

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA
CAMPUS CHAPECÓ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE 2-FENILETANOL POR LEVEDURAS
SELVAGENS A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

ALUNO Stefany Kell Bressan
ORIENTADOR Prof. Dr Sergio Luiz Alves Jr.
COORIENTADOR Me. Anderson Giehl

Novembro – 2025

STÉFANY KELL BRESSAN

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE 2-FENILETANOL POR LEVEDURAS
SELVAGENS POR MEIO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: **Prof. Sérgio Luiz Alves Jr.**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca
em: 04.12.2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO LUIZ ALVES JUNIOR**
Data: 04/12/2025 11:51:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr - UFFS

Documento assinado digitalmente
 **HELEN TREICHEL**
Data: 04/12/2025 13:53:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Helen Treichel – UFFS

Documento assinado digitalmente
 **ANGELA ALVES DOS SANTOS**
Data: 04/12/2025 12:31:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Angela Alves dos Santos - Bolsista de Pós-Doutorado - UFSC

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE 2-FENILETANOL POR LEVEDURAS SELVAGENS A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Stéfany Kell Bressan*
Anderson Giehl**
Sérgio Luiz Alves Jr. ***

RESUMO

O 2-feniletanol (2-PE) é um composto aromático de alto valor agregado amplamente aplicado nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. A produção microbiana desse aroma, especialmente por leveduras, tem ganhado destaque como alternativa sustentável aos métodos químicos tradicionais. Além do 2-PE, leveduras selvagens são capazes de produzir outros Compostos Orgânicos Voláteis (VOCs) de relevância biotecnológica. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi isolar e selecionar leveduras com potencial biotecnológico e avaliar a produção de 2-PE a partir de resíduos agroindustriais — casca de laranja e bagaço de malte — investigando como diferentes concentrações de L-fenilalanina (L-Phe) e nitrogênio assimilável influenciam o rendimento e a eficiência do processo fermentativo. A triagem inicial das leveduras isoladas de nectários florais demonstrou a produção de diversos VOCs. O 2-PE foi o composto mais predominante, com áreas de pico de até 55%, mas também foram identificados triptofol, 4-hidroxi-2-metilacetofenona e ácido fenilacético. A espécie isolada *Aureobasidium leucospermi* (cepa CHAP-214) surgiu como a melhor produtora de 2-PE, alcançando 145,736 mg/L em meio sintético, sendo este um dos primeiros relatos da produção deste composto por essa linhagem. Testes com extratos dos resíduos (casca de laranja e bagaço de malte) foram conduzidos com variação do balanço carbono–nitrogênio (M1-M5) e quatro formulações (E1–E4) com diferentes concentrações de L-phe. O meio E3, contendo extrato de casca de laranja, bagaço de malte e 4 g/L de L-phe, apresentou a maior produção de 2-PE ($2,477 \pm 0,01$ g/L) e o melhor rendimento ($0,83 \pm 0,02$ g/g). Os resultados demonstram o potencial de *A. leucospermi* como plataforma microbiana promissora para a produção sustentável de 2-PE a partir de resíduos agroindustriais, reforçando a importância do ajuste da composição do meio e da concentração do precursor para a otimização do bioprocessamento.

Palavras-chaves: casca de laranja; bagaço de malte; *Aureobasidium leucospermi*, VOCs.

*Discente do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária - Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó, SC, Brasil. E-mail: stefanybressan123@gmail.com

**Doutorando do Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Florianópolis, SC, Brasil. Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária. E-mail: andergiehl@gmail.com.

***Docente do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária – Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó, SC, Brasil. Doutor em Ciências. E-mail: slalvesjr@uffs.edu.br.

1 INTRODUÇÃO

Leveduras são capazes de produzir compostos orgânicos voláteis (VOCs) de relevância biotecnológica (Fenner et al., 2022). Esses compostos podem ser sintetizados durante o metabolismo de açúcares presentes em nectários florais, como glicose, frutose e sacarose (Ryniewicz et al., 2020). A produção de VOCs por leveduras, aliada ao crescente interesse por compostos naturais de alto valor agregado, tem impulsionado o desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis e economicamente competitivos. Entre esses compostos, destaca-se o 2-feniletanol (2-PE), um álcool aromático com odor característico de rosas e amplamente utilizado nas indústrias cosmética, alimentícia, farmacêutica e química devido às suas propriedades organolépticas, antimicrobianas e antifúngicas (Guo et al., 2018; Martínez-Avila et al., 2018).

O mercado global de 2-PE foi avaliado em 255 milhões de dólares em 2021, com previsão de crescimento anual composto (CAGR) de 5,5% entre 2024 e 2028 (Global Market Insights Inc., 2022). Atualmente, a maior parte desse composto é obtida por síntese química, principalmente por reações de Friedel-Crafts, Grignard ou hidrogenação. Contudo, tais rotas utilizam precursores nocivos e geram subprodutos indesejáveis (como cloretos metálicos residuais, derivados aromáticos halogenados, compostos parcialmente reduzidos e lamas catalíticas contendo metais pesados) resultando em elevado impacto ambiental (Bernardino et al., 2024). Leis e regulamentações foram promulgadas nos Estados Unidos e na Europa para restringir o uso de 2-PE sintetizado quimicamente em alimentos, cosméticos e bebidas (Shen et al., 2016). Além disso, a extração direta de 2-PE de flores e plantas é limitada devido ao baixo rendimento e aos altos custos associados (Mitri et al., 2022).

Neste contexto, a produção biotecnológica de 2-PE apresenta vantagens significativas, uma vez que na indústria de alimentos foi reconhecido por diversas organizações — Food and Drug Administration (FDA), Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA), o Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Council of Europe (COE) — como produto seguro (GRAS), quando produzido por vias naturais, o que lhe confere um valor agregado (Scognamiglio et al., 2012). Assim sendo, leveduras são capazes de sintetizar naturalmente 2-PE por duas principais rotas, a via do chiquimato e a via de Ehrlich, sendo esta última a mais eficiente (Mitri et al., 2022). A via de Ehrlich é uma via secundária e tem início com a transaminação da L-fenilalanina (L-Phe) em fenilpiruvato, catalisada por aminotransferases dependentes de piridoxal-fosfato. Em seguida, o fenilpiruvato é descarboxilado por descarboxilases aromáticas, gerando fenilacetaldeído. Por fim, o fenilacetaldeído pode ser

reduzido a 2-PE por álcool desidrogenases (ADH) ou oxidado a ácido fenilacético por aldeído desidrogenases (ALDH), de modo que o destino metabólico do intermediário depende da composição do meio (Gu et al., 2020).

A escolha do meio de cultivo é, portanto, determinante para a eficiência do processo fermentativo. O uso de resíduos agroindustriais como fontes de carbono e nitrogênio reduz custos, agrega valor a subprodutos e contribui para processos mais sustentáveis (Mitri et al., 2022). Entre esses resíduos, destacam-se a casca de laranja, rica em açúcares fermentáveis (Lima; Souza; Cunha, 2020; Torrado et al., 2011), e o bagaço de malte, proveniente do setor cervejeiro, com elevado conteúdo proteico e presença de aminoácidos, incluindo L-Phe (Mussatto, 2014). O Brasil é um dos maiores produtores de suco de laranja e, conseqüentemente, de resíduos deste produto. Ademais, o resíduo do processo produtivo cervejeiro tem se mostrado uma promissora matéria-prima para uso em biorrefinarias, porém a principal destinação desse subproduto é a ração animal, que apresenta baixa valorização (Mussatto, 2014; Minussi et al., 2024). Entretanto, sua utilização como substrato para microrganismos requer estratégias de pré-tratamento capazes de disponibilizar seus componentes nutricionais (Minussi et al., 2024; Schmidt et al., 2023).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar leveduras com potencial biotecnológico e avaliar a produção de 2-PE a partir de resíduos agroindustriais — casca de laranja e bagaço de malte — investigando como diferentes concentrações de L-Phe e nitrogênio assimilável influenciam o rendimento e a eficiência do processo fermentativo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

Onze linhagens de levedura isoladas dos nectários florais de *Senna macranthera*, (encontradas na Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó) foram analisadas neste trabalho: CHAP-208, CHAP-209, CHAP-211, CHAP-213, CHAP-214, CHAP-215, CHAP-216, CHAP-218, CHAP-219, CHAP-220 e CHAP-221. Para o isolamento, um swab estéril foi utilizado para coletar material dos nectários, que foram posteriormente inoculados em placas de Petri contendo meio YNB (6,7 g/L de base nitrogenada de levedura) com 10 g/L de xilose, 0,2 g/L de cloranfenicol e 20 g/L de ágar, pH 5,0. Em seguida, os morfotipos de leveduras foram isolados e purificados por sucessivas repicagens no mesmo meio sólido.

Na sequência, as linhagens CHAP-208, CHAP-209, CHAP-213, CHAP-214, CHAP-216, CHAP-218, CHAP-219 e CHAP-221 foram identificadas taxonomicamente por meio do

sequenciamento de duas regiões do rDNA: o Espaçador Interno Transcrito (ITS1-5.8S-ITS2), amplificado pelos primers ITS1 e ITS4, e os domínios variáveis da subunidade grande (LSU), amplificados pelos primers LR0R e LR16. O DNA amplificado foi purificado e sequenciado em um sistema ABI 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, EUA) usando BigDye v3.1 e polímero POP7. As sequências foram montadas, editadas e alinhadas no MEGA6 e comparadas às sequências depositadas no GenBank por meio da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), conforme descrito por Tadioto et al. (2022). As linhagens CHAP-211, CHAP-215 e CHAP-220 foram identificadas por DNA fingerprinting utilizando o primer repetitivo (GTG)_s, que gera perfis de bandas específicos para cada isolado (Giehl et al., 2025). Todas as regiões ITS e LSU foram depositadas no NCBI, onde receberam números de acesso, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Identificação taxonômica das linhagens de leveduras isoladas e seus respectivos códigos de identificação molecular.

Linhagem	Espécie	Número NCBI
CHAP - 208	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	PQ046786 (ITS), PV749300 (LSU)
CHAP - 209	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	PP580037 (LSU), PP580034 (ITS)
CHAP - 211	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	GTG
CHAP - 213	<i>Aureobasidium</i> sp.	PP580040 (LSU), PP580038 (ITS)
CHAP - 214	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	PP580041 (LSU), PP580039 (ITS)
CHAP - 215	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	GTG
CHAP - 216	<i>Papiliotrema rajasthanensis</i>	PQ109716 (LSU)
CHAP - 218	<i>Meyerozyma caribbica</i>	PQ115148 (LSU), PQ788426 (ITS)
CHAP - 219	<i>Aureobasidium</i> sp.	PP580516 (LSU), PP580507 (ITS)
CHAP - 220	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	GTG
CHAP - 221	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	PQ046650 (ITS), PV749306 (LSU)

Fonte: os autores, 2025.

2.2 CULTIVO EM MEIOS SINTÉTICOS E ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (VOCs)

A fim de verificar o perfil de crescimento das linhagens isoladas em meios com carboidratos encontrados nos nectários, todas as linhagens foram inicialmente submetidas a um pré-inóculo em meio sólido inclinado YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose e 20 g/L de ágar) a 30 °C por 72 horas. Após esse período, 1 µL de cada

linhagem foi inoculado em frascos Erlenmeyer com meios YP (10 g/L de extrato de leveduras e 20 g/L de peptona, pH 5,0) contendo, alternadamente, 20 g/L de frutose e glicose ou 150 g/L de sacarose. Os cultivos foram realizados sob agitação de 145 rpm a 30 °C por 48 h em todas as condições, exceto para meios com sacarose, que permaneceram incubados por 72h (haja vista a maior disponibilidade de açúcar). Para o acompanhamento do crescimento celular, amostras do meio foram coletadas em 0 h, 14 h, 19 h, 24 h, 38 h, 43 h e 48 h de cultivo. Para os meios contendo sacarose, o acompanhamento seguiu até os tempos de 62 h, 67 h e 72 h. A densidade de células foi avaliada por turbidimetria, com absorbâncias analisadas em um espectrofotômetro a 570 nm.

Ao fim dos cultivos os meios foram transferidos para tubos Falcon que passaram por centrifugação a 8500 g por 5 min, com objetivo de separar o sobrenadante e utilizá-lo para extração dos compostos. A extração líquido-líquido foi realizada com o auxílio de um funil de separação, 20 mL de cada sobrenadante foram misturados a 6,67 mL de diclorometano. Na sequência, a fase apolar contendo diclorometano foi enviada para um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS), a fim de identificar os compostos provenientes do metabolismo das leveduras avaliadas. A biblioteca utilizada para a espectrometria foi a NIST08s, como descrito por Fenner et al. (2024). Como controle negativo, meios de cultura prévios ao inóculo também passaram pelo mesmo processo de extração e análise cromatográfica.

2.3 TRIAGEM DE LEVEDURAS ISOLADAS

Com objetivo de selecionar a linhagem de levedura com melhor desempenho, todas as onze cepas, após pré-inóculo realizado conforme descrito acima, foram cultivadas em frascos Erlenmeyer com meio YPS (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 50 g/L de sacarose, pH 5,0) e incubadas por 96 horas a 30 °C sob agitação de 145 rpm. Ao fim dos cultivos, os sobrenadantes foram reservados para posterior quantificação de 2-feniletanol. Os cultivos foram realizados em duplicata.

2.4 PRODUÇÃO DE EXTRATOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

As cascas de laranja (advindas de restaurante local) e o bagaço de malte (advindo de indústria cervejeira local) foram fornecidos já secos, triturados e peneirados pelo Laboratório de Resíduos Sólidos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Chapecó.

O preparo do extrato de casca de laranja, com o objetivo de obter açúcares, seguiu a metodologia adaptada de Carota et al. (2020). Para isso, o resíduo foi adicionado a água

destilada na proporção de 15:100 (p/v) e homogeneizado. Em seguida, incubado em banho-maria a 90 °C por 30 minutos. Após o resfriamento, a suspensão líquida foi centrifugada (6000 g, 15 min).

Para a obtenção do extrato de bagaço de malte, visando à obtenção de uma fonte de nitrogênio, o resíduo foi tratado com NaOH 0,1 M na proporção 1:40 (p/v), e incubado em banho-maria a 95 °C por 4 horas (Zhang; Sandres; Bruins, 2014). Ambos os extratos (casca de laranja e bagaço de malte) foram filtrados em sistema de filtração estéril a vácuo, ajustados para pH 5,0 e produzidos em triplicata.

2.5 CONDIÇÕES DE CULTIVO EM MEIOS PRODUZIDOS A PARTIR DE RESÍDUOS

Os extratos de casca de laranja e bagaço de malte mencionados na seção anterior foram misturados (na proporção de 1:1, v/v) para a composição de meios de cultura com vistas à produção de 2-PE a partir de substratos residuais. Nesse contexto, a levedura com melhor desempenho em YPS foi inoculada (1 µL) nos seguintes meios, eventualmente suplementados com sulfato de amônio, ureia e/ou sacarose:

- Extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte (meio M1);
- Extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 5 g/L de sulfato de amônio (meio M2);
- Extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 5 g/L de sulfato de amônio + 20 g/L de sacarose (meio M3);
- Extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 2,8 g/L de ureia (meio M4);
- Extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 2,8 g/L de ureia + 20 g/L de sacarose (meio M5).

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer mantidos sob agitação a 145 rpm, a uma temperatura de 30 °C, durante 72 horas. Amostras foram coletadas ao longo do tempo para leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (DO 570nm), nos tempos de 0 h, 6 h, 18 h, 30 h, 42 h, 54 h, 66 h e 72 h, com o objetivo de construir curvas de crescimento das leveduras em cada meio. Ao final do cultivo (72 h), os meios passaram por centrifugação para separação das células (fase sólida) e do sobrenadante (fase líquida), o qual foi utilizado para análise da concentração de 2-PE e L-phe.

Subsequentemente, considerando os resultados nos meios M1 a M4, novas condições de cultivo foram testadas, sendo elas:

- Extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 9 g/L de L-Fenilalanina (meio E1);
- Extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 5 g/L de sulfato de amônio + 9 g/L de L-Fenilalanina (meio E2);
- Extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 4 g/L de L-Fenilalanina (meio E3);
- Extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 4 g/L de L-Fenilalanina + 5 g/L de sulfato de amônio (meio E4).

Também nos casos dos meios E1 a E4, os extratos de casca de laranja e bagaço de malte foram misturados em uma proporção 1:1 (v/v).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES, PROTEÍNAS, 2-PE E L-PHE

A dosagem de açúcares redutores nos extratos de casca de laranja foi realizada por método DNS em microplaca, conforme descrito em Santos et al. (2017). A quantificação das proteínas extraídas do bagaço de malte seguiu a metodologia de Bradford (Zor; Seliger, 1996). As triplicatas de ambos os extratos foram misturadas e enviadas para quantificação de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; LCMS-2020, Shimadzu) com detector de índice de refração RID-10A (Refractive Index – IR, Shimadzu) e coluna AMINEX HPX-87P Bio-Rad, com respectivo pré-filtro e holder. A fase móvel utilizou 5,0 mM de ácido sulfúrico a 50 °C, com fluxo de 0,6 mL/ min durante 25 minutos por amostra.

A concentração de 2-PE e L-Phe nas amostras foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o sistema LC-20AD com detecção de 210 nm. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna C18 a 40 °C. O volume de injeção foi de 20 µL e a vazão total do sistema foi mantida constante em 0.6000 mL/min. A fase móvel era composta por acetonitrila/água operando em modo de gradiente binário, sendo 0.01 min a 5% acetonitrila, 5.00 min a 5%, 7.5 min a 10%, 10.00 min a 10%, 15.00 min a 30%, 17.50 min a 30%, 25.00 min a 5% e por fim parada em 30.00 min.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de todos os cultivos contendo resíduos agroindustriais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) one-way para testar a hipótese nula, utilizando o software GraphPad Prism® v8.0.2 (StatSoft Inc.), com o objetivo de verificar diferenças significativas entre os grupos avaliados ($p < 0,05$). Diante da significância detectada pela ANOVA, aplicou-

se o teste de comparações múltiplas post-hoc de Tukey ($p < 0,05$) para identificar quais pares apresentaram diferenças estatísticas. A distinção entre os grupos foi representada por letras sobrescritas, de modo que médias que compartilham pelo menos uma letra não diferem estatisticamente entre si, enquanto médias que não compartilham letras são consideradas significativamente diferentes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO

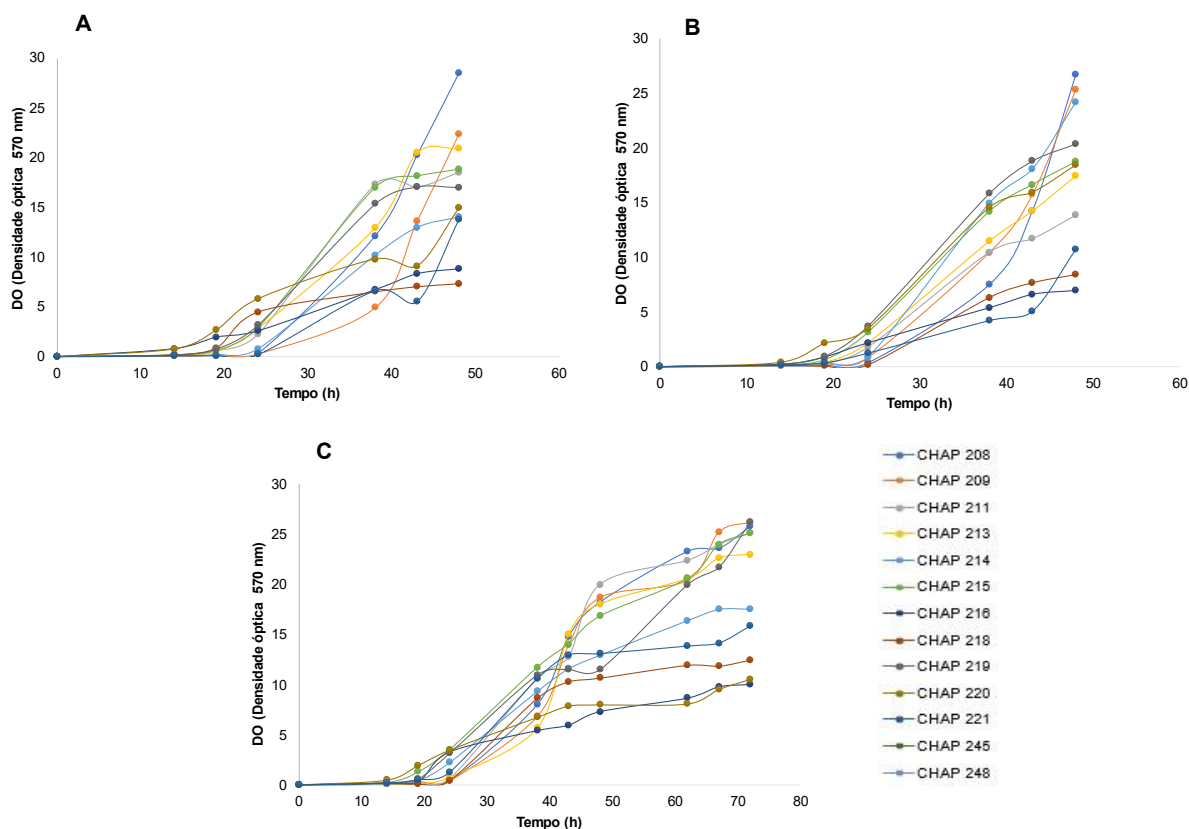
Foram identificadas onze linhagens de leveduras (Tabela 1) isoladas de nectários florais de *Senna macranthera*. A identificação apresenta uma predominância de leveduras do gênero *Aureobasidium*. Este gênero é um colonizador amplamente observado na superfície das plantas (filosfera) por se adaptar facilmente a nichos ricos em açúcar, como os nectários, que fornecem uma fonte concentrada de nutrientes (Zalar *et al.*, 2008).

Espécies do gênero *Aureobasidium* demonstram capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis (VOCs), incluindo álcoois como etanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e 2-feniletanol (Yalegedon *et al.*, 2021). Além disso, essas leveduras se destacam pela sua versatilidade, como capacidade de crescer em diferentes condições e substratos variados, incluindo resíduos agroindustriais. Dessa forma, o gênero *Aureobasidium* se apresenta como um grupo microbiano de interesse (Xiao *et al.*, 2024).

3.2 CULTIVO EM MEIO SINTÉTICOS E COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Com objetivo de analisar o desenvolvimento das onze linhagens isoladas nos principais açúcares encontrados em nectários florais, as leveduras foram cultivadas em meios contendo sacarose, glicose ou frutose (Ryniewicz *et al.*, 2020). Todas as cepas testadas apresentaram capacidade de se desenvolver nos três meios avaliados (Figura 1).

Figura 1. Curvas de crescimento das leveduras em meios contendo glicose (A), frutose (B) ou sacarose (C) como carboidratos disponíveis.



Fonte: autores, 2025.

Durante o cultivo, algumas linhagens analisadas produziram compostos orgânicos voláteis distintos a partir das três fontes de carbono disponíveis (Tabela 2). Para a análise das moléculas produzidas, foram considerados compostos com índice de similaridade maior que 90%. A área representa a predominância do composto encontrado em relação aos demais presentes nos meios.

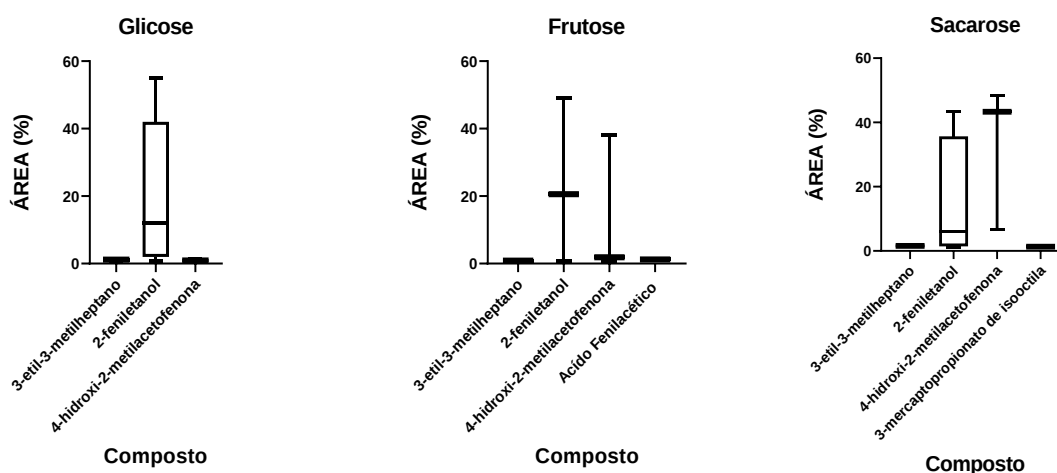
Tabela 2. Compostos produzidos pelas leveduras durante os cultivos com três açúcares diferentes.

Linhagem	Composto	Área (%)		
		Glicose	Frutose	Sacarose
CHAP - 208	-	-	-	-
CHAP - 209	3-etil-3-metilheptano	-	-	1,56
	2-feniletanol	-	-	1,44
	4-hidroxi-2-metilacetofenona	-	-	6,55
CHAP - 211	2-feniletanol	0,72	-	1,06
	4-hidroxi-2-metilacetofenona	-	-	48,48
	3-etil-3-metilheptano	0,65	-	-
CHAP - 213	2-feniletanol	-	0,65	1,49
	3-etil-3-metilheptano	-	0,85	-
	2-feniletanol	37,68	20,58	43,32
CHAP - 214	4-hidroxi-2-metilacetofenona	0,59	0,86	-
	3-etil-3-metilheptano	1,21	-	-
	Acído Fenilacético	-	1,21	-
CHAP - 215	2-feniletanol	55,02	49,02	43,32
	4-hidroxi-2-metilacetofenona	1,22	1,85	-
CHAP - 216	-	-	-	-
CHAP - 218	-	-	-	-
CHAP - 219	2-feniletanol	13,81	-	35,68
	3-mercaptopropionato de isooctila	-	-	1,31
CHAP - 220	3-etil-3-metilheptano	1,2	-	-
	2-feniletanol	10,55	38,17	20,77
CHAP - 221	2-feniletanol	2,41	-	5,99

Fonte: autores, 2025.

Neste contexto, o composto encontrado com maior predominância foi o 2-PE, com áreas de pico de até 55%, em meio contendo sacarose (Figura 2). Estudos relatam este composto como um dos principais produtos do metabolismo de leveduras, em pesquisas voltadas à modulação do perfil aromático de hidroméis com baixo teor alcoólico, o uso de leveduras selvagens resultou na detecção de 2-PE como composto dominante (Vanmullen et al., 2022). Além disso, Zou e colaboradores (2023) mencionam a produção de compostos orgânicos voláteis por leveduras com atividade antifúngica, destacando o 2-PE como um dos responsáveis pela inibição de *Botrytis cinerea* em morangos.

Figura 2. Análise quali-quantitativa dos VOCs produzidos pelas linhagens isoladas nos três meios disponíveis.



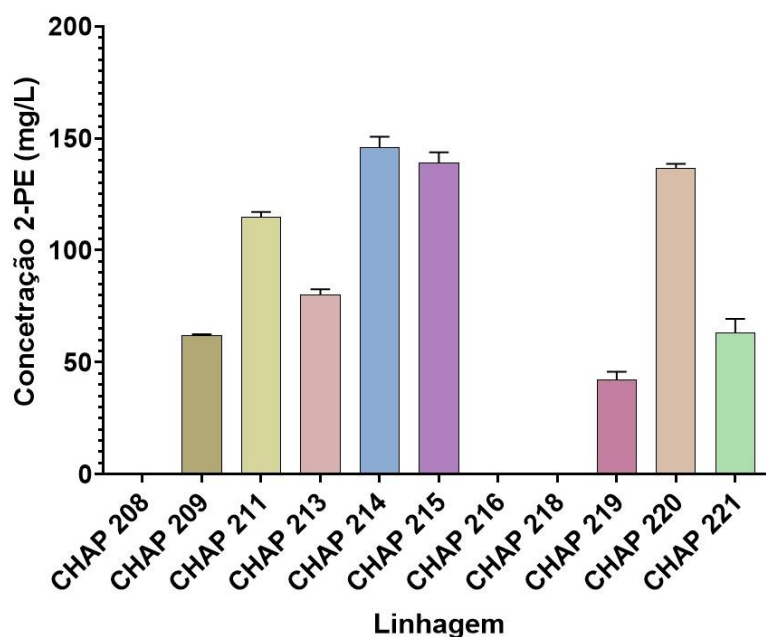
Fonte: os autores, 2025.

Além do 2-PE, foi possível identificar a 4-hidroxi-2-metilacetofenona, composto já relatado em processos fermentativos envolvendo leveduras associadas a grãos de café, é conhecida por seu perfil aromático fenólico, amplamente aplicada nas indústrias alimentícia e de aromas naturais (De Bruyn et al., 2019; De Melo Pereira et al., 2021).

3.3 TRIAGEM DE LEVEDURAS SELVAGENS

Após observar a predominância de 2-PE entre os metabólitos produzidos pelas linhagens testadas, realizou-se uma triagem para selecionar a cepa com maior capacidade de sintetizar a molécula de interesse. A Figura 3 evidencia que várias linhagens foram capazes de produzir 2-PE, contudo, as maiores produções de 2-PE ocorreram por linhagens da espécie *Aureobasidium leucospermi* (CHAP-211, CHAP-214, CHAP-215 e CHAP-220), destacando a eficiência desta espécie. Ademais, a cepa CHAP-214 *Aureobasidium leucospermi* se sobressaiu, alcançando 145,736 mg/L. Cabe salientar que a produção deste composto é uma característica intraespecífica (específica de cada cepa), ou seja, diferentes cepas de uma mesma espécie podem produzir diferentes concentrações de 2-PE (Eshkol et al., 2009). Neste contexto, até onde se tem conhecimento, não foram encontrados trabalhos que descrevam a produção desse composto por leveduras dessa espécie. Assim, o presente estudo se destaca por estar entre os primeiros a relatar essa capacidade.

Figura 3. Screening das onze linhagens testadas em meio contendo 50 g/L de sacarose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura.



Fonte: os autores, 2025.

Com isso, a cepa *A. leucospermi* CHAP-214 foi selecionada para testes subsequentes nos meios produzidos com extratos de resíduos agroindustriais.

3.4 EXTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Os extratos obtidos da casca de laranja e do bagaço de malte foram caracterizados em termos de concentração de açúcares e proteína (Tabela 3). Conforme o esperado, o extrato de casca de laranja apresentou maior teor de açúcares redutores totais ($78,754 \pm 5,354$ g/L) em relação ao extrato de bagaço de malte ($0,089 \pm 0,068$). Cabe salientar que o método colorimétrico por DNS quantifica a soma dos grupos redutores presentes na amostra, incluindo monossacarídeos e oligossacarídeos redutores (como maltodextrinas, maltotriose, oligogalacturonídeos e galactooligossacarídeos) (Miller, 1959). Em contrapartida, a análise por HPLC permite a separação cromatográfica e a quantificação individual de carboidratos que apresentam sinal na coluna utilizada, como glicose, xilose e celobiose, não detectando oligossacarídeos maiores ou polímeros (Costa; Conte-Júnior, 2015). Dessa forma, quando comparados, os valores obtidos por HPLC nos extratos foram inferiores aos determinados pelo método DNS.

Tabela 3. Composição química dos extratos de Casca de Laranja e Bagaço de Malte.

Extrato	Açúcares				Proteína (g/L)
	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	redutores totais (g/L)	
Casca de Laranja	21,549	18,025	2,523	78,754 ± 5,354	0,741 ± 0,111
Bagaço de Malte	0,000	0,000	0,000	0,089 ± 0,068	2,795 ± 0,598

Fonte: os autores, 2025.

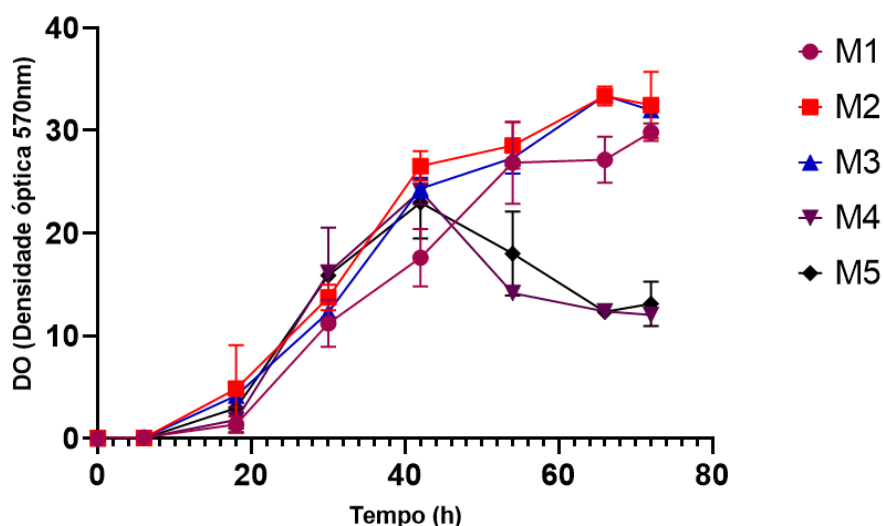
Em relação às proteínas produzidas, o extrato de bagaço de malte apresentou $2,795 \pm 0,598$ g/L, diferentemente do extrato de casca de laranja, com apenas $0,741 \pm 0,111$. Neste contexto, a junção dos extratos se mostra promissora, uma vez que juntos podem fornecer aminoácidos e fontes de carbono essenciais para o metabolismo das leveduras (Tian et al., 2020).

3.5 CULTIVO NOS EXTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Para a avaliação do desempenho da levedura *A. leucospermi* CHAP-214 em meios oriundos de resíduos agroindustriais, os extratos de casca de laranja e bagaço de malte foram misturados na proporção de 1:1 (v/v). No entanto, considerando o baixo teor de proteína em relação ao de carboidratos nos extratos, os meios de cultura foram alternadamente suplementados com fonte de nitrogênio extra (ureia ou sulfato de amônio). Além disso, alguns meios também foram suplementados com sacarose, considerando a abundância desse dissacarídeo nos nectários florais e a sua vantagem frente aos demais açúcares na produção de VOCs (vide Tabela 2). Cabe destacar que as fontes de nitrogênio, como ureia e sulfato de amônio, e a disponibilidade de carbono, como a sacarose, influenciam diretamente o equilíbrio entre metabolismo primário e secundário em leveduras, afetando o fluxo metabólico da via de Ehrlich e a formação de compostos aromáticos (Mitri et al., 2025).

O cultivo da *A. leucospermi* CHAP-214 nos meios com extratos demonstrou a capacidade dessa linhagem se desenvolver em todas as condições testadas (Figura 4). É possível observar que todas as culturas apresentaram fase lag curta, seguida por aumento da densidade óptica (fase exponencial). Os meios M4 e M5 apresentaram crescimento mais rápido até 40 h, alcançando a maior DO nesse ponto, porém com declínio subsequente. Esse fato sugere possível queda de nutrientes, uma vez que a ureia é rapidamente assimilada e a quantidade disponível pode ser consumida ainda nas fases iniciais do cultivo, levando à limitação de nitrogênio nas fases subsequentes (Courchesne; Magasanik, 1988).

Figura 4. Curvas de crescimento da linhagem *A. leucospermi* CHAP-214 nos meios testados.



Fonte: Os autores, 2025.

Legenda: M1 (extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte), M2 (extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 5 g/L de sulfato de amônio), M3 (M2 + 20 g/L de sacarose), M4 (extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 2,8 g/L de ureia) e M5 (M4 + 20 g/L de sacarose).

Em contrapartida, nos meios M1, M2 e M3, a linhagem testada manteve seu crescimento estável. Em especial, o meio M2 e M3 apresentaram uma DO ~35 após 72h. Visto isso, sugere-se que sua composição apresentou maior equilíbrio entre fontes de carbono e nitrogênio, possibilitando o desenvolvimento celular (Rodrigues-Romero et al., 2020).

Ao observar a produção de 2-PE nos meios M1 a M4 (Tabela 4), nota-se que os meios contendo ureia (M4 e M5) não apresentaram formação do composto desejado, e que a adição de sacarose também não favoreceu sua biossíntese. Já o meio suplementado apenas com sulfato de amônio (M2) promoveu maior crescimento celular, porém com redução na síntese do composto aromático quando comparado com o meio M1.

Tabela 4. Produção de 2-Feniletanol pela levedura *Aureobasidium leucospermi* nos meios M1 a M5.

Extrato	Concentração 2-PE (mg/L)
M1	2,935 ± 0,59 ^A
M2	2,690 ± 0,55 ^{AB}
M3	1,828 ± 0,39 ^B
M4	0,000 ± 0,0 ^C
M5	0,000 ± 0,0 ^C

Fonte: Os autores, 2025.

Ademais, ocorreu produção próxima de 2-PE nos meios M1 (2,935mg/L) e M2 (2,690 mg/L), fator que indica equilíbrio adequado entre carbono e nitrogênio nos dois meios testados. Visto isso, ambos foram escolhidos para testes com L-fenilalanina. A L-Phe foi adicionada como precursor direto da via de Ehrlich, com objetivo de aumentar o fluxo metabólico para formação de 2-PE pelas leveduras (Alonso-Vargas et al., 2022).

Apesar de a L-Phe ser um precursor de elevado custo, sua utilização continua sendo economicamente válida, uma vez que o 2-PE possui um valor agregado aproximadamente duas vezes superior ao da L-Phe. Essa diferença sustenta o uso do aminoácido como substrato e reforça a importância de otimizar o rendimento da conversão para maximizar a margem de lucro e manter o processo competitivo (Jorge et al., 2025).

Ao analisar a Tabela 5, observa-se que o rendimento (g/g) da bioconversão não tem relação direta com a concentração final de 2-PE produzida pela linhagem. Enquanto a concentração final (g/L) é fundamental para quantificar a produtividade volumétrica do bioprocessamento, o rendimento (g/g) reflete a eficiência da levedura na conversão do precursor (L-phe) em produto. Essa relação pode ser exemplificada ao comparar os meios E2 e E4, enquanto o meio E2 apresentou menor rendimento (0,19 g/g), porém maior concentração final de 2-PE (1,302 g/L), o meio E4 exibiu rendimento superior (0,33 g/g), porém menor concentração final do composto (0,810 g/L).

O meio E4 com menor produção final de 2-PE, continha adição de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, fato que pode ter levado a levedura a direcionar seu metabolismo para o crescimento celular. Isso ocorre porque o íon amônio (NH₄⁺), uma fonte de nitrogênio de alta assimilabilidade, induz a célula a priorizar as vias metabólicas primárias relacionadas ao crescimento, reduzindo o desvio de L-Phe para a via secundária de Ehrlich (Wang et al., 2017).

Tabela 5. Consumo de L-fenilalanina, Produção e Rendimento de 2-Feniletanol nos diferentes extratos de cultivo pela levedura *A. leucospermi* CHAP-214.

Meio	L-phe Consumida (g/L)	Concentração final 2-PE (g/L)	Rendimento (g/g)
E1	6,554 ± 0,21 ^a	1,418 ± 0,06 ^d	0,21 ± 0,01 ^g
E2	6,779 ± 0,19 ^a	1,302 ± 0,07 ^d	0,19 ± 0,01 ^g
E3	2,975 ± 0,83 ^b	2,477 ± 0,01 ^e	0,83 ± 0,02 ^h
E4	2,449 ± 0,33 ^c	0,810 ± 0,01 ^f	0,33 ± 0,00 ⁱ

Fonte: Os autores, 2025.

Legenda: E1 (extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 9 g/L de L-Fenilalanina), E2 (extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 5 g/L de sulfato de amônio + 9 g/L de L-Fenilalanina), E3 (extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 4 g/L de L-Fenilalanina), E4 (extrato de casca de laranja + extrato de bagaço de malte + 4 g/L de L-Fenilalanina + 5 g/L de sulfato de amônio).

Embora a L-Phe tenha sido amplamente consumida no meio E1 e E2, o rendimento de 2-PE permaneceu baixo. Esse comportamento indica que, apesar da elevada disponibilidade inicial do precursor, a levedura não direcionou a maior parte da L-Phe para a via de Ehrlich. Em vez disso, uma fração significativa desse aminoácido pode ter sido desviada para outras rotas metabólicas, como incorporação proteica ou formação de intermediários como fenilacetaldeído e sua posterior oxidação a ácido fenilacético por aldeído desidrogenases (Gu et al., 2020; Dai et al., 2021).

Em contraste, o meio E3 se destaca, por apresentar tanto a maior produção final de 2-PE (2,477 g/L) quanto o maior rendimento da bioconversão (0,83 g/g). O desempenho de E3 sugere que, nessas condições, a relação entre carbono, nitrogênio e precursor disponível foi mais equilibrada.

Neste contexto, vale mencionar que Kim et al. (2013) detectaram até 4,8 g/L de 2-PE em *Saccharomyces cerevisiae* com modificação genética da via de Ehrlich, apontando para competição entre oxidação (via Ald3) e redução para 2-PE. Já em *Yarrowia lipolytica*, a engenharia metabólica mostrou que melhorar a disponibilidade de cofatores e otimizar módulos da via de Ehrlich levou a rendimentos de até 0,702 g de 2-PE por g de L-Phe, destacando a importância da otimização redox e de fornecimento de precursores (Gu et al., 2020). Os resultados desses autores, portanto, corroboram o bom desempenho apresentado pela cepa *A. leucospermi* CHAP-214, especialmente considerando que, no presente caso, ainda existe a possibilidade de otimização em trabalhos futuros.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o potencial da levedura *A. leucospermi* CHAP-214 para a produção de 2-PE a partir de resíduos agroindustriais, uma vez que a linhagem foi capaz de produzir quantidades expressivas do composto em meios de extratos de casca de laranja e bagaço de malte, que foram capazes de fornecer fontes de carbono e nitrogênio necessárias para sustentar o desenvolvimento celular e a bioconversão.

Ademais, os ensaios com diferentes concentrações de L-Phe mostraram que o resultado do bioprocessamento depende do equilíbrio entre precursor, carbono e nitrogênio. Dos meios avaliados, o meio E3, com quantidade intermediária de L-Phe, apresentou a maior produção de 2-PE e melhor rendimento. Neste contexto, nota-se que concentrações moderadas do precursor favorecem o direcionamento do metabolismo para a via de Ehrlich. Por outro lado, concentrações elevadas de L-phe não resultaram em maior formação de 2-PE.

Assim, este trabalho amplia o conhecimento sobre o metabolismo aromático de *A. leucospermi* e demonstra seu potencial como produtora de 2-PE em meios formulados com resíduos agroindustriais. A linhagem mostrou-se sensível às alterações do meio e apresentou rendimentos elevados em condições otimizadas. Estudos futuros devem buscar ajustes das condições fermentativas e abordagens de engenharia metabólica para intensificar o fluxo pela via de Ehrlich.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-VARGAS, Monserrat et al. Optimization of 2-Phenylethanol Production from Sweet Whey Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus*. **Fermentation**, v. 8, n. 2, p. 39, 2022.
- BERNARDINO, Ana R. S.; TORRES, Cristiana A. V.; CRESPO, João G.; REIS, Maria A. M. Biotechnological 2-Phenylethanol Production: Recent Developments. **Molecules**, v. 29, n. 23, p. 5761, 2024. DOI: 10.3390/molecules29235761.
- CAROTA, Eleonora et al. Orange peel waste–based liquid medium for biodiesel production by oleaginous yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 10, p. 4617–4628, 2020.
- COURCHESNE, W.E.; MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 2, p. 708-713, 1988. DOI: 10.1128/jb.170.2.708-713.1988.
- COSTA, Marion P.; CONTE-JÚNIOR, Carlos Adam. Chromatographic methods for the determination of carbohydrates and organic acids in foods of animal origin. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, p. 586-600, 2015. DOI: 10.1111/1541-4337.12148.
- DAI, Jun; XIA, Huili; YANG, Chunlei; CHEN, Xiong. Sensing, uptake and catabolism of L-phenylalanine during 2-phenylethanol biosynthesis via the Ehrlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 601963, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.601963.
- DE BRUYN, F. et al. Exploring the impacts of postharvest processing on the microbiota and metabolite profiles during green coffee bean fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 302, p. 75-85, 2019.
- DE MELO PEREIRA, G. V. et al. Yeasts associated with coffee beans: Fermentation impacts, sensory contribution, and biotechnological potential. **Food Research International**, v. 140, p. 110–118, 2021.
- ESHKOL, N. et al. Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n.2, p. 534–542, 2009.
- FENNER, Eduardo Dias et al. Ethanol and 2-phenylethanol production by bee-isolated *Meyerozyma caribbica* strains. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 55, n.3, p. 359–369, 2025.

FENNER, Eduardo Dias et al. Nature's most fruitful threesome: the relationship between yeasts, insects, and angiosperms. **Journal of Fungi**, 2022.

GIEHL, Anderson; dos SANTOS, Angela A.; WERLANG, Larissa; TEIXEIRA, Elisa A. A.; LOPES, Joana C.; TREICHEL, Helen; DUARTE, Rubens T. D.; ROSA, Carlos A.; STAMBUK, Boris U.; ALVES, Sérgio L., Jr. Prospecting Araucaria-Associated Yeasts for Second-Generation Biorefineries. **Sustainability**, v. 17, n. 18, p. 8134, 2025. DOI: 10.3390/su17188134.

GLOBAL MARKET INSIGHTS INC. 2-Phenylethanol Market – By Product (Synthetic, Natural), By Application. Forecast, 2022–2028. Selbyville: Global Market Insights Inc., mar. 2022. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/2-phenylethanol-market>.

GU, Yang; MA, Jingbo; ZHU, Yonglian; XU, Peng. Refactoring Ehrlich Pathway for High-Yield 2-Phenylethanol Production in *Yarrowia lipolytica*. **ACS Synthetic Biology**, v. 9, n. 3, p. 623–633, 2020. DOI: 10.1021/acssynbio.9b00468.

GUO, Daoyi et al. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of 2-Phenylethanol and 2-Phenylethyl Acetate from Glucose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 23, p. 5886–5891, 2018.

JORGE, F. T. A.; ORYNBÉK, N.; ABDURATIOVA, A.; VALAKHANOVICH, A.; FLORES-NESTOR, H. A.; MOUSSA, M.; SAULOU-BÉRION, C.; SÁNCHEZ-CASTAÑEDA, A. K. Biotechnological production of 2-phenylethanol from agro-industrial byproducts: experimental evaluation, technoeconomic analysis, and life cycle assessment. **Biotechnology and Bioengineering**, 2025. Publicado online em: 23 jun. 2025. DOI: 10.1002/bbb.2815.

KIM, Bosu; CHO, Bo-Ram; HAHN, Ji-Sook. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 115-124, 2014. DOI: 10.1002/bit.24993.

LIMA, Jayra Maria Silva; SOUZA, Hellen Dianne Pereira de; CUNHA, José Renato Matos Sucupira. Use of orange peel (*Citrus sinensis*) in the bioabsorption of potentially toxic metals from water resources through ICP-OES. **Ciência e Natura**, v. 42, p. e16, 2020.

MARTÍNEZ-AVILA, Oscar et al. Bioprocesses for 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 23, p. 9991–10004, 2018.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MINUSSI, Gabriel do Amaral et al. Transforming orange waste with yeasts: bioprocess prospects. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, v. 59, p. e1859, 2024.

- MITRI, Sara; LOUKA, Nicolas; ROSSIGNOL, Tristan; MAROUN, Richard G.; KOUBAA, Mohamed. Sustainable 2-Phenylethanol Production: Co-Cultivation of *Yarrowia lipolytica* Strains in Mixed Agro-Industrial By-Products. **Fermentation**, v. 11, n. 11, p. 611, 2025. DOI: 10.3390/fermentation11110611.
- MITRI, Sara; KOUBAA, Mohamed; MAROUN, Richard G.; ROSSIGNOL, Tristan; NICAUD, Jean-Marc; LOUKA, Nicolas. Bioproduction of 2-Phenylethanol through Yeast Fermentation on Synthetic Media and on Agro-Industrial Waste and By-Products: A Review. **Foods**, v. 11, n. 1, p. 109, 2022. DOI: 10.3390/foods11010109.
- MUSSATTO, Solange I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 7, p. 1264–1275, 2014.
- OLIVEIRA, C. G. de; SANTOS, A. A. dos; PRITSCH, E. J. P.; BRESSAN, S. K.; GIEHL, A.; FOGOLARI, O.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H.; ALVES, S. L. Jr. Production of indole-3-acetic acid and degradation of 2,4-D by yeasts isolated from pollinating insects. **Microorganisms**, v. 13, n. 7, p. 1492, 2025. DOI: 10.3390/microorganisms13071492.
- RODRÍGUEZ-ROMERO, José de Jesús; ACEVES-LARA, César Arturo; SILVA, Cristina Ferreira; GSCHAEGLER, Anne; AMAYA-DELAGADO, Lorena; ARRIZON, Javier. 2-Phenylethanol and 2-phenylethylacetate production by nonconventional yeasts using tequila vinasses as a substrate. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00420, 2020. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00420.
- RYNIEWICZ, Justyna et al. Intraspecific Variation in Nectar Chemistry and Its Implications for Insect Visitors: The Case of the Medicinal Plant, *Polemonium Caeruleum* L. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1297, 2020.
- SANTOS, Angela Alves dos et al. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, n. 0, 2017.
- SCHMIDT, Aline Ruth et al. Applications of Brewer's Spent Grain Hemicelluloses in Biorefineries: Extraction and Value-Added Product Obtention. **Catalysts**, v. 13, n. 4, p. 755, 2023.
- SHEN, Li et al. Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 1, p. 34–39, 2016.
- TADIOTO, Viviani; MILANI, Letícia M.; BARRILLI, Evelyn T.; BAPTISTA, Cristina W.; BOHN, Letícia; DRESCH, Aline; HAKAKA, Ricardo; FOGOLARI, Odinei; MIBIELLI, Guilherme M.; BENDER, João P.; TREICHEL, Helen; STAMBUK, Boris U.; MÜLLER, Caroline; ALVES Jr., Sérgio L. Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous

- Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 35, 2022. DOI: 10.1007/s11274-021-03221-0.
- TIAN, Shufang; LIANG, Xiaolin; CHEN, Jian; ZENG, Weizhu; ZHOU, Jingwen; DU, Guocheng. Enhancement of 2-phenylethanol production by a wild-type *Wickerhamomyces anomalus* strain isolated from rice wine. **Bioresource Technology**, v. 318, p. 124257, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124257.
- TORRADO, Ana María et al. Citric acid production from orange peel wastes by solid- state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 394–409, 2011.
- VAN MULLEM, Joshua Johannes; ZHANG, Jing; DIAS, Disney Ribeiro; SCHWAN, Rosane Freitas. Using wild yeasts to modulate the aroma profile of low-alcoholic meads. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 2173–2184, 2022. DOI: 10.1007/s42770-022-00840-z.
- WANG, Zhaoyue; JIANG, Ming; GUO, Xiaolei; LIU, Zhiyuan; HE, Xiuzhen. Regulation of crucial enzymes and transcription factors on 2-phenylethanol biosynthesis via Ehrlich pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 129–139, 2017. DOI: 10.1007/s10295-016-1852-5.
- WANG, X.; SWIEGERS, J. H.; PRETORIUS, I. S. The production of sulfur-containing volatile compound by yeast and their contribution to wine aroma. South African **Journal of Enology and Viticulture**, v. 35, p. 220-232, 2014.
- XIAO, Difan; DRILLER, Marielle; DIELENTHEIS-FRENKEN, Marie; HAALA, Frederick; KOHL, Philipp; STEIN, Karla; BLANK, Lars M.; TISO, Till. Advances in *Aureobasidium* research: Paving the path to industrial utilization. **Microbial Biotechnology**, v. 17, e14535, 2024. DOI: 10.1111/1751-7915.14535.
- YALAGE DON, Sashika M.; GAMBETTA, Joanna M.; STEEL, Christopher C.; SCHMIDTKE, Leigh M. Elucidating the interaction of carbon, nitrogen, and temperature on the biosynthesis of *Aureobasidium pullulans* antifungal volatiles. **Environmental Microbiology Reports**, v. 13, n. 4, p. 482-494, 2021. DOI: 10.1111/1758-2229.12925.
- ZALAR, P.; GOSTINČAR, C.; DE HOOG, G. S.; URŠIČ, V.; SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**, v. 61, n. 1, p. 21–40, 2008. DOI: 10.3114/sim.2008.61.02.
- ZOR, Tsaffrir; SELINGER, Zvi. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. **Analytical Biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 302–308, 1996. DOI: 10.1006/abio.1996.0171.

ZOU, Xiurong; WEI, Yingying; ZHU, Jianhua; SUN, Jincai; SHAO, Xingfeng. Volatile Organic Compounds of *Scheffersomyces spartinae* W9 Have Antifungal Effect against ***Botrytis cinerea*** on Strawberry Fruit. *Foods*, v. 12, n. 19, p. 3619, 2023. DOI: 10.3390/foods12193619.

ZHANG, C.; SANDERS, J.P.M.; BRUINS, M.E. Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and Bioenergy*, v. 67, p. 466–472, 2014. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.05.020.