



LUCIANA SILVA RIBEIRO

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE
CALDO DE CANA E ABACAXI UTILIZANDO
LEVEDURAS *Saccharomyces* e NÃO-
*Saccharomyces***

LAVRAS – MG

2014

LUCIANA SILVA RIBEIRO

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE CALDO DE CANA E
ABACAXI UTILIZANDO LEVEDURAS *Saccharomyces* e NÃO-
*Saccharomyces***

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

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

Coorientador

Dr. Whasley Ferreira Duarte

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Ribeiro, Luciana Silva.

Elaboração de bebida fermentada de caldo de cana e abacaxi
utilizando leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* / Luciana
Silva Ribeiro. – Lavras : UFLA, 2014.

87 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Compostos voláteis. 2. Fermentação. 3. Cana-de-açúcar. 4.
Microorganismos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

LUCIANA SILVA RIBEIRO

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE CALDO DE CANA E
ABACAXI UTILIZANDO LEVEDURAS *Saccharomyces* e NÃO-
*Saccharomyces***

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

APROVADA em 28 de fevereiro de 2014.

Dr. Whasley Ferreira Duarte UFLA

Dr^a. Maria das Graças Cardoso UFLA

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan
Orientadora

LAVRAS – MG

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus , por estar ao meu lado a cada momento dessa incrível jornada, por me iluminar e me dar força para vencer cada um dos obstáculos.

À professora Rosane, pela sua orientação, por me receber na UFLA, pelos conhecimentos passados, pela atenção, pelo carinho e compreensão nos momentos difíceis e por confiar plenamente na minha capacidade.

Ao professor Whasley, pela sua coorientação, disponibilidade, pelas sugestões apresentadas, apoio e contribuição com sua experiência.

Ao professor Disney, por suas sugestões.

Ao Senhor Toninho, responsável por nos fornecer o caldo de cana e pelos ensinamentos sobre cachaça.

À Juliana, Daelen e William, por toda ajuda nos trabalhos realizados no laboratório.

À Cidinha, por toda amizade abnegada e pelas ajudas nas análises cromatográficas.

Aos colegas da microbiologia e do NEFER, pelo apoio nas horas difíceis e pela convivência agradável no laboratório: Verónica, Monique, Andréia, Kelly, Ana Luiza, Karla, Camila, Maria Carolina, Daniely, Noely, Mariana Dias, Suzana, Angélica e Gabriela.

À Rose, por sempre nos auxiliar com as informações do mestrado e sempre nos atender com atenção e zelo.

À minha família por todo carinho e compreensão da minha ausência nos momentos importantes.

À minha amiga Abiah, por tornar a jornada e meus dias em Lavras mais alegres, por me apoiar nas horas de dificuldade e por sua amizade verdadeira.

Ao meu companheiro e amigo Diego, pela confiança, apoio e dedicação.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

A todos os que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Deus quando te olha Ele não vê como a vida te tornou, quando Ele te olha Ele sabe exatamente quem você é, porque Ele te formou Ele te conhece desde o ventre da tua mãe. Nada do que te fazem pode alterar a tua identidade celestial.

Cristo sabia disso, por isso imagino que Ele pensava: Eu posso andar mais uma milha... eu sou o amor, nada pode mudar isso,

Eu posso orar pelos que me perseguem... Eu sou o amor, nada pode mudar isso.

Eu posso abençoar os que me amaldiçoam... Eu sou o amor, e nada pode mudar isso.” Bianca Toledo

RESUMO

Diversas leveduras são encontradas no caldo de cana de açúcar, porém a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável pelo processo fermentativo. Outras espécies comumente encontradas são não-*Saccharomyces*. No estágio final da fermentação ocorre uma redução das populações de leveduras não-*Saccharomyces*, em razão da baixa capacidade de tolerância a altas concentrações de etanol. É importante considerar a relevância dessas leveduras na produção de compostos aromáticos durante a fermentação. Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de elaborar uma bebida fermentada utilizando caldo de cana e abacaxi. A mistura caldo de cana e polpa de abacaxi foi corrigida quanto ao teor de sólidos solúveis para 16 °Brix. Foram utilizadas leveduras pertencentes à coleção de leveduras do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, sendo duas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (UFLA CA11 e UFLA FW15) e uma levedura Não-*Saccharomyces*, *Pichia caribbica* (UFLA CAF733). A fermentação foi realizada em batelada simples a 28 °C por 48 horas. Os alcoóis, carboidratos e ácidos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os compostos voláteis foram determinados por cromatografia gasosa (CG). A composição química (pH, teor de sólidos solúveis, acidez volátil, graduação alcoólica, densidade) da bebida foi determinada. Foram avaliados os parâmetros fermentativos e atividade enzimática. De acordo com o *screening* de fermentações, foi escolhida a fermentação realizada com inóculo puro da levedura *P. caribbica* UFLA CAF733 e foi realizada análise sensorial da bebida. Essa levedura produziu compostos voláteis, considerados agradáveis em bebidas fermentadas alcoólicas e mostrou alta atividade enzimática da β -glicosidase. A levedura *P. caribbica* aumentou as concentrações de compostos voláteis desejáveis, tais como 2-feniletanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, acetato de etila, butirato de etila, acetato de feniletila, dietilsuccinato e a-terpeniol. A inoculação resultou em fermentado com teor alcóolico de 9,03% (v v⁻¹).

Palavras-chave: *Pichia caribbica*. 2-feniletanol. 2-metil-1-propanol. Etil acetate. Fermentação alcoólica.

ABSTRACT

Many yeasts are found in sugarcane broth, however the *Saccharomyces cerevisiae* species is the main responsible for the fermentative process. Other commonly found species are non-*Saccharomyces*. In the final stage of fermentation occurs the reduction of the non-*Saccharomyces* yeast population, due to the low tolerance capacity for high ethanol concentrations. It is important to consider the relevance of these yeasts in the production of aromatic compounds during fermentation. This work was conducted with the objective of elaborating a fermented beverage using sugarcane and pineapple broth. The mixture of sugarcane broth and pineapple pulp was corrected regarding the content of soluble solids for 16 °Brix. Yeasts belonging to the yeast collection of the Microbiology Laboratory of the Universidade Federal de Lavras – UFLA were used, with two being *Saccharomyces cerevisiae* yeast (UFLA CA11 and UFLA FW15) and one non-*Saccharomyces*, *Pichia caribbica* (UFLA CAF733). The fermentation was performed in simple batch at 28 °C for 48 hours. The alcohols, carbohydrates and acids were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The volatile compounds were determined by gas chromatography (GC). The chemical composition (pH, content of soluble solids, volatile acidity, alcoholic graduation, density) of the beverage were determined. The fermentative parameters and enzymatic activity were evaluated. According to the fermentation screening, the fermentation performed with pure UFLA CAF733 *P. caribbica* yeast inoculum was chosen and the sensorial analysis of the beverage was conducted. This yeast produced volatile compounds, considered pleasant in alcoholic fermented beverages, and showed high β -glucosidase enzymatic activity. The *P. caribbica* yeast increased the concentrations of desirable volatile compounds, such as 2-phenylethanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, ethyl acetate, ethyl butyrate, phenylethyl acetate, diethylsuccinate and α -terpineol. The inoculation resulted in a fermented product with alcohol content of 9.03% (v v⁻¹).

Keywords: *Pichia caribbica*. 2-phenylethanol. 2-methyl-1-propanol. Ethyl acetate. Alcoholic fermentation.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Cana-de-açúcar	13
2.2	Abacaxi	14
2.3	Bebidas Fermentadas	17
2.4	Leveduras	18
2.4.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.4.2	<i>Não-Saccharomyces</i>	22
2.5	Aromas e compostos secundários produzidos pelas leveduras	24
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
	REFERÊNCIAS	29
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	40
	ARTIGO 1 Fermented beverage of sugar cane juice and pineapple using <i>Saccharomyces</i> and non-<i>saccharomyces</i>	40

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A fermentação microbiana é um processo complexo, no qual os microrganismos utilizam os açúcares do substrato, produzem etanol, CO₂ e compostos precursores de aromas que contribuem para a boa aceitação de bebidas fermentadas.

Durante muitos anos, o vinho foi obtido por meio da fermentação espontânea, ou seja, aquela originada pela ação dos microrganismos autoctones da uva de maneira natural, sem nenhum tipo de inoculação. Fermentações espontâneas geralmente são realizadas por várias espécies microbianas. Embora muitos gêneros de leveduras sejam encontrados no mosto, o gênero *Saccharomyces* e a espécie *S. cerevisiae* são os principais responsáveis pelo processo fermentativo. Outros gêneros de leveduras comumente encontrados são chamados de não-*Saccharomyces*. As leveduras não-*Saccharomyces* geralmente perdem a viabilidade nos estágios finais da fermentação, em razão da baixa tolerância a altas concentrações de etanol. As leveduras não-*Saccharomyces* possuem grande relevância na fermentação, pois destacam-se na produção de aromas. De modo geral, nos processos fermentativos alcoólicos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* produz etanol a partir de glicose e as não-*Saccharomyces* podem produzir outros metabólitos relacionados ao aroma da bebida.

O metabolismo de espécies diferentes de leveduras apresenta características únicas para o desenvolvimento dessas espécies ou estirpes em substratos para a elaboração das bebidas alcoólicas. Dentre essas características, pode-se citar: produção baixa ou nula de H₂S, alta capacidade fermentativa, tolerância a elevadas concentrações de etanol e de açúcar, capacidade de

floculação e resistência a temperaturas elevadas (BERNARDI et al., 2008; FLEET, 2003; GOMES et al., 2007; PEREIRA et al., 2010).

A cana-de-açúcar é geralmente utilizada para a produção de açúcar, álcool, cachaça, rum e para silagem na alimentação animal. Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2013), a produção mundial de cana-de-açúcar no ano de 2011 foi de 1,7 bilhões de toneladas e , no Brasil, a produção chegou a 7,3 milhões de toneladas. O caldo de cana, bebida comum em muitas cidades brasileiras, é obtido pela moagem dos colmos da cana- de- açúcar. Esse suco ou caldo da cana é altamente perecível, pela alta concentração de açúcares disponíveis, que pode atingir 22 °Brix (OLIVEIRA et al., 2007). Normalmente, o caldo de cana- de- açúcar é comercializado em misturas com sucos de frutas ácidas com intenção de melhorar sensorialmente a bebida, conferindo um sabor “refrescante” muito agradável ao paladar (PRATI; MORETTI; CARDELLO, 2005).

A fermentação do caldo de cana é tradicionalmente utilizada para produção de cachaça brasileira, quando o mosto da cana fermentado é submetido à destilação, originando, assim, uma bebida com graduação alcoólica de 38 a 48% em volume. De acordo com o Instituto Brasileiro da Cachaça - IBRAC (2012), o Brasil possui capacidade instalada de produção de cachaça de aproximadamente 1,2 bilhões de litros ao ano. Atualmente, são mais de 40 mil produtores (4 mil marcas) e as microempresas correspondem a 99% do total de produtores. Os estados brasileiros que mais se destacam na produção da cachaça são: São Paulo, Pernambuco, Ceará, Minas Gerais e Paraíba.

O abacaxi (*Ananas comosus*) apresenta excelente qualidade organoléptica, decorrente de características que são atribuídas por diversos compostos químicos. Os açúcares e ácidos presentes no suco de abacaxi são responsáveis pelo sabor e compostos voláteis que são associados ao aroma do fruto.

O Brasil produziu 2 milhões de toneladas de abacaxi, no ano de 2011 (FAO, 2013), sendo os estados da Paraíba, Pará e Minas Gerais os maiores produtores, somando 51,4% da produção brasileira.

A busca pela qualidade das bebidas exige adoção de procedimentos adequados em toda cadeia de produção. As etapas de colheita no estágio de maturação adequado, tratamento térmico do caldo ou polpa para redução da microbiota acompanhante, inoculação em condições assépticas e controle e monitoramento da temperatura em todos os ciclos fermentativos influenciarão na qualidade da bebida produzida.

A produção de uma bebida fermentada a partir de caldo de cana suplementada com mosto de abacaxi reuniria o sabor ácido do abacaxi ao aroma resultante da fermentação dos açúcares, mantendo o mosto em condições ideais para o desenvolvimento das leveduras. A produção de fermentado de cana com abacaxi poderá acrescentar maiores ganhos econômicos aos produtores, além de apresentar uma nova bebida fermentada ao mercado brasileiro. Com este trabalho, objetivou-se elaborar uma bebida fermentada a base de caldo de cana e abacaxi.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum* spp., sendo uma das mais importantes culturas agrícolas utilizadas como fonte de energia e para produção de açúcar no mundo todo. É cultivada em mais de 110 países e 50% da produção total ocorre no Brasil e na Índia (BHATIA et al., 2012; FISCHER et al., 2012; NAKAYAMA, 2012). Com a descoberta das Américas, surgiu a possibilidade de aumentar a produção de cana-de-açúcar, sendo a cultura introduzida no Brasil, em 1532, por Martin Afonso de Souza, na capitania de São Vicente. O solo fértil e o clima quente e úmido permitiram o rápido desenvolvimento da cultura, marcando o início de uma atividade que iria se transformar em grande fonte de riqueza para Portugal (MUTTON; MUTTON, 2005).

A exploração da cana-de-açúcar tem grande contribuição socioeconômica, em razão de seu elevado teor de sacarose, pois é utilizada com vários fins, dentre eles a produção de açúcar, álcool combustível, cachaça e também para a alimentação animal (variedades forrageiras). O caldo extraído dos colmos pode ser consumido in natura, bebida comum em muitas cidades brasileiras a qual é comercializada e servida imediatamente após a moagem (SILVA; FARIA, 2006; TFOUNI et al., 2009).

O Brasil apresentou em 2011 uma área total de nove milhões de hectares plantados com cana-de-açúcar (FAO, 2013). Existem duas épocas de colheita no Brasil, a primeira começa nas regiões do nordeste brasileiro onde a safra se inicia nos meses de agosto/setembro até março/abril do ano seguinte. Nos estados do centro-sul brasileiro, a safra inicia-se em maio e termina nos meses de novembro/dezembro (ANDRADE, 2013).

A caracterização do ciclo de produção para indústria é muito importante, pois irá determinar o início da colheita e até onde ela pode ser efetuada, estabelecendo, dessa forma, um período útil de industrialização, que ocorre quando a cana-de-açúcar atinge teores mínimos de açúcares suficientes para permitir a extração e transformação em produtos comerciais (AZEVEDO et al., 2003).

O caldo de cana puro, extraído e não diluído apresenta elevado teor de açúcares, que pode variar de acordo com o grau de maturação da cana, sendo impróprio para receber o inóculo (MUTTON; MUTTON, 2005). Quantitativamente, o caldo de cana é constituído basicamente por água (80%) e sólidos totais dissolvidos (20%). Dos sólidos totais destacam-se os açúcares: sacarose (17%), glicose (0,4%) e frutose (0,2%); as substâncias nitrogenadas, gorduras, ceras, pectinas, ácidos orgânicos, matérias corantes e as cinzas (OLIVEIRA et al., 2007).

2.2 Abacaxi

O abacaxi é um dos frutos subtropicais mais popular, cultivado e consumido no mundo. Os frutos são consumidos frescos, e também, largamente utilizados na indústria de alimentos para a produção de conservas de frutas, geleia, suco concentrado e na produção de vinho (PINO; QUERIS, 2010).

As duas principais cultivares de abacaxi produzidas no país são: Smooth Cayenne e Pérola, sendo que a primeira variedade é encontrada apenas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, enquanto o abacaxi Pérola é cultivado em todo o país, sendo destinado ao consumo *in natura*, por ser mais doce e menos ácido (VAILLANT; MILLAN; DORNIER, 2001). O estado de Minas Gerais é o maior produtor de abacaxi variedade Smooth Cayenne, e os estados da Paraíba e Pará são grandes produtores da variedade Pérola (ALMEIDA et al., 2004).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, no Brasil a produção está concentrada principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Norte (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2012a). A Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF do ano de 2008-2009 relatou aumento de 75% no consumo de abacaxi, quando comparado à pesquisa anterior e indicou que o brasileiro tem consumo anual per capita de 1,47 quilogramas de abacaxi (IBGE, 2012b).

O abacaxi apresenta excelente qualidade organoléptica, e sua composição química varia de acordo com a época em que é produzido. De modo geral, a produção ocorre no verão e origina frutos com maior teor de açúcares e menor acidez (GRANADA; ZAMBIAZI; MENDONÇA, 2004). O suco de abacaxi é fonte de vitaminas, fenóis, ácidos orgânicos e carboidratos, conferindo sabor e aroma característicos que lhe são atribuídos por esses constituintes químicos (ZHENG; LU, 2011), além de várias propriedades benéficas, incluindo atividade antioxidante. A oxidação enzimática, bem como a oxidação de lipídios durante o armazenamento e processamento, são as principais reações responsáveis pela deterioração na qualidade alimentar que afeta a cor, sabor, textura e valor nutritivo dos alimentos. Há um interesse considerável pela indústria e uma tendência crescente nas preferências dos consumidores em antioxidantes naturais sobre compostos sintéticos. Estudos indicam que o abacaxi pode ser uma boa fonte de compostos fenólicos antioxidantes (HOSSAIN; RAHMAN, 2011; MHATRE; TILAK-JAIN; DEVASAGAYAM, 2009).

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de frutas tropicais. Entretanto, pela alta perecibilidade das frutas, o país sofre com as perdas pós-colheita, decorrentes da abundância de colheita, da sazonalidade, da produção e da distância dos mercados consumidores, adicionados ainda à ausência de tratamentos e manuseio pós-colheita eficientes. Esses fatores dificultam o

escoamento da produção e seu consumo a tempo. Estima-se que a perda pós-colheita de frutas e hortaliças no Brasil esteja entre 30 e 40% da produção total (LOMBADI, 2003).

A colheita do fruto no estágio próprio de maturidade para a obtenção de qualidade e manutenção da pós-colheita é de grande importância (CHITARRA; CHITARRA, 2005). O abacaxi é um fruto não-climatérico, ou seja, não amadurece após a colheita, portanto sua colheita deve ser realizada após seu completo desenvolvimento fisiológico (BARTHOLOMEW; PAULL; ROHRBACH, 2002).

Um estudo identificou aproximadamente 130 compostos por HRGC-MS (Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à Espectrometria de Massas) em sucos de abacaxi, revelando a prevalência de ésteres como componentes principais. O abacaxi apresenta um amplo perfil de aroma que pode ser facilmente alterado no decurso do processamento da fruta, isto é, a partir da pós-colheita, armazenamento e até procedimentos térmicos (ELSS et al., 2005).

O abacaxi pode ser utilizado para produzir vinho de fruta por possuir um sabor frutado original e nutrientes suficientes (incluindo nitrogênio) para o crescimento das leveduras, originando caracteres aceitáveis para o vinho resultante (CHANPRASARTSUK et al., 2010). Esses autores relataram que o suco de abacaxi pode ser facilmente extraído com rendimento de 55% em peso, afirmando ser um bom rendimento. Além, disso o abacaxi pode ser empregado em conjunto com o caldo de cana, pois melhora sensorialmente a bebida e confere uma mudança na relação °Brix/acidez da bebida (PRATI; MORETTI; CARDELLO, 2005).

2.3 Bebidas Fermentadas

O vinho é definido como uma bebida alcoólica, obtida do suco de uva fermentado por leveduras (REDDY et al., 2008). Como a uva, várias outras frutas podem ser utilizadas para a formulação de mostos que podem, posteriormente, ser submetidos à fermentação alcoólica por ação de leveduras e bactérias. Entretanto, não há tecnologia totalmente voltada para a elaboração dessas bebidas no que diz respeito à levedura a ser utilizada, a temperatura ideal de fermentação e o tipo de tratamento dado ao mosto da fruta (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003).

A fermentação de muitas frutas tem sido investigada, dentre elas pode-se citar o caju (ARAÚJO et al., 2011), jabuticaba (ASQUIERI; SILVA; CÂNDIDO, 2009; DUARTE et al., 2010a), cajá (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2003), cacau (DIAS et al., 2007), cagaita (OLIVEIRA et al., 2011), framboesa (DUARTE et al., 2010b, 2010c; GONZÁLEZ et al., 2011) e manga (KUMAR; PRAKASAM; REDDY, 2009).

O caldo de cana fresco é popular em muitos países como na Malásia, México e algumas partes da América do Sul como uma bebida de baixo custo e sabor adocicado. No entanto, a comercialização do caldo de cana é limitada pela sua rápida deterioração. Muitos autores propõem métodos de conservação, como o branqueamento e utilização de ácido ascórbico (MAO; XU; QUE, 2007), radiação gama e processamento térmico (OLIVEIRA et al., 2007; SILVA; FARIA, 2006), com o intuito de aumentar a vida útil do caldo de cana. No entanto, há poucos relatos sobre o uso do caldo de cana na elaboração de bebidas fermentadas (RIBEIRO; HORII, 1999; RIVERA-ESPINOZA; VALDEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2005).

Prati, Moretti e Cardello (2005) analisaram a aceitação sensorial de bebida composta de cana-de-açúcar e suco de frutas ácidas, constatando que

melhora sensorialmente a bebida, pois confere ao produto um sabor “resfrescante” muito agradável ao paladar, já que promove uma mudança na relação °Brix/acidez. Os mesmos autores afirmaram que a obtenção de novos produtos seria uma forma de estimular o desenvolvimento de agroindústrias já existentes, bem como a implantação de outras microempresas do ramo.

A denominação “vinho” é privativa da uva, sendo vedada sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias-primas (BRASIL, 1988). No Brasil, a legislação define fermentado de cana como uma bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a 20 °C, obtida do mosto de caldo de cana-de-açúcar fermentado (BRASIL, 2008). Qualquer fruto ou vegetal comestível, que contenha umidade suficiente, açúcar e outros nutrientes para as leveduras, pode servir como matéria-prima para a produção de vinhos (ARRUDA et al., 2003).

A elaboração de uma bebida fermentada com características aceitáveis, utilizando caldo de cana como substrato, é tecnicamente viável e uma boa alternativa utilizar para essa matéria-prima (RIVERA-ESPINOZA; VALDEZ-LÓPEZ; HERNANDEZ-SANCHEZ, 2005).

2.4 Leveduras

Durante a fermentação, as leveduras presentes no mosto, metabolizam a glicose pela via Embden-Meyrhop Parnas sob condições anaeróbicas para a produção de ATP e compostos primários da fermentação como etanol e dióxido de carbono. As leveduras produzem também enzimas que estão envolvidas na fermentação para a produção de compostos secundários como alcoóis, ésteres, aldeídos e ácidos (ARAÚJO et al., 2011).

A habilidade de converter os açúcares em etanol é característica de um pequeno grupo de microrganismos, sendo *S.cerevisiae*, dentre as leveduras, a

que mais se destaca pela alta produção e tolerância a concentrações elevadas de etanol (SCHWAN; CASTRO, 2001). Dependendo das condições de crescimento, as leveduras podem ser aeróbicas quando cultivadas para produzir biomassa ou anaeróbicas facultativas quando cultivadas para produzir produtos de metabolismo. As leveduras são encontradas na superfície de frutos, partes vegetativas de plantas e em associação com insetos (NDIP et al., 2001).

Algumas leveduras são frequentemente encontradas nas fases fermentativas do vinho como *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Kluyveromyces*. No entanto, as leveduras não-*Saccharomyces* morrem gradualmente, pois possuem baixa tolerância às concentrações de etanol (FLEET, 2003).

O processo de fermentação para elaboração de bebidas depende do desempenho das leveduras em converter os açúcares em compostos como alcoóis e ésteres. As diferentes espécies de leveduras que se desenvolvem durante a fermentação determinam as características de aroma e sabor no produto final (DUARTE et al., 2009). Em aplicações industriais, a escolha da estirpe apropriada e a temperatura operacional são fatores importantes que determinam o custo de produção e qualidade do produto final (KOPSAHELIS et al., 2012).

Muitos fatores afetam a ocorrência e crescimento de leveduras durante a fermentação alcoólica. Estes incluem a população inicial e diversidade de espécies e estirpes, a inoculação do mosto com leveduras selecionadas, a composição química do mosto, incluindo os resíduos de fungicida/pesticida, condições de processamento, tais como a concentração de dióxido de enxofre e temperatura de fermentação, e as interações entre as diferentes espécies de leveduras e estirpes (FLEET, 2003).

A partir do início dos anos de 1880, com o trabalho de Emil Christian Hansen, a utilização de culturas puras de levedura para iniciar a fermentação

alcoólica passou progressivamente a dominar as práticas mundiais de fermentação. A utilização de culturas *starter* adaptadas para cada processo é agora a regra e não a exceção na fabricação de cerveja, vinificação e panificação. Vários esforços têm sido realizados para melhorar as estirpes de leveduras utilizadas na indústria de alimentos e bebidas (ALBERTIN et al., 2011).

Fermentações inoculadas com estirpes selecionadas tendem a ocorrer mais rapidamente e de maneira mais previsível que as fermentações espontâneas. As estirpes inoculadas podem suprimir o crescimento da microbiota de ocorrência espontânea, dominando, assim, o processo de fermentação (FLEET, 1999).

A seleção da levedura adequada para cada tipo de fermentação é uma estratégia importante para garantir uma fermentação completa, assim como para melhorar as características finais da bebida. Ainda que seja evidente que a qualidade da bebida esteja associada à variedade e à qualidade do mosto, as leveduras podem produzir compostos que proporcionam distinção do produto final obtido. Leveduras selecionadas têm sido utilizadas com excelentes resultados em muitos países, onde os produtos finais obtidos são de qualidade mais uniforme que os produzidos por fermentações espontâneas (DEQUIN, 2001).

2.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Uma variedade de fatores ambientais influencia a produção de metabólitos e a sobrevivência de leveduras durante as fermentações industriais (DIAS; SCHWAN; LIMA, 2007). Do ponto de vista econômico, as linhagens de leveduras do gênero *Saccharomyces* são consideradas os microrganismos mais importantes na obtenção de álcool por via fermentativa, embora em

fermentações de aguardente artesanais estejam presentes leveduras de outros gêneros, como *Candida* e *Schizosaccharomyces*, também com atividade fermentativa (OLIVEIRA et al., 2007).

As espécies do gênero *Saccharomyces* são as principais responsáveis pela fermentação alcoólica e *S. cerevisiae* é a espécie predominante durante fermentação espontânea para a produção de cachaça (BERNARDI et al., 2008). *S. cerevisiae* é um microrganismo que tem sido muito utilizado como cultura *starter* para a produção de produtos como bebidas alcoólicas e pão e, por ser não patogênico, foi então classificado como microrganismo geralmente considerado seguro (GRAS – generally recognized as safe) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2014). A consolidada tecnologia de fermentação e do processo de produção em grande escala com *S. cerevisiae* faz desse microrganismo, uma atração para vários fins biotecnológicos (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

Em seus estudos, Bernardi et al. (2008) demonstraram a diversidade genética das populações de *S. cerevisiae* em diferentes unidades produtoras de cachaça no sul de Minas Gerais. Utilizando técnicas moleculares identificaram 61 isolados leveduriformes. Os autores, porém constataram que para a produção industrial de cachaça, a utilização de leveduras selecionadas com características especiais, como baixa produção de ácido acético e elevada produção de etanol, pode conduzir a otimização do processo fermentativo.

A levedura *S. cerevisiae* produz metabólitos voláteis, tais como ésteres, compostos carbonílicos, ácidos graxos voláteis, compostos de enxofre e alcoóis superiores que derivam do metabolismo de açúcares e de aminoácidos. Diferentes cepas de *S. cerevisiae* produzem quantidades variáveis de compostos secundários, determinantes de sabor desejáveis e indesejáveis que podem afetar a qualidade final do produto (SOUZA et al., 2012).

Kumar, Prakasam e Reddy (2009), relataram que as condições de temperatura e pH têm grande impacto sobre a qualidade do aroma do vinho. Os autores afirmaram que a temperatura ótima de crescimento das leveduras *S. carlsbergensis*, *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* seria entre 25, 28–30 e 30–35 °C, respectivamente.

2.4.2 Não-*Saccharomyces*

As leveduras não-*Saccharomyces* são microrganismos que desempenham um papel importante na dinâmica de fermentação, composições e sabor de vinho. Um dos principais grupos de compostos aromáticos responsáveis pelo aroma em vinhos são os terpenos, dos quais os mais importantes compostos são os monoterpênicos, pela sua volatilidade e odor quando se apresentam de forma livre, pois alguns glicosídeos terpênicos não contribuem para o aroma, a menos que eles sejam hidrolisados. A forma glicosilada de terpenos pode ser convertida por hidrólise pela enzima β -glicosidase, produzida por leveduras durante o processo de vinificação, em compostos aromáticos (CALABRETTI et al., 2012).

Estudos feitos por Romano et al. (1999) relataram que os gêneros *Kloeckera* e *Hanseniaspora* são muito comuns em sucos de frutas e têm atraído a atenção de pesquisadores, pois apresentam papel ativo na produção de características aromáticas às bebidas por elas fermentadas. Esses autores também declararam que a levedura *Saccharomyces ludwigii* foi eficiente na produção de metabólitos secundários de fermentação, caracterizados como odor fresco e sabor frutado.

Mingorance-Cazorla et al. (2003), estudando a fermentação de frutas com diferentes leveduras não-*Saccharomyces* isoladas de frutas e cana-de-açúcar observou que *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Hanseniaspora*

uvarum produziram uma bebida de boa qualidade com teor alcoólico baixo e a levedura *P. fermentans* resultou na presença de alcoóis superiores e acetato etílico.

O gênero *Pichia* representa um grupo de microrganismos muito interessante a partir de duas perspectivas fundamentais e aplicadas. Do ponto de vista celular, provaram ter grande valor em estudos de organelas, estruturas e funções biológicas, além de muito difundida do ponto de vista biotecnológico (WALKER, 2011). Algumas espécies de *Pichia* têm sido relatadas como produtoras de enzimas invertases, boas produtoras de compostos voláteis, apresentando atividade de biocontrole contra fungos deterioradores de frutas e alimentos e alta produção de etanol, a partir de componentes lignocelulósicos (DUARTE; AMORIM; SCHWAN, 2013; GHASEMI et al., 2011; HANDE; MAHAJAN; PRABBHUNE, 2013; MELIN; SCHÜRER; HAKANSSON, 2011; SAUCEDO-LUNA et al., 2011).

Em indústrias produtoras de bebidas que utilizam substratos compostos de açúcares complexos como indústrias de tequila, uísque ou para produção de etanol de segunda geração, nas quais são utilizados substratos lignocelulósicos complexos, são muito utilizadas leveduras do gênero *Saccharomyces* sp., porém alguns resíduos de pentoses não são fermentados (SAUCEDO-LUNA et al., 2011). Uma levedura capaz de fermentar diversos tipos de açúcares poderia aumentar significativamente o rendimento em etanol e reduzir a concentração de açúcares residuais (NIGAM, 2001).

Nos últimos anos, houve uma reavaliação do papel das leveduras não-*Saccharomyces* em processos de vinificação, resultando em estudos que analisaram o uso controlado de fermentações mistas, utilizando espécies de leveduras *Saccharomyces*, juntamente com não-*Saccharomyces* (CIANI; COMITINI, 2011).

2.5 Aromas e compostos secundários produzidos pelas leveduras

Os microrganismos, durante a fermentação, produzem metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são formados ao mesmo tempo em que as células seguem a curva de crescimento celular. Os metabólitos secundários não são produzidos até que o microrganismo tenha completado toda sua fase de crescimento logarítmico e tenha iniciado a fase estacionária (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000). A temperatura de incubação é um importante fator que pode afetar não apenas crescimento e taxa de fermentação de levedura, mas também o metabolismo, o que vai determinar a composição química da bebida final (DIAS et al., 2007).

A fermentação alcoólica produz uma série de subprodutos, como compostos carbonílicos, alcoóis, ésteres e ácidos. Todos eles influenciam a qualidade do produto acabado. As concentrações e diversidade desses subprodutos podem variar amplamente (DUARTE et al., 2010a).

De acordo com Reddy, Kumar e Reddy (2009), o principal metabólito produzido pela fermentação é o etanol e sua presença é essencial para melhorar os atributos sensoriais dos componentes de vinhos. A legislação brasileira admite que o grau alcoólico de vinhos varie entre 7 e 13 °GL (BRASIL, 1988). O conteúdo de etanol pode ter impacto sobre sabor percebido, corpo e viscosidade e menor efeito sobre a doçura, acidez, aroma e propriedades de textura (GAWEL; SLUYTER; WATERS, 2007).

A produção de glicerol por leveduras é influenciada por muitos fatores de crescimento e ambientais. O aumento da temperatura pode resultar em maior produção de glicerol. Relata-se que a temperatura ótima para a máxima produção de glicerol por leveduras de vinho comercial pelas estirpes de *S. cerevisiae* varia entre 22 °C e 32 °C (KUMAR; PRAKASAM; REDDY, 2009).

Os alcoóis superiores são produtos metabólicos decorrentes do crescimento de leveduras e aproveitamento de aminoácidos como fonte de nitrogênio. A formação de alcoóis superiores depende grandemente das condições do meio de fermentação, da quantidade e viabilidade do inóculo, da temperatura, do teor alcoólico final do vinho, entre outros fatores (LÉAUTÉ, 1990). Araújo et al. (2011), analisando fermentado de caju utilizando *S. cerevisiae* observaram que os alcoóis superiores foram o grupo com maior número de componentes. Quando os alcoóis superiores estão presentes no vinho, contribuem positivamente para a caracterização e aroma da bebida, mas quando eles estão presentes em níveis maiores de 400 mg L^{-1} caracterizam a bebida com odor desagradável que pode interferir negativamente na qualidade global da bebida. Os alcoóis superiores são também importantes como precursores para a formação de ésteres, durante o envelhecimento, descritos como aromas de ‘banana’, ‘abacaxi’, ‘maça’, beneficiando sensorialmente a bebida (RAPP; KNIPSER, 1979).

Os aldeídos são compostos altamente voláteis e possuem odor penetrante, afetando o aroma das bebidas alcoólicas (NYKÄNEN; NYKÄNEN, 1991; SUOMAILANEN; LEHTONEN, 1979). Alguns compostos carbonílicos, como o diacetil e o acetaldeído desempenham um papel importante no desenvolvimento de sabores. Aldeídos que possuam um limite de detecção muito baixo, tendem a ser considerados indesejáveis (BERRY, 1995). O principal aldeído associado à fermentação alcoólica é o acetaldeído (ENGAN, 1970).

O acetaldeído é um produto do metabolismo primário da fermentação, produzido a partir de aminoácidos presentes no meio fermentativo e pela oxidação do etanol. Um alto teor de acetaldeído é responsável pelo odor oxidado do vinho de mesa e altas concentrações de etanal no vinho ou no destilado são

resultados de uma sulfitação do meio (mosto) antes da vinificação (TORRES NETO et al., 2006).

Em bebidas fermentadas de cacau, cupuaçu, gabioba, jabuticaba e umbu foram encontrados teores de acetaldeído entre 5,1 e 45,3 mg L⁻¹ (DUARTE et al., 2010a). É importante que o acetaldeído esteja presente em baixas concentrações, pois dá um aroma frutado agradável para os vinhos, porém em concentrações mais elevadas, tem um odor pungente e irritante (MIYAKE; SHIBAMOTO, 1993).

Os ésteres são derivados dos ácidos carboxílicos, onde o grupo OH é substituído por um grupo-OR e são geralmente substâncias de odores agradáveis com baixos limiares de percepção, que constituem importante fração de compostos orgânicos responsáveis pelo sabor e aroma de diversas frutas e flores (HART; SCHUETZ, 1983). Os ésteres mais comuns são o acetato de etila, laurato de etila, butanoato de etila, acetato de amila, acetato de pentila e acetato de hexila (HASHIZUME, 2001).

Os ésteres são produzidos em baixas concentrações, no entanto, pelo efeito de sinergia que ocorre entre as substâncias, acabam por provocar uma sensação olfativa agradável para o consumidor. Os ésteres de acetato são aqueles que recebem maior atenção, uma vez que eles são encontrados em maior concentração, são mais facilmente caracterizados pelos métodos de detecção disponíveis e mais facilmente excretados por células de levedura (SOUZA et al., 2012). Dos componentes ésteres nos vinhos e destilados, o acetato de etila é o que apresenta maior quantidade. Concentrações superiores a 80 mg L⁻¹ de acetato de etila diminuem a qualidade do vinho e do destilado, mas em teores entre 50 e 80 mg L⁻¹ favorecem o aroma agradável do vinho (TORRES NETO et al., 2006).

Reddy e Reddy (2005), em estudo com fermentado de manga, observaram que a concentração de ésteres ficou entre 10 e 30 mg L⁻¹.

Verificando que a formação de ésteres foi fortemente influenciada pelo pH e temperatura, sendo relativamente regida pela estirpe de levedura e condições de fermentação.

Os ácidos orgânicos são caracterizados pela presença em sua estrutura do grupo carboxila (-COOH). Os ácidos orgânicos são considerados ácidos fracos, nos quais o grupo carboxila libera prótons suficientes em água, justificando as propriedades ácidas desses compostos (ALLINGER, 1978).

Os principais ácidos presentes no vinho são tartárico, málico e cítrico, provenientes da uva, e os ácidos láctico, succínico e acético, provenientes da fermentação (GUERRA, BARNABÉ, 2005). Os ácidos orgânicos são compostos de grande importância, pois influenciam as qualidades organolépticas, e também estão relacionados com o controle da estabilidade microbiológica das bebidas (MATO; SUAREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2005).

As técnicas analíticas mais frequentemente utilizadas para determinar perfis aromáticos de frutas e bebidas são técnicas cromatográficas, em particular, cromatografia em fase gasosa (GC). Técnicas quimiométricas, juntamente com os dados do GC têm sido investigada como um meio de diferenciação de compostos voláteis entre um grande número de amostras (MONTERO-PRADO; BENTAYEB; NERÍN, 2013).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de cana de açúcar e polpa de abacaxi constitui uma alternativa viável para a produção de bebida alcóolica fermentada. As fermentações com inóculos mistos, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* apresentam um alto desempenho fermentativo ao consumirem rapidamente os açúcares presentes no mosto e finalizaram o processo com maior rapidez e as leveduras não-*Saccharomyces* apresentam bons resultados na produção de compostos voláteis. Portanto, a utilização em conjunto dessas leveduras constitui uma possibilidade para a produção de bebidas fermentadas de boa qualidade sensorial.

Estudos mais aprofundados sobre a metabolômica dessas leveduras deverão ser realizados, a fim de entender melhor o papel das leveduras não-*Saccharomyces* em fermentações e seu comportamento em diferentes concentrações de substratos como o caldo de cana e a polpa de abacaxi.

REFERÊNCIAS

- ALBERTIN, W. et al. Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 8, p. 2772-2784, Apr. 2011.
- ALLINGER, N. L. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978. 984 p.
- ALMEIDA, C. O. et al. Peso médio do abacaxi no Brasil: um tema em discussão. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 6, n. 3, p. 41-46, nov. 2004.
- ANDRADE, L. A. B. Cultura de cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. G. (Ed.). **Produção de aguardente**. Lavras: UFLA, 2013. p. 19-50.
- ARAÚJO, S. M. et al. Biotechnological process for obtaining new fermented products from cashew apple fruit by *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 1161-1169, Nov. 2011.
- ARRUDA, A. R. et al. Processamento de bebida fermentada de banana. **Revista Ciência e Agrônômica**, Fortaleza, v. 34, n. 2, p. 161-167, 2003.
- ASQUIERI, E. R.; SILVA, A. G. M.; CÂNDIDO, M. A. Aguardente de jaboticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jaboticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 896-904, dez. 2009.
- AZEVÊDO, J. A. G. et al. Composição químico-bromatológica, fracionamento de carboidratos e cinética da degradação *in vitro* da fibra de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 32, n. 6, p. 1443-1453, 2003.

BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. **The pineapple: botany, production and uses**. Honolulu: University of Hawaii at Manoa. Wallingford: CABI, 2002. 400 p.

BERNARDI, T. L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with the production of *cachaça*: identification and characterization by traditional and molecular methods (PCR, PFGE and mtDNA-RFLP). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 2705-2712, Nov. 2008.

BERRY, D. R. Alcoholic beverage fermentations. In: LEA, A. G. H.; PIGGOTT, J. R. (Ed.). **Fermented beverage production**. London: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 32-44.

BHATIA, S. et al. Partial purification and characterization of acid invertase from the fresh and stale sugarcane juice. **Sugar Tech**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 148-155, Apr./June 2012.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 08 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação, comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 8 nov. 1988. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=189>>. Acesso em: 23 ago. 2012.

BRASIL. Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008. Submete à consulta pública os Regulamentos Técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para fermentado de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/551657/dou-secao-1-24-04-2008-pg-9>>. Acesso em: 23 ago. 2012.

CALABRETTI, A. et al. Characterization of volatile fraction of typical Irpinian wines fermented with a new starter yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 1433-1442, Apr. 2012.

CHANPRASARTSUK, O. O. et al. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 19, p. 7500-7509, Oct. 2010.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 783 p.

CIANI, M.; COMITINI, F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 25-32, Mar. 2011.

DEQUIN, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 5/6, p. 577-588, 2001.

DIAS, D. R. et al. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Teobroma cacao* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 319-329, Mar. 2007.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, set./dez. 2003.

DUARTE, W. F.; AMORIM, J. C.; SCHWAN, R. F. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 175-194, Jan. 2013.

DUARTE, W. F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, jaboticaba and umbu. **LWT Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, Dec. 2010a.

DUARTE, W. F. et al. Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 173-182, Oct. 2010b.

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabiroba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

DUARTE, W. F. et al. Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 9, p. 2303-2314, Nov. 2010c.

ELSS, S. et al. Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananascomosus* L.) and pineapple products. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 38, n. 3, p. 263-274, May 2005.

ENGAN, S. The influence of some aminoacids on the formation of higher aliphatic alcohol and esters. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 76, p. 254-256, 1970.

FISCHER, D. et al. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 356, n. 1/2, p. 83-99, 2012.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 101-117, Sept. 1999.

FLEET, G. H. Yeast interaction and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1/2, p. 11-22, Sept. 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em:
<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>.
Acesso em: 19 fev. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Microorganisms e microbial:** derived ingredients used in food. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 12 fev. 2014.

GAWEL, R.; SLUYTER, S. van; WATERS, E. J. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 13, n. 1, p. 38-45, Mar. 2007.

GHASEMI, Y. et al. Experimental design of medium optimization for invertase production by *Pichia* sp. **Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 267-275, Feb. 2011.

GOMES, F. C. O. et al. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 6, p. 2438-2447, Dec. 2007.

GONZÁLEZ, E. A. et al. Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus ideaus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo*, L.) and characterization of their distillates. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 5, p. 1419-1426, 2011.

GRANADA, G. G.; ZAMBIAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 405-422, 2004.

GUERRA, C. C.; BARNABÉ, D. Vinho. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: E. Blücher, 2005. p. 423-451.

HANDE, A.; MAHAJAN, S.; PRABBHUNE, A. Evaluation of ethanol production by a new isolate of yeast during fermentation in synthetic medium and sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 63, n. 1, p. 63-70, 2013.

HART, H.; SCHUETZ, R. D. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: Campus, 1983. 244 p.

HASHIZUME, T. Tecnologia do vinho. In: AQUARONE, E. et al. (Ed.). **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de Alimentos**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 4, p. 21-68.

HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, S. M. M. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 3, p. 672-676, Apr. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA. **Mercado interno**. Disponível em:
<http://www.ibraccachaças.org/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=47>. Acesso em: 20 set. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 18 ago. 2012a.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares: aquisição domiciliar per capita: Brasil e grandes regiões**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 18 ago. 2012b.

KOPSAHELIS, N. et al. Volatiles formation from grape must fermentation using a cryophilic and thermotolerant yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 167, n. 5, p. 1183-1198, 2012.

KUMAR, Y. S.; PRAKASAM, R. S.; REDDY, O. V. S. Optimisation of fermentation conditions for mango (*Mangifera indica* L.) wine production by employing response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 11, p. 2320-2327, Nov. 2009.

LÉAUTÉ, R. Distillation in alembic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 41, n. 1, p. 90-103, 1990.

LOMBADI, R. Brasil aprimora produção de frutas cítricas. **Frutas e Legumes: Ciclo de Produção**, Lisboa, n. 118, p. 8-14, 2003.

MAO, L. C.; XU, Y. Q.; QUE, F. Maintaining the quality of sugarcane juice with blanching and ascorbic acid. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 2, p. 740-745, 2007.

MATO, I.; SUAREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, Barking, v. 38, n. 10, p. 1175-1188, 2005.

MELIN, P.; SCHÜRER, J.; HAKANSSON, S. Formulation and stabilisation of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 107-112, Jan. 2011.

MHATRE, M.; TILAK-JAIN, J.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Evaluation of the antioxidant activity of non-transformed and transformed pineapple: a comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 11, p. 2696-2702, Nov. 2009.

MINGORANCE-CAZORLA, L. et al. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 297-304, Apr. 2003.

MIYAKE, T.; SHIBAMOTO, T. Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 11, p. 1968-1970, 1993.

MONTERO-PRADO, P.; BENTAYEB, K.; NERÍN, C. Pattern recognition of peach cultivars (*Prunus persica* L.) from their volatile components. **Food Chemistry**, London, v. 138, p. 724-731, 2013.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Aguardente. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: E. Blücher, 2005. p. 485-523.

NAKAYAMA, S. Inter-MITE polymorphisms of a newly identified MITE show relationships among sugarcane (*Saccharum*) species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 7, p. 1389-1396, Oct. 2012.

NDIP, R. N. et al. Characterization of yeast strains for wine production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 95, n. 3, p. 209-220, Sept. 2001.

NIGAM, J. N. Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 26, n. 3, p. 145-150, Mar. 2001.

NYKÄNEN, L.; NYKÄNEN, I. Distilled beverages. In: MAARSE, H. (Ed.). **Volatile compounds in food and beverages**. New York: M. Dekker, 1991. p. 548-580.

OLIVEIRA, A. C. G. et al. Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 863-873, 2007.

OLIVEIRA, M. E. S. et al. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilized yeast cell fermentation. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, Aug. 2011.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.

PEREIRA, F. B. et al. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 11, p. 1655-1661, Nov. 2010.

PINO, J. A.; QUERIS, O. Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques. **Food Chemistry**, London, v. 122, n. 4, p. 1241-1246, Oct. 2010.

PRATI, P.; MORETTI, R. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e suco de frutas ácidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 147-152, 2005.

RAPP, A.; KNIPSER, W. 3,7-Dimethyl-okta-1, 5-dien-3, 7-diol Eine neue terpenoide verbindung des trauben-und wein aromas. **Vitis**, Siebeldingen, v. 18, p. 229-233, 1979.

REDDY, L. V. A. et al. Wine production by novel yeast biocatalyst prepared by immobilization on watermelon (*Citrullus vulgaris*) rind pieces and characterization of volatile compounds. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 7, p. 748-752, July 2008.

REDDY, L. V. A.; KUMAR, Y. S.; REDDY, O. V. Analysis of volatile aroma constituents of wine produced from Indian mango (*Mangifera indica* L.) by GC-MS. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 50, n. 2, p. 183-191, June 2010.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Production and characterization of wine from mango fruit (*Mangifera indica* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 8/9, p. 1345-1350, Dec. 2005.

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

RIVERA-ESPINOZA, Y.; VALDEZ-LÓPEZ, E.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. Characterization of a wine-like beverage obtained from sugarcane juice. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 44-452, June 2005.

ROMANO, P. et al. Biotechnological suitability of *Saccharomyces ludwigii* for fermented beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 451-454, Aug. 1999.

SAUCEDO-LUNA, J. et al. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 38, n. 6, p. 725-732, 2011.

SCHWAN, R. F.; CASTRO, H. A. **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, 2001. 126 p.

SILVA, K. S.; FARIA, J. A. F. Avaliação da qualidade de caldo de cana envasado a quente e por sistema asséptico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 754-758, 2006.

SOUZA, A. P. G. et al. Strategies to select yeast starters cultures for production of flavor compounds in *cachaça* fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 379-392, Feb. 2012.

SUOMAILANEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 85, p. 149-156, 1979.

TFOUNI, S. A. V. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice. **Food Chemistry**, London, v. 116, n. 1, p. 391-394, Sept. 2009.

TORRES NETO, A. B. et al. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 489-492, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 894 p.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; DORNIER, M. Strategy for economical optimization of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 48, n. 1, p. 83-90, Apr. 2001.

WALKER, G. M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 25-34, Jan. 2011.

ZHENG, H.; LU, H. Use of kinetic, Weibull and PLSR models to predict the retention of ascorbic acid, total phenols and antioxidant activity during storage of pasteurized pineapple juice. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 44, n. 5, p. 1273-1281, June 2011.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1 Fermented beverage of sugar cane juice and pineapple using
Saccharomyces and Non-*saccharomyces*

**Artigo preparado de acordo com as normas para submissão do periódico
International Journal of Food Science & Technology.**

Abstract

Saccharomyces cerevisiae (strains UFLA CA11 and UFLA FW15) and *Pichia caribbica* (UFLA CAF733) were evaluated for their potential to produce a sugar cane juice and pineapple fermented beverage. The yeasts were evaluated in co- and pure culture in different proportions of sugar cane juice and pineapple (80:20, 70:30, 60:40). The sugar concentration of the must was adjusted to 16° Brix and was inoculated with approximately $7 \log \text{CFU mL}^{-1}$ and the fermentation was performed at 28 °C until soluble solids stabilization. After the preliminary test and based on the higher activity of β -glucosidase, higher concentrations of desirable volatile components, less amount of residual sugars, low production of acetic acid, high production of ethanol and kinetic parameters, one yeast strain was chosen to perform a large scale experiment. The fermentation performed with *P. caribbica* in proportions of sugar cane juice and pineapple of 60:40 showed higher values of Y_p/s , 0.45 g g^{-1} , Q_p , $1.32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, and E_f , 88.22%. Maximum ethanol concentration (79.78 g L^{-1}) was achieved after 72 h of fermentation. *P. caribbica* increased concentrations of desirable volatile compounds, such as 2-phenylethanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, ethyl acetate, phenylethyl acetate, diethylsuccinate and α -terpineol. The sensory analysis revealed a beverage with good acceptance by the tasters.

Keywords: *Pichia caribbica*; 2-phenylethanol, 2-methyl-1-propanol; ethyl acetate; alcoholic fermentation

1 Introduction

Wine manufacture is challenging in the sense of obtaining a marketable product, but the processes involved in its production are relatively straightforward. Grapes have been used as the main raw material in the production of wine. However, a number of researchers found other suitable

fruits for fruit wine production (KUMAR; PRAKASAM; REDDY, 2009). All over the world, different raw materials are used for the production of alcoholic beverages traditionally (KUMAR, MISHRA, 2012).

Fermentation of apples (XU, FAN, QIAN, 2007; BRAGA et al., 2013), pineapples (CHANPRASARTSUK et al., 2010; THEPKAEW; CHOMSRI 2013; CHANPRASARTSUK et al., 2013), sugarcane (RIVERA-ESPINOZA; VALDEZ-LÓPEZ; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2005), strawberry (SANTO et al., 2012) and raspberry (GONZÁLEZ et al., 2011; DUARTE et al., 2010) have been successfully studied and even commercialized in many countries. Pineapples have already been used for a successful production of wines (EZERONYE, 2004). Pineapple can be used to produce fruit wine since it contains a unique fruity flavor and has sufficient nutrients (including nitrogen) for yeast growth and fermentation, giving acceptable wine characters to the resultant (typically dry) white wine (CHANPRASARTSUK et al., 2010)

Most fruits used for processing of wine introduces low sugar and high acidity at the peak of maturity, therefore should be corrected with sugar and/or water to give a product containing the ethanol content desired (ARRUDA et al., 2003).

The sugar cane is a plant belonging to the family *Poaceae* and the genus *Saccharum* spp., one of the most important agricultural crops used for energy and sugar production worldwide. It is grown in more than 110 countries and 50% of total production occurs in Brazil and India. (NAKAYAMA, 2012; BHATIA et al., 2012; FISCHER et al, 2012.). In many Brazilian States sugarcane juice is consumed jointly with acid fruit juices, like lemon, pineapple and passion fruit improving the flavor and giving a sensation of refreshing taste of the beverage.

Several studies have evaluated the involvement of non-*Saccharomyces* yeasts in alcoholic fermentation especially regarding to their metabolic and

aroma impact (DOMIZIO et al., 2007; LEE et al., 2010a; LEE et al., 2012). Use of non-*Saccharomyces* yeasts together with *S. cerevisiae* may improve wine quality and diversify wine flavor (ANDORRA et al., 2010).

The aim of this work was to elaborate a novel alcoholic beverage using a mixture of pineapple and sugar cane inoculated with *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts.

2 Material and methods

2.1 Raw materials

The sugar cane juice (*Saccharum* spp.) was provided by Alambique Bocaina, located in Southern area of the state of Minas Gerais, Brazil. The sugar cane was harvested and crushed immediately, and the juice was filtered to remove possible solids. The pineapples (*Ananas comosus*) were purchased in local market of Lavras, MG, standardized in size and skin color. The pineapples were washed, manually peeled, sliced, shredded in a blender and filtered to remove excess fragments.

Humidity, ash, protein, lipids, fiber content, total titratable acidity, pH and soluble solids were determined according to INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2005). The total sugars and citric acid were determined by high performance liquid chromatography according Duarte, Amorim and Schwan (2013).

2.2 Must preparation

The methodology proposed by Dias et al. (2003; 2007) was used for preparation of the must. The resulting must from mixing sugar cane juice and pineapple pulp was diluted for the total soluble solids to 16 °Brix with the addition of distilled water. The must was sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 minutes. Bentonite was added in the must at a concentration of 1 g L⁻¹. The

different proportions of sugar cane juice and pineapple pulp used in the must and the code for each treatment are showed in Table 1.

Table 1. Combinations of inoculum and pulp proportion of pineapple and sugar cane juice, with a value of soluble solids of 16 °Brix.

Species and code yeast	Sugar cane juice (%)	Pineapple pulp (%)	Code treatment
<i>P. caribbica</i> UFLA CAF733 + <i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11	80	20	PCSC8:2
<i>P. caribbica</i> UFLA CAF733 + <i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11	70	30	PCSC7:3
<i>P. caribbica</i> UFLA CAF733 + <i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11	60	40	PCSC6:4
<i>P. caribbica</i> UFLA CAF733 + <i>S. cerevisiae</i> UFLA FW15	80	20	PCSC*8:2
<i>P. caribbica</i> UFLA CAF733 + <i>S. cerevisiae</i> UFLA FW15	70	30	PCSC*7:3
<i>P. caribbica</i> UFLA CAF733 + <i>S. cerevisiae</i> UFLA FW15	60	40	PCSC*6:4
<i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11	80	20	SC8:2
<i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11	70	30	SC7:2
<i>S. cerevisiae</i> UFLA CA11	60	40	SC6:4
<i>S. cerevisiae</i> UFLA FW15	80	20	SC*8:2
<i>S. cerevisiae</i> UFLA FW15	70	30	SC*7:3
<i>S. cerevisiae</i> UFLA FW15	60	40	SC*6:4
<i>P. caribbica</i> UFLA CAF733	80	20	PC8:2
<i>P. caribbica</i> UFLA CAF733	70	30	PC7:3
<i>P. caribbica</i> UFLA CAF733	60	40	PC6:4

SC* represents the inoculation with *S. cerevisiae* UFLA FW15.

2.3 Yeasts strains and inoculum preparation

Three strains (two *Saccharomyces cerevisiae*, UFLA CA11 and UFLA FW15, and one *Pichia caribbica* UFLA CAF733), previously selected due to their properties to ferment fruit pulp and sugar cane juice (DUARTE; AMORIM; SCHWAN, 2013; DUARTE et al., 2010) were tested (Table 1). These yeasts belong to the collection of Microbial Physiology Laboratory/Department of Biology from University of Lavras (UFLA). Inocula were prepared according to Duarte et al. (2010) using *S. cerevisiae* and *P. caribbica* alone or mixed (Table 1).

The medium was renewed until the population reaches 10^8 cel.mL⁻¹ and 10^7 cel.mL⁻¹ of *S. cerevisiae* and *P. caribbica*, respectively. The same population was adopted for pure inoculum. Cells were separated by centrifugation (RCF = 4053, 20 °C, 10 min) and washed twice with sterile peptone water 0.1% (DUARTE et al., 2010). The pellet obtained was inoculated in the must containing sugar cane juice and pineapple pulp (Table 1).

2.4 Fermentation conditions

In the first step (as shown in Table 1) the fermentations were conducted in 250 mL flasks and the step of scaling up (best condition observed after experiments showed in Table 1) were conducted in 5 L vats and maintained at 28 °C. Samples were collected every 12 hours to evaluate the fermentation process by measuring total soluble solids, sugars, ethanol and viable cells. The end of fermentation was considered after soluble solids (°Brix) stabilization. After fermentation, the flasks were kept at 10 °C for sedimentation of solid material. After 10 days, the beverage was vacuum filtered. The fermented beverage was stored in glass bottles of 750 mL at 10 °C. All tests were performed in duplicate.

2.5 Microbiological analysis

The total population of yeasts was determined by plate count using YPD agar (10 g L⁻¹ yeast extract; 20 g L⁻¹ soy peptone; 20 g L⁻¹ glucose; 16 g L⁻¹ agar) and incubated at 28 °C for 48 hours. Lysine Agar supplemented with 50% potassium lactate and acidified with 10% lactic acid was used to count of non-*Saccharomyces* yeasts, incubated at 28 °C for 48 hours (FOWELL, 1965; HEARD; FLEET, 1986). *S. cerevisiae* population was determined by difference from the count of total yeasts and non-*Saccharomyces* yeasts.

2.6 Chromatographic analysis

Alcohols (ethanol, glycerol), organic acids (acetic acid, malic, succinic, tartaric, citric) and carbohydrates (glucose, sucrose and fructose) were identified and quantified by HPLC (Duarte, Amorim and Schwan, 2013). All analyses were performed using a Shimadzu chromatograph (Shimadzu Corp., Japan), equipped with a dual detection system consisting of a UV detector (SPD-10Ai) and a refractive index detector (RID-10A). All samples were examined in duplicate.

Volatile compounds were analyzed by gas chromatography. Major volatile compounds were analyzed directly after the filtration (0.22- μ m pores) of samples without any other prior treatments. The minor volatile compounds were determined after extraction with dichloromethane as described by Duarte et al. (2010). This analysis was performed using a gas chromatography Shimadzu (model 17A), equipped with a flame ionization detector (FID) operated under conditions described by Duarte et al. 2011. All samples were examined in duplicate.

2.7 Evaluation of fermentation parameters

The fermentation kinetics calculations were carried out according to Duarte et al. (2011). The yield in ethanol ($Y_{p/s}$) production was calculated as grams of ethanol per gram of total consumed sugars ($\text{g}_p \cdot \text{g}_s^{-1}$). The fermentation efficiency (E_f) was calculated by the ratio of process yield and theoretical yield. The ethanol productivity (Q_p) was calculated as the ratio of the concentration of the end product and the total fermentation time, measured in grams of ethanol per liter of fermented broth per hour ($\text{g}_p \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

$$Y_{p/s} = (P - P_0) / (S_0 - S)$$

$$E_f = \frac{Y_{p/s}}{0,511} \times 100$$

$$Q_p = P / t_f$$

In these equations, P is the final concentration of ethanol e P_0 is the initial concentration of ethanol, S is substrate concentration at the end of the fermentation, S_0 is the initial substrate concentration, t_f is the total time of fermentation and 0,511 is the theoretical value of the efficient consumer of sugars in ethanol.

2.8 Enzymatic quantification of β -glucosidase

The enzymatic quantification of β -glucosidase was performed by measuring *p*-nitrophenol (*p*NP) remaining artificial substrate, *p*-nitrophenol- β -D- glucopyranoside (*p*NPG). The enzyme solution (0.1 mL supernatant) was mixed with 0.2 ml of the solution *p*NPG (2 mM) phosphate citrate buffer pH 5.0. The mixture is incubated at 30 °C for 30 minutes and the enzymatic reaction was stopped by adding 2.0 mL of Na_2CO_3 (0.25 M). The remaining *p*NP was measured in a spectrophotometer at 405 nm, and the measured enzymatic activity was expressed as nanomoles of *p*NP per milliliter per hour under test conditions through from a standard curve (SWANGKEAW et al., 2011).

2.9 Chemical analysis of fermented beverage

The pH, total soluble solids, volatile acidity, alcoholic contents and density were determined according to the methodology proposed by Brazil (2005).

2.10 Screening of the yeasts strains

After the preliminary test and based on the best conditions of the fermentation performance (higher activity of β -glucosidase, higher concentrations of desirable volatile components, low production of acetic acid and high production of ethanol) one yeast strain was chosen to scale up, therefore a new experiment was conducted.

2.11 Fermentation in 5 liters batches

The best fermentative yeast strain was used to perform a fermentation in a 5 L (4 replicates) of must under the same conditions mentioned above. At the initial and final time of fermentation, samples were taken to determine cell population, sugars, alcohols, acids and volatile compounds.

2.12 Sensory Analysis

Sensory acceptability of beverage was held at the Federal University of Lavras (UFLA) with 52 non-trained panellists, males and females, older than 18 years (staff and students).

Refrigerated samples (10 °C) of 20-25 mL, were served in a single session of monadic form in transparent disposable cups. Tasters evaluated the beverage, using a nine-point hedonic scale (STONE; SIDEL, 1993), indicating how much they liked or disliked the fermented beverage sugar cane juice and pineapple for attributes overall impression, flavor, color, taste and viscosity.

2.13 Statistical analysis

The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Scott-Knott test for comparison between means, adopting a significance level of 5% probability. The software SISVAR 5.1 (FERREIRA, 2010) was used was used.

3 Results and discussion

3.1 Physico-chemical characterization of raw material

The sugar cane juice and the pineapple pulp used were characterized prior mixing and the results are showed in table 2.

Table 2. Physico-chemical characterization of pineapple pulp and sugar cane juice

Characteristics	Pineapple pulp	Sugar cane juice
Total soluble solids (°Brix)	10.93 ± 1.12	19.54 ± 2.21
Total titrable acid (%)	13.26 ± 0.36	0.92 ± 0.29
pH	3.63 ± 0.05	5.73 ± 0.03
Proteins	4.90 ± 0.12	7.43 ± 0.18
Lipids	nd	0.15 ± 0.00
Dry matter (%)	8.95 ± 0.16	17.79 ± 0.39
Ash (%)	0.36 ± 0.01	nd
Fiber (%)	0.25 ± 0.07	nd
Moisture (%)	91.06 ± 0.16	82.22 ± 0.39
Glucose (g/L)	4.14 ± 0.17	2.70 ± 0.23
Fructose (g/L)	12.32 ± 0.52	5.07 ± 0.05
Sucrose (g/L)	59.44 ± 2.49	178.75 ± 4.48
Citric acid (g/L)	3.67 ± 0.15	0.001 ± 0.00

Data are presented as mean ± standard deviation.
nd, not detected.

The alcohol content of fruit wine depends directly on the sugar content of the fruit, with a poor must in sugar resulting wines with low alcohol content (SANTOS et al., 2005). The high influence of factors such as cultivar, ripeness, climate and fruit portion may explain the discrepancy found by different researchers for certain components of the fruit (GRANADA; ZAMBIANZI; MENDONÇA, 2004; PINHEIRO et al., 2006; FALLAHI; MOHAN, 2000). The results of pH, total soluble solids, lipids, ash, proteins and carbohydrates in pineapple pulp and sugar cane juice were similar to those described in the literature (PRATI; MORETTI; CARDELLO, 2005; CÂMARA; DÍEZ; TORIJA, 1995).

The sugar cane juice used for the production of the fermented beverage had higher total soluble solids (19.54 °Brix) and also higher pH value (5.73) than pineapple. Rivera-Espinoza et al. (2005) testing *S. cerevisiae* and *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* for ability to ferment sugar cane (*Saccharum officinarum*) juice reported similar results for pH (5.1), Brix (19.7), total sugars (200 g L⁻¹), and nitrogen (2.3%).

3.2 Monitoring of yeast populations during fermentations

Fermentations with mixed inoculum PCSC and PCSC* took 28 h and 52 h of fermentation, respectively. Fermentations with pure inoculum of *S. cerevisiae* SC (UFLA CA11) and SC* (UFLA FW15) also showed different fermentation times (average 36 h and 54 h, respectively). This variation was due to the fermentative ability of *S. cerevisiae* strains. The yeast *S. cerevisiae* UFLA CA11 is marketed in Brazil as starter culture for the production of cachaça. Previous works (DUARTE et al., 2009; CAMPOS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; DUARTE, AMORIM, SCHWAN, 2013) showed the efficiency of UFLA CA11 in ethanol production and productivity was relative higher than other strains of *S. cerevisiae*. Fermentation conducted with the yeast *P. caribbica* showed the highest fermentation time (68 h).

The fermentations conducted with mixed inoculum showed similar viable counts of yeasts *Saccharomyces* in the early steps of the fermentative process. The mixed inoculum with UFLA CA11 showed a count $8.30 \log \text{CFU mL}^{-1}$ and the mixed inoculum with UFLA FW15 showed a count of $8.39 \log \text{CFU mL}^{-1}$ for *S. cerevisiae*. Yeast count increased during the fermentation but at the end, there was a slight decrease for SC*, $7.91 \log \text{CFU mL}^{-1}$, and an increase for SC, $8.8 \log \text{CFU mL}^{-1}$. The results found in LA medium for non-*Saccharomyces* yeasts were similar during fermentations. In the fermentations PCSC and PCSC* the population of the yeast *P. caribbica* kept in $\log 7 \text{CFU mL}^{-1}$. Duarte et al. (2013) reported that some non-*Saccharomyces* yeasts, including *Pichia caribbica*, were able to survive during fermentations with high levels of ethanol (12%), which is an essential feature for the production of alcoholic beverages. These data suggested that *P. caribbica* managed to stay during the fermentation process, even in the presence of ethanol and the competition for nutrients and other limiting factors did not affect their ability to survive.

In fermentations conducted with pure inoculum of P1 and P2 it was observed a reduction in the populations at the end of fermentations (average of 7 counts $\log \text{CFU mL}^{-1}$). Fermentations of fruits like gabirola and sugar cane juice using the yeast UFLA CA11 as starter culture showed a stable viable populations around 8.5 and 9 $\log \text{CFU mL}^{-1}$ in co-culture, whereas in pure culture it was $8.81 \log \text{CFU mL}^{-1}$ (DUARTE et al., 2009; DUARTE, AMORIM, SCHWAN, 2013).

Using only the yeast *P. caribbica* as starter culture there was a slight decrease at the end of fermentation and the average was 6 $\log \text{CFU mL}^{-1}$. It seems that the percentage of pineapple pulp in the mixture with sugar cane juice did not influence the yeast growth.

3.3 Fermentation kinetics and sugar, alcohol and organic acids profile

The yeast strains were selected based on the results from the concentration of sugars, alcohols and organic acids (Table 3) and fermentation kinetics (Table 4).

Table 3. Concentrations (g L⁻¹) of sugars, alcohols and organic acids determined with HPLC in the fermented beverage of sugar cane and pineapple juice.

Code treatment	Sucrose	Glucose	Fructose	Glycerol	Ethanol	Citric acid	Acetic acid
PCSC8:2	2.26 ^c ± 0.19	nd	0.09 ^a ± 0.12	10.65 ^a ± 0.21	85.13 ^a ± 0.62	1.12 ^b ± 0.02	0.56 ^d ± 0.03
PCSC7:3	0.08 ^b ± 0.04	nd	0.32 ^a ± 0.07	9.70 ^a ± 0.15	77.30 ^a ± 0.89	1.84 ^d ± 0.04	0.44 ^c ± 0.02
PCSC6:4	0.17 ^a ± 0.03	nd	0.91 ^a ± 0.14	10.46 ^a ± 0.10	84.21 ^a ± 0.27	2.45 ^e ± 0.01	0.42 ^c ± 0.03
PCSC*8:2	1.05 ^b ± 0.68	nd	0.13 ^a ± 0.14	7.09 ^b ± 1.07	76.91 ^a ± 7.86	0.76 ^a ± 0.10	0.29 ^b ± 0.10
PCSC*7:3	0.85 ^b ± 0.11	nd	0.06 ^a ± 0.00	7.20 ^b ± 0.40	72.65 ^b ± 3.80	1.92 ^d ± 0.11	0.43 ^c ± 0.01
PCSC*6:4	0.38 ^a ± 0.08	0.11 ^a ± 0.04	2.31 ^b ± 0.81	7.03 ^b ± 0.26	68.65 ^b ± 0.36	2.48 ^e ± 0.09	0.41 ^c ± 0.01
SC8:2	0.23 ^a ± 0.04	0.41 ^a ± 0.05	0.21 ^a ± 0.18	9.69 ^a ± 1.22	71.93 ^b ± 0.00	0.91 ^b ± 0.24	0.61 ^d ± 0.02
SC7:3	0.41 ^a ± 0.07	nd	nd	10.70 ^a ± 0.52	77.18 ^a ± 4.86	1.61 ^c ± 0.02	0.52 ^d ± 0.13
SC6:4	0.39 ^a ± 0.05	0.09 ^a ± 0.04	0.62 ^a ± 0.07	9.73 ^a ± 0.11	71.96 ^b ± 1.76	2.40 ^e ± 0.10	0.77 ^e ± 0.06
SC*8:2	0.57 ^a ± 0.02	nd	0.07 ^a ± 0.08	6.64 ^b ± 0.19	75.75 ^b ± 2.36	0.75 ^a ± 0.03	0.32 ^b ± 0.01
SC*7:3	0.69 ^b ± 0.08	nd	0.05 ^a ± 0.00	6.74 ^b ± 0.85	68.85 ^b ± 8.75	1.80 ^d ± 0.22	0.41 ^c ± 0.03
SC*6:4	0.49 ^a ± 0.10	0.06 ^a ± 0.01	0.24 ^a ± 0.01	7.19 ^b ± 0.04	71.03 ^b ± 0.00	2.55 ^e ± 0.06	0.43 ^c ± 0.02
PC8:2	1.19 ^b ± 0.00	0.02 ^a ± 0.00	3.91 ^b ± 0.08	2.70 ^c ± 0.18	80.44 ^a ± 1.78	0.94 ^b ± 0.00	0.10 ^a ± 0.01
PC7:3	0.52 ^a ± 0.09	1.50 ^b ± 0.02	0.19 ^a ± 0.00	4.31 ^c ± 0.33	83.84 ^a ± 2.29	1.56 ^c ± 0.02	nd
PC6:4	0.79 ^b ± 0.01	1.08 ^b ± 0.45	nd	6.31 ^b ± 0.61	79.78 ^a ± 0.80	2.26 ^e ± 0.01	nd

Data are presented as mean ± standard deviation. nd: not detected.

Values identified by the same letters are not significantly different at the 0.05 level (Scott-Knott test).

Fermentations with mixed inoculum PCSC6:4 and PCSC*6:4 had a lower concentration of residual sucrose (0.17 g L^{-1} and 0.38 g L^{-1} , respectively) and the pure inoculum of *S. cerevisiae* (SC8:2, SC7:3, SC6:4, SC*8:2 and SC*6:4) were more efficient in terms of sugar consumption, presenting values between 0.23 g L^{-1} and 0.57 g L^{-1} for residual sucrose. The mixed inoculum PCSC8:2 had the highest concentration of residual sucrose (2.26 g L^{-1}). About the residual glucose, the pure inoculum of *P. caribbica* PC7:3 and PC6:4 had the highest concentration (1.50 and 1.08 g L^{-1} , respectively). Duarte, Amorim and Schwan (2013) studying the fermentation of sugarcane juice inoculated with of *S. cerevisiae* and *P. caribbica* found that this fermentation was more efficient in terms of sugar consumption, leaving the residual sugars content of only 1.14 g L^{-1} (glucose) and 19.92 g L^{-1} (fructose) than when only *S. cerevisiae* was the sole inoculum 8.92 g L^{-1} (glucose) and 41.94 g L^{-1} (fructose).

The largest amount of glycerol (10.70 g L^{-1}) was found in SC7:3 (Table 3), follow by the PCSC8:2 and PCSC6:4 with 10.65 and 10.46 g L^{-1} of glycerol, respectively. The fermentations that produced the smallest amount of glycerol (2.70 and 4.31 g L^{-1}) were *P. caribbica* PC8:2 and PC7:3, respectively. It can be seen that the fermentations conducted with *S. cerevisiae* UFLA CA11 showed higher concentrations of glycerol, showing the efficiency of such yeast for this parameter. Glycerol is the most abundant by-product of wine fermentation after ethanol and carbon dioxide. This polyalcohol does not directly contribute to wine aroma due to its nonvolatile nature, but it contributes to sweetness, fullness and smoothness (GARDNER et al., 1993; REMIZE et al., 2000; TAHERZADEH et al., 2002). Typical glycerol levels in wine vary from 1 to 15 g L^{-1} , with average of 7 g L^{-1} (TAHERZADEH et al., 2002).

Fermentations with mixed inoculum of PCSC8:2, PCSC7:3, PCSC6:4 and PCSC*8:2 produced higher concentrations of ethanol. Only one pure inoculum of *S. cerevisiae* the SC7:3 produced better concentrations

(77.18 g L⁻¹), whereas all pure inoculum of *P. caribbica* PC8:2, PC7:3 and PC6:4 produced high concentrations of ethanol (Table 3).

The citric acid concentration increased proportionally with increasing the pineapple pulp in the mixture with sugar cane juice, since it is a predominantly acidic pulp due to the high levels of citric acid (Table 2). Acetic acid was present in high concentration (0.77 g L⁻¹) in the fermentation with pure inoculum of *S. cerevisiae* SC6:4. Acetic acid was not detected in fermentations inoculated only with *P. caribbica* PC7:3 and PC6:4. The level of acetic acid, the main component of volatile acidity, is critical for the quality of wines. The concentration of acetic acid in wines is usually about 0.5 g L⁻¹ and must remain below 0.8 g L⁻¹. Yeasts sometimes produce excessive acetic acid, due either to their genetic background or to the wine-making processes (e.g. excessive clarification) (DEQUIN, 2001).

Table 4. Kinetics parameters for ethanol of fermented beverage of sugar cane and pineapple juice and fermentation time.

Code treatment	Y _{P/S} (g g ⁻¹)	Ef (%)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Fermentation time (h)
PCSC8:2	0.48 ^a ± 0.02	92.82 ^a ± 4.33	3.29 ^a ± 0.38	24
PCSC7:3	0.47 ^a ± 0.01	90.57 ^a ± 1.05	3.21 ^a ± 0.04	24
PCSC6:4	0.48 ^a ± 0.01	92.74 ^a ± 1.80	2.33 ^b ± 0.01	36
PCSC*8:2	0.46 ^a ± 0.02	89.59 ^a ± 3.48	1.28 ^d ± 0.13	60
PCSC*7:3	0.45 ^a ± 0.00	88.33 ^a ± 0.31	1.51 ^d ± 0.08	48
PCSC*6:4	0.39 ^c ± 0.00	76.24 ^b ± 0.35	1.42 ^d ± 0.01	48
SC8:2	0.43 ^b ± 0.03	83.89 ^b ± 5.96	1.99 ^c ± 0.00	36
SC7:3	0.48 ^a ± 0.00	93.54 ^a ± 0.71	2.14 ^c ± 0.14	36
SC6:4	0.41 ^c ± 0.02	79.20 ^b ± 3.25	1.99 ^c ± 0.05	36
SC*8:2	0.45 ^b ± 0.02	88.16 ^a ± 3.27	1.42 ^d ± 0.27	60
SC*7:3	0.43 ^a ± 0.03	83.42 ^b ± 5.86	1.14 ^e ± 0.15	60
SC*6:4	0.40 ^c ± 0.01	78.01 ^b ± 1.20	1.47 ^d ± 0.00	48
PC8:2	0.48 ^a ± 0.02	93.25 ^a ± 4.45	1.08 ^e ± 0.02	72
PC7:3	0.49 ^a ± 0.01	96.10 ^a ± 1.73	1.08 ^c ± 0.04	72
PC6:4	0.45 ^a ± 0.00	88.22 ^a ± 0.20	1.32 ^d ± 0.01	60

Data are presented as mean \pm standard deviation. nd: not detected.
 Values identified by the same letters are not significantly different at the 0.05 level (Scott-Knott test).

The kinetic parameters of the fermentations conducted with pure inoculum *P. caribbica* PC7:3 showed the highest $Y_{P/S}$ 0.49 g g⁻¹ and hence greater efficiency 96.10%. This fermentation produces 83.84 g L⁻¹ of ethanol. However, this fermentation did not show a very high productivity 1.08 g L⁻¹ h⁻¹, since this parameter was calculated as a function of fermentation time, and this case was longer (72 hours) than the other experiments (Table 4). The fermentation that used mixed inoculum PCSC*6:4 showed $Y_{P/S}$ (0.39 g g⁻¹) and an efficiency of only 76.24% (Table 4). The productivity of fermentation was slightly higher 1.42 g L⁻¹ h⁻¹ because this fermentation had a mean duration of 52 hours. It can be seen that the fermentation that used the yeast *S. cerevisiae* UFLA CA11 both as pure as mixed inoculum had higher yields (average 2.94 g L⁻¹ h⁻¹) and performed with pure inoculum of *P. caribbica* had low productivity (average 1.16 g L⁻¹ h⁻¹).

The ethanol productivity by yeasts is theoretically about 51%, when hexose is used as the fermentation substrate (BOULTON et al., 1996). Oliveira et al. (2011) proposed that strains showing values of $Y_{P/S}$ between 0.42 and 0.45 g g⁻¹ are grouped in the medium level, while strains with $Y_{P/S}$ values ranging from 0.451 to 0.49 g g⁻¹ are grouped in the high level. Therefore, the SC in all concentrations, PCSC*8:2, SC*7:3, PC8:2 and PC7:3 are classified as high fermentation level and PCSC*7:3, SC8:2, SC*8:2 and PC are classified as medium fermentation level.

Among all experiments carried out, those with pure inoculum of *P. caribbica* PC8:2 and PC7:3 showed low amount of glycerol (2.70 and 4.31 g L⁻¹) and low productivity (1.08 g L⁻¹ h⁻¹). Therefore, fermentations with mixed cultures PCSC8:2, PCSC7:3 and PCSC6:4 showed higher ethanol concentrations

(85.13 g L⁻¹, 77.30 g L⁻¹, 84.21 g L⁻¹, respectively) and high efficiency (92.82%, 90.57%; 92.74%, respectively).

3.4 Metabolite profile of pre-selected yeast strains

The major volatile compounds found in fermented beverage of sugar cane juice and pineapple pulp using different inoculum are shown on Table 5. Thirty-six volatile compounds (VOCs) were identified in the first step of the fermented beverage of sugar cane juice and pineapple pulp.

Table 5. Concentration (mg L⁻¹) of volatile compounds in sugar cane juice and pineapple fermented beverage by different inoculum identified by GC-FID.

N° Compounds	PCSC8:	PCSC7:	PCSC6:	PCSC*8:	PCSC*7:	PCSC*6:	SC8:2	SC7:3	SC6:4	SC*8:2	SC*7:3	SC*6:4	PC8:2	PC7:3	PC6:4
	2	3	4	2	3	4									
<i>Carbonyl Compounds</i>															
1 Acetaldehyde	3.99 ± 1.01	3.27 ± 0.67	1.88 ± 0.06	6.07 ± 1.57	7.40 ± 1.92	2.76 ± 1.05	9.07 ± 1.20	13.58 ± 3.14	5.03 ± 0.15	8.95 ± 2.12	4.81 ± 1.12	1.60 ± 0.37	3.04 ± 0.59	3.62 ± 0.85	9.10 ± 0.27
2 Acetoin	1.82 ± 0.37	nd	nd	1.68 ± 0.38	nd	nd	0.93 ± 0.10	nd	0.98 ± 0.13	1.98 ± 0.39	nd	0.68 ± 0.24	nd	nd	nd
3 Decyl aldehyde	1.05 ± 0.77	0.43 ± 0.17	nd	8.02 ± 6.80	3.13 ± 0.04	0.95 ± 0.56	4.77 ± 0.96	1.92 ± 0.89	nd	6.78 ± 0.96	1.14 ± 0.06	nd	nd	nd	nd
4 2-nonanone	0.88 ± 0.25	0.99 ± 0.18	0.57 ± 0.16	nd	0.39 ± 0.05	nd	0.41 ± 0.12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5 Nonanal	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9.02 ± 1.87	6.07 ± 1.27	8.50 ± 0.76
6 Verbenone	16.72 ± 0.13	nd	8.35 ± 0.49	nd	nd	7.43 ± 1.11	2.44 ± 0.61	nd	5.66 ± 0.24	nd	nd	4.46 ± 0.12	3.36 ± 0.42	2.07 ± 0.10	4.23 ± 0.23
Total Carbonyl Compounds	24.46	4.69	10.80	15.77	10.92	11.14	17.62	15.5	11.67	17.71	5.95	6.74	15.42	11.76	21.83
<i>Higher alcohols</i>															
7 1-propanol	23.28 ± 2.21	15.93 ± 1.26	11.03 ± 1.81	5.00 ± 1.28	14.62 ± 1.20	15.72 ± 2.20	9.94 ± 2.10	14.36 ± 1.87	18.81 ± 0.47	6.43 ± 1.08	11.82 ± 0.01	9.68 ± 3.02	12.69 ± 1.89	11.79 ± 2.88	18.33 ± 2.60
8 2-methyl-1-propanol	69.39 ± 6.43	41.04 ± 4.48	32.01 ± 2.56	10.77 ± 1.23	26.45 ± 2.44	22.09 ± 5.57	50.01 ± 17.57	32.45 ± 2.33	37.97 ± 9.43	26.64 ± 3.17	19.94 ± 3.01	9.20 ± 1.62	142.37 ± 20.06	89.32 ± 9.77	99.61 ± 3.01
9 2-methyl-1-butanol	17.67 ± 3.96	11.22 ± 0.46	13.67 ± 0.24	nd	nd	nd	10.24 ± 2.38	9.51 ± 1.80	16.05 ± 4.91	nd	nd	nd	29.93 ± 3.03	23.64 ± 5.40	21.75 ± 8.88

Table 5. continued

N° Compounds	PCSC8:	PCSC7:	PCSC6:	PCSC*8	PCSC*7	PCSC*6	SC8:2	SC7:3	SC6:4	SC*8:2	SC*7:3	SC*6:4	PC8:2	PC7:3	PC6:4
	2	3	4	:2	:3	:4									
10 3-methyl-1-butanol	125.56 ± 12.17	84.93 ± 3.61	89.72 ± 0.24	73.81 ± 2.57	104.43 ± 0.70	101.84 ± 13.91	61.75 ± 1.07	47.76 ± 7.51	110.84 ± 24.76	95.51 ± 10.29	88.69 ± 13.76	85.44 ± 0.37	107.10 ± 22.75	106.82 ± 26.11	150.36 ± 1.96
11 2-phenylethanol	12.64 ± 2.87	7.71 ± 0.02	9.40 ± 0.17	14.64 ± 2.08	11.85 ± 1.29	10.85 ± 2.36	10.12 ± 0.72	6.23 ± 0.99	12.06 ± 2.02	16.16 ± 5.43	11.10 ± 0.92	8.10 ± 0.01	120.67 ± 23.81	73.77 ± 12.60	91.78 ± 3.78
12 1,3-butanediol	nd	2.42 ± 0.95	0.33 ± 0.19	nd	1.88 ± 0.07	nd	nd	1.40 ± 0.46	nd	nd	1.89 ± 0.28	nd	0.44 ± 0.14	nd	nd
13 Methanol	2.04 ± 0.53	1.51 ± 0.17	1.43 ± 0.15	4.11 ± 2.20	2.17 ± 2.35	1.61 ± 0.52	2.79 ± 0.52	1.76 ± 0.33	2.08 ± 0.55	2.70 ± 0.69	1.77 ± 0.37	1.33 ± 0.02	1.12 ± 0.27	1.33 ± 0.11	1.31 ± 0.37
Total Higher alcohols	250.58	164.76	157.59	108.33	161.40	152.11	144.85	113.47	197.81	147.44	135.21	113.75	414.32	303.67	383.14
<i>Ethyl esters</i>															
14 Diethyl succinate	nd	0.96 ± 0.32	nd	nd	0.43 ± 0.17	0.29 ± 0.41	0.58 ± 0.01	0.37 ± 0.06	1.05 ± 0.66	0.93 ± 0.44	0.40 ± 0.05	0.40 ± 0.07	nd	0.82 ± 0.43	0.82 ± 0.11
15 Diethyl malate	nd	1.17 ± 0.42	0.59 ± 0.34	nd	0.69 ± 0.15	0.99 ± 0.36	0.51 ± 0.03	0.57 ± 0.29	1.06 ± 0.79	0.47 ± 0.26	0.67 ± 0.04	0.90 ± 0.09	nd	1.10 ± 0.17	2.35 ± 0.12
16 Diethyl malonate	nd	nd	nd	nd	nd	26.74 ± 2.46	nd	43.59 ± 6.29	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17 Ethyl octanoate	nd	nd	nd	nd	26.10 ± 7.90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.76 ± 0.90	nd	nd
18 Mono-ethyl succinate	4.46 ± 1.17	nd	2.27 ± 0.08	1.36 ± 0.01	nd	nd	3.51 ± 0.05	4.43 ± 1.67	4.46 ± 1.39	2.00 ± 0.66	1.53 ± 0.14	nd	5.63 ± 1.63	nd	0.31 ± 0.00
19 Propyl butyrate	2.24 ± 1.35	nd	1.30 ± 0.00	2.12 ± 0.12	nd	1.87 ± 0.52	2.28 ± 0.35	nd	2.17 ± 0.50	3.11 ± 0.63	nd	1.56 ± 0.20	1.57 ± 0.15	1.16 ± 0.21	1.39 ± 0.33

Table 5. continued

N° Compounds	PCSC8:	PCSC7:	PCSC6:	PCSC*8:	PCSC*7:	PCSC*6:	SC8:2	SC7:3	SC6:4	SC*8:2	SC*7:3	SC*6:4	PC8:2	PC7:3	PC6:4
	2	3	4	2	3	4									
Total Ethyl esters	6.70	2.13	4.16	25.53	27.22	3.15	62.97	5.37	84.49	53.28	32.33	2.86	76.72	40.80	24.52
<i>Acetates</i>															
20 Ethyl acetate	4.17 ± 0.78	nd	2.75 ± 0.08	3.12 ± 0.93	nd	3.65 ± 0.42	1.94 ± 0.87	nd	2.58 ± 1.24	2.62 ± 0.07	nd	nd	3.49 ± 0.41	nd	nd
21 Phenylethyl acetate	nd	0.42 ± 0.07	0.44 ± 0.09	0.97 ± 0.10	0.85 ± 0.05	0.60 ± 0.05	0.95 ± 0.38	0.73 ± 0.27	1.35 ± 0.38	1.74 ± 0.18	1.60 ± 0.17	3.35 ± 0.84	5.40 ± 1.96	3.64 ± 1.01	3.71 ± 0.96
22 Phenyl acetate	29.10 ± 4.71	63.28 ± 10.00	42.32 ± 0.74	0.26 ± 0.05	8.27 ± 0.63	63.45 ± 16.96	nd	14.70 ± 0.90	nd	nd	11.63 ± 7.65	11.62 ± 2.66	nd	nd	35.89 ± 5.32
Total Acetates	33.27	63.70	45.51	4.35	9.12	67.70	2.89	15.43	3.93	4.36	13.23	11.62	8.89	3.64	39.60
<i>Monoterpenic alcohols</i>															
23 α-Terpineol	nd	8.65 ± 0.34	nd	nd	4.68 ± 0.01	nd	nd	4.38 ± 1.84	2.03 ± 0.03	nd	5.63 ± 1.40	nd	nd	nd	nd
24 β-Citronellol	nd	0.55 ± 0.02	1.19 ± 0.15	1.28 ± 0.23	1.32 ± 0.47	1.27 ± 0.24	0.68 ± 0.30	0.85 ± 0.12	nd	1.28 ± 0.20	0.90 ± 0.02	nd	1.44 ± 0.66	0.75 ± 0.18	0.92 ± 0.07
Total Monoterpenic alcohols	-	9.2	1.19	1.28	6.00	1.27	0.68	5.23	2.03	1.28	6.53	-	1.44	0.75	0.92
<i>Volatile Acids</i>															
25 Propionic acid	1.80 ± 0.42	1.12 ± 0.30	1.64 ± 0.09	2.60 ± 0.58	2.05 ± 0.28	1.91 ± 0.33	1.87 ± 0.36	1.82 ± 0.34	2.55 ± 0.62	2.31 ± 0.61	2.25 ± 0.51	1.53 ± 0.09	1.61 ± 0.81	1.05 ± 0.06	1.71 ± 0.41

Table 5. continued

N° Compounds	PCSC8:	PCSC7	PCSC	PCSC	PCSC*	PCSC*	SC8:2	SC7:3	SC6:4	SC*8:2	SC*7:3	SC*6:4	PC8:2	PC7:3	PC6:4
	2	:3	6:4	*8:2	7:3	6:4									
26 Isobutyric acid	5.78 ± 1.05	3.54 ± 0.45	3.56 ± 0.17	2.70 ± 0.07	2.16 ± 0.15	2.50 ± 0.88	8.18 ± 2.17	2.30 ± 0.01	8.58 ± 1.61	3.59 ± 0.46	2.01 ± 0.12	1.80 ± 0.25	7.86 ± 0.78	14.10 ± 1.62	8.16 ± 2.70
27 Butyric acid	2.27 ± 0.43	7.36 ± 1.96	0.58 ± 0.08	0.26 ± 0.18	0.42 ± 0.06	0.30 ± 0.00	0.27 ± 0.12	0.50 ± 0.00	nd	0.43 ± 0.03	0.32 ± 0.10	0.36 ± 0.01	2.53 ± 0.03	0.96 ± 0.20	0.78 ± 0.10
28 Hexanoic acid	0.51 ± 0.01	nd	nd	0.85 ± 0.26	0.58 ± 0.11	0.86 ± 0.12	0.63 ± 0.17	0.36 ± 0.08	0.70 ± 0.26	1.26 ± 0.23	0.54 ± 0.12	0.82 ± 0.45	0.63 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.26 ± 0.01
32 Octanoic acid	1.04 ± 0.88	nd	nd	nd	1.11 ± 0.27	0.96 ± 0.05	nd	nd	nd	1.31 ± 0.08	0.73 ± 0.02	1.09 ± 0.78	nd	nd	0.82 ± 0.09
29 Nonanoic acid	nd	0.62 ± 0.02	nd	7.89 ± 1.32	nd	0.30 ± 0.02	11.34 ± 0.50	nd	1.71 ± 0.40	nd	nd	nd	4.94 ± 0.86	1.60 ± 0.63	1.45 ± 0.01
30 Decanoic acid	0.83 ± 0.24	0.71 ± 0.49	0.60 ± 0.15	2.76 ± 0.02	nd	1.17 ± 0.30	6.27 ± 0.43	0.38 ± 0.07	3.91 ± 0.76	nd	0.24 ± 0.12	1.66 ± 1.35	13.60 ± 2.10	3.67 ± 1.05	4.11 ± 0.12
31 Benzoic acid	3.49 ± 0.93	2.13 ± 0.85	1.65 ± 0.27	2.36 ± 0.10	2.39 ± 0.28	2.26 ± 0.18	1.44 ± 0.12	1.80 ± 0.35	1.97 ± 0.64	1.22 ± 0.27	2.16 ± 0.42	1.38 ± 0.66	2.03 ± 1.03	1.02 ± 0.23	1.23 ± 0.17
Total Volatile Acids	15.72	15.48	8.03	19.42	8.71	10.26	30.00	7.16	19.42	10.12	8.25	8.64	33.2	22.77	18.52

nd: not detected

The initial activity of non-*Saccharomyces* yeasts in must fermentation is considered important for the final aromatic profile of wines. These yeasts are responsible for different enzymatic reactions developing a wide range of volatile and nonvolatile end products, which are important to the sensory characteristics of wines (SADINENI; KONDAPALLI; OBULAM, 2012). The main groups of compounds that form the fermentation's bouquet are the acids, alcohols, and esters, and, to a lesser extent, aldehydes and ketones. These compounds are mainly produced by yeast metabolism (HERRERO; GARCIA; DIAZ, 2006).

Fermented beverages with pure and mixed inoculum containing the yeast *S. cerevisiae*, PCSC8:2 had the highest amount of carbonyl compounds (24.46 mg L⁻¹, Table 5), due to the high amount of verbenone (16.72 mg L⁻¹). Fermentation with pure inoculum PC6:4 showed 21.83 mg L⁻¹ of carbonyl compounds, in which 9.10 mg L⁻¹ was acetaldehyde and 4.23 mg L⁻¹ was verbenone. Acetaldehyde is one of the largest carbonyl compound found in wines with a concentration in the range of 13-30 mg L⁻¹ (REDDY; REDDY, 2005). In this experiment, the fermentation that produced more acetaldehyde was carried out with pure inoculum *S. cerevisiae* SC7:3 (13.58 mg L⁻¹, Table 5). Some aldehydes contribute with aroma descriptors such as 'apple bruised' and 'nutty' but also can indicate wine oxidation (SWIEGERS et al., 2005a). Rozenbaum et al. (2006) suggest that verbenone is an important intermediate of terpene and that these compounds are important in the flavor.

Higher alcohols, the group of highest concentration in alcoholic beverages, are generally regarded as important flavor compounds with a great influence in the quality of the beverage (GONZÁLEZ et al. 2011). The fermentation with *P. caribbica* resulted in an increase in the concentration of 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol and 2-phenylethanol. Braga et al. (2013) detected 3-methyl-1-butanol in samples of fermented apple beverage in values between 54.68 and 126.48 mg L⁻¹. Duarte et

al. (2010) reported a large number of higher alcohols found in fruit wines, especially 3-methyl-1-butanol. The 3-methyl-1-butanol is derived from leucine and is considered the most quantitatively important alcohol. Fermentation with PC8:2 and PC6:4 showed highest concentration of 2-phenylethanol (120.67 and 91.78 mg L⁻¹, respectively). The 2-phenylethanol is an aromatic alcohol with a rose-like odor and is used as a flavor component in food as well as a substrate to produce its derivatives such as phenylethyl acetate, another valuable flavor compound (ETSCHMANN et al., 2002).

Methanol is derived from the degradation of pectin, a present cane sugar during fermentation polysaccharide is an undesirable and drink alcohol, because of toxicity (ZACARONI et al., 2011). All fermentations, independently of inocula or pineapple juice concentration produced low concentrations of methanol, between 1.12 and 4.11 mg L⁻¹.

Esters are responsible for sweet and fruity odors (RITA et al., 2011). The fermentation that produced the greatest amount of ethyl esters was performed with inoculum of *S. cerevisiae* SC6:4 (84.49 mg L⁻¹). Among esters, one of the most significant compound that affect flavor in fermented beverages is ethyl ethanoate, produced from acetyl-CoA and ethanol (HERRERO; GARCÍA; DÍAZ, 2006). It can negatively affect wine aroma when levels are over 200 mg L⁻¹. In our experiments, two fermentations produced these esters and in low concentrations, PCSC*7:3 and PC8:2 (26.10 and 7.76 mg L⁻¹, respectively). Among the existing esters, the ethyl types of fatty acids and acetates are considered important in alcoholic beverages because its flavor characteristics are high and pleasant addition to odor threshold values are relatively low (NÓBREGA, 2003).

Ethyl acetate is one of the important volatile compounds that are present in wine and its presence will give the positive effect on the organoleptic characteristics of the wine (KOURKOUTAS et al., 2002). The characteristic

aroma of citrus found in wines is generally attributed to the presence of ethyl acetate and phenethyl alcohol (SELLI, 2008). The ethyl acetate was more pronounced in fermentation PCSC8:2 (4.17 mg L⁻¹). However, phenylethyl acetate was produced in higher amounts by pure inoculum of *P. caribbica* PC8:2 (5.40 mg L⁻¹). Phenyl acetate showed a concentration of 63.45 mg L⁻¹ in fermentation with mixed inoculum PCSC*6:4.

Monoterpene alcohols found in some fermentation were α - terpineol and β -citronellol. The fermentation with mixed inoculum PCSC7:3 had the highest amount of these alcohols (9.20 mg L⁻¹).

Volatile acids identified among the volatile components in beverages include propionic, isobutyric, octanoic, nonanoic and dodecanoic, which are considered low-end taste in distillates (SOUFLEROS et al., 2001). The fermentation with pure inoculums SC*8:2 had higher concentration of total volatile acids (40.12 mg L⁻¹).

3.5. Quantitative test of β -glucosidase activity

The fermentation using pure yeast inoculum of *P. caribbica* PC6:4 showed the highest level of the enzyme β -glucosidase 0.134 nmol pNP/mL h, followed by fermentation performed with the yeast *S. cerevisiae* SC*8:2 (0.127 nmol pNP/mL h). Fermentations performed with mixed inoculum SC and SC* had low values of β -glucosidase activity, except the fermentation PCSC*8:2 (0.121 nmol pNP/mL h).

It was reported that the yeast *Metschnikowia pulcherrima* produces β -glucosidase which is able to release aromatic compounds from odour less of grape juice precursors under winemaking conditions (RODRÍGUEZ et al. 2007) and have a positive effect on the taste and aroma of alcoholic beverages (PARAPOULI et al. 2010). Duarte, Amorim and Schwan (2013) studied yeast fermentation profile of non-*Saccharomyces* yeasts reported that *P. anomala* and

P. caribbica also showed higher β -glucosidase activity 0.495 nmol pNP/mL h and 0.312 nmol pNP/mL h, respectively. These reported values were higher than the ones found in this work. These differences may be due to the composition of the fermentation must. The quoted author used only sugar cane juice (16 °Brix) as fermentation must while in this work it was added different concentrations of pineapple pulp, which significantly altered the pH of the medium. It is possible that the low pH value influenced negatively β -glucosidase production and activity. Several authors suggested that the acidic conditions of wine may cause denaturation of these enzymes and inhibition of their activity (SPANNO et al., 2005; MACMAHON et al., 1999; UGLIANO et al., 2003; MATURANO et al., 2012).

Enzymatic extracts of yeast *S. cerevisiae* have low glycosidases activity especially when compared with non-*Saccharomyces* yeasts. The glycosidases possesses a low activity in the pH of wine and is strongly inhibited by high concentrations of sugars and ethanol (UGLIANO et al., 2003).

3.6. Fermentation in 5 liter batch

The fermentation with pure inoculum of *P. caribbica* CAF733 (PC6:4) was selected for increase the scale production. The selection criterion was based on results from ethanol, low production of acetic acid, from their profile of metabolites identified mainly due to concentration of higher alcohols and esters compounds. Then, the fermentation was carried out with 5 liter to validate the methodology and sensory analysis.

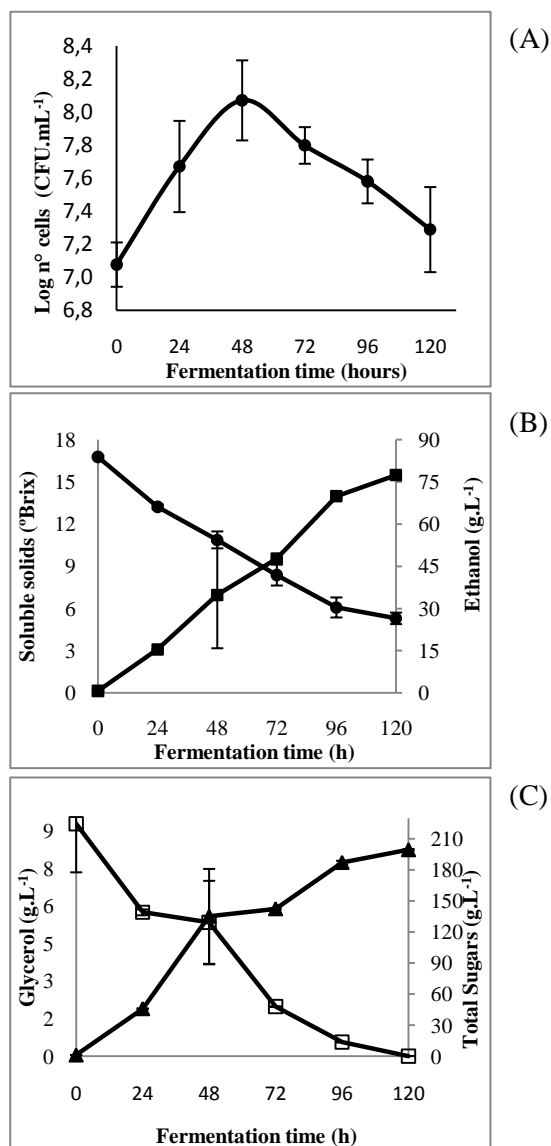


Figure 1. (A) Viable counts of yeast during fermentation of sugar cane juice and pineapple pulp. (B) Consumption of soluble solids (circles) and ethanol (squares) production in fermentation of sugar cane juice and pineapple pulp. (C) Consumption of total sugars (filled triangles) and glycerol (open squares) production in fermentation of sugar cane juice and pineapple pulp. The bars indicate standard deviations.

Throughout the fermentation process, when *P. caribbica* CAF733 was inoculated, there were stable viable populations of 7.08 log CFU mL⁻¹. The maximum population (8.07 log CFU mL⁻¹) was reached after 48 hours of fermentation (Figure 1). After this period, a phase of decline in growth after 120 hours of fermentation was observed. This decline may be due to some yeasts have less resistance to factors such as heat shock, oxidative and osmotic stress, the concentrations of nitrogen, sugar and ethanol causing difficulties in the fermentation process, reducing the growth rates and survival, and may result in low fermentation efficiency (SANTOS et al., 2013).

The results of sugars, ethanol, glycerol, organic acids are showed in Table 7. The ethanol and glycerol produced by microbial activity were analyzed throughout the fermentation process (Figure 2 and 3). The rapid decrease in sugar content and the increase in the concentration of ethanol during the fermentation is show in Figure 2. The initial levels of soluble solids (16 °Brix) decreased approximately 68.42% reaching the end of fermentation with 5.30 °Brix. The soluble solids used in a fermentation is directly related to theoretical expected alcohol content, which in this study was up to 14% (v/v) after fermentation (BRASIL, 1988). The highest ethanol concentration (77.42 g L⁻¹) was achieved after 120 hours of fermentation (Figure 2). The total sugars were found in high levels at the beginning of fermentation (224.59 g L⁻¹), but were consumed during the process. At the end of fermentation, the sucrose content was 0.02 g L⁻¹ and glucose and fructose were not detected. The production of glycerol by *P. caribbica* was evaluated in fermentation time (Figure 3). Glycerol is a non-volatile compound with no aromatic properties, but it significantly contributes to wine quality by might contribute to the sweetness, viscosity and smoothness of wine (SWIEGERS et al, 2005a; LI et al., 2012). Glycerol concentration was 8.24 g L⁻¹.

Table 6. Organic compounds determined by HPLC in fermented beverage of sugar cane juice and pineapple pulp.

Compound	Must	Beverage of sugar cane juice and pineapple
Sucrose	68.91 ± 0.32	0.02 ± 0.01
Glucose	74.05 ± 0.04	nd
Fructose	77.99 ± 0.39	nd
Glycerol	0.05 ± 0.01	8.24 ± 0.03
Ethanol	0.72 ± 0.13	77.42 ± 0.61
Citric acid	7.70 ± 0.70	4.88 ± 0.05
Malic acid	2.22 ± 0.51	1.28 ± 0.03
Succinic acid	3.13 ± 0.16	4.02 ± 0.06
Acetic acid	nd	nd

nd: not detected

Data are presented as mean ± SD.

Citric, malic, succinic and acetic acids were identified and quantified in fermented beverage of sugar cane juice and pineapple pulp (Table 7). Citric acid was found to be the major organic acid in the must (7.70 g L⁻¹) and sugar cane juice and pineapple fermented (4.78 g L⁻¹). Santos et al., 2013 reported similar results for the citric acid level in orange juice wine (8.55 g L⁻¹). Citric acid was the main acid available in the fresh pineapple juice and during fermentation its concentration can decreased (CHANPRASARTSUK et al., 2010). Succinic acid was the second most abundant organic acid in in the must (3.13 g L⁻¹) and in the final beverage (4.02 g L⁻¹). The production of succinic acid is common during the alcoholic fermentation by yeast and is the major acid formed during fermentation. This acid gives an unusual salty, bitter taste to wine (COULTER; GODDEN; PRETORIUS, 2004; SWIEGERS et al., 2005b). There was a consumption of malic acid, because in must the concentration was 2.22 g L⁻¹ and a decrease after 120 hours of fermentation (1.28 g L⁻¹) was observed. Most yeast can utilize significant concentrations of malic acid. Strains of *S. cerevisiae* typically degrade 3-45% of malic acid during the fermentation (SWIEGERS; et al., 2005b). Li et al. (2012) found 5.79 g L⁻¹ of malic acid in mango wine. Acetic

acid was not detected, which is beneficial because wine containing acetic acid in high concentrations has a pronounced vinegar-like taste (ESCUADERO et al., 2004; SIEBERT et al., 2005).

Several volatile compounds, which consisted of higher alcohols, ethyl esters, monoterpenic alcohols and volatile acids were identified and quantified by gas chromatography.

Table 7 lists the concentrations of the major volatile compounds in the beverage of sugar cane juice and pineapple. Seven compounds were quantified: acetaldehyde, methanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol, propyl butyrate and ethyl acetate.

Table 7. Concentration of major volatile compounds (mg L^{-1}) detected in beverage sugar cane juice and pineapple pulp by GC-FID; descriptors reported in literature.

Compound	Beverage of sugar cane juice and pineapple	Descriptors
Acetaldehyde	6.24 ± 0.07	Green leaves, fruity (c)Nutty, sherry-like (d)
Methanol	3.93 ± 0.07	-
2-methyl-1-propanol	15.79 ± 0.04	Alcohol, banana, medicinal, solvent (c); nailpolish (b)
3-methyl-1-butanol	74.48 ± 1.49	Alcohol, banana, medicinal, solvent (c); sweetish, aromatica (g); cheese (e)
2-phenylethanol	18.03 ± 1.07	Roses, sweetish, perfumed (c, e, g)
Propyl butyrate	1.27 ± 0.91	-
Ethyl Acetate	12.43 ± 2.09	Solvent, fruity, sweetish, nailpolish (c, h, i, j)

Data are presented as mean \pm SD.

nd: not detected.

(a) Czerny et al. (2008).

(b) Siebert et al. (2005).

(c) Meilgaard (1975).

(d) Fugelsang (1997).

- (e) Escudero et al. (2004).
- (f) Salo (1970).
- (g) Falqué et al. (2001).
- (h) Apostolopoulou et al. (2005).
- (i) Mingorance-Cazorla et al. (2003).

Among the principal chemical classes representing aroma of fermented products, alcohols are the group that contributed to a larger number of constituents (ARAÚJO et al., 2011). The higher alcohols quantified was 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol and 2-phenylethanol (Table 9). During the production of alcoholic beverage from cheese whey, Dragone et al. (2009) founded values higher than those found in this work for 2-methyl-1-propanol e 3-methyl-1-butanol (542 mg L^{-1} ; 887 mg L^{-1}). However Plutowska and Wardencki (2008) reported that the concentration of these components depends on the quality of the raw materials used for production of the beverage as well as the process conditions. Alcohols similar to 2-phenylethanol have aromatic descriptions of 'rose-like', 'sweet' and 'perfume-like' and can positively influence the beverage aroma (FALQUÉ et al., 2001). In this study, 2-phenylethanol was present at concentration 18.03 mg L^{-1} . Santos et al. (2013) also found that a concentration of 2-phenylethanol of 27.26 mg L^{-1} .

Ethyl acetate was the main ester detected with a concentration of 12.43 mg L^{-1} in final beverage. The values of ethyl acetate found in this work were similar to values found by Hernández-Gómez et al. (2008) in fermented beverages from sugar cane, orange and grape.

Acetaldehyde was found in values 6.24 mg L^{-1} (Table 9). Acetaldehyde was measured at a concentration of 22.56 mg L^{-1} in jabuticaba fermented must (DUARTE et al., 2011). The concentration of methanol was 3.93 mg L^{-1} .

The concentrations of the minor volatile compounds detected beverage of sugar cane juice and pineapple are showed in table 8. GC-FID analysis allowed for the identification and quantification of twenty-seven volatile

compounds, including carbonyl compounds, higher alcohols, ethyl esters, acetates, monoterpenic alcohols, volatile acids and other compounds.

Table 8. Concentration of minor volatile compounds ($\mu\text{g L}^{-1}$) detected in beverage of sugar cane juice and pineapple by GC-FID; descriptors reported in literature.

Nº	Compound	Beverage of sugar cane juice and pineapple	Descriptors
1	2-nonanone	153.98 \pm 7.40	-
2	1-propanol	271.84 \pm 8.74	Alcohol (c)
3	Ethyl hexanoate	20.77 \pm 2.42	Apple, fruity, sweetish, estery, aniseed (d)
4	Diethyl succinate	58.54 \pm 11.30	-
5	Diethyl malate	270.38 \pm 41.34	-
6	Mono ethyl succinate	825.37 \pm 41.60	-
7	Isoamyl acetate	164.69 \pm 15.54	Banana, apple, solvent (c)
8	Phenyl acetate	19.08 \pm 2.32	-
9	Phenylethyl acetate	310.74 \pm 73.81	Roses, honey, apple, sweetish(c); flowery (e)
10	a-Terpeniol	174.08 \pm 15.31	Pine, terpenoid (d) Lilac, citrus, lime H
11	Propionic acid	19.91 \pm 8.82	Acetic acid, milk (c); vinegar (b)
12	Isobutyric acid	34.10 \pm 3.69	Sweaty, bitter(c); cheese, rancid (b)
13	Butyric acid	15.72 \pm 4.72	Buttery, cheesy, sweaty (c)
14	Hexanoic acid	310.74 \pm 3.90	Goaty, fatty acid, vegetable oil, sweaty (c) sweaty
15	2-ethyl caproic acid	27.03 \pm 5.13	-
16	Octanoic acid	270.38 \pm 41.34	Fatty acid, vegetable oil (c); rancid, harsh (b) Goaty, wet dog (d)
17	Nonanoic acid	99.78 \pm 37.98	-
18	Decanoic acid	36.29 \pm 7.85	Waxy, tallow, caprylic, rancid, soapy (c); fatty (b)
19	Verbenone	148.39 \pm 27.63	-

Data are presented as mean \pm SD.

nd: not detected.

(a) Czerny et al. (2008).

(b) Siebert et al. (2005).

(c) Meilgaard (1975).

(d) Fugelsang (1997).

(e) Mingorance-Cazorla et al. (2003).

The most abundant higher alcohol quantified in this study was 1-propanol ($271.84 \mu\text{g L}^{-1}$). Ethyl esters are one of the most important groups for the formation wine aroma. The concentrations of esters depend on factors such as yeast strain, fermentation temperature, aeration and sugar content. These compounds possess fruity aroma which contributes favorably to the sensory properties of wines (PERESTRELO et al., 2006). Four ethyl esters were quantified. Ethyl hexanoate is an important ester and at the end of the fermentation the concentration was $22.77 \mu\text{g L}^{-1}$. According some authors, ethyl hexanoate is characterized as having a fruity aroma, as “apples” (FUGELSANG 1997). Duarte et al. (2010) found a similar concentration of these compounds in cacao, gabiropa and jaboticaba wines (17.7 ; 20.2 ; $12.8 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively). Diethyl succinate, diethyl malate and mono ethyl succinate also were found (table 10).

Some members of the group of acetates were identified, such as isoamyl acetate, isobutyl acetate, phenyl acetate and phenylethyl acetate. The components of this group enhance “banana” and “apple” aromas (MEILGAARD, 1975). Lee et al. (2012) reported that non-*Saccharomyces* yeasts, like *Williopsis saturnus*, produced higher amount of isoamyl acetate (75.18 mg L^{-1}) and phenylethyl acetate (2.31 mg L^{-1}) cultivated sole than in co-culture with *S. cerevisiae*.

The only monoterpenic alcohol found was the α -terpineol ($174.08 \mu\text{g L}^{-1}$). Volatile acids were one of the most prevalent groups, with a total of eight

compounds. Short-chain fatty acids, such as isobutyric and butyric were found in low concentrations, 34.10 and 15.72 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The odor of these volatile acids may be strong as “sweaty”, “bitter” (MEILGAARD, 1975), “cheese” and “rancid” (SIEBERT et al., 2005) and contribute significantly to the wine aroma (SOUFLEROS et al., 2001). Acids like propionic, hexanoic, 2-ethyl caproic, octanoic, nonanoic and decanoic were all detected in elevated concentrations.

3.7 Chemical analysis of the beverage

The relative density value was 0.99. The volatile acidity (such as acetic acid) was found at a concentration of 385.15 mg 100 mL⁻¹ of anhydrous alcohol.. Madrera et al. (2010) investigated the influence of cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider beverages and found volatile acidities between 10 and 15 mg.100 mL⁻¹ of acetic acid. Acidity has a negative influence on the sensory quality of a beverage. The main source of these compounds could be the metabolism of yeast during fermentation. However, some compounds in fermented beverages are from the fruit that is used as a raw material (SANTOS et al., 2013).

The alcoholic content was 9.03% (v v⁻¹) at 20 °C. Araújo et al. (2011) reported the value of alcoholic content above 6% (v v⁻¹) in fermented products from cashew apple fruit. Reddy, Kumar and Reddy (2010) produced a mango wine with 8.5 and 7.2% (v v⁻¹) of alcoholic content.

3.8 Sensory analysis

After the chemical analyses, the beverage was subjected to sensory analysis to assess its acceptance among consumers. Table 9 presents the

percentage of acceptance attributed to the beverage by 52 untrained tasters, designated based upon a nine-point hedonic scale.

Table 9. Frequency and average notes for the attributes of sensory analysis.

Attribute	Frequency and average notes									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mean
Color	-	-	1	4	5	4	10	22	6	7.08
Viscosity	-	-	-	2	1	2	10	22	15	7.81
Aroma	-	1	-	2	2	8	13	15	11	7.27
Taste	-	-	4	4	5	10	16	9	4	6.40
Overall impressio n	-	-	-	2	3	14	15	15	3	6.90

(1), dislike extremely; (2) dislike very much, (5) no preference, (6) like slightly, (7) like moderately, (8) like very much and (9) like extremely.

Similar averages were recorded for the five evaluated attributes, where the viscosity achieved a slightly higher value, followed by aroma, color, overall impression and taste, with respective scores of 7.81, 7.27, 7.08, 6.90 and 6.40 (Table 11). The viscosity attribute had the highest frequency of the maximum value in the hedonic scale (15 votes – 28.85% of the tasters). The overall impression attribute, which corresponds to the global acceptance of the beverage by the tasters, reached a higher frequency (15 tasters, 28.85% of the total) in point 7 and 8 on the hedonic scale, meaning that the tasters ‘like moderately’ and ‘liked very much’ the beverage. The color of the beverage reached an average of 7.08, indicating that the tasters ‘moderately liked’ the color of the beverage. A greater number of panellists chose values above 8 on the hedonic scale for the evaluated attributes of the sugar cane juice and pineapple beverage.

4 Conclusions

Mixed inocula using *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia caribbica* and pure inoculum using only *S. cerevisiae* exhibit a high fermentation performance by quickly consuming the sugars and therefore finishing the fermentation process faster. However, these fermentations produce high concentration of acetic acid or low concentration of ethanol resulting in low efficiency. The pure inoculum of *P. caribbica* UFLA CAF733 (60:40) produced volatile compounds considered as pleasurable in alcoholic fermented beverages. The yeast *P. caribbica* increased concentrations of desirable volatile compounds, such as 2-phenylethanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol, ethyl acetate, phenylethyl acetate, diethylsuccinate and α -terpineol.

Acknowledgments

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), FAPEMIG and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support and scholarships and Laboratory of Analysis of Beverages from the Chemistry Department of the Federal University of Lavras especially Professor Maria das Graças Cardoso.

References

- ANDORRÀ, I.; BERRADRE, M.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M.; ESTEVE-ZARZOSO, B. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 2, p. 215-224, Jun. 2010.
- APOSTOLOPOULOU, A. A.; FLOUROS, A. I.; DEMERTZIS, P. G.; AKRIDA-DEMERTZI, K. Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. **Food Control**, v. 16, n.2, p. 157–164, Feb. 2005.

ARAÚJO, S. M.; SILVA, C. F.; MOREIRA, J. J.; NARAIN, N.; SOUZA, R.R. Biotechnological process for obtaining new fermented products from cashew apple fruit by *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1161-1169, Nov. 2011.

ARRUDA, A. R.; CASIMIRO, A. R. S.; GARRUTI, D. S.; ABREU, F. A. P. Processamento de bebida fermentada de banana. **Revista Ciência e Agronomia**, v. 34, n. 2, p. 161-167, 2003.

AZEVEDO, L.C.; REIS, M. M.; SILVA, L. A.; ANDRADE, J. B. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1968-1975, Nov. 2007.

BHATIA, S. et al. Partial Purification and Characterization of acid invertase from the fresh and stale sugarcane juice. **Sugar Tech**, v. 14, n. 2, p. 148-155, Jun. 2012.

BOULTON, R. B.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F.; KUNKEE, R. E. Principles and practices of wine making. New York: Chapman & Hall; 1996. p. 73-79.

BRAGA, C. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; DA SILVA, K. M.; DE SOUZA, F. K. F.; PIETROWSKI, G. A. M.; COUTO, M.; GRANATO, D.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Classification of juices and fermented beverages made from unripe, ripe and senescent apples based on the aromatic profile using chemometrics. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 967-974, Nov. 2013.

BRASIL. Instrução Normativa nº 24, de 08 de setembro de 2005. Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de setembro de 2005, Seção 1. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13576>. Acesso em: 23 ago 2012.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 08 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação, comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 8 de nov. de 1988. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=189>> Acesso em: 23 ago 2012.

CAMPOS, C. R.; SILVA, C. F.; DIAS, D. R.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; SCHWAN, R. F. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, Jun. 2010.

CHANPRASARTSUK, O. O.; PRAKITCHAIWATTANA, C.; SANGUANDEEKUL, R. Comparison of methods for identification of yeasts isolated during spontaneous fermentation of freshly crushed pineapple juices. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, p. 1479-1490, Dec. 2013.

CHANPRASARTSUK, O. O.; PRAKITCAIWATTANA, C.; SANQEANDEEKUL, R.; FLEET, G. H. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7500-7509, Oct. 2010.

CHMARA, M.; DIEZ, C.; TORIJA, E. Chemical characterization of pineapple juice and nectars. Principal components analysis. **Food Chemistry**, v. 54, n.1, p. 93-100, 1995.

COULTER, A. D.; GODDEN, P. W.; PRETORIUS, I. S. Succinic acid – How is formed, what its effect on titratable acidity, and what factors influence its concentration in wine? **Australian and New Zealand Wine Industry Journal**, v. 19, n. 6, p. 16-25, 2004.

CZERNY, M.; CHRISTLBAUER, M.; CHRISTLBAUER, M.; FISCHER, A.; GRANVOGL, M.; HAMMER, M.; HARTL, C.; HERNANDEZ, N. M.; SCHIEBERLE, P. Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 2, p. 265-273, 2008.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Technology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

DUARTE, W. F.; DRAGONE, G.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B.; SCHWAN, R. F. Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 173-182, Oct. 2010.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A. SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu. **LWT Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, Dec. 2010.

DUARTE, W. F.; AMORIM, J. C.; LAGO, L. A.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Optimization of fermentation conditions for production of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) spirit using the response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. 782-790, Jun-Jul. 2011.

DUARTE, W. F.; AMORIM, J.C.; SCHWAN, R.F. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 175-194, Jan. 2013.

DEQUIN, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 5-6, p. 577-588, Sep. 2001.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; FREIRE, E. S.; SERÔDIO, R. S. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Teobroma cacao* L.). **International Journal of Food and Technology**, Amsterdam, v. 42, n. 3, p. 319-329, Mar. 2007.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 342-350, Set.-Dez. 2003.

DOMIZIO, P.; LENCIONI, L.; CIANI, M.; DI BLASI, S.; PONTREMOLESI, C.; SABATELLI, M. P. Spontaneous and inoculated yeast population dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n.3, p. 281-289, Apr. 2007.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. L.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v.112, n. 4, p. 929-935, Feb. 2009.

EZERONYE, O.U. Nutrient utilization profile of *Saccharomyces Cerevisiae* from palm wine in tropical fruit fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n.3, p. 235-240, Oct. 2004.

FALLAHI, E.; MOHAN, S.K. Influence of nitrogen and rootstock on tree growth, precocity, fruit quality, leaf mineral nutrients, and fire blight in 'Scarlet Gala' apple. **Hort Technology**, Alexandria, v.10, n.3, p.589-596, Jul.-Set. 2000.

FALQUÉ, E.; FERNÁNDEZ, E.; DUBOURDIEU, D. Differentiation of white wines by their aromatic index. **Talanta**, v. 54, n. 2, p. 271-281, Apr. 2001.

FERREIRA, D. F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FISCHER, D. PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCLOTER, M. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 83-99, Jul. 2012.

FUGELSANG, K. C. Wine microbiology. New York: Chapman & Hall, 1997.

GARDNER, N.; RODRIGUE, N.; CHAMPAGNE, C.P. Combined effects of sulfites, temperature, and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 2022–2028, Jul. 1993.

GRANADA, G. G.; ZAMBIANZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. **B.CEPPAC**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 405-422, Jul-Dec. 2004.

GONZÁLEZ, E. A.; AGRASAR, A. T.; CASTRO, L. M. P.; FERNÁNDEZ, I. O.; GUERRA, N. P. Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus ideaus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo*, L.) and characterization of their distillates. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1419–1426, Jun. 2011.

HERNÁNDEZ-GÓMEZ, L. F., ÚBEDA-IRANZO, J., AND BRIONES, A. Characterisation of wines and distilled spirits from melon (*Cucumis melo* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 644–650, Apr. 2008.

HERRERO, M., GARCÍA, L. A., DÍAZ, M. Volatile compounds in cider: Inoculation time and fermentation temperature effects. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n.3, p. 210–214, Oct. 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** São Paulo: Ed. Adolfo Lutz, 4ª ed. 2005.

KIM, B.; CHO, B.; HAHN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via Ehrlich pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 1, Jan. 2014.

KOURKOUTAS, Y.; KOUTINAS, A. A.; KANALLAKI, M.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Continuous wine fermentation using a psychrophilic yeast immobilized on apple cuts at different temperatures. **Food Microbiology**, v. 19, n. 2-3, p. 127–134, Apr. 2002.

KUMAR, A.; MISHRA, S. Studies on production of alcoholic beverages from some tropical fruits. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 88-92, Oct. 2012.

KUMAR, Y. S.; PRAKASAM, R. S.; REDDY, O. V. S. Optimisation of fermentation conditions for mango (*Mangifera indica* L.) wine production by employing response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 11, p. 2320-2327, Nov. 2009.

LEE, J.; CHANG, C.; YU, T.; LAI, S. Studies on the quality and flavor of ponkan (*Citrus poonensis* hort.) wines fermented by different yeasts. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 21, n. 3, p. 301-309, Sep. 2013.

LEE, P. R.; ONG, Y. L.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Evolution of volatile compounds in papaya wine fermented with three *Williopsis saturnus* yeasts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n.10, p. 2032-2041, Oct. 2010.

LEE, P.; SAPUTRA, A.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Biotransformation of durian pulp by mono- and mixed-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. **Food Science and Technology**, v. 46, n.1, p. 84-90, Apr. 2012.

LI, X.; CHAN, L. J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Fermentation of three varieties of mango juices with a mixture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus* var. *mrakii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, p. 28-35, 2012.

MACMAHON, H.; ZOECKELEIN, B. W.; FUGELSANG, K.; JASINSKY, Y. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n.3, p. 198–203, Sep. 1999.

MANDRERA, R. R.; LOBO, A. P.; ALONSO, J. J. M. Effect of cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider spirits. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 70–78, Jan. 2010.

MATURANO, Y. P.; ASSAF, L. A. R.; TORO, M. E.; NALLY, M. C.; VALLEJO, M.; FIGUEROA, L. I. C.; COMBINA, M.; VAZQUEZ, F. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 1-2, p. 43–50, Apr. 2012.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer: part II: flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **MBAA Technical Quarterly**, v. 12, n.3, p. 151-168, 1975.

MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J. M.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, S.; HERAS-VÁZQUEZ, F. J. L.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n.3, p. 297-304, Apr. 2003.

NAKAYAMA, S. Inter-MITE polymorphisms of a newly identified MITE show relationships among sugarcane (*Saccharum*) species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 7, p. 1389-1396, Oct. 2012.

NOBREGA, I. C. C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do “headspace” e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p.210-216, May-Aug. 2003.

OLIVEIRA, M. E. S.; PANTOJA, L.; DUARTE, W. F.; COLLELA, C. F.; VALARELL, L. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R.; Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilized yeast cell fermentation. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, Aug. 2011.

PARAPOULI, M.; HATZILOUKAS, E.; DRAINAS, C.; PERISYNAKIS, A. The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavor. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 37, n.1, p. 85–93, Jan. 2010.

PERESTRELO, R.; FERNANDES, A.; ALBUQUERQUE, F.; MARQUES, J.; CAMARA, J. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: identification of the main odorants compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, n. 1-2, p. 154-164, Jan. 2006.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E.C.; PRADO, G.M.; SOUSA, P. H. M.; MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p. 98-103, Jan-Mar. 2006.

PLUTOWSKA, B.; WARDENCKI, W. Application of gas chromatography–olfactometry (GC–O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages–A review. **Food Chemistry**, v. 107, n.1, p. 449–463, Mar. 2008.

PRATI, P.; MORETTI, R. H.; CARDELLO, H. M. A. B. Elaboração de bebida composta por mistura de garapa parcialmente clarificada-estabilizada e suco de frutas ácidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 147-152, Jan.-Mar. 2005.

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v. 42, p. 873–884, 1986.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Production and characterization of wine from mango fruit (*Mangifera indica* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1345-1350, Dec. 2005.

REDDY, L. V.; KUMAR, Y. S.; REDDY, O. V. Analysis of volatile aroma constituents of wine produced from Indian mango (*Mangifera indica* L.) by GC-MS. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 183-91. Jun. 2010.

REMIZE, F.; SABLAYROLLES, J.M; DEQUIN, S. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n.3, p. 371– 378, Mar. 2000.

RITA, R.; ZANDA, K.; DAINA, K.; DALIJA, S. Compositions of aroma compounds in fermented apple juice: Effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1709–1716, 2011.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; VALDEZ-LÓPEZ, E.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. Characterization of a wine-like beverage obtained from sugarcane juice. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 44-452, Jun. 2005.

RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C.; MANFEDINI, S. **Como Elaborar Vinho de Qualidade na Pequena Propriedade**. Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, 1994. 52 p.

RODRÍGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; BROOCK, M. V.; VALLÉS, S.; CABALLERO, A. C. Selection and preliminary characterization of β -glycosidases producer Patagonian wild yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n.6-7, p. 812–820, Nov. 2007.

ROZENBAUM, H. F.; PATITUCCI, M. L.; ANTUNES, O. A. C.; PEREIRA JR, N. Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 3, p. 273-279, Jul-Sept, 2006.

SADINENI, V.; KONDAPALLI, N.; OBULAM, V. S. R. Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p.1353-1360, Dec. 2012.

SALO, P. Determining the odor thresholds for some compounds in alcoholic beverages. **Journal of Food Science**, v. 35, n. 1, p. 95–99, Jan. 1970.

SANTO, D. E.; GALEGO, L.; GONÇALVES, T.; QUINTAS, C. Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. **Food Research International**, v. 47, n. 1, p. 45–50, Jun. 2012.

SANTOS, C. C. A. A.; DUARTE, W. F.; CARREIRO, S. C.; SCHWAN, R. F. Inoculated fermentation of orange juice (*Citrus sinensis* L.) for production of a citric fruit spirit. **Journal of Institute of Institute of Brewing**, v.119, n. 4, p. 280–287, Sep. 2013.

SANTOS, S. C.; ALMEIDA, S. S.; TOLEDO, A. L.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**. 5a SIPAL, p. 47-50, Mar. 2005.

SELLI, S.; CANBAS, A.; VARLET, V.; KELEBEK, H.; PROST, C.; SEROT, T. Characterization of the most odor-active volatiles orange wine made from a Turkish cv. Kozan (*Citrus sinensis* L. *Osbeck*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 227–234. Jan. 2008.

SIEBERT, T. E.; SMYTH, H. E.; CAPONE, D. L.; NEUWÖHNER, C.; PARDON, K. H.; SKOUROUMOUNIS, G. K.; HERDERICH, M. J.; SEFTON, M. A.; POLLNITZ, A. P. Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 4, p. 937-947, Feb. 2005.

SOUFLEROS, E. H.; PISSA, P.; PETRIDIS, D.; LYGERAKIS, M.; MERMELAS, K.; BOUKOUVALAS, G.; TSIMITAKIS, E. Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine, sensory evaluation and optimisation of its composition. **Food Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 487-500, Dec. 2001.

SPANO, G.; RINALDI, A.; UGLIANO, M.; BENEDUCE, L.; MASSA, S. A β -glucosidase producing gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses, **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, n. 4, p. 855- 861, Apr. 2005.

STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices**. 2^a ed. Orlando Flórida: Academic Press. 1993. 338p.

SWANGKEAW, J.; VICHITPHAN, S.; BUTZKE, C. E.; VICHITPHAN, K. Characterization of β -glucosidases from *Hanseniaspora* sp. and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 423-430, Feb. 2011.

SWIEGERS, J.H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, n. 2, p. 139-173, Jul. 2005a.

SWIEGERS, J.H.; WILLMOUNT, R.; HILL-LING, A.; CAPONE, D. L.; PARDON, K. H.; ELSEY, G. M.; HOWELL, K. S.; LOPES, M. A. B.; SEFTON, M. A.; LILLY, M.; PRETORIUS, I.S. Modulation of volatile thiol and esters aromas in wine by modified wine yeast. **Proceedings of the Weurman Flavor Research**, Denmark, 2005b.

TAHERZADEH, M. J.; ADLER, L.; LIDEN, G. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol - A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. -2, p. 53–66, Jul. 2002.

THEPKAEW, N.; CHIMSRI, N. Fermentation of pineapple juice using wine yeasts: kinetics and characteristics. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2013.

UGLIANO, M.; GENOVESE, A.; MOIO, L. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 5073–5078, Jul. 2003.

XU, Y.; FAN, W.; QIAN, M. C. Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.8, p. 3051–3057, Apr. 2007.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; ANJOS, J. P. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. **Quimica Nova**, v. 34, n. 2, p. 320-324, Nov. 2011.

ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F.S. **Analisis y produccion de vino**. ed. Acribia, S.A., 2001, p. 101–119.