Central (DCC)	42
3.2.3.1	<i>Métodos analíticos</i>	<i>44</i>
3.2.3.2	<i>Determinação de sacarose e etanol</i>	<i>44</i>
3.2.3.3	<i>Análise de COVs.....</i>	<i>45</i>
3.2.3.3.1	<i>Extração dos COVs</i>	<i>45</i>
3.2.3.3.2	<i>Identificação dos COVs.....</i>	<i>45</i>

3.2.3.3.3	Crêterios de seleção de COVs.....	45
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
3.3.1	Cepas de leveduras obtidas pelo isolamento	46
3.3.2	Perfis de crescimento das leveduras submetidas ao <i>Screening</i>.....	47
3.3.3	Dados compilados do DCC.....	49
3.3.4	Análises estatísticas e comparações entre variáveis.....	53
3.3.4.1	<i>Percentual de a���ar consumido.....</i>	<i>53</i>
3.3.4.2	<i>Rendimento de etanol.....</i>	<i>55</i>
3.3.4.3	<i>Produtividade de etanol</i>	<i>58</i>
3.3.5	Identificação de COVs	61
3.3.5.1	<i>COVs encontrados.....</i>	<i>61</i>
3.3.5.2	<i>Aplicações e relevância comercial dos COVs encontrados nesse estudo</i>	<i>63</i>
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso desenfreado e irracional dos recursos fósseis apresenta riscos preocupantes ao meio ambiente. A extração e o tratamento do petróleo acabam poluindo diversos ecossistemas, impactando direta e negativamente a fauna e a flora, gerando atividades anormais no planeta que se manifestam através de eventos climáticos extremos (Damian, 2014; Jaiswal *et al.*, 2017). Os combustíveis em sua maioria são provenientes do petróleo, porém a produção de etanol também está consolidada no mercado há décadas e é uma alternativa que tem uma tendência de ser mais prática, menos onerosa em relação a custos operacionais e mais vantajosa para o meio ambiente pois ela provém do campo (Almeida; Longhi; Santos, 2017).

Microrganismos, especificamente as leveduras, consomem carboidratos como a sacarose, principal dissacarídeo presente na cana-de-açúcar e no néctar das flores. As leveduras também metabolizam monossacarídeos como glicose e frutose, que também estão presentes nos vegetais. Como resultado da metabolização desses açúcares, ocorre a fermentação, gerando etanol e outros Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) desejáveis para diferentes setores industriais (Antoñ; Denisow, 2014).

Leveduras selvagens estão presentes nos nectários florais e produzem COVs que são responsáveis por atrair ou repelir insetos, impactando diretamente na polinização e na propagação de espécies de flores (Becher *et al.*, 2018; Pozo *et al.*, 2009). A atração ou repulsão dos insetos ocorre, pois, ao metabolizar os açúcares presentes no néctar, as leveduras expõem COVs como consequência de suas rotas metabólicas e isso pode influenciar em qual inseto irá visitar aquela flor. Considerando então que a preferência do inseto pela flor visitada pode ser influenciada pelo tipo de composto expelido pelos microrganismos, alguns casos de repulsão de insetos servirão de biocontrole, e os atraídos poderão servir de polinizadores, formando uma propagação coordenada de angiospermas (Colda *et al.*, 2021; Fenner *et al.*, 2022; Sobhy *et al.*, 2018). Os COVs possuem altos valores agregados no mercado mundial em diferentes setores como indústrias de bebidas, alimentícias, farmacêuticas, cosméticas, dentre outras (Giehl *et al.*, 2022).

A espécie de levedura comumente utilizada para processos de biorrefinarias de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae*, por possuir diversas vantagens como a

tolerância à alta concentração de etanol no fim do processo fermentativo, ao elevado estresse osmótico causado pela alta concentração de açúcares e aos níveis baixos de pH nas dornas e no reciclo celular (Fernandes *et al.*, 2022; Alves Jr *et al.*, 2022). Entretanto, diversos estudos estão prospectando linhagens selvagens de leveduras fermentadoras de açúcares (dissacarídeos, hexoses e pentoses) isoladas da própria natureza, desde plantas a insetos, ou até mesmo realizando engenharia metabólica em leveduras já utilizadas, com o intuito de aumentar a produtividade de bioetanol de primeira (1G) (Albarelo *et al.*, 2023; Tadioto *et al.*, 2023; Iram; Cekmecelioglu; Demirci, 2022; Sun *et al.*, 2022; Ruchala *et al.*, 2020). Ao encontro dessa situação, há perspectivas biotecnológicas envolvidas além da produção de etanol. Enzimas produzidas por leveduras são capazes de hidrolisar moléculas complexas, transformando-as em carboidratos mais simples (dissacarídeos ou monossacarídeos) que são fermentáveis (Alves Jr *et al.*, 2019).

O Brasil e os Estados Unidos juntos responderam por 81% da produção mundial de etanol em 2023, e há anos mantêm a liderança da produção desse combustível. O Brasil, sozinho, produziu 31.267,5 milhões de litros de etanol, correspondendo a 28% do montante mundial no ano de 2023, sendo que de 2021 para 2023 teve um crescimento de produção de 12,84%. Já os Estados Unidos produziram cerca de 59.128,132 milhões de litros de etanol, correspondendo a 53% da produção total em 2023, acompanhado de um crescimento entre os anos de 2021 e 2023 de 4% (Renewble Fuels Association, 2024).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Comparar a performance de sete cepas de leveduras isoladas de insetos e, por meio de delineamento experimental, avaliar a influência de variáveis na capacidade de fermentação e geração de COVs.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Isolar leveduras da microbiota de abelhas e besouros;
2. Comparar o desempenho de sete cepas de leveduras em néctar sintético e meio rico;
3. Analisar a influência do pH e das concentrações de sacarose, peptona de caseína e extrato de levedura sobre o metabolismo das leveduras em um delineamento experimental;
4. Avaliar a produtividade e o rendimento de etanol nas condições testadas;
5. Identificar a geração de outros COVs além do etanol.

2 ARTIGO DE REVISÃO: NATURE'S MOST FRUITFUL THREESOME: THE RELATIONSHIP BETWEEN YEASTS, INSECTS, AND ANGIOSPERMS

Review

Nature's Most Fruitful Threesome: The Relationship between Yeasts, Insects, and Angiosperms

Eduardo D. Fenner ^{1,2}, Thamaris Scapini ³, Mariana da Costa Diniz ², Anderson Giehl ², Helen Treichel ³, Sergio Álvarez-Pérez ⁴ and Sérgio L. Alves, Jr. ^{1,2,*}

¹ Graduate Program in Environment and Sustainable Technologies, Federal University of Fronteira Sul, Campus Cerro Largo, 97900-000, Cerro Largo/RS Brazil; eduardo.dfenner@outlook.com

² Laboratory of Yeast Biochemistry, Federal University of Fronteira Sul, Campus Chapecó, 89815-899, Chapecó/SC Brazil; mcdiniz2021@gmail.com (M.d.C.D.); andergiehl@gmail.com (A.G.)

³ Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Campus Erechim, 99700-970, Erechim/RS, Brazil; scapini.thamaris@gmail.com (T.S.); helentreichel@gmail.com (H.T.)

⁴ Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain; sergioaperez@ucm.es

* Correspondence: slalvesjr@uffs.edu.br

J. Fungi 2022, 8(10), 984; <https://doi.org/10.3390/jof8100984>

Citation: Fenner, E.D.; Scapini, T.; da Costa Diniz, M.; Giehl, A.; Treichel, H.; Álvarez-Pérez, S.; Alves, S.L., Jr. Nature's most Fruitful Threesome: The Relationship between Yeasts, Insects, and Angiosperms. J. Fungi 2022, 8, 984. <https://doi.org/10.3390/jof8100984>

Academic Editor(s):

Received: 21 August 2022

Accepted: 18 September 2022

Published: 20 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The importance of insects for angiosperm pollination is widely recognized. In fact, approximately 90% of all plant species benefit from animal-mediated pollination. However, only recently, a third part player in this story has been properly acknowledged. Microorganisms inhabiting floral nectar, among which yeasts have a prominent role, can ferment glucose, fructose, sucrose, and/or other carbon sources in this habitat. As a result of their metabolism, nectar yeasts produce diverse volatile organic compounds (VOCs) and other valuable metabolites. Notably, some VOCs of yeast origin can influence insects' foraging behavior, e.g., by attracting them to flowers (although repelling effects have also been reported). Moreover, when insects feed on nectar, they also ingest yeast cells, which provide them with nutrients and protect them from pathogenic microorganisms. In return, insects serve yeasts as transportation and a safer habitat during winter when floral nectar is absent. From the plant's point of view, the result is flowers being pollinated. From humanity's perspective, this ecological relationship may also be highly profitable. Therefore, prospecting nectar-inhabiting yeasts for VOC production is of major biotechnological interest. Substances such as acetaldehyde, ethyl acetate, ethyl butyrate, and isobutanol have been reported in yeast volatomes, and they account for a global market of approximately USD 15 billion. In this scenario, the present review addresses the ecological, environmental, and biotechnological outlooks of this three-party mutualism, aiming to encourage researchers worldwide to dig into this field.

Keywords: angiosperms; bioprospection; floral nectar; insects; volatile organic compounds; yeasts

2.1 INTRODUCTION

Pollinating insects forage flowers in order to nourish themselves, and through these forages, plants can be rewarded with pollination. Although this plant–animal relationship has been documented for more than a century [1], only in the last decades has it been demonstrated that these invertebrates are mostly attracted to the chemical signals released by the microorganisms inhabiting the whole flower — especially by yeasts dwelling in the floral nectaries [2–4].

About 550 million years ago, in the Paleozoic era, coexistence with animals and plants directly impacted fungi's chemical and ecological processes so that new relationships were established between these three kingdoms as they co-evolved [5–7]. The hemiascomycetous yeasts of the Saccharomycetes class separated from filamentous fungi around 300 to 400 million years ago and then began to adapt to habitats rich in organic carbon. The same goes for primitive wingless hexapods (Collembola, Protura, among others), pterygote insects, and some holometabola, which evolved around the same period as yeasts [5,6,8,9].

The wide diversity of yeasts thus far described as members of the insect microbiota reflects the latter's diversity, which consequently influences yeast evolution in this habitat [10]. Angiosperms, which appeared at the beginning of the Cretaceous period (125 million years ago), provided high availability of sugar through the nectar produced in their flowers and fruits (especially the fleshy ones) generated as a result of their sexual reproduction. Such sugar abundance in flowers and fruits offered an outstanding habitat for yeast growth, such as *Saccharomyces*, showing the first traces of interactions between yeasts and insects related to flowers and fruits [11,12].

As by-products of their metabolism, yeasts produce volatile organic compounds (VOCs) that can modify insect behavior. When found in substrates that serve as animal food, such as floral nectar, yeasts can access the insect body to be transported on its surface or inside. Thus, the evolution of the ecological characteristics of these microorganisms is intrinsically linked to the interaction between insects and flowering plants [13,14]. On the other hand, it is worth noting that yeast dispersal by insects is older than pollen. Therefore, the ability to attract insects by releasing diverse chemicals was already present in the yeasts associated with ancient angiosperms, which suggests that the insect–yeast relationship also impacted plant evolution [2].

Nectar-dwelling yeasts need to find another place to live in the nonflowering seasons. Indeed, under these circumstances, yeasts may persist in soil from winter to early spring, and, through the winds, they are then dispersed again to plants. However, some of these microorganisms find, in the insect gastrointestinal tract, a more favorable environment to survive until the next flowering season. When flower season arrives, yeasts are again inoculated into the floral nectaries thanks to the foraging activity of pollinators [15,16].

Some species of the genus *Metschnikowia* (Ascomycota) are the predominant yeasts inhabitants of floral nectar, being found associated with flowers of phylogenetically diverse plants on all continents of the world except Antarctica [17–26]. Notably, some *Metschnikowia* species show a restricted biogeographic distribution, and their relationships with specific insects and plants may have favored their allopatric or peripatric speciation; that is the case, for example, for *Metschnikowia hawaiiensis*, a yeast species which is exclusively found in association with some plants from Hawaii (USA), and *M. arizonensis*, which has been only found in the USA, Costa Rica, Brazil, and Belize [27,28].

In the last ten years, several new yeast species of the *Metschnikowia* clade have been discovered associated with insects and angiosperms. To name just a few examples, *M. proteae* [29], *M. drakensbergensis*, and *M. caudata* [30] were found to be nectarivorous yeasts associated with *Protea* flowers in South Africa. Still on the African continent, in Morocco, a taxonomic study of the floral nectar yeasts of *Teucrium pseudochamaepitys*, *Teucrium polium*, and *Gladiolus italicus* described the new species *M. maroccana* [23]. In the Cerrado ecosystem (Brazil), Rosa et al. [31] isolated twelve strains of *M. cerradonensis* from flowers of *Ipomoea carnea* and from beetles of the genus *Conotelus*. In the Amazonia, a new species closely related to *M. arizonensis* was discovered in passion fruit (*Passiflora edulis*) flowers and was named *M. amazonensis* [25]. From mustard (*Brassica rapa*) and broad bean (*Vicia faba*) fields in Japan, four new strains closely related to the Hawaiian *M. hawaiiiana* were isolated; the four strains were described as a new species named *M. miensis* [24]. Regardless of continent or habitat, there is an extraordinarily high diversity of yeast species that transit between the floral nectaries of diverse plant

species and insects. Table 1 lists some such yeast species and the plant and insect taxa with which they are associated.

It is well known that, through their fermentation activity, yeast communities play significant ecological roles in plant reproduction through mutual relationships with pollinator attraction [32,33]. However, some plants pollinated by invertebrates have their nectar sugars primarily metabolized by the dense populations of yeasts in these environments, drastically reducing pollinators' food reward [34,35]. The following sections will present (i) an overview of the nectar nutrients found in different plant species, (ii) the metabolic pathways carried out by the yeasts inhabiting floral nectar, and (iii) the biotechnological potential of these yeasts. Although it is widely known how beneficial the relationship is to the three parts in question here (yeasts, insects, and plants), we will also address mutualistic relationships in pairs — that is, the mutualism established between yeasts and only one of the other two parties (i.e., plant or insect, but not both simultaneously). Finally, this article aims to encourage researchers worldwide to dig into yeast prospection for high-added-value VOCs.

Table 1. Examples of nectar- and insect-associated yeast species.

Yeasts	Plants	Insects	References
<i>Candida ipomoeae</i>	<i>Ipomoea</i> spp. and Convolvulaceae	<i>Conotelus</i> sp.	[22]
<i>Candida kunwiensis</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Bombus terrestris</i>	[36]
<i>Candida powellii</i> and <i>Candida tilneyi</i>	<i>Ipomoea carnea</i>	<i>Conotelus</i> sp.	[26]
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Helleborus foetidus</i>	<i>Bombus</i> spp.	[15]
<i>Cryptococcus victoriae</i>	<i>Helleborus foetidus</i>	<i>Bombus</i> spp.	[15]
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	<i>Helleborus foetidus</i>	<i>Bombus</i> spp.	[15]
<i>Kodamaea transpacifica</i>	<i>Ipomoea alba</i>	Beetles (<i>Nitidulidae</i>)	[37]
<i>Metschnikowia amazonensis</i>	<i>Passiflora edulis</i>	<i>Conotelus</i> sp.	[25]
<i>Metschnikowia bowlesiae</i>	<i>Ipomoea indica</i>	<i>Conotelus mexicanus</i>	[27]
<i>Metschnikowia caudata</i>	<i>Protea roupelliae</i> , <i>Protea dracomontana</i> , and <i>Protea subvestida</i>	<i>Apis mellifera</i>	[30]
<i>Metschnikowia cerradonensis</i>	<i>Ipomoea carnea</i>	Beetles (<i>Conotelus</i>)	[31]
<i>Metschnikowia cubensis</i>	<i>Ipomoea acuminata</i>	<i>Conotelus</i> spp.	[38]
<i>Metschnikowia drakenbergensis</i>	<i>Protea dracomontana</i>	<i>Heterochelus</i> sp.	[30]
<i>Metschnikowia drosophilae</i>	<i>Ipomoea</i> sp.	<i>Drosophila bromeliae</i>	[26]
<i>Metschnikowia lochheadii</i>	<i>Ipomoea indica</i>	<i>Conotelus mexicanus</i>	[26]
<i>Metschnikowia maroccana</i>	<i>Teucrium polio</i>	NR*	[23]
<i>Metschnikowia miensis</i>	<i>Brassica rapa</i>	NR*	[24]
<i>Metschnikowia proteae</i>	<i>Protea caffra</i>	<i>Atrichelaphinis tigrina</i> , <i>Cyrtothyrea marginalis</i> , and <i>Heterochelus</i> sp.	[29]
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	<i>Helleborus foetidus</i>	<i>Bombus terrestris</i>	[39]
<i>Metschnikowia santaceciliae</i> , <i>Candida hawaiiiana</i> , and <i>Candida kipukae</i>	<i>Ipomoea indica</i>	<i>Conotelus</i> spp.	[40]
<i>Metschnikowia vanudenii</i>	<i>Asclepias syriaca</i>	Flies (<i>Muscidae</i>)	[20]
<i>Pseudohyphozyma bogoriensis</i>	<i>Lamprococcus chlorocarpus</i>	Bees	[41]
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	<i>Cryptanthus diana</i>	Bees	[41]
<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	<i>Aechmea froesii</i>	Bees	[41]
<i>Teunia rosae</i>	<i>Rosa chinensis</i>	NR*	[42]
<i>Teunia rudbeckiae</i>	<i>Rudbeckia bicolor</i>	NR*	[42]

*NR = not reported by the authors.

Table 2. Nectar composition of different angiosperm species.

Plant Species	Sucrose (%) ^a	Glucose (%) ^a	Fructose (%) ^a	Amino Acids Detected ^b	References
<i>Aconitum</i> spp. ^c	39.9–87.6	0–2.9	9.5–60.1	-	[52]
<i>Antirrhinum australe</i>	78.2 ^d	9.4 ^d	12.5 ^d	-	[61]
<i>Aquilegia</i> spp. ^c	96–98.4	1.0–2.5	0.6–1.5	-	[61]
<i>Billbergia distachia</i>	69.5	14.8	15.3	Ala, Asp, Arg, Asn, GABA, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Tyr, Val	[62]
<i>Cotoneaster</i> spp. ^c	0–11.2	22.9–75.0	25.0–65.9	-	[63]
<i>Diplacus (Mimulus) aurantiacus</i>	66.6 ^d	13.3 ^d	20.1 ^d	Ala, Arg, Asp, CIT, GABA, Glu, His, Leu, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val	[64]
<i>Gladiolus illyricus</i>	51.3 ^d	30.7 ^d	18.0 ^d	-	[61]
<i>Gentiana lutea</i>	<1.5 ^d	50.0–55.0 ^d	45.0–50.0 ^d	Ala, BALA, Arg, Cys, CIT, L-HSE, GABA	[65]
<i>Iris</i> spp. ^c	71.4–94.1	3.6–18.6	2.3–10.0	-	[61]
<i>Lonicera</i> spp. ^c	63.5–64.6	22.3–22.7	12.7–14.2	-	[61]
<i>Marrubium supinum</i>	43.6 ^d	26.7 ^d	29.7 ^d	-	[61]
<i>Neottia ovata</i>	18.3	44.0	37.8	Ala, BALA, Arg, Cys, AABA, GABA	[66]
<i>Nicotiana</i> spp. ^c	3.8–57.0	2.7–38.5	29.8–63.2	AABA, Ala, Asn, Asp, BALA, GABA, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Ile, ORN, Phe, Pro, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val	[67]
<i>Polemonium caeruleum</i>	42.1 ^e	21.0 ^e	32.8 ^e	Arg, BABA, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, NVA, ORN, Phe, Pro, Ser, Thr, Val	[68]
<i>Vicia</i> spp. ^c	54.2–56.0	23.9–26.2	19.6–20.1	-	[61]

^a Percentages of the amount of sugar, as reported in the references consulted. ^b Compounds determined to be present in nectar in the references consulted. Some of them did not determine other compounds besides sugar. AABA, α -aminobutyric acid; AAPA, α -aminoadipic acid; Ala, alanine; Arg, Arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartate; BABA, β -aminobutyric acid; BALA, β -alanine; CIT, citrulline; Cys, cysteine; GABA, γ -aminobutyric acid; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycine; His, histidine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; LHSE, L-homoserine; Lys, lysine; Phe, phenylalanine; Met, methionine; NVA, norvaline; ORN, ornithine; Pro, proline; Ser, serine; Thr, threonine; Trp, tryptophan; Tyr, Tyrosine; Val, valine. Proteogenic amino acids have only the first letter capitalized; non-protein amino acids have all letters capitalized. ^c Values are the range of different species of the same genus in each indicated study. ^d Approximated mean values based on the different experimental conditions tested by the authors. ^e Values are the mean of 14 studied populations by [68].

2.2.2 Main Metabolic Routes for Nectar-Based VOC Production

2.2.2.1 Carbohydrate Metabolism

The products of yeast fermentation of sugars are widely described in the literature, although most research on this topic refers to *Saccharomyces cerevisiae* and other model yeasts that are rarely isolated from floral nectar (however, see Gonçalves et al. [69–71] for some pioneer studies on the carbohydrate metabolism of the *Wickerhamiella/Starmerella* clade, which is prevalent in floral nectar). In any case, it is known that, depending on the yeast species involved and the environmental conditions, many VOCs may be obtained from carbohydrate metabolism [72–74]. This is especially relevant for acetaldehyde, ethanol, ethyl acetate, acetic acid, and acetoin, which can be produced within one-to-three reactions (of a metabolic pathway) from pyruvate [75–80]. In fact, as an intermediate product of sugar oxidation, pyruvate can work as a wildcard and be used in different metabolic pathways (Figure 2).

Sucrose, glucose, and fructose are the major sugars in nectar [55,68,81]. Furthermore, yeast cells may hydrolyze sucrose either in the periplasm, cytoplasm, or both [82]. Glucose and fructose result from this breakdown, and then they are channeled to the Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) pathway, producing two mols of pyruvate for each mol of monosaccharide. Pyruvate can follow the alcoholic fermentation route, being decarboxylated into acetaldehyde, which, in turn, is predominantly reduced

into ethanol. Nevertheless, acetaldehyde may have two major species-dependent alternative fates that matter in this context: acetic acid and acetoin. While the first results from acetaldehyde oxidation [77], the second emerges from the condensation of two acetaldehydes. Moreover, when acetaldehyde eventually condensates with pyruvate, acetolactate arises, and this later compound can also be decarboxylated into acetoin [79]. Besides acetoin, acetolactate may give rise to isobutanol as well. In this case, though, it must be first reduced into 2,3-dihydroxyisovalerate, and this is then dehydrated to 2-ketoisovalerate. In turn, 2-ketoisovalerate can be either aminated, producing valine, or decarboxylated into isobutyraldehyde, which is reduced into isobutanol [75,77,80]. Finally, pyruvate can also be oxidized and decarboxylated into acetyl coenzyme A (acetyl-CoA). When it alternatively condensates with ethanol or isobutanol, acetyl-CoA generates ethyl acetate or isobutyl acetate, respectively [78,80] (Figure 2).

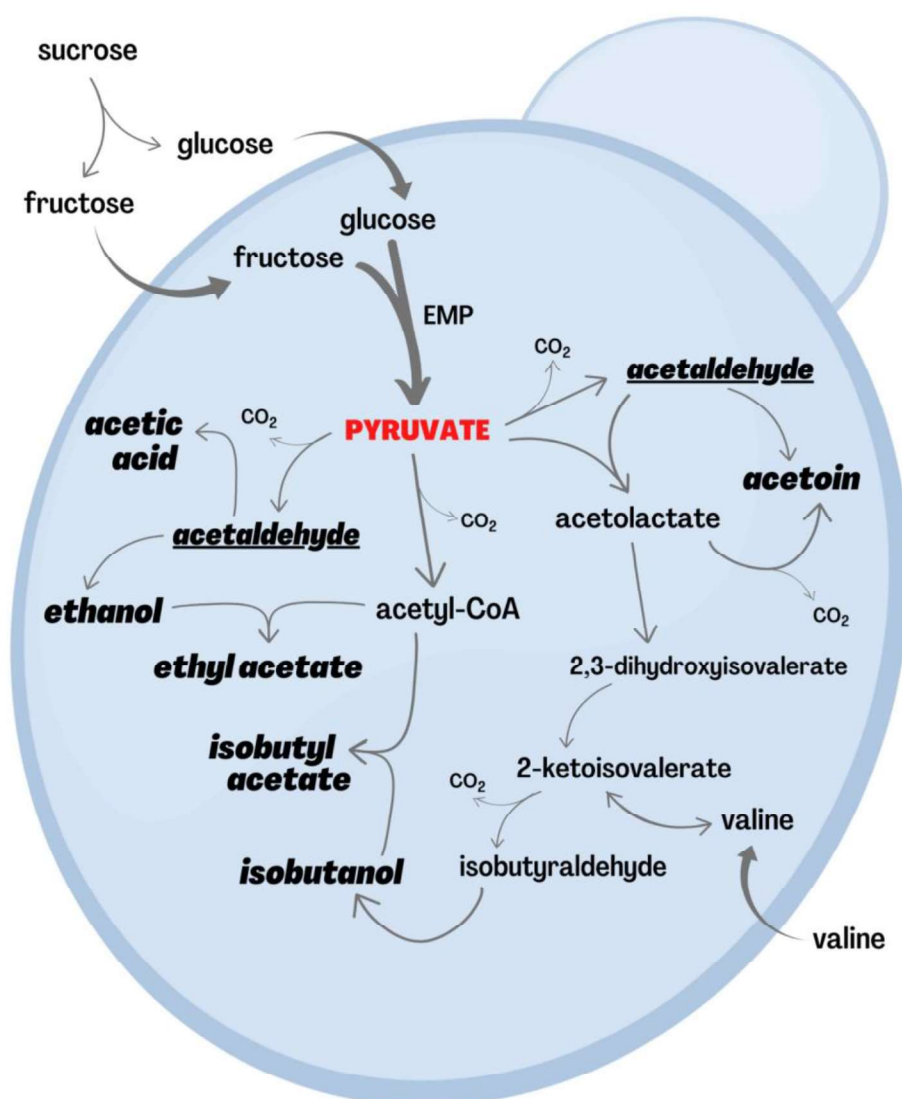


Figure 2. Pyruvate's central role in VOC production from sugars occurring within the cells of *Saccharomyces cerevisiae* and other model yeasts. The hexoses glucose and fructose can be directly available in nectar or be generated from sucrose hydrolysis. Each mol of these hexoses is converted into two mols of pyruvate through the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway, herein represented by a thick arrow. Pyruvate also works as a precursor of amino acids, such as valine, which can be found in nectar as well. VOCs are shown in bold italics. Acetaldehyde (underlined) can be either secreted as any other volatile compound or converted into different VOCs. Enzymes and coenzymes were omitted for the sake of simplification. Carbohydrate metabolism in *Metschnikowia* and other non-*Saccharomyces* yeasts prevalent in floral nectar remains greatly understudied. For further details, see the main text.

Floral nectar can also contain glycoconjugates formed by monosaccharides bound (especially through a β -glucosidic linkage) to aromatic compounds (aglycones), such as geraniol [83,84], α -terpineol [85,86], methyl salicylate [85,87], 1-hexanol [88,89], eugenol [59,90], vanillin, and vanillyl alcohol [91–93]. When these glycoconjugates are hydrolyzed by yeast glucosidases, their aglycones volatilize [94–98], working as attractive or repelling agents for insects (see Section 3).

Last but not least, it is worth noting that pyruvate is an α -keto acid, from which different amino acids can result. This is not just the case of valine, as shown in Figure 2, but also of leucine, isoleucine, and alanine, which can be produced when pyruvate reacts with itself, oxaloacetate (another α -keto acid), threonine, or glutamate [99,100]. The following section will address the role of amino acid metabolism in VOC production.

2.2.2.2 What else, Besides Sugar, may Nectaries Offer to Yeast-Based VOC Production?

Although VOCs can be mostly produced from sugar metabolism, as stated before, other nutrients available in floral nectar cannot be disregarded in the generation of volatile compounds. In fact, these nutrients are meant to work as precursors, being sometimes converted into VOCs. Considering the diversity of the compounds besides sugars in natural nectars (Table 2), amino acids stand out as the second most abundant components [65,101,102], and their transformation increases the myriad of VOCs that may be produced in nectaries [3,76]. As an additional evolutionary strategy, a high rate of tandem gene duplication in the genome of the prevalent nectar-dwelling yeast *Metschnikowia reukaufii* has been reported [103]. It is worth noting that those duplicated genes are directly related to the improvement of this yeast nitrogen metabolism. Moreover, Dhimi et al. [103] found that the high-capacity amino acid importers encoded by *GAP1* and *PUT4* genes were highly expressed in synthetic nectar and regulated by the availability and quality of amino acids. Interestingly, the rapid depletion of nitrogen sources promoted by gene duplications is, in fact, a key mechanism of the priority effects that determine the co-occurrence of nectar microbes.

When metabolizing amino acids, yeasts produce higher alcohols (alcohols that have more than two carbons) and esters [104,105]. Although they are present in much less concentration than sugars [43,55,68,106], virtually all proteogenic amino acids (those twenty used in the protein translational process) are found in floral nectars [66,101,106], with proline, phenylalanine, histidine, asparagine, serine, glutamine, cysteine, and glutamate being the most prevalent ones [65,68,101,102,107,108]. Among them, phenylalanine and cysteine can be, respectively, converted into the higher alcohols 2-phenylethanol and 2-mercaptoethanol through the three-step (transamination–decarboxylation–reduction) Ehrlich Pathway. Moreover, when a higher alcohol such as 2-phenylethanol reacts with acetyl-CoA (which can be originated through both sugar and amino acid oxidation), an acetate ester such as 2-phenylethyl acetate can be easily produced, contributing to the formation of the floral bouquet (reviewed by Dzialo et al. [76]).

In addition to these VOCs, it is worth mentioning that other amino acids (yet present in lower concentrations in floral nectar) can also be converted, within a few reactions, into several other aroma compounds. This is the case of branched-chain amino acids (BCAAs), such as valine (see Figure 2). When catabolized, BCAAs result in their α -keto-acid derivative branched alcohols 2-methyl propanol (isobutanol) and 2- and 3-methyl butanol (isoamyl alcohol) [109,110]. Moreover, threonine, an amino acid highly metabolized by yeasts [76,111,112], may be converted into propanol, butanol, propionic acid, acetic acid, and ethyl acetate [113].

Among the amino acids typically found in nectar, some are not used to build proteins (i.e., the so-called non-protein amino acids—NPAAs). About 250 NPAAs have already been found in plants, especially in the families Fabaceae, Sapindaceae, and Cucurbitaceae [114]. Although NPAAs play central physiological roles in plants, mainly as bioactive compounds (acting as antiherbivore, antimicrobial, antioxidant, and/or growth-promoting agents), some of these amino acids are known to be metabolized by yeasts, namely, taurine [115], β -alanine [116,117], citrulline [89,118], ornithine [119], γ -aminobutyric acid (GABA) [120,121], hydroxytryptophan [122], selenocysteine [123], methionine

sulfoxide [124], serotonin [125], and dopamine [126]. Despite the lack of studies regarding VOC production from NPAAAs by nectar microbes, it is likely that some of them (especially those with S-containing side chains) are converted into volatile compounds by yeast cells [127].

2.3 DOUBLE AGENT YEASTS

The presence of yeasts in flowers and insects has been acknowledged since the 19th century (see, for example, the pioneer study of Boutroux [128]), but it is during the last few decades that the mycological study of flowers and their pollinators has acquired a particular interest [15,21,22,129–131]. In most cases, the relationship between plants and nectar yeast has been pointed out as beneficial to angiosperms because these microorganisms contribute to attracting pollinating insects (as described above). Despite this fruitful symbiosis for the three parts involved, flowers and yeasts can also work together as a duo, establishing a partnership against some insects (e.g., by attracting the parasitoids that infect some pest insects [112,132]).

Nectar-inhabiting yeasts can thus work as “double agents”, either attracting or repelling insects [133]. Although repelling insects may appear to be a disservice to the plant (avoiding approximation of potential pollinators), it may indeed protect the plant from mere pollinivorous insects (the ones that feed on pollen). In line with that, Ljunggren et al. [132] showed that the presence of *Metschnikowia andauensis* and *Metschnikowia pulcherrima*, which are often found in association with insects feeding on foliage, flowers, and/or fruits, had a repelling effect on larvae of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae), an insect species that naturally feeds on the foliage of a wide spectrum of broad-leaved plants [134]. Furthermore, the authors highlighted some VOCs produced by those yeasts in a particularly high manner—such as ethyl 3-methyl butanoate, ethyl propanoate, heptan-4-ol, nonan-2-ol, and sulcatone—which may be involved with the repelling effect they observed.

Interestingly, yeasts may also act against some pest insects, namely, aphids, by attracting their natural parasitoids to the flowers. In this context, Sobhy et al. [112] showed that the aphid parasitoid wasp *Aphidius ervi* is highly attracted by VOCs produced by the nectar specialist yeasts *M. gruessii* and *M. reukaufii*. Moreover, this *Metschnikowia*-fermented nectar proved to offer satisfactory amounts of macro- and micronutrients to meet the *A. ervi* needs. The results found by those authors suggest that parasitoid-attracting VOCs may integrate strategies of insect pest biocontrol.

However, yeasts can also work the other way around, i.e., pro-insect and against plants. In this case, one can say that the plant is the betrayed party. As Ljunggren et al. [132] also showed, the plant-associated yeasts *Cryptococcus nemorosus*, *Metschnikowia lophuriensis*, and *M. hawaiiensis* had an attracting effect on the cotton leafworm *S. littoralis* larvae. It is likely that geranyl acetone, cyclohexanone, 2-ethyl-1-benzofuran, and 1,3,5-undecatriene produced by the so-referred yeasts are related to the leafworm attraction [132]. In this yeast–insect partnership, while the plant is attacked by herbivores, the animal finds a rich nutrient source, and the microorganism benefits from dispersal and a safe breeding place [135,136].

Curiously, Herrera et al. [39] showed that free-ranging bumble bees (*Bombus terrestris*) preferred to feed on yeast-containing nectar of the early-blooming herb *Helleborus foetidus*. However, yeast presence led to a reduction in the number of pollen tubes in style and, consequently, a decline in plant fecundity. In agreement with these findings, *M. reukaufii* has been considered a nectar contaminant. By consuming the nectar sugars, this yeast ends up inhibiting pollen germination (which relies on these carbohydrates as carbon and energy sources) and probably limits fertilization and fruit set in *Asclepias syriaca* [137,138]. The negative effect of *M. reukaufii* on plant fecundity was also corroborated by de Vega and Herrera [139], who demonstrated that the growth of this yeast species renders floral nectar nutritionally poor; the nutrient concentration on flower decreases while yeast density increases. In contrast, Zhou et al. [140] recently showed a positive effect of *Pichia fermentans* on *Carya illinoensis* pollen germination ability, with an average increase of 33.6%. Additionally, Colda et al. [141] observed significantly higher visitation rates of honeybees and hoverflies to the flowers of different varieties of European pear trees (*Pyrus communis*) when *M. reukaufii* was inoculated on nectar with the bacterium *Acinetobacter nectaris*.

However, this visitation increase was not seen when both microorganisms were separately sprayed in the pear flowers [141].

Finally, de Vega et al. [142] have recently reported that the effects of *M. reukaufii* on the reproduction of different Mediterranean plants ranged from negative to neutral or positive, depending on the plant species. Moreover, the authors suggested that the inter-species variation in the indirect effects of nectar-inhabiting yeasts on plant pollination might be due to the variation in the pollinator community, the specific microbes colonizing floral nectar, and the order of microbial arrival to the nectary (i.e., priority effects) [142]. Therefore, the differences between treatments observed by these authors might be driven not only by the interaction of *M. reukaufii* with insect pollinators, but also by the interactions of this yeast species with other nectar microbes, such as bacteria [142].

Be that as it may, the nutritional decay of floral nectar results in decreased concentrations of sucrose, glucose, and fructose, as well as intraspecific characteristics of the nectar, directly impacting the behavior of pollinators [34,53]. Herrera et al. [129] emphasize that the density of yeast cells in nectar can reach an order of between 10^3 and 10^5 cells/mm³, which explains such a change. On the other hand, although this consumption of nutrients by nectar yeasts may seem harmful (from the plant's point of view), it is worth noting that the biotransformations carried out by these microorganisms and even their own cells may be attractive to pollinators and other flower-visiting insects. Furthermore, these metabolic activities produce heat [143,144] and can increase flower temperature by up to 6 °C [145]. This increase in temperature, especially in winter-blooming plants or angiosperms from arctic and alpine environments, has been shown to be beneficial for pollination. In this context, some hypotheses can be raised to explain this benefit: (i) the heat released warms the internal air of the flower and, to a certain extent, the air around it as well, making the temperature more attractive to pollinators; (ii) the increase in temperature favors plant metabolism and, consequently, pollen germination [145]; and (iii) the heat gain facilitates the volatilization of compounds that attract pollinating insects [146].

2.4 PROSPECTING YEASTS FOR BIOTECHNOLOGICAL PURPOSES

The ecological functions of nectar-inhabiting yeasts and the relevance of their relationship with angiosperms and insects for the environmental equilibrium are unquestionable. Furthermore, from a biotechnological point of view, the exploitation of yeast VOCs emerges as a strategy for process development, since there is an increasing commercial interest and market expansion of these compounds. Acetaldehyde, dimethyl disulfide, ethyl acetate, 2-phenyl ethanol, 3-methyl-1-butanol, 2-acetyl furan, indole, geranyl acetone, hexanoic acid, and benzyl alcohol are some examples of VOCs emitted by nectar-inhabiting yeasts that could be commercially exploited as biotechnological products in fermentative processes [133].

VOCs' market expansion attracts advances in yeast prospecting research and bioprocess investment for product development. For example, from the aldehyde class, acetaldehyde is highlighted as a VOC widely expanding in the market and which may be of interest for production by yeasts prospected from angiosperms. This compound is considered a building block for its wide industrial application, being used in the manufacture of acetic acid, flavorings, dyes, and medicines, and it is an intermediate compound for the production of different alcohols [147]. Between 2015 and 2021, the market value of acetaldehyde increased from USD 1.14 billion to USD 1.53 billion, and is expected to further increase to USD 2.54 billion by 2029 [148]. Notably, acetaldehyde is commonly reported as a VOC produced by yeasts obtained from floral nectar, such as *M. reukaufii* and *M. gruessii* [88,112]. *Aureobasidium pullulans* also has the potential for acetaldehyde production. This species has also been reported to produce other compounds of interest, such as n-propanol, isobutanol, 2-methyl-1-butanol, and ethanol [88]. Another important characteristic of *A. pullulans* is its ability to assimilate glucose and xylose, which makes it a promising candidate for the co-production of second-generation bioethanol (using hydrolysates from lignocellulosic biomass) [149].

Given their commercial relevance, the alcohols produced by nectar yeasts can expand the field of biofuels and fine chemical production. For example, ethanol is a primary metabolite of yeast fermentative processes, being a widely reported VOC among prospected yeasts of angiosperms, and

has a high expanding economic interest [88,112,149]. The compound annual growth rate (CAGR) of ethanol is estimated to increase by 4.8% from 2020 to 2027, with a market value of USD 89.1 billion in 2019 [150]. The application of ethanol as a biofuel is the most widespread. Furthermore, ethanol is considered a building block in the industry, since it can be used in the automotive industry and in the medical and food fields. Besides the potential of *A. pullulans* for xylanase production and ethanol co-production, yeasts prospected from angiosperms, such as *M. reukaufii*, *M. koreensis*, and *Rhodotorula* sp. are also associated with ethanol production [149,151].

Other alcohols of interest detected in these natural systems are, for example, 2-methyl propanol, 2-phenyl ethanol, 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanol, and 2-ethyl-1-hexanol [88,112,133,151]. The prospection of VOC-producing yeasts in angiosperms is an alternative for the biotechnological development of a mixture of alcohols with high added value for the biotechnological industry, since these alcohols are used in different sectors for the development of solvents, sanitizing agents, plasticizing agents, and in other highly valued chemicals. The commercial interest of these compounds is associated with the growth of other sectors where these alcohols are building blocks for interesting products, e.g., a 5% growth in the CAGR of 2-ethyl-1-hexanol is estimated between 2020 and 2025. As this alcohol is used in products such as paints, coatings, other construction materials, and adhesives, its market value is projected to expand while its demand increases [152].

A dual role of yeasts in this insect–angiosperm relationship can also be considered. On the one hand, the mutualistic relationship strongly impacts the plant’s nectar chemistry, since yeasts produce VOC mixtures that can attract more insects to the plant. Therefore, the main market interest is focused on prospecting yeasts as VOC production biofactories. On the other hand, this distinctive mixture of VOCs can have a neutral or repelling effect on insects, and exert antimicrobial functions, which can be of interest to exploring the potential of these yeasts and the compounds they produce in agricultural biocontrol [112,153].

The mechanisms of communication between insects and their microbiota have yet to be explored, but there is growing interest in exploiting the insect–microbe system for agricultural biocontrol. These processes may boost studies on the possibilities of using the attraction based on the insect–microorganism system. Since it has been shown that VOCs produced by yeasts can attract hosts to locate food, Sobhy et al. [112] have suggested that strategies to attract the insect out of the planting area would prevent agricultural pest populations from reaching levels of economic damage.

Other strategies such as the production of extracts containing VOC-producing yeast cells or other antimicrobial compounds may also be exploitable. *Metschnikowia pulcherrima* was used for postharvest biocontrol of blue mold infections of apples (caused by *Penicillium expansum*) and was observed to significantly reduce the disease on the fruit during one month of storage, and, to exhibit resistance to diphenylamine, a postharvest antioxidant treatment [154]. Similarly, *Sporobolomyces roseus* was isolated from grape flowers and used for postharvest biocontrol against *P. expansum*, proving to control pathogen growth and mycotoxin production. The results were associated with competition for nutrients and the production of antifungal VOCs [155]. Due to the advances in research on reducing the use of agrochemicals in agriculture, this field of using yeasts related to pollination systems as biocontrol agents for pests in agriculture is still an unexplored gap in research that has a broad biotechnological potential [154–156].

The biotechnological potential of yeasts in the foods and beverages industry (for example in bioflavor production) can be achieved through two approaches: by adjusting the environmental factors of fermentation conduction or via genotype modification of yeast strains. Changing environmental factors can be an important and convenient but sometimes challenging strategy to optimize the production of desired compounds. Therefore, given the recent expansion of the biodiversity of newly isolated yeasts, genetic engineering strategies have been driven to select or develop strains with aromatic properties far beyond what is possible by adjusting environmental parameters [76].

The scenario herein described thus makes clear the importance of prospecting new yeast strains for their potential for VOC production, leading to expanding the biotechnological markets. Table 3 summarizes the industrial application of the main VOCs produced by insect–plant-associated yeasts. Although the real industrial potential nectar-inhabiting yeasts remains to be thoroughly evaluated in terms such as process yield vs. production costs, some yeasts species often found in flowers (including floral nectar) and insects, such as *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces* spp., and *Yarrowia lipolytica*,

have already demonstrated unique metabolic, genetic, and/or physiological features to play a major role in diverse bioprocesses [157–159]. All in all, the near future seems promising, since new technologies for evaluating and collecting these compounds have been investigated and could be significant drivers of further research and investments in the field [157].

Table 3. Summary of the biotechnological potential of insect–plant-associated yeasts for VOC production.

VOCs	Producing Yeasts	Industrial Application	References
Acetaldehyde	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Metschnikowia reukaufii</i> <i>Sporobolomyces roseus</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Adhesive Corrosion inhibitor Flavoring agent Personal care Pesticide Solvent	[88,112,158,159]
Dimethyl disulfide	<i>Metschnikowia reukaufii</i> <i>Metschnikowia gruessii</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Sporobolomyces roseus</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Flavoring agent	[112,158,160]
Ethyl acetate	<i>Metschnikowia reukaufii</i> <i>Sporobolomyces roseus</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Aureobasidium pullulans</i>	Adhesive Household care Flavoring agent Furniture Medical supplies Motor oil Personal and pet care Paint composition Pesticide Pure chemical Solvent	[88,112,158]
Ethanol	<i>Rhodotorula</i> sp. <i>Metschnikowia koreensis</i> <i>Metschnikowia reukaufii</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Antifoaming agent Antimicrobial active Astringent Defoamer Drying agent Flavoring agent Hand sanitizer Laboratory supplies Personal and pet care Sealant Stabilizing agent Surfactant Solvent	[88,112,133,149,151,158,159,161]
2-phenyl ethanol	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Lachancea thermotolerans</i> <i>Metschnikowia reukaufii</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Flavoring agent Household care Personal care Pesticide Preservative	[88,112,158,162,163]
2-methyl-1-butanol	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Metschnikowia gruessii</i> <i>Metschnikowia reukaufii</i> <i>Sporobolomyces roseus</i>	Flavoring agent	[88,112,151,158,161]
2-ethyl-1-hexanol	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Metschnikowia reukaufii</i>	Additive Building materials Dispersant Flavoring agent Solvent	[88,151,161]
Indole	<i>Lachancea thermotolerans</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Flavoring agent Personal care	[162,164]
Geranyl acetone	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Flavoring agent	[162]

Hexanoic acid	<i>Lachancea thermotolerans</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Household care Cleansing Emulsifying Chemical Personal care Surfactant Solvent	[159,162]
Benzyl alcohol	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Antimicrobial Adhesive removers Binder Craft supplies Chemical synthesis Cleaning agent Curing agent Emulsifier Flavoring agent Personal and pet care Solvent Surfactant Viscosity modifier	[162]
Acetic acid	<i>Metschnikowia reukaufii</i> <i>Metschnikowia koreensis</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Antimicrobial agent Craft supplies Buffering agent Flavoring agent Household care Laboratory supplies Pesticide Refining agents	[151,159]

2.5 CONCLUSIONS

It is generally acknowledged that a better understanding of yeast diversity in natural habitats, their tolerance to environmental stressors, their relationships with other organisms, and their ecological roles may help to improve the current biotechnological uses of these microorganisms and develop novel applications. Furthermore, the application of ecological concepts to the design of yeast-based bioprocesses might contribute to achieving the major goals of a circular bioeconomy, namely, the sustainable, resource-efficient valorization of biomass and other resources in integrated production chains [165].

As discussed in previous sections, nectar-inhabiting yeasts have a huge potential in diverse bioprocesses due to the diverse metabolic capabilities linked to niche adaptations they possess and their tolerance to the multiple stress factors often encountered in their natural habitat, such as high osmotic pressure, limited nitrogen availability, acidic pH, presence of toxins of plant origin, and strong competition with other microbes [56,58,61,103,166–169]. Production of a huge variety of VOCs is an additional desirable trait of some nectar yeasts that opens the door to new strategies for controlled pollination and pest biocontrol [112,141,170]. Therefore, although it might still take a long time to dethrone *Saccharomyces cerevisiae* as the main (and sometimes the only) yeast used in most current bioprocesses, we expect that further research on nectar-inhabiting yeasts might lead to expanding the list of non-conventional yeasts of biotechnological interest [171].

Author Contributions: S.L.A.J. conceptualized the manuscript. E.D.F., T.S., M.d.C.D., A.G., and S.L.A.J. wrote the article and assembled its tables and figures. H.T., S.Á.-P., and S.L.A.J. reviewed, corrected, and edited the first, second, and third drafts. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Informed Consent Statement: Not applicable

Funding: AG is a recipient of a scholarship from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development—CNPq. SA-P acknowledges a ‘Ramón y Cajal’ contract funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (RYC2018-023847-I). The funder had no role in the preparation of the manuscript or in the decision to publish. SLAJ acknowledges the Research Promotion Program from the Federal University of Fronteira Sul—UFFS.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Lovell, J.H. Conspicuous Flowers Rarely Visited by Insects. *J. Anim. Behav.* **1914**, *4*, 147–175. <https://doi.org/10.1037/h0072201>.
2. Becher, P.G.; Hagman, A.; Verschut, V.; Chakraborty, A.; Rozpędowska, E.; Lebreton, S.; Bengtsson, M.; Flick, G.; Witzgall, P.; Piškur, J. Chemical Signaling and Insect Attraction Is a Conserved Trait in Yeasts. *Ecol. Evol.* **2018**, *8*, 2962–2974. <https://doi.org/10.1002/ece3.3905>.
3. Raguso, R.A. Why are some floral nectars scented? *Ecology* **2004**, *85*, 1486–1494. <https://doi.org/10.1890/03-0410>.
4. Pozo, M.J.; de Vega, C.; Canto, A.; Herrera, C.M. Presence of Yeasts in Floral Nectar Is Consistent with the Hypothesis of Microbial-Mediated Signaling in Plant-Pollinator Interactions. *Plant Signal Behav.* **2009**, *4*, 1102–1104. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9874>.
5. Brundrett, M.C. Coevolution of Roots and Mycorrhizas of Land Plants. *New Phytol.* **2002**, *154*, 275–304. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00397.x>.
6. Nel, A.; Roques, P.; Nel, P.; Prokin, A.A.; Bourgoin, T.; Prokop, J.; Szwed, J.; Azar, D.; Desutter-Grandcolas, L.; Wappler, T.; et al. The Earliest Known Holometabolous Insects. *Nature* **2013**, *503*, 257–261. <https://doi.org/10.1038/nature12629>.
7. Dujon, B. Yeasts Illustrate the Molecular Mechanisms of Eukaryotic Genome Evolution. *Trends Genet.* **2006**, *22*, 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.05.007>.
8. Kurtzman, C.; Robnett, C. Phylogenetic Relationships among Yeasts of the “*Saccharomyces* complex” Determined from Multigene Sequence Analyses. *FEMS Yeast Res.* **2003**, *3*, 417–432. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00012-6).
9. Heckman, D.S.; Geiser, D.M.; Eidell, B.R.; Stauffer, R.L.; Kardos, N.L.; Hedges, S.B. Molecular Evidence for the Early Colonization of Land by Fungi and Plants. *Science* **2001**, *293*, 1129–1133. <https://doi.org/10.1126/science.1061457>.
10. Boekhout, T. Gut Feeling for Yeasts. *Nature* **2005**, *434*, 449–451. <https://doi.org/10.1038/434449a>.
11. Sun, G.; Dilcher, D.L.; Wang, H.; Chen, Z. A Eudicot from the Early Cretaceous of China. *Nature* **2011**, *471*, 625–628. <https://doi.org/10.1038/nature09811>.
12. Piskur, J.; Rozpędowska, E.; Polakova, S.; Merico, A.; Compagno, C. How Did *Saccharomyces* Evolve to Become a Good Brewer? *Trends Genet.* **2006**, *22*, 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002>.
13. Schiestl, F.P.; Steinebrunner, F.; Schulz, C.; von Reuß, S.; Franke, W.; Weymuth, C.; Leuchtmann, A. Evolution of ‘Pollinator’- Attracting Signals in Fungi. *Biol. Lett.* **2006**, *2*, 401–404. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0479>.
14. Kaiser, R. Flowers and Fungi Use Scents to Mimic Each Other. *Science* **2006**, *311*, 806–807. <https://doi.org/10.1126/science.1119499>.
15. Brysch-Herzberg, M. Ecology of Yeasts in Plant-Bumblebee Mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2004**, *50*, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.06.003>.
16. Pozo, M.I.; Bartlewicz, J.; van Oystaeyen, A.; Benavente, A.; van Kemenade, G.; Wäckers, F.; Jacquemyn, H. Surviving in the Absence of Flowers: Do Nectar Yeasts Rely on Overwintering Bumblebee Queens to Complete Their Annual Life Cycle? *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*, fiy196. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy196>.
17. Herrera, C.M.; Pozo, M.I.; Bazaga, P. Nonrandom Genotype Distribution among Floral Hosts Contributes to Local and Regional Genetic Diversity in the Nectar-Living Yeast *Metschnikowia Reukaufii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *87*, 568–575. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12245>.
18. Hong, S.G.; Chun, J.; Oh, H.W.; Bae, K.S. *Metschnikowia koreensis* sp. nov., a Novel Yeast Species Isolated from Flowers in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 1927–1931. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1927>.
19. Guzmán, B.; Lachance, M.-A.; Herrera, C.M. Phylogenetic Analysis of the Angiosperm-Floricolous Insect–Yeast Association: Have Yeast and Angiosperm Lineages Co-Diversified? *Mol. Phylogenet. Evol.* **2013**, *68*, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.04.003>.

20. Giménez-Jurado, G.; Kurtzman, C.P.; Starmer, W.T.; Spencer-Martins, I. *Metschnikowia vanudenii* sp. nov. and *Metschnikowia lachancei* sp. nov., from Flowers and Associated Insects in North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 1665–1670. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02470-0>.
21. Lachance, M.-A.; Rosa, C.A.; Starmer, W.T.; Schlag-Edler, B.; Baker, J.S.F.; Bowles, J.M. *Metschnikowia continentalis* Var. *borealis*, *Metschnikowia continentalis* Var. *continentalis*, and *Metschnikowia hibisci*, New Heterothallic Haploid Yeasts from Ephemeral Flowers and Associated Insects. *Can. J. Microbiol.* **1998**, *44*, 279–288. <https://doi.org/10.1139/w97-148>.
22. Lachance, M.-A.; Rosa, C.A.; Starmer, W.T.; Schlag-Edler, B.; Barker, J.S.F.; Bowles, J.M. *Wickerhamiella australiensis*, *Wickerhamiella cacticola*, *Wickerhamiella occidentalis*, *Candida drosophilae* and *Candida lipophila*, Five New Related Yeast Species from Flowers and Associated Insects. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1998**, *48*, 1431–1443. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1431>.
23. de Vega, C.; Albaladejo, R.G.; Lachance, M.-A. *Metschnikowia Maroccana* f.a., Sp. Nov., a New Yeast Species Associated with Floral Nectar from Morocco. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2018**, *68*, 2028–2035. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002784>.
24. Shibayama, K.; Otoguro, M.; Nakashima, C.; Yanagida, F. *Metschnikowia miensis* f.a., sp. nov., Isolated from Flowers in Mie Prefecture, Japan. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2020**, *113*, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01340-1>.
25. de Santos, A.R.O.; Lee, D.K.; Ferreira, A.G.; Carmo, M.C.; Rondelli, V.M.; Barros, K.O.; Hsiang, T.; Rosa, C.A.; Lachance, M. The Yeast Community of *Conotelus* Sp. (Coleoptera: Nitidulidae) in Brazilian Passionfruit Flowers (*Passiflora Edulis*) and Description of *Metschnikowia amazonensis* sp. nov., a Large-spored Clade Yeast. *Yeast* **2020**, *37*, 253–260. <https://doi.org/10.1002/yea.3453>.
26. Lachance, M.; Starmer, W.; Rosa, C.; Bowles, J.; Barker, J.; Janzen, D. Biogeography of the Yeasts of Ephemeral Flowers and Their Insects. *FEMS Yeast Res.* **2001**, *1*, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(00\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(00)00003-9).
27. Lachance, M.-A.; Fedor, A.N. Catching Speciation in the Act: *Metschnikowia bowlesiae* sp. nov., a Yeast Species Found in Nitidulid Beetles of Hawaii and Belize. *Antonie Leeuwenhoek* **2014**, *105*, 541–550. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0106-z>.
28. Lachance, M.-A.; Ewing, C.P.; Bowles, J.M.; Starmer, W.T. *Metschnikowia hamakuensis* sp. nov., *Metschnikowia kamakouana* sp. nov. and *Metschnikowia mauinuiana* sp. nov., Three Endemic Yeasts from Hawaiian Nitidulid Beetles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1369–1377. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63615-0>.
29. de Vega, C.; Guzmán, B.; Lachance, M.-A.; Steenhuisen, S.-L.; Johnson, S.D.; Herrera, C.M. *Metschnikowia proteae* Sp. Nov., a Nectarivorous Insect-Associated Yeast Species from Africa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2012**, *62*, 2538–2545. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.040790-0>.
30. de Vega, C.; Guzmán, B.; Steenhuisen, S.-L.; Johnson, S.D.; Herrera, C.M.; Lachance, M.-A. *Metschnikowia drakensbergensis* Sp. Nov. and *Metschnikowia caudata* Sp. Nov., Endemic Yeasts Associated with Protea Flowers in South Africa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, *64*, 3724–3732. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.068445-0>.
31. Rosa, C.A.; Lachance, M.-A.; Teixeira, L.C.R.S.; Pimenta, R.S.; Morais, P.B. *Metschnikowia cerradonensis* Sp. Nov., a Yeast Species Isolated from Ephemeral Flowers and Their Nitidulid Beetles in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57*, 161–165. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64624-0>.
32. Boby, V.U.; Balakrishna, A.N.; Bagyaraj, D.J. Interaction between *Glomus mosseae* and Soil Yeasts on Growth and Nutrition of Cowpea. *Microbiol. Res.* **2008**, *163*, 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.004>.
33. Rodrigues, A.; Cable, R.N.; Mueller, U.G.; Bacci, M.; Pagnocca, F.C. Antagonistic Interactions between Garden Yeasts and Microfungal Garden Pathogens of Leaf-Cutting Ants. *Antonie Leeuwenhoek* **2009**, *96*, 331–342. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9350-7>.
34. Herrera, C.M.; García, I.M.; Pérez, R. Invisible floral larcenies: Microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology* **2008**, *89*, 2369–2376. <https://doi.org/10.1890/08-0241.1>.
35. de Vega, C.; Herrera, C.M.; Johnson, S.D. Yeasts in Floral Nectar of Some South African Plants: Quantification and Associations with Pollinator Type and Sugar Concentration. *South Afr. J. Bot.* **2009**, *75*, 798–806. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.07.016>.
36. Hong, S.G.; Bae, K.S.; Herzberg, M.; Titze, A.; Lachance, M.-A. *Candida kunwiensis* Sp. Nov., a Yeast Associated with Flowers and Bumblebees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 367–372. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02200-0>.
37. Freitas, L.F.D.; Barriga, E.J.C.; Barahona, P.P.; Lachance, M.-A.; Rosa, C.A. *Kodamaea transpacificae* f.a., Sp. Nov., a Yeast Species Isolated from Ephemeral Flowers and Insects in the Galápagos Islands and Malaysia: Further Evidence for Ancient Human Transpacific Contacts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 4324–4329. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052282-0>.
38. Fidalgo-Jimenez, A.; Daniel, H.-M.; Evrard, P.; Decock, C.; Lachance, M.-A. *Metschnikowia cubensis* Sp. Nov., a Yeast Species Isolated from Flowers in Cuba. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 2955–2961. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/001198-0>.
39. Herrera, C.M.; Pozo, M.I.; Medrano, M. Yeasts in Nectar of an Early-Blooming Herb: Sought by Bumble Bees, Detrimental to Plant Fecundity. *Ecology* **2013**, *94*, 273–279. <https://doi.org/10.1890/12-0595.1>.

40. Lachance, M.-A.; Bowles, J.M.; Starmer, W.T. *Metschnikowia santaciliae*, *Candida hawaiiiana*, and *Candida kipukae*, Three New Yeast Species Associated with Insects of Tropical Morning Glory. *FEMS Yeast Res.* **2003**, *3*, 97–103. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2003.tb00144.x>.
41. Félix, C.R.; Navarro, H.M.C.; Paulino, G.V.B.; Almeida, J.H.; Landell, M.F. Behind the Nectar: The Yeast Community in Bromeliads Inflorescences after the Exudate Removal. *Mycol. Prog.* **2021**, *20*, 1191–1202. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01728-2>.
42. Wang, G.-S.; Zhou, Y.; Xue, L.; Li, A.-H.; Wangmu; Wang, Q.-M. *Teunia rosae* Sp. Nov. and *Teunia rudbeckiae* Sp. Nov. (Cryptococcaceae, Tremellales), Two Novel Basidiomycetous Yeast Species Isolated from Flowers. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 5394–5400. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004423>.
43. Jacquemyn, H.; Pozo, M.I.; Álvarez-Pérez, S.; Lievens, B.; Fukami, T. Yeast–Nectar Interactions: Metacommunities and Effects on Pollinators. *Curr. Opin. Insect. Sci.* **2021**, *44*, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.09.014>.
44. Roy, R.; Schmitt, A.J.; Thomas, J.B.; Carter, C.J. Review: Nectar Biology: From Molecules to Ecosystems. *Plant Sci.* **2017**, *262*, 148–164. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.04.012>.
45. Mitchell, R.J.; Irwin, R.E.; Flanagan, R.J.; Karron, J.D. Ecology and Evolution of Plant–Pollinator Interactions. *Ann. Bot.* **2009**, *103*, 1355–1363. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp122>.
46. Jones, G.D.; Jones, S.D. The Uses of Pollen and Its Implication for Entomology. *Neotrop. Entomol.* **2001**, *30*, 314–349. <https://doi.org/10.1590/S1519-566x2001000300001>.
47. Cusumano, A.; Bella, P.; Peri, E.; Rostás, M.; Guarino, S.; Lievens, B.; Colazza, S. Nectar-Inhabiting Bacteria Affect Olfactory Responses of an Insect Parasitoid by Altering Nectar Odors. *Microb. Ecol.* **2022**. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02078-6>.
48. Schaeffer, R.N.; Rering, C.C.; Maalouf, I.; Beck, J.J.; Vannette, R.L. Microbial Metabolites Elicit Distinct Olfactory and Gustatory Preferences in Bumblebees. *Biol. Lett.* **2019**, *15*, 20190132. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0132>.
49. Wehner, J.; Mittelbach, M.; Rillig, M.C.; Verbruggen, E. Specialist Nectar-Yeasts Decline with Urbanization in Berlin. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45315. <https://doi.org/10.1038/srep45315>.
50. Percival, M.S. Types of Nectar in Angiosperms. *New Phytol.* **1961**, *60*, 235–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1961.tb06255.x>.
51. Bernardello, G. A Systematic Survey of Floral Nectaries. In *Nectaries and Nectar*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 19–128.
52. Antón, S.; Denisow, B. Nectar Production and Carbohydrate Composition across Floral Sexual Phases: Contrasting Patterns in Two Protandrous Aconitum Species (Delphinieae, Ranunculaceae). *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* **2014**, *209*, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.07.001>.
53. Canto, A.; Perez, R.; Medrano, M.; Castellanos, M.C.; Herrera, C.M. Intra-Plant Variation in Nectar Sugar Composition in Two Aquilegia Species (Ranunculaceae): Contrasting Patterns under Field and Glasshouse Conditions. *Ann. Bot.* **2006**, *99*, 653–660. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl291>.
54. Herrera, C.M.; Perez, R.; Alonso, C. Extreme Intraplant Variation in Nectar Sugar Composition in an Insect-Pollinated Perennial Herb. *Am. J. Bot.* **2006**, *93*, 575–581. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.4.575>.
55. Nicolson, S.W.; Thornburg, R.W. Nectar Chemistry. In *Nectaries and Nectar*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 215–264.
56. Álvarez-Pérez, S.; Tsuji, K.; Donald, M.; van Assche, A.; Vannette, R.L.; Herrera, C.M.; Jacquemyn, H.; Fukami, T.; Lievens, B. Nitrogen Assimilation Varies Among Clades of Nectar- and Insect-Associated Acinetobacters. *Microb. Ecol.* **2021**, *81*, 990–1003. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01671-x>.
57. Goulson, D. Foraging Strategies of Insects for Gathering Nectar and Pollen, and Implications for Plant Ecology and Evolution. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **1999**, *2*, 185–209. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00070>.
58. Herrera, C.M. Scavengers That Fit beneath a Microscope Lens. *Ecology* **2017**, *98*, 2725–2726. <https://doi.org/10.1002/ecy.1874>.
59. Palmer-Young, E.C.; Farrell, I.W.; Adler, L.S.; Milano, N.J.; Egan, P.A.; Junker, R.R.; Irwin, R.E.; Stevenson, P.C. Chemistry of Floral Rewards: Intra- and Interspecific Variability of Nectar and Pollen Secondary Metabolites across Taxa. *Ecol. Monogr.* **2019**, *89*, e01335. <https://doi.org/10.1002/ecm.1335>.
60. Pozo, M.I.; Jacquemyn, H. Addition of Pollen Increases Growth of Nectar-Living Yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2019**, *366*, fnz191. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz191>.
61. Pozo, M.I.; Herrera, C.M.; van den Ende, W.; Verstrepen, K.; Lievens, B.; Jacquemyn, H. The Impact of Nectar Chemical Features on Phenotypic Variation in Two Related Nectar Yeasts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2015**, *91*, fiv055. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv055>.
62. Zambon, V.; Agostini, K.; Nepi, M.; Rossi, M.L.; Martinelli, A.P.; Sazima, M. The Role of Nectar Traits and Nectary Morphoanatomy in the Plant-Pollinator Interaction between *Billbergia distachia* (Bromeliaceae) and the Hermit *Phaethornis eurynome* (Trochilidae). *Bot. J. Linn. Soc.* **2020**, *192*, 816–827. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boz107>.

63. Dmitruk, M.; Strzałkowska-Abamek, M.; Bożek, M.; Denisow, B. Plants Enhancing Urban Pollinators: Nectar Rather than Pollen Attracts Pollinators of *Cotoneaster* Species. *Urban Urban Green* **2022**, *74*, 127651. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2022.127651>.
64. Peay, K.G.; Belisle, M.; Fukami, T. Phylogenetic Relatedness Predicts Priority Effects in Nectar Yeast Communities. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *279*, 749–758. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1230>.
65. Bogó, G.; Fisogni, A.; Rabassa-Juvanteny, J.; Bortolotti, L.; Nepi, M.; Guarnieri, M.; Conte, L.; Galloni, M. Nectar Chemistry Is Not Only a Plant's Affair: Floral Visitors Affect Nectar Sugar and Amino Acid Composition. *Oikos* **2021**, *130*, 1180–1192. <https://doi.org/10.1111/oik.08176>.
66. Brzosko, E.; Bajguz, A.; Chmur, M.; Burzyńska, J.; Jermakowicz, E.; Mirski, P.; Zieliński, P. How Are the Flower Structure and Nectar Composition of the Generalistic Orchid *Neottia Ovata* Adapted to a Wide Range of Pollinators? *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2214. <https://doi.org/10.3390/ijms22042214>.
67. Silva, F.A.; Chatt, E.C.; Mahalim, S.-N.; Guirgis, A.; Guo, X.; Nettleton, D.S.; Nikolau, B.J.; Thornburg, R.W. Metabolomic Profiling of *Nicotiana* spp. Nectars Indicate That Pollinator Feeding Preference Is a Stronger Determinant Than Plant Phylogenetics in Shaping Nectar Diversity. *Metabolites* **2020**, *10*, 214. <https://doi.org/10.3390/metabo10050214>.
68. Ryniewicz, J.; Skłodowski, M.; Chmur, M.; Bajguz, A.; Roguz, K.; Roguz, A.; Zych, M. Intraspecific Variation in Nectar Chemistry and Its Implications for Insect Visitors: The Case of the Medicinal Plant, *Polemonium caeruleum* L. *Plants* **2020**, *9*, 1297. <https://doi.org/10.3390/plants9101297>.
69. Gonçalves, C.; Marques, M.; Gonçalves, P. Contrasting Strategies for Sucrose Utilization in a Floral Yeast Clade. *mSphere* **2022**, *7*, e00035-22. <https://doi.org/10.1128/msphere.00035-22>.
70. Gonçalves, C.; Ferreira, C.; Gonçalves, L.G.; Turner, D.L.; Leandro, M.J.; Salema-Oom, M.; Santos, H.; Gonçalves, P. A New Pathway for Mannitol Metabolism in Yeasts Suggests a Link to the Evolution of Alcoholic Fermentation. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2510. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02510>.
71. Gonçalves, C.; Wisecaver, J.H.; Kominek, J.; Oom, M.S.; Leandro, M.J.; Shen, X.-X.; Opulente, D.A.; Zhou, X.; Peris, D.; Kurtzman, C.P.; et al. Evidence for Loss and Reacquisition of Alcoholic Fermentation in a Fructophilic Yeast Lineage. *Elife* **2018**, *7*, 33034. <https://doi.org/10.7554/eLife.33034>.
72. Amorim, J.C.; Schwan, R.F.; Duarte, W.F. Sugar Cane Spirit (Cachaça): Effects of Mixed Inoculum of Yeasts on the Sensory and Chemical Characteristics. *Food Res. Int.* **2016**, *85*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.014>.
73. Arrizon, J.; Fiore, C.; Acosta, G.; Romano, P.; Gschaedler, A. Fermentation Behaviour and Volatile Compound Production by Agave and Grape Must Yeasts in High Sugar Agave Tequilana and Grape Must Fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2006**, *89*, 181–189. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9022-1>.
74. Perrusquía-Luévano, S.; Cano-Herrera, M.S.; Guigón-López, C.; del Avitia-Talamantes, M.C.; Torres-Torres, C.; Villalpando, I. Microbiology of high-sugar must fermentation by novel yeasts from the chihuahuan desert. *FEMS Yeast Res.* **2018**, *19*, foy099. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy099>.
75. Brat, D.; Weber, C.; Lorenzen, W.; Bode, H.B.; Boles, E. Cytosolic Re-Localization and Optimization of Valine Synthesis and Catabolism Enables Increased Isobutanol Production with the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 65. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-65>.
76. Dzialo, M.C.; Park, R.; Steensels, J.; Lievens, B.; Verstrepen, K.J. Physiology, Ecology and Industrial Applications of Aroma Formation in Yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, S95–S128. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>.
77. Ida, K.; Ishii, J.; Matsuda, F.; Kondo, T.; Kondo, A. Eliminating the Isoleucine Biosynthetic Pathway to Reduce Competitive Carbon Outflow during Isobutanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 62. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0240-6>.
78. Kruis, A.J.; Levisson, M.; Mars, A.E.; van der Ploeg, M.; Garcés Daza, F.; Ellena, V.; Kengen, S.W.M.; van der Oost, J.; Weusthuis, R.A. Ethyl Acetate Production by the Elusive Alcohol Acetyltransferase from Yeast. *Metab. Eng.* **2017**, *41*, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.03.004>.
79. Romano, P.; Suzzi, G. Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 309–315. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.309-315.1996>.
80. Seo, H.; Giannone, R.J.; Yang, Y.-H.; Trinh, C.T. Proteome Reallocation Enables the Selective de Novo Biosynthesis of Non-Linear, Branched-Chain Acetate Esters. *Metab. Eng.* **2022**, *73*, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.05.003>.
81. Pacini, E.; Nepi, M. Nectar Production and Presentation. In *Nectaries and Nectar*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 167–214.
82. Badotti, F.; Dário, M.G.; Alves, S.L.; Cordioli, M.L.A.; Miletto, L.C.; de Araujo, P.S.; Stambuk, B.U. Switching the Mode of Sucrose Utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **2008**, *7*, 4. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-4>.
83. Serra Colomer, M.; Funch, B.; Solodovnikova, N.; Hobley, T.J.; Förster, J. Biotransformation of Hop Derived Compounds by *Brettanomyces* Yeast Strains. *J. Inst. Brew.* **2020**, *126*, 280–288. <https://doi.org/10.1002/jib.610>.

84. Ecroyd, C.E.; Franich, R.A.; Kroese, H.W.; Steward, D. Volatile Constituents of *Dactylanthus Taylorii* Flower Nectar in Relation to Flower Pollination and Browsing by Animals. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1387–1389. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00403-T](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00403-T).
85. Cabaroglu, T.; Selli, S.; Canbas, A.; Lepoutre, J.-P.; Günata, Z. Wine Flavor Enhancement through the Use of Exogenous Fungal Glycosidases. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 581–587. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00179-0).
86. Jerković, I.; Prdun, S.; Marijanović, Z.; Zekić, M.; Bubalo, D.; Svečnjak, L.; Tuberoso, C. Traceability of *Satsuma mandarin* (Citrus Unshiu Marc.) Honey through Nectar/Honey-Sac/Honey Pathways of the Headspace, Volatiles, and Semi-Volatiles: Chemical Markers. *Molecules* **2016**, *21*, 1302. <https://doi.org/10.3390/molecules21101302>.
87. Primante, C.; Dötterl, S. A Syrphid Fly Uses Olfactory Cues to Find a Non-Yellow Flower. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36*, 1207–1210. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9871-6>.
88. Rering, C.C.; Beck, J.J.; Hall, G.W.; McCartney, M.M.; Vannette, R.L. Nectar-inhabiting Microorganisms Influence Nectar Volatile Composition and Attractiveness to a Generalist Pollinator. *New Phytol.* **2018**, *220*, 750–759. <https://doi.org/10.1111/nph.14809>.
89. Wu, D.; Li, X.; Sun, J.; Cai, G.; Xie, G.; Lu, J. Effect of Citrulline Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* on the Formation of Ethyl Carbamate during Chinese Rice Wine Fermentation. *J. Inst. Brew.* **2018**, *124*, 77–84. <https://doi.org/10.1002/jib.473>.
90. Pérez, A.G.; Cert, A.; Ríos, J.J.; Olías, J.M. Free and Glycosidically Bound Volatile Compounds from Two Banana Cultivars: Valery and Pequeña Enana. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4393–4397. <https://doi.org/10.1021/jf9704524>.
91. Aurore, G.; Ginies, C.; Ganou-parfait, B.; Renard, C.M.G.C.; Fährasmane, L. Comparative Study of Free and Glycoconjugated Volatile Compounds of Three Banana Cultivars from French West Indies: Cavendish, Frayssinette and Plantain. *Food Chem.* **2011**, *129*, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.104>.
92. Krammer, G.; Winterhalter, P.; Schwab, M.; Schreier, P. Glycosidically Bound Aroma Compounds in the Fruits of *Prunus* Species: Apricot (*P. Armeniaca*, L.), Peach (*P. Persica*, L.), Yellow Plum (*P. Domestica*, L. Ssp. *Syriaca*). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 778–781. <https://doi.org/10.1021/jf00004a032>.
93. Jakubska-Busse, A.; Czeluśniak, I.; Kobyłka, M.J.; Hojniak, M. Why Does an Obligate Autogamous Orchid Produce Insect Attractants in Nectar? A Case Study on *Epipactis Albensis* (Orchidaceae). *BMC Plant. Biol.* **2022**, *22*, 196. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03563-3>.
94. dos Santos, A.C.; Biluca, F.C.; Braghini, F.; Gonzaga, L.V.; Costa, A.C.O.; Fett, R. Phenolic Composition and Biological Activities of Stingless Bee Honey: An Overview Based on Its Aglycone and Glycoside Compounds. *Food Res. Int.* **2021**, *147*, 110553. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110553>.
95. Cna'ani, A.; Shavit, R.; Ravid, J.; Aravena-Calvo, J.; Skaliter, O.; Masci, T.; Vainstein, A. Phenylpropanoid Scent Compounds in *Petunia* × *Hybrida* Are Glycosylated and Accumulate in Vacuoles. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1898. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01898>.
96. Hampel, D.; Robinson, A.L.; Johnson, A.J.; Ebeler, S.E. Direct Hydrolysis and Analysis of Glycosidically Bound Aroma Compounds in Grapes and Wines: Comparison of Hydrolysis Conditions and Sample Preparation Methods. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2014**, *20*, 361–377. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12087>.
97. Liang, Z.; Fang, Z.; Pai, A.; Luo, J.; Gan, R.; Gao, Y.; Lu, J.; Zhang, P. Glycosidically Bound Aroma Precursors in Fruits: A Comprehensive Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 215–243. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1813684>.
98. Yazaki, K.; Arimura, G.; Ohnishi, T. 'Hidden' Terpenoids in Plants: Their Biosynthesis, Localization and Ecological Roles. *Plant Cell Physiol.* **2017**, *58*, 1615–1621. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx123>.
99. Lehnen, M.; Ebert, B.E.; Blank, L.M. A Comprehensive Evaluation of Constraining Amino Acid Biosynthesis in Compartmented Models for Metabolic Flux Analysis. *Metab. Eng. Commun.* **2017**, *5*, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2017.07.001>.
100. Yang, S.; Chen, X.; Xu, N.; Liu, L.; Chen, J. Urea Enhances Cell Growth and Pyruvate Production in *Torulopsis glabrata*. *Biotechnol. Prog.* **2014**, *30*, 19–27. <https://doi.org/10.1002/btpr.1817>.
101. Broadhead, G.T.; Raguso, R.A. Associative Learning of Non-Sugar Nectar Components: Amino Acids Modify Nectar Preference in a Hawkmoth. *J. Exp. Biol.* **2021**, *224*, 234633. <https://doi.org/10.1242/jeb.234633>.
102. Nepi, M. Beyond Nectar Sweetness: The Hidden Ecological Role of Non-Protein Amino Acids in Nectar. *J. Ecol.* **2014**, *102*, 108–115. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12170>.
103. Dhami, M.K.; Hartwig, T.; Fukami, T. Genetic Basis of Priority Effects: Insights from Nectar Yeast. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2016**, *283*, 20161455. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1455>.
104. Eleutério dos Santos, C.M.; de Pietrowski, G.A.M.; Braga, C.M.; Rossi, M.J.; Ninow, J.; Machado dos Santos, T.P.; Wosiacki, G.; Jorge, R.M.M.; Nogueira, A. Apple Aminoacid Profile and Yeast Strains in the Formation of Fusel Alcohols and Esters in Cider Production. *J. Food Sci.* **2015**, *80*, C1170–C1177. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12879>.

105. Pereira, C.; Mendes, D.; Dias, T.; Garcia, R.; da Silva, M.G.; Cabrita, M.J. Revealing the Yeast Modulation Potential on Amino Acid Composition and Volatile Profile of Arinto White Wines by a Combined Chromatographic-Based Approach. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1641*, 461991. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461991>.
106. Baker, H.G.; Baker, I. The Occurrence and Significance of Amino Acids in Floral Nectar. *Plant Syst. Evol.* **1986**, *151*, 175–186. <https://doi.org/10.1007/BF02430273>.
107. Nepi, M.; von Aderkas, P.; Wagner, R.; Mugnaini, S.; Coulter, A.; Pacini, E. Nectar and Pollination Drops: How Different Are They? *Ann. Bot.* **2009**, *104*, 205–219. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp124>.
108. Zych, M.; Stpiczyńska, M.; Roguz, K. Reproductive Biology of the Red List Species *Polemonium caeruleum* (Polemoniaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **2013**, *173*, 92–107. <https://doi.org/10.1111/boj.12071>.
109. Ardö, Y. Flavour Formation by Amino Acid Catabolism. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.005>.
110. Filannino, P.; di Cagno, R.; Gambacorta, G.; Tlais, A.Z.A.; Cantatore, V.; Gobbetti, M. Volatilome and Bioaccessible Phenolics Profiles in Lab-Scale Fermented Bee Pollen. *Foods* **2021**, *10*, 286. <https://doi.org/10.3390/foods10020286>.
111. Chua, J.-Y.; Tan, S.J.; Liu, S.-Q. Understanding the Interaction of Isoleucine Paired with Other Amino Acids in Soy Whey Alcohol Fermentation Using *Torulaspora delbrueckii*. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *333*, 108802. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108802>.
112. Sobhy, I.S.; Baets, D.; Goelen, T.; Herrera-Malaver, B.; Bosmans, L.; van den Ende, W.; Verstrepen, K.J.; Wäckers, F.; Jacquemyn, H.; Lievens, B. Sweet Scents: Nectar Specialist Yeasts Enhance Nectar Attraction of a Generalist Aphid Parasitoid Without Affecting Survival. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1009. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01009>.
113. Fairbairn, S.; McKinnon, A.; Musarurwa, H.T.; Ferreira, A.C.; Bauer, F.F. The Impact of Single Amino Acids on Growth and Volatile Aroma Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2554. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02554>.
114. Vranova, V.; Rejsek, K.; Skene, K.R.; Formanek, P. Non-Protein Amino Acids: Plant, Soil and Ecosystem Interactions. *Plant Soil* **2011**, *342*, 31–48. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0673-y>.
115. Hébert, A.; Forquin-Gomez, M.-P.; Roux, A.; Aubert, J.; Junot, C.; Heilier, J.-F.; Landaud, S.; Bonnarne, P.; Beckerich, J.-M. New Insights into Sulfur Metabolism in Yeasts as Revealed by Studies of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 1200–1211. <https://doi.org/10.1128/AEM.03259-12>.
116. Andersen, G.; Andersen, B.; Dobritsch, D.; Schnackerz, K.D.; Piškur, J. A Gene Duplication Led to Specialized γ -Aminobutyrate and β -Alanine Aminotransferase in Yeast. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1804–1817. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05729.x>.
117. Linder, T. Phenotypical Characterisation of a Putative ω -Amino Acid Transaminase in the Yeast *Scheffersomyces stipitis*. *Arch. Microbiol.* **2019**, *201*, 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1608-x>.
118. Leça, J.M.; Pereira, V.; Miranda, A.; Vilchez, J.L.; Malfeito-Ferreira, M.; Marques, J.C. Impact of Indigenous Non-*Saccharomyces* Yeasts Isolated from Madeira Island Vineyards on the Formation of Ethyl Carbamate in the Aging of Fortified Wines. *Processes* **2021**, *9*, 799. <https://doi.org/10.3390/pr9050799>.
119. Nielsen, J. Yeast Cells Handle Stress by Reprogramming Their Metabolism. *Nature* **2019**, *572*, 184–185. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-02288-y>.
120. Ji, H.; Lu, X.; Zong, H.; Zhuge, B. γ -Aminobutyric Acid Accumulation Enhances the Cell Growth of *Candida glycerinogenes* under Hyperosmotic Conditions. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2018**, *64*, 84–89. <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.08.002>.
121. Palavecino-Ruiz, M.; Bermudez-Moretti, M.; Correa-Garcia, S. Unravelling the Transcriptional Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* UGA Genes: The Dual Role of Transcription Factor Leu3. *Microbiology* **2017**, *163*, 1692–1701. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000560>.
122. PARK, M.; KANG, K.; PARK, S.; BACK, K. Conversion of 5-Hydroxytryptophan into Serotonin by Tryptophan Decarboxylase in Plants, *Escherichia coli*, and Yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 2456–2458. <https://doi.org/10.1271/bbb.80220>.
123. Bierla, K.; Bianga, J.; Ouerdane, L.; Szpunar, J.; Yiannikouris, A.; Lobinski, R. A Comparative Study of the Se/S Substitution in Methionine and Cysteine in Se-Enriched Yeast Using an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP MS)-Assisted Proteomics Approach. *J. Proteom.* **2013**, *87*, 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.010>.
124. Sideri, T.C.; Willetts, S.A.; Avery, S. v. Methionine Sulphoxide Reductases Protect Iron–Sulphur Clusters from Oxidative Inactivation in Yeast. *Microbiology* **2009**, *155*, 612–623. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022665-0>.
125. Muñoz-Calvo, S.; Bisquert, R.; Fernández-Cruz, E.; García-Parrilla, M.C.; Guillaumon, J.M. Deciphering the Melatonin Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* by the Bioconversion of Related Metabolites. *J. Pineal. Res.* **2019**, *66*, e12554. <https://doi.org/10.1111/jpi.12554>.

126. Yilmaz, C.; Gökmen, V. Formation of Amino Acid Derivatives in White and Red Wines during Fermentation: Effects of Non-*Saccharomyces* Yeasts and *Oenococcus oeni*. *Food Chem.* **2021**, *343*, 128415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128415>.
127. Banwart, W.L.; Bremner, J.M. Formation of Volatile Sulfur Compounds by Microbial Decomposition of Sulfur-Containing Amino Acids in Soils. *Soil Biol. Biochem.* **1975**, *7*, 359–364. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(75\)90050-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(75)90050-4).
128. Boutroux L Conservation Des Ferments Alcooliques Dans La Nature. *Ann. Sci Nat.* **1884**, *17*, 144–209.
129. Herrera, C.M.; de Vega, C.; Canto, A.; Pozo, M.I. Yeasts in Floral Nectar: A Quantitative Survey. *Ann. Bot.* **2009**, *103*, 1415–1423. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp026>.
130. Kevan, P.G.; Eisikowitch, D.; Fowle, S.; Thomas, K. Yeast-Contaminated Nectar and Its Effects on Bee Foraging. *J. Apic. Res.* **1988**, *27*, 26–29. <https://doi.org/10.1080/00218839.1988.11100777>.
131. Sandhu, D.K.; Waraich, M.K. Yeasts Associated with Pollinating Bees and Flower Nectar. *Microb. Ecol.* **1985**, *11*, 51–58. <https://doi.org/10.1007/BF02015108>.
132. Ljunggren, J.; Borrero-Echeverry, F.; Chakraborty, A.; Lindblom, T.U.T.; Hedenström, E.; Karlsson, M.; Witzgall, P.; Bengtsson, M. Yeast Volatomes Differentially Affect Larval Feeding in an Insect Herbivore. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e01761-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01761-19>.
133. Crowley-Gall, A.; Rering, C.C.; Rudolph, A.B.; Vannette, R.L.; Beck, J.J. Volatile Microbial Semiochemicals and Insect Perception at Flowers. *Curr. Opin. Insect. Sci.* **2021**, *44*, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.10.004>.
134. Zakir, A.; Khallaf, M.A.; Hansson, B.S.; Witzgall, P.; Anderson, P. Herbivore-Induced Changes in Cotton Modulates Reproductive Behavior in the Moth *Spodoptera littoralis*. *Front. Ecol. Evol.* **2017**, *5*, 49. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00049>.
135. Blackwell, M. Made for Each Other: Ascomycete Yeasts and Insects. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5*, 945–962. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0081-2016>.
136. Stefanini, I. Yeast-Insect Associations: It Takes Guts. *Yeast* **2018**, *35*, 315–330. <https://doi.org/10.1002/yea.3309>.
137. Eisdowitch, D.; Kevan, P.G.; Lachance, M.-A. The nectar-inhabiting yeasts and their effect on pollen germination in common milkweed, *Asclepias syriaca* L. *Isr. J. Bot.* **1990**, *39*, 217–225. <https://doi.org/10.1080/0021213X.1990.10677145>.
138. Eisikowitch, D.; Lachance, M.A.; Kevan, P.G.; Willis, S.; Collins-Thompson, D.L. The Effect of the Natural Assemblage of Microorganisms and Selected Strains of the Yeast *Metschnikowia reukaufii* in Controlling the Germination of Pollen of the Common Milkweed *Asclepias syriaca*. *Can. J. Bot.* **1990**, *68*, 1163–1165. <https://doi.org/10.1139/b90-147>.
139. de Vega, C.; Herrera, C.M. Relationships among Nectar-Dwelling Yeasts, Flowers and Ants: Patterns and Incidence on Nectar Traits. *Oikos* **2012**, *121*, 1878–1888. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2012.20295.x>.
140. Zhou, J.; Jin, Q.; Peng, H.; Ye, H.; Qi, Q.; Zhu, T. Delaying the Decline of Germination Ability of Pecan Pollen by Yeast *Pichia fermentans* 15B1. *Sci. Hortic.* **2022**, *304*, 111301. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111301>.
141. Colda, A.; Bossaert, S.; Verreth, C.; Vanhoutte, B.; Honnay, O.; Keulemans, W.; Lievens, B. Inoculation of Pear Flowers with *Metschnikowia reukaufii* and *Acinetobacter nectaris* Enhances Attraction of Honeybees and Hoverflies, but Does Not Increase Fruit and Seed Set. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0250203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250203>.
142. de Vega, C.; Albaladejo, R.G.; Álvarez-Pérez, S.; Herrera, C.M. Contrasting Effects of Nectar Yeasts on the Reproduction of Mediterranean Plant Species. *Am. J. Bot.* **2022**, *109*, 393–405. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1834>.
143. Cooney, M.J.; Marison, I.W.; van Gulik, W.M.; von Stockar, U. Calorimetric and Stoichiometric Analysis of Growth of *Kluyveromyces fragilis* in Continuous Culture: Nitrogen Limitation Imposed upon Carbon-Limited Growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *44*, 643–653. <https://doi.org/10.1007/BF00172498>.
144. Lamprecht, I. Calorimetry and Thermodynamics of Living Systems. *Thermochim. Acta* **2003**, *405*, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(03\)00123-0](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(03)00123-0).
145. Herrera, C.M.; Pozo, M.I. Nectar Yeasts Warm the Flowers of a Winter-Blooming Plant. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2010**, *277*, 1827–1834. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2252>.
146. van der Kooi, C.J.; Kevan, P.G.; Koski, M.H. The Thermal Ecology of Flowers. *Ann. Bot.* **2019**, *124*, 343–353. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz073>.
147. IndustryARC™—Market Research Reports, Business Consulting Services & Analytics. Available online: <https://www.industryarc.com/> (accessed on 19 August 2022).
148. Acetaldehyde Market Value Worldwide 2015–2029 | Statista. Available online: <https://www.statista.com/statistics/1244409/global-market-value-acetaldehyde/> (accessed on 19 August 2022).
149. Martins, G.M.; Bocchini-Martins, D.A.; Bezzerra-Bussoli, C.; Pagnocca, F.C.; Boscolo, M.; Monteiro, D.A.; da Silva, R.; Gomes, E. The Isolation of Pentose-Assimilating Yeasts and Their Xylose Fermentation Potential. *Braz. J. Microbiol.* **2018**, *49*, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.014>.
150. Ethanol Market Size, Share & Trends Report, 2020–2027. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/ethanol-market> (accessed on 19 August 2022).

151. Golonka, A.; Johnson, B.; Freeman, J.; Hinson, D.W. Impact of Nectarivorous Yeasts on *Silene Caroliniana*'s Scent. *East. Biol.* **2014**, *3*, 1–26.
152. 2-Ethyl Hexanol Market | 2022 —27 | Industry Share, Size, Growth—Mordor Intelligence. Available online: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/2-ethyl-hexanol-market> (accessed on 19 August 2022).
153. Quintana-Rodríguez, E.; Ramírez-Rodríguez, A.G.; Ramírez-Chávez, E.; Molina-Torres, J.; Camacho-Coronel, X.; Esparza-Claudio, J.; Heil, M.; Orona-Tamayo, D. Biochemical Traits in the Flower Lifetime of a Mexican Mistletoe Parasitizing Mesquite Biomass. *Front. Plant. Sci.* **2018**, *9*, 1031. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01031>.
154. Janisiewicz, W.J.; Tworowski, T.J.; Kurtzman, C.P. Biocontrol Potential of *Metschnikowia pulcherrima* Strains Against Blue Mold of Apple. *Phytopathology* **2001**, *91*, 1098–1108. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2001.91.11.1098>.
155. Sanzani, S.M.; Sgaramella, M.; Mosca, S.; Solfrizzo, M.; Ippolito, A. Control of *Penicillium expansum* by an Epiphytic Basidiomycetous Yeast. *Horticulturae* **2021**, *7*, 473. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110473>.
156. Kurtzman, C.P.; Droby, S. *Metschnikowia Fructicola*, a New Ascosporic Yeast with Potential for Biocontrol of Postharvest Fruit Rots. *Syst. Appl. Microbiol.* **2001**, *24*, 395–399. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00045>.
157. Rering, C.C.; Gaffke, A.M.; Rudolph, A.B.; Beck, J.J.; Alborn, H.T. A Comparison of Collection Methods for Microbial Volatiles. *Front. Sustain. Food Syst.* **2020**, *4*, 598967. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.598967>.
158. Sobhy, I.S.; Goelen, T.; Herrera-Malaver, B.; Verstrepen, K.J.; Wäckers, F.; Jacquemyn, H.; Lievens, B. Associative Learning and Memory Retention of Nectar Yeast Volatiles in a Generalist Parasitoid. *Anim. Behav.* **2019**, *153*, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2019.05.006>.
159. Patrignani, F.; Vannini, L.; Gardini, F.; Guerzoni, M.E.; Lanciotti, R. Variability of the Lipolytic Activity and Volatile Molecules Production by a Strain of *Yarrowia lipolytica* in Pork Fat and Its Dependence on Environmental Conditions. *Meat. Sci.* **2011**, *89*, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.03.015>.
160. Zhao, Q.; Wang, Z.; Yang, L.; Zhang, S.; Jia, K. YALI0C22088g from *Yarrowia lipolytica* Catalyses the Conversion of L-methionine into Volatile Organic Sulfur-containing Compounds. *Microb. Biotechnol.* **2021**, *14*, 1462–1471. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13796>.
161. Yang, M.; Deng, G.-C.; Gong, Y. -B.; Huang, S. -Q. Nectar Yeasts Enhance the Interaction between *Clematis akebioides* and Its Bumblebee Pollinator. *Plant Biol.* **2019**, *21*, 732–737. <https://doi.org/10.1111/plb.12957>.
162. Peach, D.A.H.; Carroll, C.; Meraj, S.; Gomes, S.; Galloway, E.; Balcita, A.; Coatsworth, H.; Young, N.; Uriel, Y.; Gries, R.; et al. Nectar-Dwelling Microbes of Common Tansy Are Attractive to Its Mosquito Pollinator, *Culex pipiens* L. *BMC Ecol. Evol.* **2021**, *21*, 29. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01761-5>.
163. Lee, L.W.; Tay, G.Y.; Cheong, M.W.; Curran, P.; Yu, B.; Liu, S.Q. Modulation of the Volatile and Non-Volatile Profiles of Coffee Fermented with *Yarrowia lipolytica*: I. Green Coffee. *LWT* **2017**, *77*, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.047>.
164. Gul Jan, F.; Hamayun, M.; Hussain, A.; Jan, G.; Iqbal, A.; Khan, A.; Lee, I.-J. An Endophytic Isolate of the Fungus *Yarrowia lipolytica* Produces Metabolites That Ameliorate the Negative Impact of Salt Stress on the Physiology of Maize. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 3. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1374-6>.
165. Stegmann, P.; Londo, M.; Junginger, M. The Circular Bioeconomy: Its Elements and Role in European Bioeconomy Clusters. *Resour. Conserv. Recycl. X* **2020**, *6*, 100029. <https://doi.org/10.1016/j.rcrx.2019.100029>.
166. Álvarez-Pérez, S.; Dhami, M.K.; Pozo, M.I.; Crauwels, S.; Verstrepen, K.J.; Herrera, C.M.; Lievens, B.; Jacquemyn, H. Genetic Admixture Increases Phenotypic Diversity in the Nectar Yeast *Metschnikowia reukaufii*. *Fungal. Ecol.* **2021**, *49*, 101016. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.101016>.
167. Lievens, B.; Hallsworth, J.E.; Pozo, M.I.; ben Belgacem, Z.; Stevenson, A.; Willems, K.A.; Jacquemyn, H. Microbiology of Sugar-Rich Environments: Diversity, Ecology and System Constraints. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 278–298. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12570>.
168. Pozo, M.I.; Lachance, M.-A.; Herrera, C.M. Nectar Yeasts of Two Southern Spanish Plants: The Roles of Immigration and Physiological Traits in Community Assembly. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2012**, *80*, 281–293. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01286.x>.
169. Pozo, M.I.; Herrera, C.M.; Lachance, M.-A.; Verstrepen, K.; Lievens, B.; Jacquemyn, H. Species Coexistence in Simple Microbial Communities: Unravelling the Phenotypic Landscape of Co-Occurring *Metschnikowia* Species in Floral Nectar. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 1850–1862. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13037>.
170. Giehl, A.; Scapini, T.; Treichel, H.; Alves Jr., S.L. Production of Volatile Organic Compounds by Yeasts in Biorefineries: Ecological, Environmental, And Biotechnological Outlooks. In *Ciências Ambientais e da Saúde na Atualidade: Insights para Alcançar os Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável*; Instituto de Inteligência em Pesquisa e Consultoria Científica Ltd.: Concórdia/SC, Brazil, 2022; pp. 64–78.
171. Geijer, C.; Ledesma-Amaro, R.; Tomás-Pejó, E. Unraveling the Potential of Non-Conventional Yeasts in Biotechnology. *FEMS Yeast Res.* **2022**, *22*, foab071. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab071>.

3 ARTIGO A SER SUBMETIDO: ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS POR LEVEDURAS DA MICROBIOTA DE BESOUROS E ABELHAS

RESUMO

A produção de etanol que ocorre pela fermentação microbiana está consolidada no mercado há décadas e é uma alternativa sustentável e renovável. Também na natureza, leveduras consomem carboidratos como a sacarose, principal dissacarídeo presente na cana-de-açúcar e no néctar das flores, e os convertem no referido álcool e noutros compostos orgânicos voláteis. A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada nos mais variados bioprocessos, porém ela possui algumas limitações quanto à geração de alguns metabólitos, exigindo modificações genéticas para essa produção. No entanto, como alternativa, pode-se recorrer a leveduras selvagens presentes em diversos ambientes. Leveduras que habitam nectários florais, por exemplo, consomem nutrientes do néctar e produzem Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) que são responsáveis por atrair ou repelir insetos, impactando diretamente na polinização ou servindo de biocontrole contra pragas, protegendo algumas plantas. O presente trabalho isolou 26 cepas de leveduras, sendo 7 de abelhas e 19 de besouros. Aleatoriamente foram selecionadas sete dessas cepas para um *screening* em um meio de cultura que simulou o néctar (pH 5, 150 g/L de sacarose e 2 g/L de peptona de caseína) e um meio rico (pH 5, 150 g/L de sacarose e 20 g/L de peptona de caseína e 10 g/L de extrato de levedura), com o intuito de observar através de perfis de crescimento, a performance de biomassa dessas leveduras. Dessa triagem, três cepas (CHAP-242, CHAP-245 e CHAP-248) se destacaram em ambos os meios e foram submetidas a um Delineamento de Composto Central (DCC) com quatro variáveis (pH e concentração de sacarose, peptona de caseína e extrato de levedura). O consumo de sacarose e a produção de etanol em 34 e 96 horas de incubação foram quantificadas em HPLC, e três respostas foram analisadas: percentual de consumo de sacarose e rendimento e produtividade de etanol. No DCC, a cepa que obteve destaque em todas as respostas foi a CHAP-248, que atingiu, em algumas das condições testadas, 100% de consumo de sacarose, rendimento de 472,66 mg_{etanol}/g_{sacarose} e produtividade de etanol de 1595,96 mg/L*h. A análise dos COVs produzidos além do etanol foi realizada por extração líquido-líquido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Cinco compostos mostraram-se prevalentes: o 2-Feniletanol foi identificado em todas as amostras do *screening* e do DCC; o triptofol foi identificado na CHAP-245 em ambos os meios do *screening* e em algumas condições do DCC; o metionol apareceu somente na CHAP-245 e CHAP-248 do meio rico do *screening*; o fosfato de trietila foi identificado somente no meio rico do *screening* em 70% das cepas analisadas; e, o 2-Ciclohexen-1,3,5,5-trimetil, somente no néctar sintético em 60% das cepas analisadas.

Palavras-chave: Insetos; Néctar floral; Prospeção de leveduras; Sacarose; Fermentação; COVs; Etanol; Biotecnologia.

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização excessiva de combustíveis fósseis apresenta sérios riscos para o meio ambiente. Por serem recursos não renováveis, esgotam em curto período de tempo, acarretando mudanças climáticas drásticas e indesejáveis (Eswaran; Parameswaran; Johnson, 2021). Com isso, surge a necessidade de se encontrar maneiras renováveis e sustentáveis de obtenção de produtos que são altamente demandados pelos mais diversos setores industriais. O etanol é um composto que possui aplicação nos setores farmacêuticos, alimentícios, bebidas e principalmente no ramo dos combustíveis, atuando como combustível primário ou complementar da gasolina, recurso proveniente diretamente do petróleo (fonte não renovável), como forma de aumentar a eficiência energética (Iram; Cekmecelioglu; Demirci, 2022).

Leveduras são microrganismos unicelulares pertencentes ao reino Fungi que há centenas de milhões de anos vivem em simbiose com diversos seres vivos, como plantas, insetos e até mesmo seres humanos (Heckman *et al.*, 2001). As leveduras utilizam carboidratos como fonte de energia para aumentarem sua biomassa e consequentemente expelirem metabólitos que podem ser de grande interesse comercial, como os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) (Giehl *et al.*, 2022). O dissacarídeo mais consumido por esses microrganismos é a sacarose, que está em maior quantidade na cana-de-açúcar e nos nectários florais. A glicose é o monossacarídeo mais consumido pelas leveduras, porém a frutose e a xilose, que estão presentes nesses vegetais, também fazem parte dos substratos por elas consumidos (Antoñ; Denisow, 2014; Herrera *et al.*, 2009).

O néctar presente nas flores é rico em açúcares e pobre em aminoácidos. As leveduras selvagens estão presentes em quase todos os ecossistemas, inclusive em ambientes florais, usando dos recursos disponíveis no néctar para se reproduzirem. Como consequência de seu metabolismo nesses ambientes, elas produzem COVs (Becher *et al.*, 2018; Pozo *et al.*, 2009). Ao metabolizar os nutrientes presentes nas flores, as leveduras geram COVs que podem servir de atrativos ou repelentes para insetos que irão ou não visitar determinada planta. Essa interação pode resultar em benefício para as flores. Quando há atração, consequentemente ocorre a polinização que acaba propagando algumas espécies de plantas. Quando os compostos gerados repelem insetos, eles podem estar atuando como controladores biológicos de pragas.

As leveduras também se aderem à superfície ou adentram a microbiota intestinal de insetos no momento em que se alimentam do néctar ou do pólen das flores. Assim, esses microrganismos usam os insetos como forma de transporte de um local para outro ou até mesmo como forma de se preservarem em épocas de temperaturas baixas e fora dos períodos de floração (Colda *et al.*, 2021; Fenner *et al.*, 2022; Makopa *et al.*, 2024; Sobhy *et al.*, 2018).

Alguns desses compostos voláteis possuem uma altíssima demanda no mercado global, fazendo parte de um mercado bilionário e crescente. O ácido acético, popularmente conhecido por conta do vinagre, é obtido pela oxidação do etanol que acontece em rotas metabólicas de microrganismos. Esse ácido fraco é utilizado para a fabricação de diversos produtos químicos e aplicado em vários setores, como alimentício, plástico, borracha, tinta e têxtil, movimentando no ano de 2022 cerca de 13 bilhões de dólares, e com perspectiva de até 2030 o mercado atingir patamares de 23 bilhões de dólares (Grand View Research, 2022). O isobutanol, que é utilizado em tintas, revestimentos, produtos têxteis, químicos e farmacêuticos, movimentou cerca de 1 bilhão de dólares em 2020, com expectativa de dobrar esse valor até 2030 (Allied Market Research, 2022). Acetaldeído, produto intermediador para produção de outros compostos nas mais diversas indústrias, teve uma demanda em 2022 de 1,39 milhões de toneladas (Statista, 2022). O acetato de etila, em 2020, teve uma receita global de 2,8 bilhões de dólares do produto, e há previsões que até 2028 atinja valores acima de 5,38 bilhões de dólares (Globe Newswire, 2022).

O etanol é indubitavelmente o composto orgânico volátil mais produzido e com maior receita no mundo, sendo que somente em 2023 foram produzidos 112 bilhões de litros de etanol no planeta, gerando uma receita de aproximadamente 260 bilhões de reais (CEPEA-Esalq, 2023; Renewable Fuels Association, 2023). Nesse cenário, os países líderes no ranking global são o Brasil e os Estados Unidos, que responderam, no último ano, por 81% da produção do etanol. O Brasil ocupa o segundo lugar nesse ranking, com 28% do montante mundial, o que representa aproximadamente 31,3 bilhões de litros de etanol produzidos. Os Estados Unidos ocupam o primeiro lugar, tendo produzido, em 2023, em torno de 59,2 bilhões de litros desse álcool. Entre os anos de 2021 e 2023, o Brasil e os Estados Unidos tiveram um aumento de produção de 12,84% e 4%, respectivamente (Renewable Fuels Association, 2023).

Muitas leveduras possuem características fundamentais para o processo fermentativo em biorrefinarias, como a tolerância à alta concentração de etanol no fim do processo fermentativo, ao elevado estresse osmótico causado pela alta concentração de açúcares e aos níveis baixos de pH nas dornas e no reciclo celular, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* o microrganismo mais utilizado para fins industriais que visam obtenção de etanol (Fernandes *et al.*, 2022; Alves Jr *et al.*, 2022). Apesar das cepas industriais já realizarem seu papel de forma eficiente, há estudos que estão prospectando leveduras selvagens que são capazes de fermentar tão bem (ou quase tão bem) quanto as convencionais (Hawary *et al.*, 2024). Há também estudos que estão isolando leveduras de insetos e plantas para produção de bioetanol. Alguns desses trabalhos visam também cepas capazes de suportar efeitos de compostos inibidores e/ou de produzirem enzimas que atuem na quebra dos polissacarídeos complexos presentes em resíduos lignocelulósicos, como da cana-de-açúcar ou do coco, liberando mono ou dissacarídeos que são mais facilmente fermentados (Albarello *et al.*, 2023; Alves Jr. *et al.*, 2019; Lucaroni *et al.*, 2022; Tadioto *et al.*, 2023)

Haja vista a crescente demanda de COVs, principalmente do etanol (cujos países líderes produzem cada vez mais no decorrer dos anos), e o desempenho positivo de leveduras selvagens para outros produtos biotecnológicos, o presente trabalho buscou inicialmente avaliar o desempenho, através de um *screening*, de sete cepas de leveduras isoladas de besouros e abelhas sem ferrão. Dessas sete linhagens, as três que obtiveram melhor performance nos perfis de crescimento, foram submetidas a um Delineamento de Composto Central (DCC) para avaliar o consumo de sacarose, rendimento e a produtividade de etanol. O trabalho também analisou o potencial de produção de COVs, além de etanol, e qualitativamente avaliou a predominância de alguns dos principais compostos.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Isolamento de leveduras

Os besouros foram coletados sobre flores com tubos Falcon estéreis. As abelhas foram capturadas com puçá entomológico e então transferidas também para

tubos Falcon estéreis. Após a coleta, os insetos inteiros ou macerados foram inoculados em frascos Erlenmeyer com 20% de sua capacidade preenchida com meio YNB (6,7 g/L de base nitrogenada de leveduras, pH 5,0) suplementado com 10 g/L de xilose (forçando a eliminação de leveduras *Saccharomyces*) e 0,2 g/L de Cloranfenicol (antibiótico para inibir o crescimento de bactérias). Os frascos foram mantidos a 30 °C sob agitação de 145 rpm. Entre o terceiro e o quinto dia de incubação, foram realizados esgotamentos através de estrias feitas em placas de Petri contendo meios com os mesmos carboidratos e nutrientes supracitados, porém acrescidos de 20 g/L de ágar. Após confirmação morfológica das colônias e das células de leveduras ao microscópio, os isolados receberam um código e foram adicionados à Coleção Microbiológica do Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBiolev) – UFFS Chapecó. Dentre os isolados assim obtidos, quatro cepas isoladas de besouros e três de abelhas sem ferrão (Tabela 1) foram escolhidas aleatoriamente para a realização dos experimentos descritos a seguir.

Tabela 1 – Leveduras isoladas de insetos que foram submetidas ao *screening*

Inseto (Espécie)	Cepa
Besouro (<i>Astylus variegatus</i>)	CHAP-223
	CHAP-224
	CHAP-227
	CHAP-239
Abelhas Mandaguari (<i>Scaptotrigona postica</i>)	CHAP-242
	CHAP-248
Abelhas Jataí (<i>Tetragonisca angustula</i>)	CHAP-245

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

3.2.2 Screening das leveduras

A triagem das leveduras foi feita com o intuito de comparar seus perfis de crescimento em meio rico YPS (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 150 g/L de sacarose) e néctar sintético (0,2% de peptona de caseína e 150 g/L de sacarose), confeccionado conforme descrito por Peach *et al.* (2021), Rering *et al.* (2018) e Sobhy *et al.* (2018). Os pré-inóculos das cepas foram preparados em meio sólido YPDA (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona de caseína, 20 g/L de glicose e 20 g/L

de ágar) por 60 horas a 30°C. Ao fim deste período, uma alçada calibrada de 1 µL de células foi transferida para frascos Erlenmeyer preenchidos em 20% da sua capacidade com os meios YPS ou néctar sintético, acima descritos. Os frascos foram então incubados a 30 °C sob agitação de 145 rpm por 72 h. Em tempos pré-determinados conforme a Figura 1, alíquotas de 1 mL do cultivo foram transferidas para microtubos e então centrifugadas (9000 g / 3 min). Os sobrenadantes foram coletados, filtrados (filtro de 0,45 µM) e congelados para posterior análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nesses mesmos tempos de coletas, foram realizadas leituras de Densidade Óptica (DO) no espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer ajustado em comprimento de onda de 570 nm para realizar a curva de crescimento das leveduras. Ao fim dos cultivos, os conteúdos de todos os frascos foram centrifugados (9000 g / 3 min) e os sobrenadantes foram utilizados para extração líquido-líquido e subsequente análise de COVs por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (vide seções 3.2.5.2.1 e 3.2.5.2.2).

3.2.3 Delineamento Composto Central (DCC)

As três cepas que apresentaram os melhores perfis de crescimento durante o *screening* acima descrito (CHAP-242, CHAP-245 e CHAP-248) foram submetidas a um DCC com quatro variáveis: pH, concentração de sacarose, concentração de peptona de caseína e concentração de extrato de levedura. As respostas observadas no DCC foram: percentual de consumo de sacarose, rendimento de etanol e produtividade de etanol. O planejamento foi montado no software Protimiza (Rodrigues; lemma, 2014), onde foram inseridos os pontos mínimos (-1) e máximos (+1) para cada variável, gerando o ponto central (0) conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Variáveis e valores fixados

Variáveis	Unidades	-1	0	1
pH (x ₁)	-	3	5	7
Sacarose (x ₂)	g/L	50	100	150
Peptona de caseína (x ₃)	g/L	2	11	20
Extrato de levedura (x ₄)	g/L	1	5,5	10

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Foram preparadas 17 soluções de meio de cultura conforme a Tabela 3. O ponto central foi realizado em triplicata (ensaios 17, 18 e 19). Os cultivos foram mantidos a 30°C e 145 rpm por 96 horas. Amostras para determinação de crescimento celular e análises cromatográficas foram coletadas conforme descrito anteriormente.

Tabela 3 – Valores reais do delineamento experimental completo

Ensaio	pH	Sacarose (g/L)	Peptona de Caseína (g/L)	Extrato de levedura (g/L)
1	3	50	2	1
2	7	50	2	1
3	3	150	2	1
4	7	150	2	1
5	3	50	20	1
6	7	50	20	1
7	3	150	20	1
8	7	150	20	1
9	3	50	2	10
10	7	50	2	10
11	3	150	2	10
12	7	150	2	10
13	3	50	20	10
14	7	50	20	10
15	3	150	20	10
16	7	150	20	10
17	5	100	11	5,5
18	5	100	11	5,5
19	5	100	11	5,5

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

As análises estatísticas realizadas nesse estudo foram feitas através do software Protimiza por análise de variância (ANOVA) e significância dos dados obtidos. As Curvas de Contorno (CC) constando a comparação entre variáveis foram gerados no mesmo programa.

3.2.3.1 Métodos analíticos

3.2.3.2 Determinação de sacarose e etanol

A quantificação de etanol e carboidratos foi realizada em cromatógrafo líquido (LCMS-2020, Shimadzu) com detector de índice de refração RID-10 (Shimadzu), coluna Aminex HPX-87P, água ultrapura (Milli-Q) como fase móvel e vazão de 0,6 mL/min. Foram injetadas no cromatógrafo amostras retiradas dos meios antes de cada inóculo ($t = 0$ h), no início da fase estacionária de crescimento ($t = 34$ h) e no fim dos cultivos ($t = 96$ h). O percentual de sacarose consumida pelas leveduras, o rendimento e a produtividade de etanol foram calculados, respectivamente, conforme as equações 1, 2 e 3.

$$PC_{sac} = \frac{C_{isac} - C_{fsac}}{C_{isac}} * 100 \quad \text{eq (1)}$$

PC_{sac} = Percentual Consumido de sacarose (%);

C_{isac} = Concentração inicial de sacarose (g/L);

C_{fsac} = Concentração final de sacarose (no seu respectivo tempo) (g/L).

$$R_{etanol} = \frac{C_{fet}}{C_{isac}} \quad \text{eq (2)}$$

R_{etanol} = Rendimento de etanol ($g_{etanol}/g_{sacarose}$);

C_{fet} = Concentração final de etanol (no seu respectivo tempo) (g/L);

C_{isac} = Concentração inicial de sacarose (g/L).

$$P_{etanol} = \frac{C_{fet}}{t} \quad \text{eq (3)}$$

P_{etanol} = Produtividade de etanol ($g_{etanol}/L \cdot h$);

C_{fet} = Concentração final de etanol (no seu respectivo tempo) (g/L);

t = Tempo de fermentação (h).

3.2.3.3 Análise de COVs

3.2.3.3.1 Extração dos COVs

Foi feita uma extração líquido-líquido dos compostos em um funil de separação de 250 mL, conforme protocolo adaptado de Roque *et al.* (2019). No funil foi inserido um volume de 20 mL de amostra coletada no fim do cultivo e 6,67 mL de diclorometano. O funil foi fechado e agitado manualmente sendo expelido a pressão realizada dentro dele. O líquido da fase imiscível foi coletado e finalmente injetado no cromatógrafo gasoso (GCMS-QP2010Ultra, Shimadzu).

3.2.3.3.2 Identificação dos COVs

No GC-MS foram injetados 2 μ L das amostras em uma coluna capilar NST05ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) com fluxo de fase móvel de gás hélio de 14 mL/min. A temperatura do injetor foi de 150°C com um split de 1:10. O fluxo de purga foi de 3 minutos. A temperatura do forno foi de 100°C por 6 minutos com uma taxa de elevação de 4°C/min até 150°C. De 150°C para 220°C, a taxa foi mantida em 8°C/min com um tempo final de 40 min. O espectrômetro de massas foi configurado com temperatura de fonte de ionização e interface de 200°C e 220°C respectivamente, com o escaneamento (m/z) ajustado na faixa de 50–400, que corresponde a faixa de pesos moleculares de compostos orgânicos que são voláteis. Para a identificação dos compostos foi utilizada a própria biblioteca do equipamento, NIST08s.

3.2.3.3.3 Critérios de seleção de COVs

Nos cromatogramas obtidos, foram selecionados os 15–20 picos de maior destaque em cada amostra. Com essa seleção, foram gerados relatórios com a porcentagem de área de cada composto (em relação a quantidade de picos selecionados) e o Índice de Similaridade (IS), ou seja, o percentual de similaridade entre o composto detectado e a respectiva molécula da biblioteca do NIST08s. Assim,

foram consideradas moléculas que tinham IS maiores que 90%. Essa análise foi feita para cada experimento, do *screening* e do DCC, bem como do próprio diclorometano e do meio de cultura puro sem inóculo (possibilitando uma comparação de quais compostos foram oriundos do metabolismo das leveduras, e quais estavam naturalmente contidos no solvente e nos meios).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Cepas de leveduras obtidas pelo isolamento

Foram isoladas 26 linhagens de leveduras, das quais 19 foram obtidas do besouro *Astylus variegatus*, 5 de abelhas Mandaguari (*Scaptotrigona postica*) e 2 de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) (Tabela 4). Dentre as 26 cepas isoladas, foram escolhidas sete para um *screening* em dois meios de cultura diferentes, um rico (YPS) e um com restrição de nitrogênio (néctar sintético), apresentado a seguir.

Tabela 4 – Classificação de leveduras isoladas de insetos

Inseto (Espécie)	Cepa
Besouro (<i>Astylus variegatus</i>)	CHAP-223 * (M)
	CHAP-224 * (M)
	CHAP-225 (M)
	CHAP-226 (M)
	CHAP-227 (M)
	CHAP-228 (M)
	CHAP-229 (M)
	CHAP-230 (M)
	CHAP-231 (M)
	CHAP-232 (M)
	CHAP-233 (M)
	CHAP-234 (M)
	CHAP-235 (M)
	CHAP-236 (I)
	CHAP-238 (I)
	CHAP-237 * (I)
	CHAP-239 * (I)
	CHAP-240 (I)
	CHAP-241 (I)

	CHAP-242 * (I)
	CHAP-243 (I)
Abelhas Mandaguari (<i>Scaptotrigona postica</i>)	CHAP-246 (I)
	CHAP-247 (I)
	CHAP-248 * (I)
Abelhas Jataí (<i>Tetragonisca angustula</i>)	CHAP-244 (I)
	CHAP-245 * (I)

(M) Cepas isoladas de insetos Macerados;

(I) Cepas isoladas de insetos Inteiros;

* Cepas escolhidas para o *screening*.

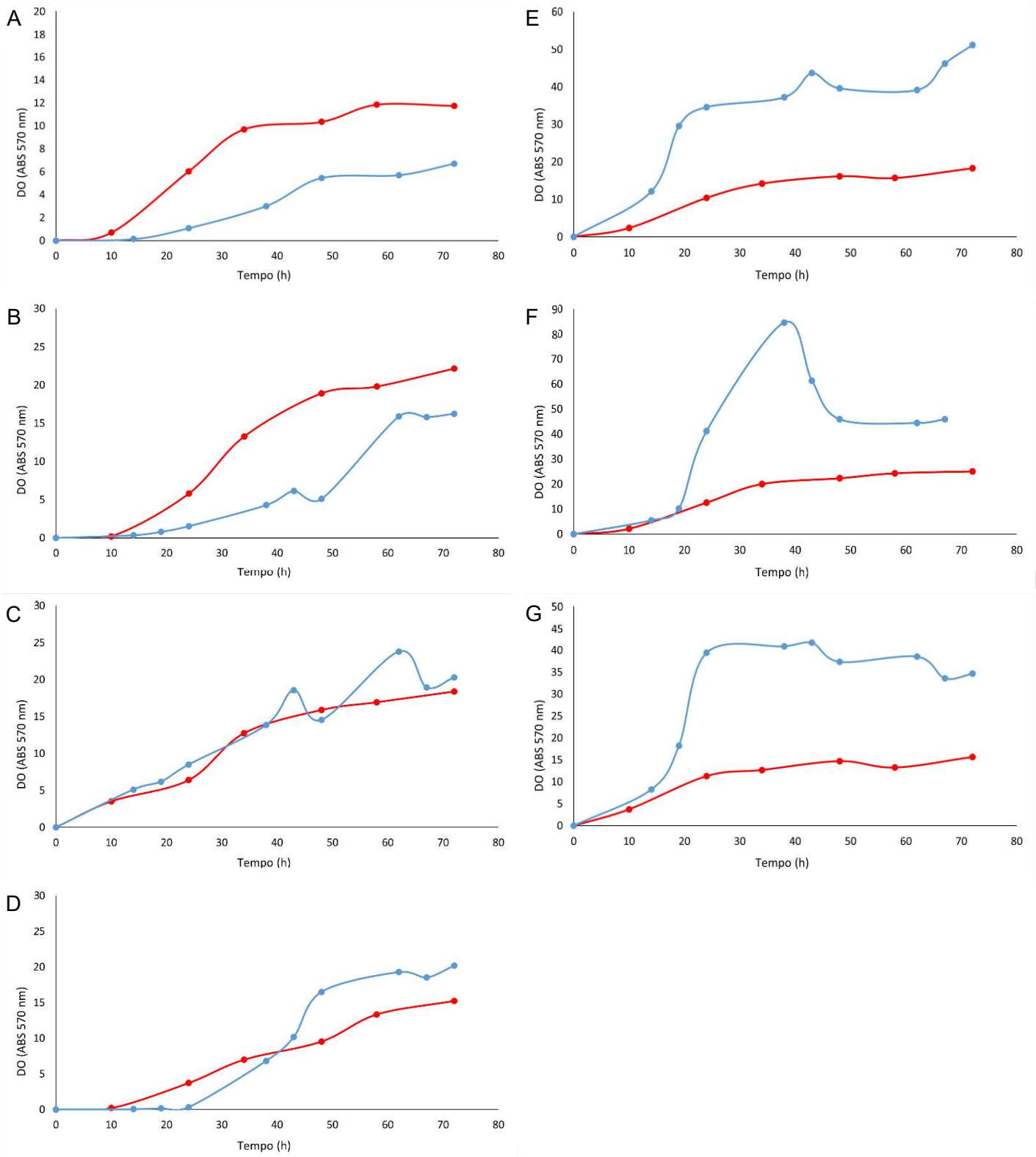
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

3.3.2 Perfis de crescimento das leveduras submetidas ao *Screening*

Foram realizados de forma paralela crescimentos em meio rico YPS (com extrato de levedura a 1%, peptona a 2% e sacarose a 15%) e néctar sintético (com apenas 0,2% de peptona de caseína e 15% de sacarose). Interessantemente, as cepas de besouro e abelhas tiveram comportamentos distintos quando comparadas as situações com alta (YPS) ou baixa (néctar sintético) disponibilidade de nitrogênio. Enquanto os isolados de abelha apresentaram maior crescimento em YPS, as leveduras da microbiota de besouros apresentaram biomassa celular até 50% superior quando em restrição de aminoácidos (Figura 1), situação semelhante à observada nos nectários florais (Nicolson; Thornburg, 2021).

Conforme pode ser verificado na Figura 1, é notório que as três cepas que mais geraram biomassa celular foram aquelas oriundas de abelhas (CHAP-242, CHAP-245 e CHAP-248). Por isso, elas foram as escolhidas para o DCC.

Figura 1 – Curvas de crescimento das cepas CHAP-223 (A), CHAP-224 (B), CHAP-237 (C), CHAP-239 (D), CHAP-242 (E), CHAP-245 (F) e CHAP-248 (G) em meio rico YPS (curvas azuis) ou néctar sintético (curvas vermelhas).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

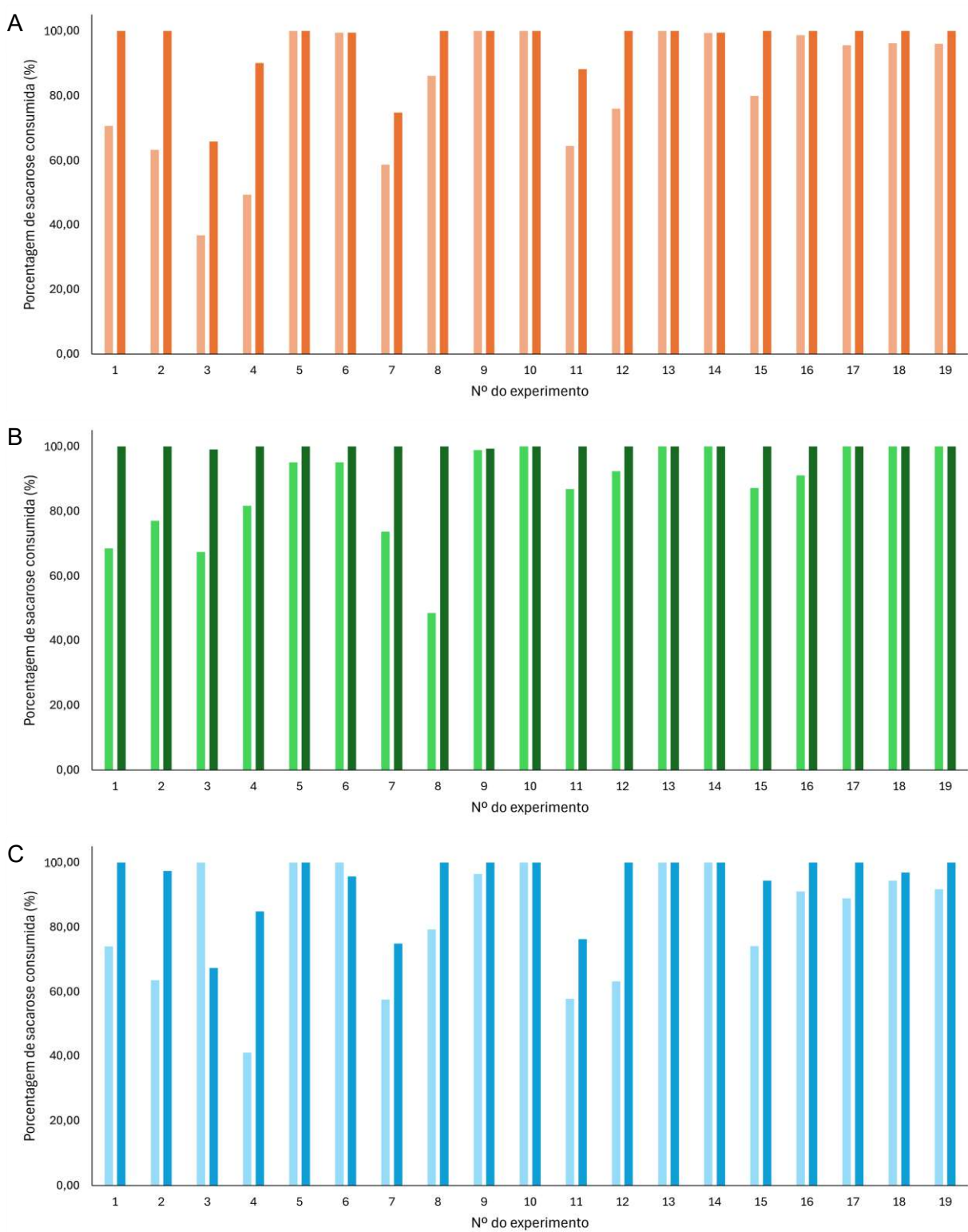
3.3.3 Dados compilados do DCC

Em 34 horas de cultivo, as três leveduras já haviam consumido toda a sacarose em cerca de 50% dos experimentos. Após 96 horas, o dissacarídeo foi inteiramente consumido em praticamente todos os ensaios (Figura 2).

O rendimento de etanol se baseia na relação de quantos gramas de etanol foi produzida por grama de açúcar consumido. Através da Figura 3, é notório que o experimento 10 (pH 7; 50 g/L sacarose; 2 g/L peptona de caseína; 10 g/L extrato de levedura) da CHAP-248 foi o de melhor rendimento, com 472,66 mg etanol/g sacarose, o que corresponde a uma eficiência fermentativa de 88% se considerada a conversão estequiométrica (rendimento máximo teórico) de cada grama de sacarose em 538 mg de etanol. É interessante notar que, no Brasil, a eficiência fermentativa observada nas usinas sucroalcooleiras gira em torno de 90–92% (Lopes et al., 2016).

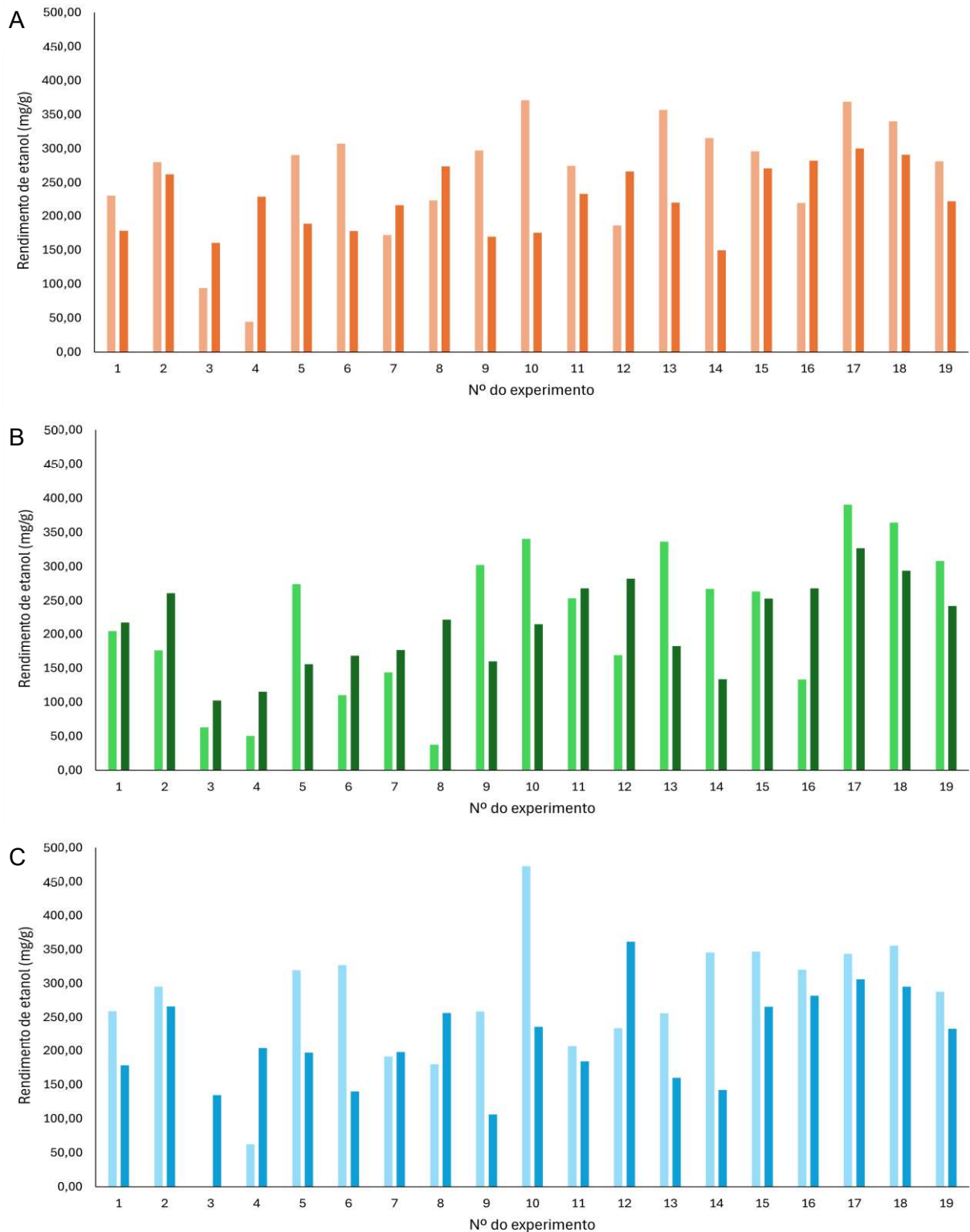
A produtividade é a relação da concentração de etanol gerada pelo tempo de incubação das leveduras. Nesse caso a maior produtividade foi no experimento 15 seguida do experimento 16 da CHAP-248 com valores de 1595,96 mg/L*h e 1490,74 mg/L*h respectivamente (Figura 4). Em trabalho recente, Hawary et al. (2024) analisaram a produção de etanol por uma levedura selvagem diante da glicose (açúcar que, como a sacarose, é amplamente fermentado por leveduras utilizadas nas indústrias de álcool) e verificaram que a sua produtividade atingiu um máximo de 1247,00 mg/L*h.

Figura 2 – Percentual de sacarose consumida em cada experimento do DCC: CHAP-242 (A); CHAP-245 (B); CHAP-248 (C). Tempos de análises: t=34h (barras claras); t=96h (barras escuras).



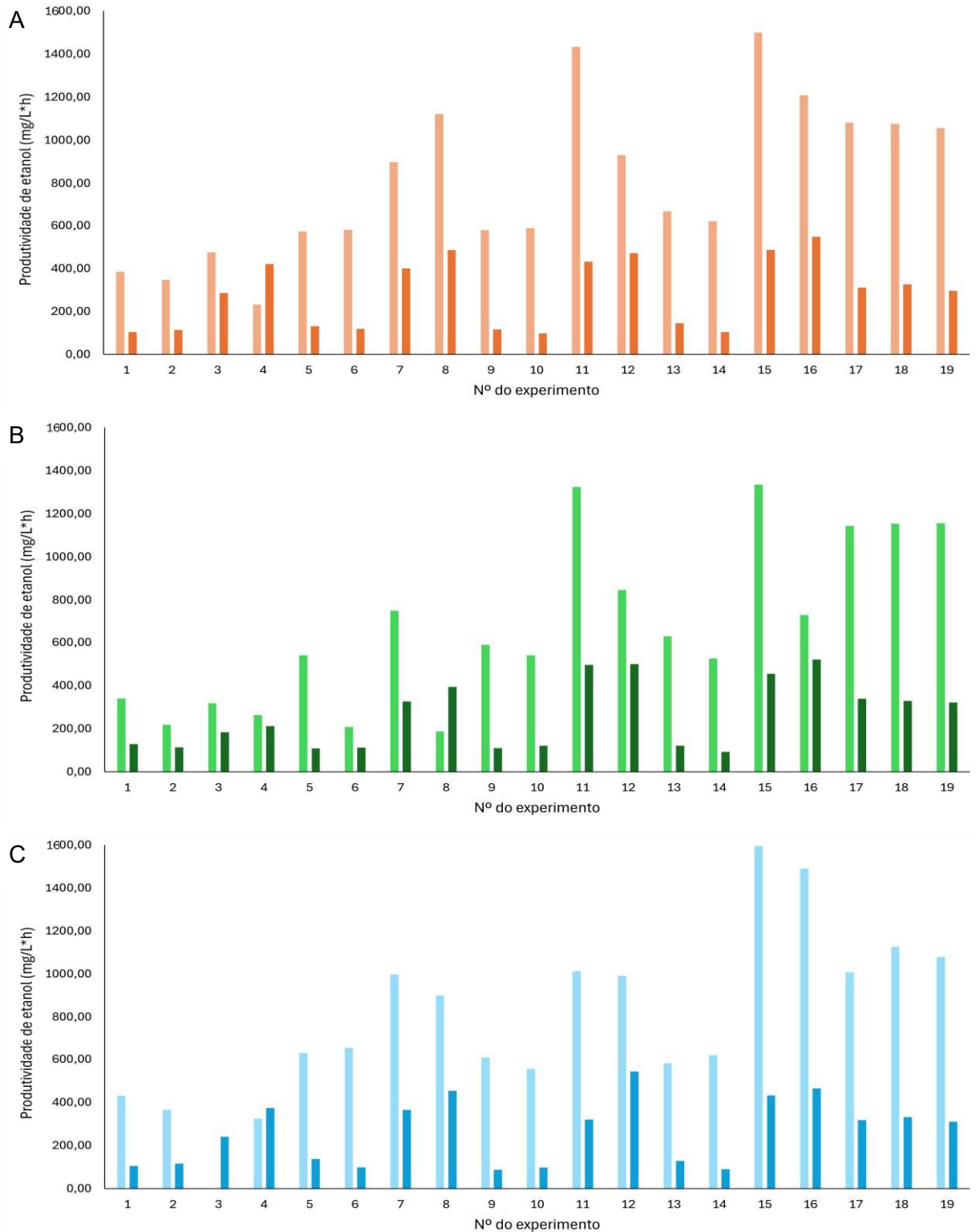
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Figura 3 – Rendimento de etanol em cada experimento do DCC: CHAP-242 (A); CHAP-245 (B); CHAP-248 (C). Tempos de análises: t=34h (barras claras); t=96h (barras escuras).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 – Produtividade de etanol em cada experimento do DCC: CHAP-242 (A); CHAP-245 (B); CHAP-248 (C). Tempos de análises: t=34h (barras claras); t=96h (barras escuras).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

3.3.4 Análises estatísticas e comparações entre variáveis

Os resultados obtidos do HPLC com aplicações das respectivas equações apresentadas na seção 3.3.2 foram todos submetidos a análises estatísticas com um nível de significância de 10%. Ademais, para a construção das superfícies de resposta, considerou-se a ANOVA satisfatória quando o coeficiente de correlação (R^2) da regressão linear entre valores preditos e reais foi superior a 75%. Vale destacar que até os parâmetros que não foram significativos nesse experimento, foram mantidos para que fosse possível gerar as curvas de contorno.

3.3.4.1 Percentual de açúcar consumido

Para a resposta “percentual de açúcar consumido”, destaca-se a linhagem CHAP-242. De acordo com a Figura 5, que apresenta o gráfico de Pareto ao fim de 36 h de cultivo, é possível notar que as concentrações de peptona (variável x_3) e extrato de levedura (x_4) exerceram efeito positivo no consumo de sacarose, indicando que a maior disponibilidade de nutrientes (conferida às leveduras por esses dois compostos) favorece o metabolismo do açúcar. Em 96 h de cultivo, não foi possível observar diferença significativa exercida pelas variáveis testadas (dados não mostrados), haja vista que, neste ponto, o açúcar já havia sido majoritariamente consumido em todas as condições analisadas (conforme pode ser visto na Figura 2).

O efeito de interação da peptona e do extrato de levedura sobre o consumo de sacarose pode ser visualizado também na curva de contorno apresentada na Figura 6: quanto maior a concentração de peptona de caseína e extrato de levedura nesse delineamento, maior o percentual de consumo de sacarose. Vale destacar, que a literatura apresenta diversos trabalhos em que a fonte de nutrientes, especialmente dos aminoácidos, pode interferir diretamente no crescimento das leveduras, na sua capacidade de metabolização de carboidratos, bem como os COVs que elas irão gerar. Isso ocorre pois essas fontes de nitrogênio podem favorecer a síntese de enzimas que podem aumentar a eficiência do consumo de açúcares (Austin; Hand; Elia, 2016; Bogo *et al.*, 2021; Dzialo *et al.*, 2017).

Figura 5 – Percentual de açúcar consumido: Gráfico de Pareto (t=34h) da CHAP-242. Variáveis: pH (x_1); Sacarose (x_2); Peptona de caseína (x_3); Extrato de levedura (x_4).

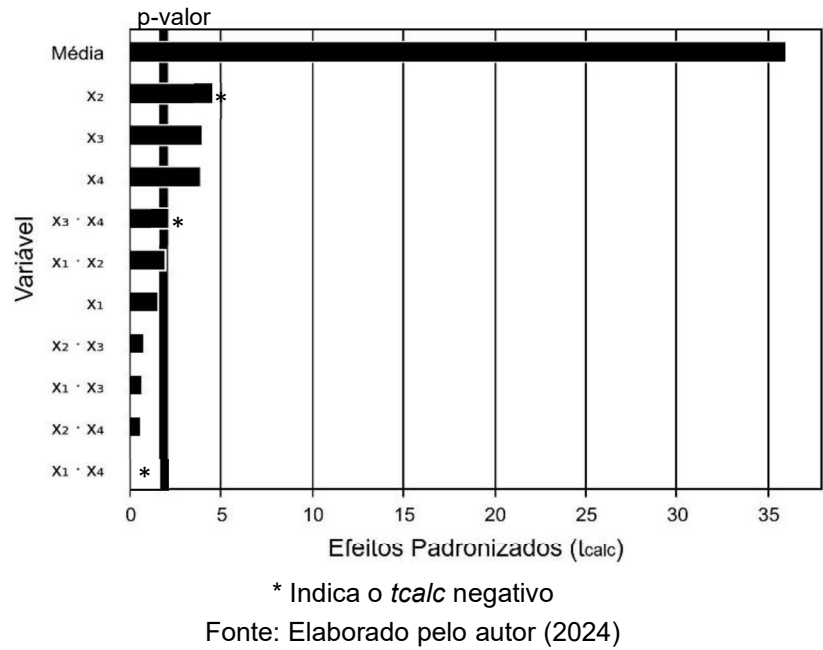
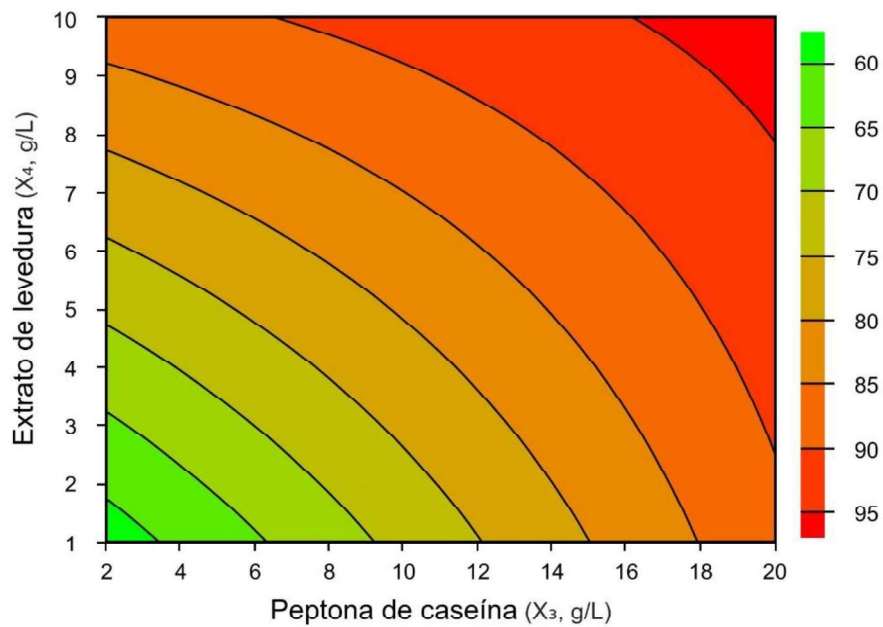


Figura 6 – Percentual de açúcar consumido: CC (t=34h) da CHAP-242: Peptona de caseína x Extrato de levedura.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

3.3.4.2 Rendimento de etanol

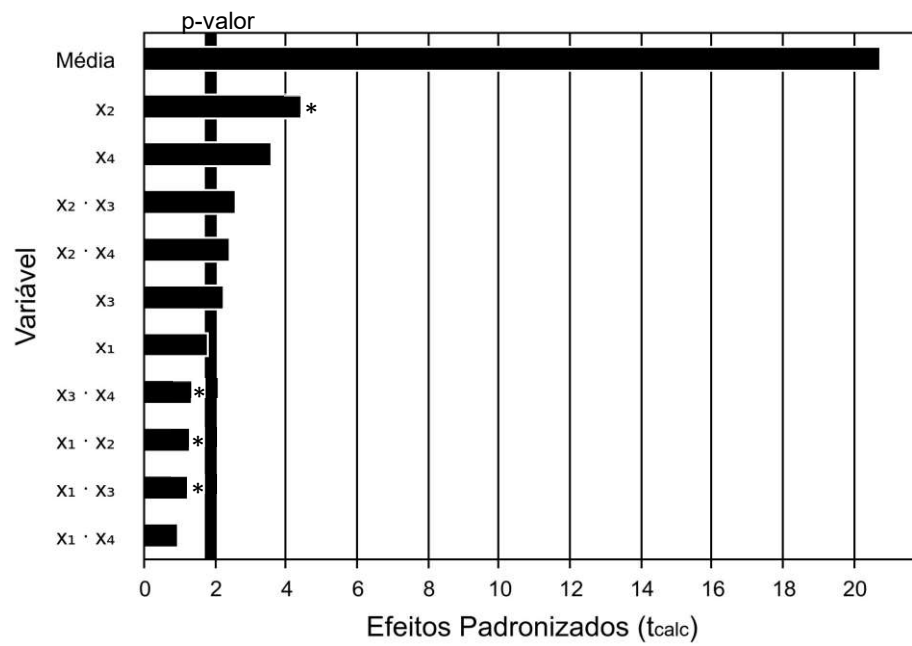
Sobre o rendimento de etanol da linhagem CHAP-242 no tempo de 34 horas, a concentração de sacarose exerceu influência significativa negativa. Haja vista que o cálculo de rendimento de etanol considera o quociente entre etanol produzido e açúcar disponível (vide equação 2), espera-se de fato que menos açúcar promova maior rendimento. Por outro lado, a peptona e o extrato de levedura influenciaram significativamente de forma positiva o rendimento de etanol, demonstrando uma proporcionalidade direta com os nutrientes desses compostos (dados não mostrados).

Na fermentação conduzida pela cepa CHAP-248, essas variáveis exerceram influência significativa positiva tanto independentemente quanto de forma conjunta com a sacarose ($x_2 \cdot x_3$ e $x_2 \cdot x_4$) (Figura 7), indicando que, diante de uma maior concentração de compostos nitrogenados, o rendimento de etanol pode ser superior mesmo com mais açúcar a ser fermentado. Essa sinergia pode ser observada nas superfícies de resposta apresentadas na Figura 8. Vale ressaltar que, neste DCC, a regressão linear dos valores experimentais versus previstos apresentou um alto coeficiente de correlação (88,09%) e o quociente $F_{\text{regressão/resíduos}}$ foi aproximadamente duas vezes o valor do F tabulado, validando assim o seguinte modelo empírico codificado (eq. 4) através de ANOVA com valor de $p < 0,1$:

$$R_{\text{etanol}} = 266,61 + 24,97x_1 - 62,04x_2 + 31,15x_3 + 50,38x_4 - 18,40x_1x_2 - 17,59x_1x_3 + 13,05x_1x_4 + 35,76x_2x_3 + 33,89x_2x_4 - 18,94x_3x_4 \quad (\text{eq. 4})$$

Para o rendimento de etanol da linhagem CHAP-245, nenhuma variável exerceu influência significativa (dados não mostrados). Nas análises realizadas em 96 horas, o coeficiente de correlação (R^2) da regressão linear entre valores preditos e reais ficou abaixo de 75%, por isso os dados não foram aqui considerados. Haja vista que as fases estacionárias ocorreram em torno das 34 h, já se esperava de fato que, após esse ponto, as células passassem pela diauxia e iniciassem o consumo do etanol, prejudicando a análise de rendimento de etanol após 96 h de cultivo.

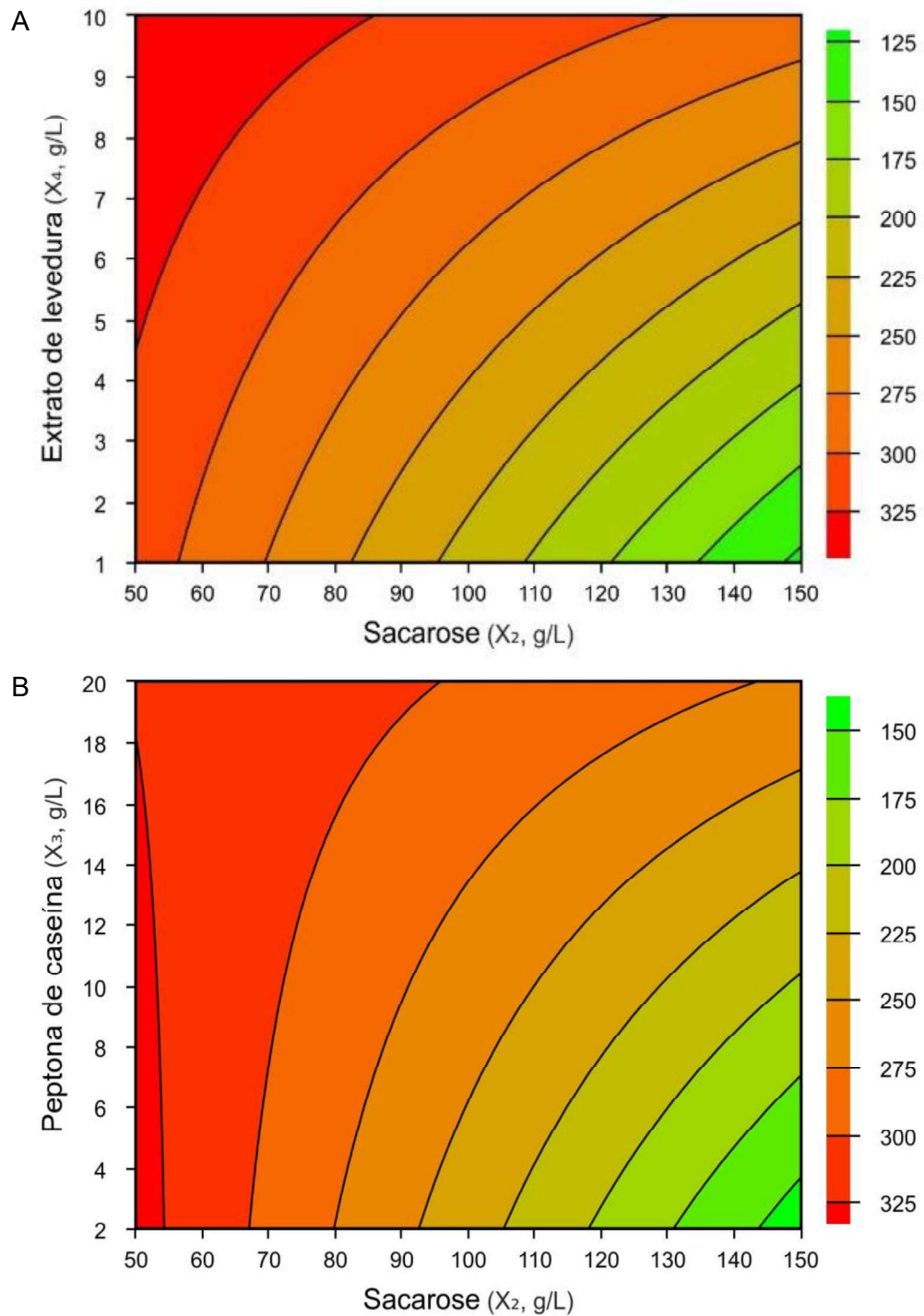
Figura 7 – Rendimento de etanol: Gráfico de Pareto ($t=34h$) da CHAP-248. Variáveis: pH (x_1); Sacarose (x_2); Peptona de caseína (x_3); Extrato de levedura (x_4).



* Indica o t_{calc} negativo

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Figura 8 – Rendimento de etanol: CC (t=34h) da CHAP-248: Sacarose x Extrato de levedura (A); Sacarose x Peptona de Caseína (B).



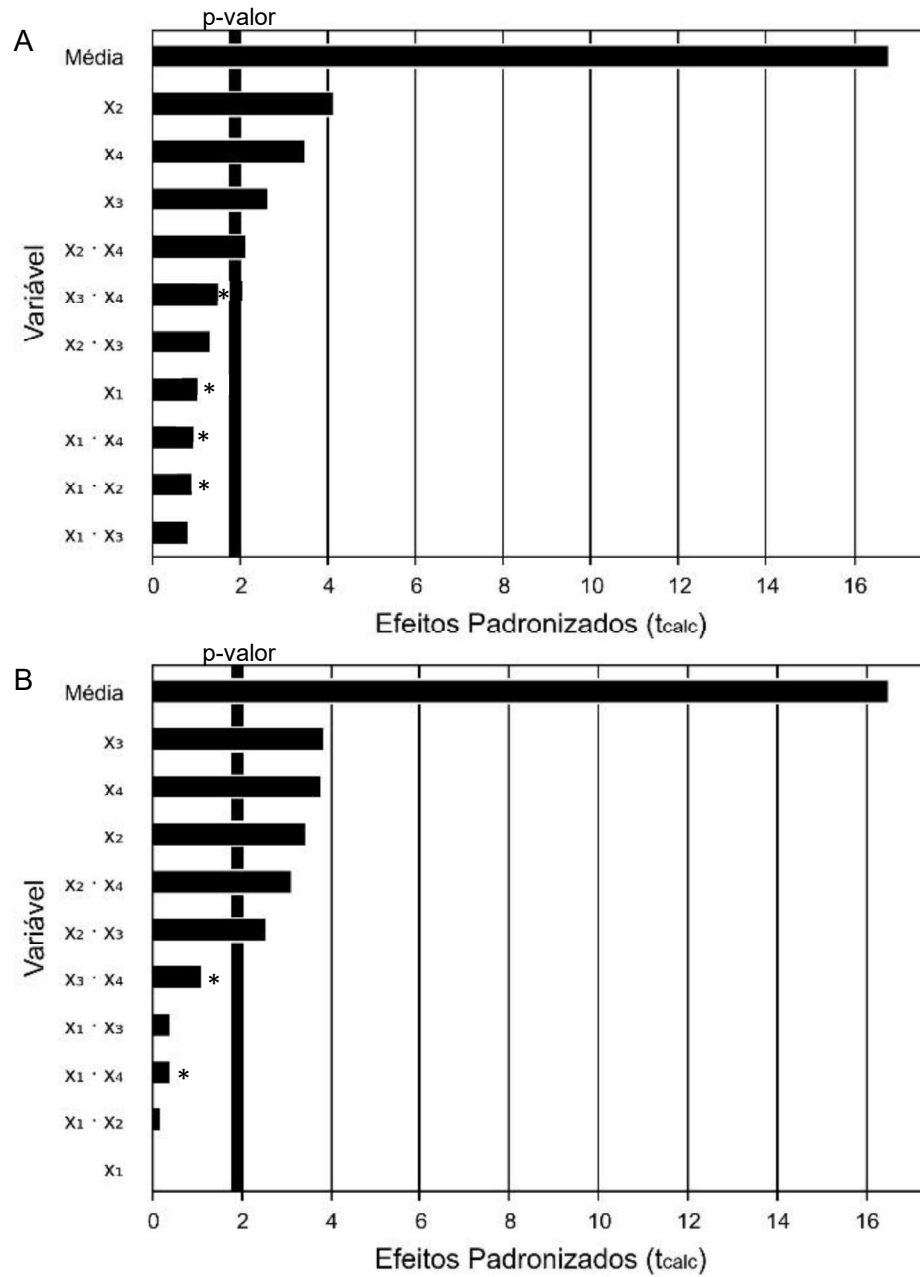
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

3.3.4.3 Produtividade de etanol

As linhagens CHAP-242 e CHAP-248 foram as que apresentaram as maiores produtividades de etanol (vide Figura 4). Ademais, para a CHAP-245, o R^2 da análise dessa resposta ficou abaixo de 75%. Assim sendo, na sequência, são mostradas as influências das variáveis testadas nos delineamentos conduzidos com as cepas CHAP-242 e CHAP-248 (Figura 9).

Conforme apontam os gráficos de Pareto da Figura 9, as mesmas variáveis independentes (sacarose, peptona e extrato de levedura) exerceram influência significativa também na produtividade de etanol. Contudo, importa ressaltar que, neste caso, também a sacarose teve efeito positivo. Assim sendo, embora o rendimento de etanol possa se beneficiar de menores concentrações do açúcar, uma maior concentração desse dissacarídeo eleva a produção e, conseqüentemente, a produtividade do álcool em questão (Figura 10).

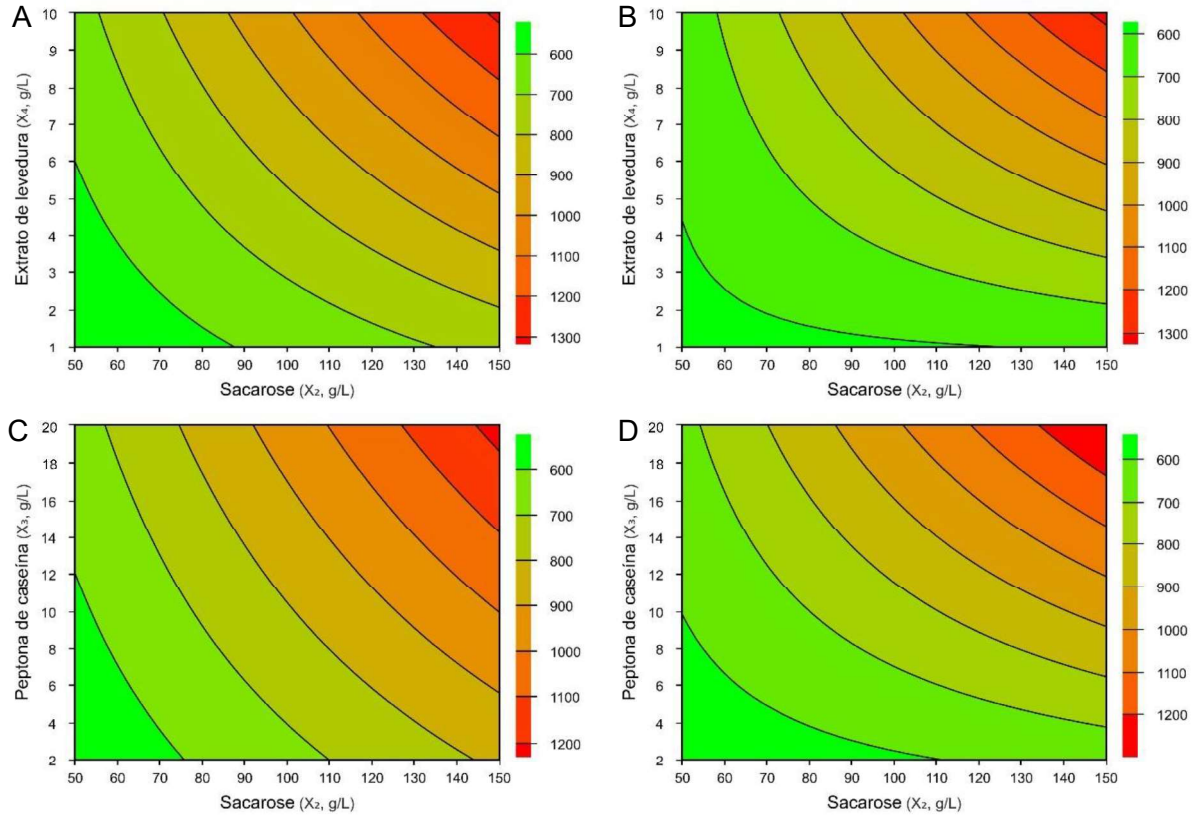
Figura 9 – Produtividade de etanol: Gráficos de Pareto (t=34h): CHAP-242 (A); CHAP-248 (B). Variáveis: pH (x_1); Sacarose (x_2); Peptona de caseína (x_3); Extrato de levedura (x_4).



* Indica o t_{calc} negativo

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Figura 10 – Produtividade de etanol: CC (t=34h) da Sacarose x Extrato de levedura, CHAP-242 (A); CHAP-248 (B). CC (t=34h) da Sacarose x Peptona de caseína, CHAP-242 (C); CHAP-248 (D).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

3.3.5 Identificação de COVs

3.3.5.1 COVs encontrados

Todos os cultivos celulares aqui realizados tiveram seus sobrenadantes, ao fim do tempo de incubação, submetidos a análises em GC-MS para determinar a produção de Compostos Orgânicos Voláteis. Com isso, então, foram analisadas 14 amostras oriundas da fase de *screening* (7 amostras do néctar sintético e 7 do meio rico), 57 amostras oriundas do DCC (19 para cada cepa) e 19 amostras de todos os meios de cultura antes da inoculação (aqui tratados como os brancos de cada ensaio).

Somente compostos com Índice de Similaridade (IS) maior que 90% foram contabilizados. As plataformas PubChem e Yeast Metabolome Database (YMDB) foram utilizadas como referência de aplicação dos compostos e como confirmação do registro deles como metabólitos já observados em leveduras.

Dentre os diversos compostos identificados, a grande maioria eram hidrocarbonetos alcanos ou variações dos mesmos como decano, dodecano, tetradecano, heptadecano, tetradecano,4-metyl, eicosano, eicosano,7-hexil-, dentre outros. Alguns aminoácidos como Glicil-L-Prolina, L-Prolina e L-leucina também apareceram. Alguns compostos, como Pirrolo[1,2-a] pirazine-1,4-dione e hexahidro-3-(2-metilpropil), apareceram tanto nas amostras como nos brancos. De fato, como o meio de cultura possui peptona de caseína, rico em aminoácidos, e extrato de leveduras, que possui células mortas de leveduras, possivelmente esses hidrocarbonetos, aminoácidos e compostos afins sejam provenientes já desse conjunto compostos.

Cinco compostos se destacaram como produtos do metabolismo das leveduras (ou seja, não foram detectados nos brancos). O 2-feniletanol apareceu em todas as 17 condições do delineamento e no *screening*, seja nos cultivos em néctar sintético (pobre em aminoácido) ou em meio rico (rico em aminoácido). O indol-3-etanol (triptofol) foi detectado como produto do metabolismo da cepa CHAP-245 em ambos os meios do *screening*; durante o DCC, esse composto foi produzido pelas três cepas testadas, embora somente em alguns experimentos. O metionol e o fosfato de trietila apareceram somente nos cultivos em meios ricos, ao contrário do 2-Ciclohexen-1,3,5,5-trimetil (isoforona), que foi encontrado somente em néctar sintético. Isso pode

ocorrer pois, além da quantidade e tipo de carboidrato, a concentração de aminoácidos presentes no meio pode também implicar em qual COV a levedura irá gerar (Fenner *et al.*, 2022). A Tabela 5 sumariza os dados supramencionados.

Tabela 5: COVs identificados por cepas de leveduras selvagens do DCC e do *screening*

Composto	CAS	Cepas (experimento)	DCC	Néctar sintético (2 g/L peptona)	Meio rico (20 g/L peptona)	Média aproximada da área do pico (%)
2-Feniletanol	60-12-8	Todas	+	+	+	66
Indol-3-etanol	526-55-6	CHAP-245 (<i>screening</i>); CHAP-242 (10); CHAP-245 (13); CHAP-248 (6; 10)	+	+	+	3
Metionol	505-10-2	CHAP-245; CHAP-248 (<i>screening</i>)	-	-	+	3
Fosfato de trietila	78-40-0	CHAP-223; CHAP-224; CHAP-239; CHAP-242; CHAP-245 (<i>screening</i>)	-	-	+	20
2-Ciclohexen-1-one, 3,5,5-trimetil-	78-59-1	CHAP-223; CHAP-224; CHAP-237; CHAP-239; (<i>screening</i>)	-	+	-	17

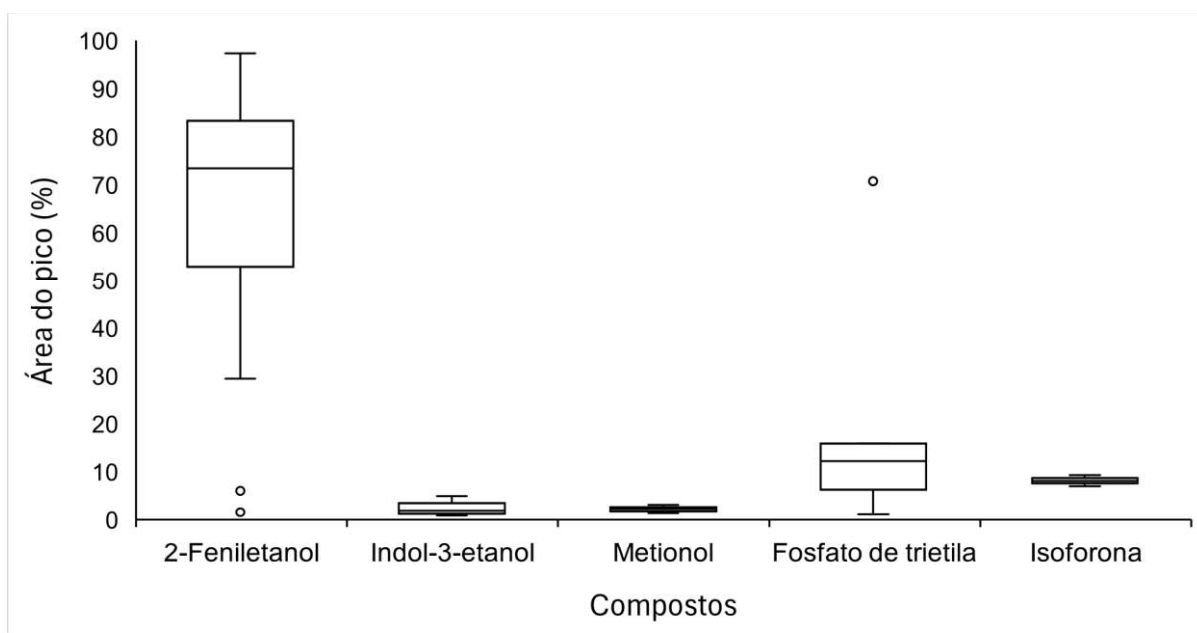
Legenda: + (Composto presente); - (Composto ausente)

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Com base nesses cinco compostos, foi realizada uma análise quali-quantitativa em boxplot (Figura 11). Com essa análise, fica nítida uma maior variabilidade no 2-Feniletanol, o que se justifica por ele estar presente em todas as amostras obtidas ao fim dos cultivos celulares. É possível observar na Figura 11 que 75% dos valores estão mais concentrados acima da mediana e possuem uma variabilidade baixa comparada aos outros 25%, que possuem uma alta variabilidade. Os maiores valores de área do pico nos cromatogramas desse composto são: CHAP-242 no experimento 14 com 88,64%; CHAP-245 no experimento 11 com 97,15%; CHAP-248 no experimento 9 com 97,33%. É notório também que há alguns outliers de baixas áreas de pico em comparação aos outros valores no 2-Feniletanol, isso ocorreu especificamente nas cepas de besouros analisadas no *screening* para ambos os meios analisados. O

Fosfato de trietila foi identificado somente em cinco situações e teve um outlier alto em comparação aos outros 4 valores, especificamente na CHAP-224 com uma área de pico de 70,80%. O Indol-3-etanol, o Metionol e a Isoforona tiveram uma distribuição de área de pico mais homogênea sem nenhum valor discrepante, e os números de identificação em amostras foram menores.

Figura 11 – Análise Quali-Quantitativa da presença dos COVs



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

3.3.5.2 Aplicações e relevância comercial dos COVs encontrados nesse estudo

O único composto que apareceu em absolutamente todas as amostras de cultivo e de todas as cepas analisadas do *screening* e do DCC foi o 2-Feniletanol (também conhecido por álcool feniletílico). Vale ressaltar que esse composto sempre se destacava com aproximadamente uma área de pico de 65% do cromatograma e sempre com IS superior a 90%. O YMDB apresenta algumas características interessantes desse álcool que possui um agradável odor floral e ocorre amplamente na natureza. Ele é encontrado em uma variedade de óleos essenciais, incluindo rosa, cravo, jacinto, pinheiro de Aleppo, flor de laranjeira, ilangue-ilangue, gerânio, néroli e champaca (Yeast Metaboloma Database, 2024). É, portanto, um ingrediente comum

em aromas e perfumaria, principalmente quando se deseja o cheiro de rosa. É responsável pelos aromas semelhantes aos do mel e um importante componente aromático do vinho Moscatel (Antonelli *et al.*, 1999; Tsakiris *et al.*, 2010). Também é utilizado como conservante em sabonetes devido à sua estabilidade em condições básicas. Na biologia, é de interesse devido às suas propriedades antimicrobianas (Sampaolesi *et al.*, 2024; Zou *et al.*, 2023).

Diversos estudos também tiveram o 2-Feniletanol como parte de seus compostos obtidos. Um estudo, por exemplo, para modular o perfil aromático de hidroméis com baixo teor alcoólico utilizou leveduras selvagens assim como no presente trabalho e identificou esse composto nos seus experimentos (Van Mullem *et al.*, 2022). Outro apresentou o resultado positivo de COVs produzidos por leveduras com efeito antifúngico para *Botrys cinerea* (um fungo filamentoso comum em frutas) em morangos. Nas amostras com esse efeito, o 2-Feniletanol não só estava presente como foi um dos compostos com mais atuação para eliminação do referido fungo (Zou *et al.*, 2023). Nessa mesma perspectiva de agentes antifúngicos, Sampaolesi *et al.* (2024) avaliaram o efeito dos COVs produzidos por leveduras *Saccharomyces pastorianus*, *S. cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii* e *Meyerozyma guilliermondii* atuando como agentes antifúngicos diante de fungos filamentosos (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*), sendo novamente o 2-Feniletanol um dos principais compostos de biocontrole. Esse composto também foi identificado em outro trabalho que avaliou a produção de COVs com espécies de *Malassezia* (leveduras que habitam peles de mamíferos, inclusive a de seres humanos) (Rios-Navarro *et al.*, 2023). Foi realizado por Traina *et al.* (2024) um trabalho da importância das leveduras no perfil organoléptico de azeitonas Taggiasca, onde foram isolados leveduras das oliveiras e essas submetidas a extração de COVs, e o 2-Feniletanol foi gerado pela levedura *Candida parapsilosis*.

Estudos também apontam que as leveduras presentes nos nectários florais podem produzir COVs com efeitos de biocontrole em plantas para repelir insetos indesejáveis, que podem ser pragas para plantações, ou atrair insetos que são importantes para a polinização de plantas. Dito isso, o 2-Feniletanol aparece em diversos estudos como atrativo para insetos (Ljunggren *et al.*, 2019). Um experimento demonstrou a produção desse composto por leveduras de diferentes espécies (*Candida albicans*, *Candida californica*, *Candida glabrata*, *Dekkera bruxellensis*, *Kluyveromyces lactis*, *Metschnikowia andauensis*, *Pichia kluyveri* e *Saccharomyces*

cerevisiae) e mostrou ser ele um atrativo para a mosca *Drosophila melanogaster* e para o colêmbolo *Folsomia candida* (Becher *et al.*, 2018). A atração por esse composto foi constada na literatura também para besouros de diversas espécies (Kandasamy; Gershenzon; Hammerbacher, 2016).

Outro COV que apareceu em algumas situações do *screening* e do DCC foi o Indol-3-etanol, também conhecido como triptofol. De acordo com o YMDB, o triptofol existe em todas as espécies vivas, desde bactérias a plantas e humanos. Nas leveduras, o triptofol está envolvido na via metabólica do triptofano. Esse composto pode ser utilizado também como aumento de eficácia no biocontrole. Essa aplicação foi confirmada por um estudo que realizou a adição de triptofol em morangos contaminados por *Botrytis cinerea* (Zhao *et al.*, 2023). Em relação a interferência do crescimento de leveduras, outro trabalho também analisou essa questão, mostrando que o triptofol altera as fermentações de *Saccharomyces cerevisiae* (Valera *et al.*, 2019).

O metionol é um volátil com sabor de enxofre, e é produzido por diversas espécies de leveduras como *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida kefyr*, além de *S. cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus* (Liu; Crow, 2010; López Del Castillo-Lozano *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2015). Em vinhos, o metionol aparece no processo de fermentação atuando no aroma e sabor dessas bebidas não sendo desejável nessas bebidas (Mestres; Busto; Guasch, 2000; Silva Ferreira *et al.*, 2003). Esse composto também foi gerado por besouros machos da espécie *Eustoma valida*, atuando como feromônio sexual de agregação, servindo de isca química para alimentação ou acasalamento (Zou *et al.*, 2024). Nessa mesma linha, outro trabalho também confirmou a atração da mosca *Drosophila suzukii* pelo metionol (Cha *et al.*, 2018).

O 3,3,5-trimetilciclohexanona (TMCH) é um importante composto químico plataforma para produzir produtos farmacêuticos, atuando como solvente orgânico, atingindo até mesmo o setor de tintas. A hidrogenação de 2-Ciclohexen-1,3,5,5-trimetil (Isoforona) gera o TMCH, que pode então ser usado nas indústrias (Hou *et al.*, 2018; Rodríguez-García *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2021). Além do estudo em questão, Sánchez *et al.* (2006) também identificou isoforona gerado por *Saccharomyces cerevisiae*.

O Fosfato de Trietila encontrado nesse estudo, conhecido pela sigla TEP (do inglês, Triethyl Phosphate), faz parte dos ésteres organofosforados, atuando como retardador de chamas ou plastificante (Liao *et al.*, 2023). O TEP foi a base de um

eletrólito não inflamável de Baterias Recarregáveis de Metal de Lítio (BRML) para atuar na estabilidade de baterias (Sun, Huaihu *et al.*, 2022). Também foi utilizado com um estabilizador na separação de fases na produção de biovidros (Bueno *et al.*, 2021).

De maneira geral, os COVs são compostos de altos valores agregados movimentando bilhões de dólares anualmente. O 2-feniletanol, principal composto detectado neste estudo, por exemplo, somente em 2022, superou valores no mercado mundial de US\$ 255 milhões, com previsão de até 2028 esse valor superar os US\$ 370 milhões, ou seja, em 6 anos é estimado um aumento de receita de 48%. Esse composto é obtido diretamente de extratos vegetais ou produzido em indústrias químicas. O estudo em questão surge como uma perspectiva de impulsionar a obtenção desse produto da forma mais ecologicamente correta possível, pois esse composto é utilizado nos mais diversos setores, tais como indústrias químicas atuando como intermediador para fabricar compostos sintéticos que são caros e difíceis de se retirar da natureza, como o ácido fenil acético, ácido benzóico, dentre outros. No setor farmacêutico ele se destaca por ser um agente antisséptico, antimicrobiano e desinfetante. Já na indústria alimentícia, ele pode se comportar como aditivo aromatizante em alimentos e bebidas, oferecendo sabores e aromas mais frescos (Global Market Insights, 2022). O fosfato de trietila (TEP), também encontrado no presente estudo, está no mercado atuando como catalisador químico, sendo produzido em larga escala através de intermediadores químicos como o anidrido acético. O TEP é um retardador de chama e solvente orgânico nas indústrias de plásticos e pesticidas. O mercado desse composto em 2023 ultrapassou os valores de US\$ 95 milhões, e há previsão que em até 10 anos esse mercado se aproxime da casa de um bilhão de dólares (Research Nester, 2024). A Isoforona também possui um valor de mercado altíssimo em razão das suas mais diversas aplicações em indústrias agroquímicas, produzindo pesticidas e herbicidas, bem como tinta, resinas dentre outros produtos. Esse mercado atingiu, em 2023, US\$ 375,2 milhões, com perspectiva de atingir meio bilhão de dólares até os anos de 2030 (Market Research Insights, 2024). Haja vista as mais diversas indústrias e aplicações em que os compostos aqui encontrados podem atuar, este estudo surge como uma opção para complementar de forma significativa a necessidade da crescente demanda no mercado.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o exposto, é possível afirmar que o isolamento de leveduras de besouros e abelhas foi positivo, gerando cepas com potenciais biotecnológicos que estão evidenciados nos resultados apresentados nos itens acima. De uma forma geral, o delineamento experimental mostrou que o valor do pH não interferiu nos experimentos. Também se pode concluir que quanto menor for a concentração de açúcar e maior a de nutrientes, melhor é o desempenho no rendimento de etanol para os microrganismos. A produtividade teve um comportamento contrário, ou seja, quanto maior a concentração de açúcar e maior a de nutrientes, maior foi a produtividade, e a explicação para isso é que a produtividade é calculada de acordo com o tempo de fermentação, ou seja, se a solução possuir mais quantidade de fonte de carbono para o microrganismo, consequentemente, a concentração de etanol produzida tende a ser maior, e quanto menor o tempo, maior será a produtividade dessa levedura. Nessa mesma perspectiva, por se ter maiores concentrações de nutrientes em geral, as leveduras ficarão fermentando por mais tempo, podendo gerar quantidades mais altas ainda de etanol mantendo a proporção alta de produtividade. Isso se confirma também pela Figura 2 que mostra o percentual de açúcar consumido.

A cepa que mais se destacou nos experimentos foi a CHAP-248, sendo responsável pelos maiores valores de rendimento e produtividade de etanol. No caso do rendimento, seu desempenho foi bastante próximo àquele observado nas usinas sucroalcooleiras do país.

Além do etanol, outros cinco COVs se mostraram bastante presentes como produto do metabolismo das leveduras. O 2-Feniletanol foi identificado nos cultivos de todas as cepas testadas, em ambos os meios do *screening* e em todas as condições do DCC. O Indol-3-etanol apareceu em ambos os meios de cultura do *screening* e em alguns experimentos do DCC. O metionol e o fosfato de trietila foram produzidos somente nos meios ricos, ao contrário da Isoforona, que foi encontrada somente em néctar sintético. Com isso, é possível concluir que as variadas concentrações de peptona de caseína empregadas nos meios avaliados podem alterar os voláteis gerados pelas leveduras.

A CHAP-248 também se destacou entre os COVs, tendo sido capaz de gerar, num mesmo experimento, além do 2-Feniletanol, o triptofol e metionol. Os COVs

possuem diversas aplicações industriais e fazem parte de uma receita bilionária no mundo anualmente, sendo que somente o 2-Feniletanol, o fosfato de trietila e a isoforona sozinhos movimentaram cerca de 1 bilhão de dólares no ano de 2023.

Avaliados em conjunto, nossos dados apontam que, embora a produção de etanol guarde uma correlação direta com a concentração disponível de peptona e extrato de levedura, a produção de COVs é bastante variada, e tende a ocorrer independentemente desses nutrientes. Assim sendo, as leveduras selvagens testadas neste trabalho mostram-se versáteis quanto a possíveis empregos em biorrefinarias, enquanto o enriquecimento dos meios pode levar a uma maior produção de etanol, a utilização de meios simples e baratos (pobres em fontes de nitrogênio e ricos em fontes de carbono) pode servir de substrato para a geração de diferentes produtos de interesse comercial.

REFERÊNCIAS

ACETALDEHYDE MARKET VALUE WORLDWIDE 2015-2030 | STATISTA. [S. /], [s. d.]. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/1244409/global-market-value-acetaldehyde/>. Acesso em: 24 ago. 2023.

ALBARELLO, Maria L.R. *et al.* Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae.

Bioenergy Research, [s. /], v. 1, p. 1–12, 2023a. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-023-10616-4>. Acesso em: 28 ago. 2023.

ALBARELLO, Maria L.R. *et al.* Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae.

Bioenergy Research, [s. /], v. 1, p. 1–12, 2023b. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-023-10616-4>. Acesso em: 3 dez. 2023.

ALLIED MARKET RESEARCH. **Isobutanol Market Expected to Reach \$1.9 Billion by 2030**. [S. /], 2022. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/press-release/isobutanol-market.html>. Acesso em: 5 abr. 2024.

ALVES Jr., Sérgio L. *et al.* Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production.

<https://home.liebertpub.com/ind>, [s. /], v. 15, n. 6, p. 336–349, 2019. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ind.2019.0019>. Acesso em: 18 mar. 2024.

ALVES JR., Sérgio L. *et al.* Engineered *Saccharomyces* or Prospected non-*Saccharomyces*: Is There Only One Good Choice for Biorefineries?. *In: Yeasts: From Nature Bioprocess*. [S. /]: Bentham Science Publishers LTD, 2022. v. 2, p. 243–268.

ANTÓN, Sebastian; DENISOW, Bozena. Nectar production and carbohydrate composition across floral sexual phases: contrasting patterns in two protandrous *Aconitum* species (Delphinieae, Ranunculaceae). **Flora - Morphology, Distribution,**

Functional Ecology of Plants, [s. l.], v. 209, n. 9, p. 464–470, 2014.

ANTONELLI, Andrea *et al.* Yeast Influence on Volatile Composition of Wines.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 1139–1144, 1999. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9807317>. Acesso em: 15 abr. 2024.

AUSTIN, P. D.; HAND, K. S.; ELIA, M. Systematic review and meta-analyses of the effect of lipid emulsion on microbial growth in parenteral nutrition. **Journal of Hospital Infection**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 307–319, 2016. Disponível em: <http://www.journalofhospitalinfection.com/article/S019567011630384X/fulltext>. Acesso em: 23 abr. 2024.

BECHER, Paul G. *et al.* Chemical signaling and insect attraction is a conserved trait in yeasts. **Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 2962–2974, 2018.

BOGO, Gherardo *et al.* Nectar chemistry is not only a plant's affair: floral visitors affect nectar sugar and amino acid composition. **Oikos**, [s. l.], v. 130, n. 7, p. 1180–1192, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/oik.08176>. Acesso em: 23 abr. 2024.

BUENO, Otto Mao Vargas Machuca *et al.* An experimental and theoretical approach on stability towards hydrolysis of triethyl phosphate and its effects on the microstructure of sol-gel-derived bioactive silicate glass. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 120, p. 111759, 2021.

CEPEA-ESALQ. Etanol - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA-Esalq/USP. [s. l.], Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br>. Acesso em: 10 abr. 2024.

CHA, Dong H. *et al.* A Multiple-Choice Bioassay Approach for Rapid Screening of Key Attractant Volatiles. **Environmental Entomology**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 946–950, 2018. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/ee/nvy054>. Acesso em: 16 abr. 2024.

COLDA, Agneta *et al.* Inoculation of pear flowers with *Metschnikowia reukaufii* and *Acinetobacter nectaris* enhances attraction of honeybees and hoverflies, but does not

increase fruit and seed set. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. e0250203, 2021.

Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0250203>. Acesso em: 25 mar. 2024.

DA SILVA FERNANDES, Flávia *et al.* Current Ethanol Production Requirements for the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 2022, 2022.

DAMIAN, Cristina. Environmental pollution in the petroleum refining industry. **Analele Universitatii “Ovidius” Constanta - Seria Chimie**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 109–114, 2014.

DEL TORO-SÁNCHEZ, L. *et al.* Generation of aroma compounds from *Ditaxis heterantha* by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 155–162, 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-005-0244-y>. Acesso em: 16 abr. 2024.

DZIALO, Maria C. *et al.* Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 41, n. Supp_1, p. S95–S128, 2017. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/femsre/fux031>. Acesso em: 23 abr. 2024.

ESWARAN, N.; PARAMESWARAN, S.; JOHNSON, T. S. Biofuels and Sustainability. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 2290, p. 317–342, 2021. Disponível em: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-1323-8_20. Acesso em: 8 abr. 2024.

ETHANOL MARKET SIZE, SHARE & TRENDS REPORT, 2020-2027. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/ethanol-market>. Acesso em: 24 ago. 2023.

FENNER, Eduardo D. *et al.* Nature's Most Fruitful Threesome: The Relationship between Yeasts, Insects, and Angiosperms. **Journal of Fungi 2022, Vol. 8, Page 984**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 984, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/10/984/htm>. Acesso em: 30 nov. 2022.

GIEHL, Anderson *et al.* PRODUCTION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS BY YEASTS IN BIOREFINERIES: ECOLOGICAL, ENVIRONMENTAL, AND BIOTECHNOLOGICAL OUTLOOKS. *In: CIÊNCIAS AMBIENTAIS E DA SAÚDE NA ATUALIDADE: INSIGHTS PARA ALCANÇAR OS OBJETIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL*. [S. l.]: Instituto de Inteligência em Pesquisa e Consultoria Científica Ltda, 2022a. p. 64–78.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **2-Phenylethanol Market Share Statistics 2022-2028**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/2-phenylethanol-market>. Acesso em: 3 abr. 2024.

GLOBE NEWSWIRE. **Ethyl Acetate Market to Reach USD 5.38 billion by 2028**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/news-release/2022/02/22/2389567/0/en/Ethyl-Acetate-Market-to-Reach-USD-5-38-billion-by-2028-Global-Size-Estimation-Revenue-Stats-Applications-Analysis-Growth-Drivers-Business-Strategy-Key-Companies-and-Forecast-The-Br.html>. Acesso em: 5 abr. 2024.

HAWARY, Heba *et al.* Kinetic modeling and optimization of ethanol fermentation by the marine yeast *Wickerhamomyces subpelliculosus* ZE75. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **2024 40:5**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 1–13, 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-024-03942-y>. Acesso em: 8 abr. 2024.

HECKMAN, D. S. *et al.* Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. **Science**, [s. l.], v. 293, n. 5532, p. 1129–1133, 2001.

HERRERA, Carlos M. *et al.* Yeasts in floral nectar: A quantitative survey. **Annals of Botany**, [s. l.], v. 103, n. 9, p. 1415–1423, 2009.

HOU, Yucui *et al.* Improvement of the selectivity of isophorone hydrogenation by Lewis acids. **Royal Society Open Science**, [s. l.], v. 5, n. 5, 2018. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.171523>. Acesso em: 16 abr. 2024.

IRAM, Attia; CEKMECELIOGLU, Deniz; DEMIRCI, Ali. Integrating 1G with 2G Bioethanol Production by Using Distillers' Dried Grains with Solubles (DDGS) as the Feedstock for Lignocellulolytic Enzyme Production. **Fermentation** **2022, Vol. 8**,

Page 705, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 705, 2022. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/2311-5637/8/12/705/htm>. Acesso em: 7 abr. 2024.

JAISWAL, Deepak *et al.* Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. **Nature Climate Change** **2017 7:11**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 788–792, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nclimate3410>. Acesso em: 15 mar. 2024.

KANDASAMY, Dineshkumar; GERSHENZON, Jonathan; HAMMERBACHER, Almuth. Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control. **Journal of Chemical Ecology** **2016 42:9**, [s. l.], v. 42, n. 9, p. 952–969, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-016-0768-x>. Acesso em: 3 abr. 2024.

LIAO, Kaizhen *et al.* Organophosphate esters concentrations in human serum and their associations with Sjögren syndrome. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 331, p. 121941, 2023.

LIU, S. Q.; CROW, V. L. Production of Dairy-Based, Natural Sulphur Flavor Concentrate by Yeast Fermentation. **Food Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 62–77, 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905430903562724>. Acesso em: 16 abr. 2024.

LJUNGGREN, Joel *et al.* Yeast volatomes differentially affect larval feeding in an insect herbivore. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 85, n. 21, 2019. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01761-19>. Acesso em: 3 abr. 2024.

LÓPEZ DEL CASTILLO-LOZANO, M. *et al.* Comparison of volatile sulphur compound production by cheese-ripening yeasts from methionine and methionine-cysteine mixtures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 1447–1454, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-007-0971-3>. Acesso em: 16 abr. 2024.

LUCARONI, Ana C. *et al.* Effects of Temperature and pH on Salt-Stressed Yeast Cultures in Non-Detoxified Coconut Hydrolysate. <https://home.liebertpub.com/ind>,

[s. l.], v. 18, n. 4, p. 205–213, 2022. Disponível em:
<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ind.2021.0029>. Acesso em: 3 dez. 2023.

MAKOPA, Tawanda P. *et al.* Yeast–insect interactions in southern Africa: Tapping the diversity of yeasts for modern bioprocessing. **Yeast**, [s. l.], 2024. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/yea.3935>. Acesso em: 11 abr. 2024.

MARKET RESEARCH INSIGHTS. **Isophorone Market Size, Share**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.linkedin.com/pulse/isophorone-market-size-share-cagr-25-8cope/>. Acesso em: 18 abr. 2024.

MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 881, n. 1–2, p. 569–581, 2000.

PEACH, D. A.H. *et al.* Nectar-dwelling microbes of common tansy are attractive to its mosquito pollinator, *Culex pipiens* L. **BMC Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em:
<https://bmcecolvol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12862-021-01761-5>. Acesso em: 30 nov. 2022.

POZO, María I. *et al.* Presence of yeasts in floral nectar is consistent with the hypothesis of microbial-mediated signaling in plant-pollinator interactions. **<https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9874>**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 1102–1104, 2009. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/psb.4.11.9874>. Acesso em: 14 jul. 2022.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Annual Ethanol Production**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>. Acesso em: 20 mar. 2024.

RERING, Caitlin C. *et al.* Nectar-inhabiting microorganisms influence nectar volatile composition and attractiveness to a generalist pollinator. **New Phytologist**, [s. l.], v. 220, n. 3, p. 750–759, 2018. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nph.14809>. Acesso em: 30 nov. 2022.

RESEARCH NESTER. **Triethyl Phosphate Market Size & Share | Global Forecast Report 2036**. [S. l.], 2024. Disponível em:

<https://www.researchnester.com/reports/triethyl-phosphate-market/5815>. Acesso em: 18 abr. 2024.

RIOS-NAVARRO, Andrea *et al.* Why Do These Yeasts Smell So Good? Volatile Organic Compounds (VOCs) Produced by *Malassezia* Species in the Exponential and Stationary Growth Phases. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 2620, 2023.

Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/6/2620/htm>. Acesso em: 3 abr. 2024.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antonio Francisco. Experimental design and process optimization. **Experimental Design and Process Optimization**, [s. l.], p. 1–304, 2014. Disponível em:

<https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/b17848/experimental-design-process-optimization-maria-isabel-rodrigues-antonio-francisco-iemma>. Acesso em: 10 abr. 2024.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, Laura *et al.* Enantioselection on Heterogeneous Noble Metal Catalyst: Proline-Induced Asymmetry in the Hydrogenation of Isophorone on Pd Catalyst. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 137, n. 37, p. 12121–12130, 2015. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jacs.5b07904>. Acesso em: 16 abr. 2024.

ROQUE, Laerti Reis *et al.* Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, [s. l.], v. 242, p. 775–787, 2019.

RUCHALA, Justyna *et al.* Construction of advanced producers of first- and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*). **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 109–132, 2020.

Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1007/s10295-019-02242-x>. Acesso em: 17 abr. 2024.

SAMPAOLESI, Sofia *et al.* Bioactive volatiles of brewer's yeasts: Antifungal action of compounds produced during wort fermentation on *Aspergillus* sp. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], p. 110692, 2024. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160524001363>. Acesso em: 15 abr.

2024.

SILVA FERREIRA, António César *et al.* Influence of some technological parameters on the formation of dimethyl sulfide, 2-mercaptoethanol, methionol, and dimethyl sulfone in port wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 727–732, 2003. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf025934g>. Acesso em: 16 abr. 2024.

SOBHY, Islam S. *et al.* Sweet scents: Nectar specialist yeasts enhance nectar attraction of a generalist aphid parasitoid without affecting survival. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 9, n. July, p. 1–13, 2018.

SUN, Yang *et al.* Metabolic and Evolutionary Engineering of Diploid Yeast for the Production of First- and Second-Generation Ethanol. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 9, p. 835928, 2022.

SUN, Huaihu *et al.* Stabilizing the cycling stability of rechargeable lithium metal batteries with tris(hexafluoroisopropyl)phosphate additive. **Science Bulletin**, [s. l.], v. 67, n. 7, p. 725–732, 2022.

TADIOTO, Viviani *et al.* Prospecting and engineering yeasts for ethanol production under inhibitory conditions: an experimental design analysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 1133–1145, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-022-02812-x>. Acesso em: 3 dez. 2023.

TRAINA, Chiara *et al.* Monitoring the yeasts ecology and volatiles profile throughout the spontaneous fermentation of Taggiasca cv. table olives through culture-dependent and independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 417, p. 110688, 2024.

TSAKIRIS, Argyris *et al.* A new process for wine production by penetration of yeast in uncrushed frozen grapes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 162, n. 4, p. 1109–1121, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-009-8881-8>. Acesso em: 15 abr. 2024.

VALERA, María José *et al.* Effects of melatonin and tryptophol addition on fermentations carried out by *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast species under different nitrogen conditions. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 289, p. 174–181, 2019.

VAN MULLEM, Joshua Johannes *et al.* Using wild yeasts to modulate the aroma profile of low-alcoholic meads. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 2173–2184, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-022-00840-z>. Acesso em: 3 abr. 2024.

VINICIUS PACHECO DE ALMEIDA; GIULIANO MANERA LONGHI; LUCAS RAMOS DOS SANTOS. Etanol: 40 anos de evolução do mercado de combustíveis e automóveis no Brasil. **Teoria e Evidência Econômica**, [s. l.], v. 49, p. 462–484, 2017.

XU, Lei *et al.* Study on the selective hydrogenation of isophorone. **RSC Advances**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 4465–4471, 2021. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/ra/d0ra08107h>. Acesso em: 16 abr. 2024.

YEAST METABOLOMA DATABASE. **2-phenylethanol (YMDB01072)**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.ymdb.ca/compounds/YMDB01072>. Acesso em: 15 abr. 2024.

YIN, Sheng *et al.* Significant enhancement of methionol production by co-expression of the aminotransferase gene ARO8 and the decarboxylase gene ARO10 in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 362, n. 5, p. 43, 2015. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnu043>. Acesso em: 16 abr. 2024.

ZHAO, Zichang *et al.* Tryptophol Improves the Biocontrol Efficacy of *Scheffersomyces spartinae* against the Gray Mold of Strawberries by Quorum Sensing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 71, n. 49, p. 19739–19748, 2023. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.3c06676>. Acesso em: 3 abr. 2024.

ZOU, Yunfan *et al.* Methionol as an aggregation-sex pheromone of the desert-

dwelling beetle *Eustromula valida* (Coleoptera: Cerambycidae). **Environmental Entomology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 101–107, 2024. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/ee/nvad123>. Acesso em: 16 abr. 2024.

ZOU, Xiurong *et al.* Volatile Organic Compounds of *Scheffersomyces spartinae* W9 Have Antifungal Effect against *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruit. **Foods 2023, Vol. 12, Page 3619**, [s. l.], v. 12, n. 19, p. 3619, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/19/3619/htm>. Acesso em: 3 abr. 2024.