Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização da comunidade bacteriana contaminante do processo fermentativo para produção de etanol e o impacto no metaboloma da fermentação

Maria Letícia Bonatelli

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2016

Maria Letícia Bonatelli
Licenciada em Ciências Biológicas

Caracterização da comunidade bacteriana contaminante do processo fermentativo para produção de etanol e o impacto no metaboloma da fermentação

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Bonatelli, Maria Letícia
Caracterização da comunidade bacteriana contaminante do processo fermentativo para produção de etanol e o impacto no metaboloma da fermentação / Maria Letícia Bonatelli. - - Piracicaba, 2016.
129 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Fermentação 2. Contaminação bacteriana 3. Análise independente de cultivo 4. Metabolômica I. Título

CDD 663.13
B699c

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedico
Ao meu querido pai Renato por se fazer tão presente durante minha jornada acadêmica, eu sei que estamos sempre lado a lado.

Ofereço
À minha querida e amada mãe Mirian por ser sempre a minha fortaleza.
Aos meus amados irmãos Guilherme e Gabriel pelo ótimo
convívio e relacionamento durante todos esses anos!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida permeada por tantas alegrias e oportunidades.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate pela confiança e orientação durante o encaminhamento do doutorado.

À Prof. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi pelos diversos conselhos e auxílios durante a execução do projeto, e pela amizade em todos os aspectos da vida!

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pelos inúmeros conselhos sobre diversidade;

Ao querido Bonde do Rucas, sempre divertindo o meu dia a dia. Pela amizade, conselhos e saídas, um muito obrigada! Vocês fizeram do meu doutorado um período de muita alegria. Amo vocês!

À Thais e Ilara por todo o suporte com as análises de cromatografia. Não preciso falar o quanto vocês foram essenciais na minha caminhada, né?

À querida Dr. Jaciane Lutz Ienczak pelos ensinamentos sobre fermentação e à todas as pessoas do CTBE/CNPEM por tanta ajuda e paciência durante as fermentações. Além de ótimos colegas de trabalho, também fiz excelentes amigos!

Aos demais amigos do Laboratório Max Feffer e do Laboratório de Genética de Micro-organismos “João Lucio de Azevedo”, um muito obrigada!

Aos demais que, de alguma forma, colaboraram com o trabalho, podem ter certeza de que sua ajuda não foi esquecida nem desvalorizada!

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (proc: 2013/08431-0) pelo apoio financeiro.

“We learn wisdom from failure more than from success:
we often discover what will do, by finding out what will not do;
and ***he who never made a mistake, never made a discovery.****”*

Samuel Smiles

SUMÁRIO

RESUMO.....13
ABSTRACT.....15
1 INTRODUÇÃO.....17
1.1 Revisão bibliográfica.....17
1.1.1 Etanol no Brasil.....17
1.1.2 Processo de fermentação.....19
1.1.3 Contaminação no processo fermentativo.....21
1.1.4 Estudo de compostos metabólicos.....22
Referências.....24
2 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA CONTAMINANTE DA FERMENTAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL.....29
Resumo.....29
Abstract.....29
2.1 Introdução.....30
2.2 Material e métodos.....32
2.2.1. Coleta das amostras.....32
2.2.2 Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rDNA.....32
2.2.3 Análise das sequências.....33
2.2.4. Predição do metagenoma.....34
2.2.5. Abundância Bacteriana.....34
2.3. Resultados.....35
2.3.1 Abundância da comunidade bacteriana das usinas de fermentação de cana-de-açúcar...35
2.3.2 Acessando a diversidade bacteriana através de metodologia independente de cultivo...35
2.3.3 Predição do metagenoma.....39
2.4 Discussão.....42
Referências.....45
3 ESTABELECIMENTO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE METABÓLITOS DE FERMENTAÇÃO POR GC-MS.....51
Resumo.....51
Abstract.....51
3.1 Introdução.....52
3.2 Material e Métodos.....53

3.2.1 Condução de ensaios fermentativos.....53
3.2.1.1 Pré-inóculo e inóculo da levedura *S. cerevisiae* CAT-1.....53
3.2.1.2 Propagação celular da levedura *S. cerevisiae* CAT-1..... 55
3.2.1.3. Processo de fermentação.....56
3.2.1.4 Análises da fermentação.....57
3.2.1.5 Cálculos dos parâmetros do processo fermentativo.....57
3.2.2 Otimização do protocolo de análise de metabólitos da fermentação por GC-MS.....58
3.2.2.1 Extração de metabólitos.....58
3.2.2.2 Análise por GC-MS e processamento dos dados.....59
3.2.3 Análise dos metabólitos de fermentação por GC-MS.....60
3.2.3.1 Extração de metabólitos.....61
3.2.3.2 Análise por GC-MS e processamento de dados.....61
3.2.3.3 Análise estatística dos dados.....62
3.3 Resultados.....62
3.3.1 Ensaios fermentativos com levedura *S. cerevisiae* CAT-1.....62
3.3.2 Otimização do protocolo de análise de metabólitos de fermentação por GC-MS.....64
3.3.3 Classificação dos metabólitos.....66
3.4 Discussão.....73
Referências.....78
4 METABOLÔMICA NÃO-ALVO DA FERMENTAÇÃO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CAT-1 NA PRESENÇA DO CONTAMINANTE *LACTOBACILLUS FERMENTUM* (I-2).....81
Resumo.....81
Abstract.....81
4.1 Introdução.....82
4.2 Materiais e métodos.....83
4.2.1 Ensaios fermentativos com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *Lactobacillus fermentum* (I-2).....83
4.2.1.1 Inóculo e propagação celular de *S. cerevisiae* CAT-1.....83
4.2.1.2 Pré-inóculo e inóculo celular de *L. fermentum* (I-2).....84
4.2.1.3 Ensaio fermentativo.....84
4.2.1.4 Análises da fermentação.....85
4.2.2 Análise dos metabólitos de fermentação por GC-MS.....85
4.2.2.1 Extração de metabólitos.....85

4.2.2.2 Análise por GC-MS e processamento de dados.....86
4.2.2.3 Análise estatística dos dados.....86
4.3 Resultados.....86
4.3.1 Ensaio fermentativo com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *Lactobacillus fermentum* (I-2).....86
4.3.2 Análise dos metabólitos da fermentação através de GC-MS.....90
4.4 Discussão.....98
Referências.....104
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....109
ANEXOS.....111

RESUMO

Caracterização da comunidade bacteriana contaminante do processo fermentativo para produção de etanol e o impacto no metaboloma da fermentação

O processo fermentativo da *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol tem grande relevância para o Brasil por ser responsável por uma fonte de energia renovável que é amplamente usada na indústria automotiva. No entanto, em escalas industriais, a fermentação da levedura não ocorre em ambiente asséptico, sendo que diferentes micro-organismos contaminantes são capazes de crescer, competir por nutrientes e até mesmo interferir na fermentação da *S. cerevisiae.* A fim de melhor compreender quem são os micro-organismos contaminantes e o que fazem na dorna de fermentação, foi utilizado uma abordagem polifásica. O levantamento da microbiota bacteriana presente nas usinas do estado de São Paulo foi realizado através de técnicas independentes de cultivo. Posteriormente, foram realizados ensaios fermentativos com *S. cerevisiae* CAT-1 na presença do contaminante *Lactobacillus fermentum* (I-2) para a análise da interação destes na dorna de fermentação. A análise foi realizada por metabolômica acessada através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e, para isso, incialmente foi estabelecida uma metodologia eficiente para análise através de GC-MS. Nas usinas, foi reportada uma porcentagem de *Lactobacillus* maior do que a descrita e a população bacteriana pareceu ser característica de cada usina e persistente ao longo do tempo. Já o estabelecimento da metodologia de análise de metabólitos da fermentação por GC-MS possibilitou a identificação de 261 metabólitos, e as três classes mais abundantes foram *Carbohydrates and carbohydrate conjugates* (16%), *Carboxylic acids and derivatives* (12%) e *Fatty Acyls* (5%). E no ensaio de *S. cerevisiae* CAT-1 na presença do contaminante *L. fermentum* (I-2), possibilitou a identificação de 208 metabólitos, onde 50 foram diferencialmente abundantes. Além disso, a via glicolítica foi reforçada na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1, sendo que nas fermentações de *S. cerevisiae* (CAT-1) na presença de *L. fermentum* (I-2), a produção de aminoácidos a partir do *glutamate* pareceu ser importante. Desta forma, uma análise polifásica pode auxiliar no esclarecimento da relação dos micro-organismos contaminantes com a levedura dentro da dorna de fermentação.

Palavras-chave: Fermentação; Contaminação bacteriana; Análise independente de cultivo; Metabolômica

ABSTRACT

Characterization of contaminating bacterial community from ethanol fermentation process and the impact on the metabolome

The fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production has great importance to Brazil since it is responsible for the production of a renewable energy source that is widely used in the automotive industry. However, in industrial scale, the yeast fermentation does not occur in an aseptic environment, where different contaminant microorganisms are capable of growing, competing for nutrients and even interfering with the *S. cerevisiae* fermentation. In order to better understand who the contaminating microorganisms are and what they do in the fermenter, it was used one polyphasic approach. The survey of the bacterial microflora present in two different São Paulo state distilleries was carried out by cultivation independent techniques. Subsequently, fermentation assays were performed with *S. cerevisiae* CAT-1 in the presence of the contaminant *Lactobacillus fermentum* (I-2) to analyze the interaction of these microorganisms in the fermenter. The analysis was performed through metabolomics accessed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and, for that, initially was established an efficient methodology for fermentation metabolite analysis by GC-MS. In the distilleries, it was reported a higher percentage of *Lactobacillus* than ever described and bacterial population appeared to be characteristic of each distillery and persistent over time. After the establishment of fermentation metabolite analysis methodology by GC-MS, it was possible to identify 261 metabolites, and the three most abundant classes were Carbohydrates and carbohydrate conjugates (16%), Carboxylic acids and derivatives (12%) and Fatty acyls (5%). In the fermentation assay of *S. cerevisiae* CAT-1 in the presence of the contaminant *L. fermentum* (I-2), it was possible to identify 208 metabolites, where 50 were differentially abundant. In addition, the glycolytic pathway was enhanced in the fermentation of *S. cerevisiae* CAT-1, and in fermentation of *S. cerevisiae* (CAT-1) in the presence of *L. fermentum* (I-2), the production of amino acids from glutamate appeared to be important. Thus, a polyphasic analysis can help in the understanding of the relationship between contaminating microorganisms with the yeast in the fermenter.

Keywords: Fermentation; Bacterial contamination; Cultivation independente analysis; Metabolomics

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar tem crescido e ganhado espaço no mercado desde a década de 70, quando foi implementado o programa Pró-Álcool. Avanços na indústria sucroalcooleira, assim como na criação de novas tecnologias automotivas – como é o caso de carros 'FLEX' – criaram um cenário onde o etanol é uma atrativa opção frente aos combustíveis derivados do petróleo.

Tais avanços ocorreram devido ao alto investimento em ciência e tecnologia no setor sucroalcooleiro, permitindo o melhoramento genético e melhores condições de cultivo da cana-de-açúcar; além da seleção e identificação de leveduras que são resistentes e eficientes ao processo industrial; de avanços na tecnologia fermentativa; entre outros.

No entanto, a produção de etanol em escala industrial não ocorre em condições assépticas. A presença de micro-organismos contaminantes no processo de fermentação da cana-de-açúcar para a produção de etanol pode ocasionar sérios problemas, como a perda do rendimento e produtividade fermentativa, floculação, entre outros, que podem causar prejuízo para a indústria.

Neste contexto, as bactérias ácido láticas têm sido frequentemente reportadas como os principais contaminantes do processo. No entanto, os estudos desta comunidade geralmente utilizam metodologias dependentes de cultivo, que podem subestimar a diversidade presente e, apesar da importância destas bactérias para o processo, pouco se sabe sobre a fisiologia da interação entre a bactéria e a levedura.

Desta forma, o presente trabalho realizou um levantamento da comunidade microbiana contaminante do processo fermentativo, utilizando técnica independente de cultivo, de duas usinas do estado de São Paulo ao longo do tempo. Além disso, na tentativa de compreender a fisiologia da interação levedura-bactéria contaminante, foi estabelecida uma metodologia de análise de metabólitos através da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e que foi utilizada para estudar ensaios fermentativos da *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 na presença de *Lactobacillus fermentum* (I-2).

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Etanol no Brasil

A primeira política oficial como medida “pró-álcool” estabelecida no Brasil foi no ano de 1931, e desde então, muitas foram as tentativas de se misturar etanol com gasolina para utilização em veículos automotores. Porém, somente na década de 70, após a crise mundial do petróleo, juntamente com a crise brasileira no setor de produção de açúcar, o governo começou a incentivar a produção e uso do etanol intensivamente, com a criação do Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool).

Na primeira fase do programa, mais álcool anídrico foi misturado à gasolina, chegando a adição de 20%, limite no qual os carros, com apenas poucas modificações, poderiam operar eficientemente. Caso utilizado este limite máximo (20%) a produção de álcool aumentaria de 600.000 para 3 bilhões de litros por ano (DE CASTRO SANTOS, 1985). Na segunda fase do programa, iniciou-se a fabricação e uso de carros movidos exclusivamente a etanol, produção que foi iniciada na década de 80 e, já na metade desta década, cerca de 90% dos carros vendidos funcionavam exclusivamente com etanol. Em ambas as fases do programa Pró-Álcool, a intervenção e subsídios do governo foram fundamentais para aumentar a produção e o consumo de álcool, assim como no desenvolvimento de novas tecnologias (OLIVEIRA, 2002).

É importante citar as modificações feitas pelo estado que possibilitaram reestruturação da produção de etanol no Brasil: mudança de política na agricultura e na indústria para atingir os objetivos do programa, como expansão da produção de cana-de-açúcar e construção de usinas; investimento na pesquisa; regulação e incentivo ao setor privado para procurar inovações e investir em atividades relacionadas ao etanol e, finalmente, incentivo aos donos dos automóveis a mudar para carros movidos a etanol, aumentando a demanda do produto (OLIVEIRA, 2002).

Entretanto, na década de 80 houve uma grande baixa no preço do petróleo, desacelerando a implementação do programa Pró-álcool. Nesta época, o etanol custava cerca de três vezes mais que a gasolina, porém o subsídio do governo cobria essa diferença. No entanto, desde a década de 90, estes subsídios foram progressivamente removidos e em 2004 o etanol tornou-se competitivo independente do apoio governamental (GOLDEMBERG, 2007).

Vários são os fatores que contribuíram para a diminuição de subsídios, como o aumento da produtividade da cultura de cana-de-açúcar, em função de melhor qualidade do solo, condições climáticas favoráveis, boas práticas agrárias, além do

próprio manejo agrícola. Além de alterações na agricultura, a utilização do bagaço na produção de energia no processo industrial, que diminuiu a utilização de combustível fóssil no processo, diminuiu o custo e, consequentemente, fez com que o balanço energético do etanol produzido de cana seja a melhor das tecnologias de produção de etanol existentes. Outra consideração importante é a utilização, hoje em dia, de carros com a tecnologia “FLEX”, que permitem ao consumidor optar por etanol como combustível (GOLDEMBERG et al., 2004).

No ano de 2015, segundo levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o total de cana-de-açúcar moída na safra 2015/16 foi de 665,6 milhões de tonelada, com aumento de 4,9% em relação à safra de 2014/15. Com relação à produção de açúcar e etanol a produção para a mesma safra foi de 33,49 milhões de tonelada e 30,5 bilhões de litros, respectivamente. Sendo que deste total, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a produção de cana-de-açúcar no estado de São Paulo representou mais de 60% da produção nacional.

1.1.2 Processo de fermentação

O processo responsável pela produção de álcool a partir da cana-de-açúcar é a fermentação. Este ocorre por intermédio das leveduras, fungo que tem sua aplicação na cultura humana datada de mais de 7000 anos atrás, na fermentação espontânea de uvas danificadas, dando origem à bebida alcoólica conhecida hoje como vinho (CHAMBERS; PRETORIUS 2011).

Aplicada à produção de etanol, a levedura mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisae*, micro-organismo exaustivamente estudado e com vasto conhecimento a cerca de seu genoma e funcionamento celular devido sua importância no processo de fermentação alcoólica, além de o mesmo ser um microrganismo modelo de organismos eucariotos (FORSTER et al., 2003).

O processo de produção de etanol utilizado no Brasil foi desenvolvido na década de 1930 por Firmino Boinot em usinas francesas da região de Melle (Figura 1). No entanto, durante os últimos 30 anos, algumas etapas do processo sofreram otimizações, o que possibilitou um aumento no rendimento da fermentação de 75-80% para 92-93%. (AMORIM et al, 2011).

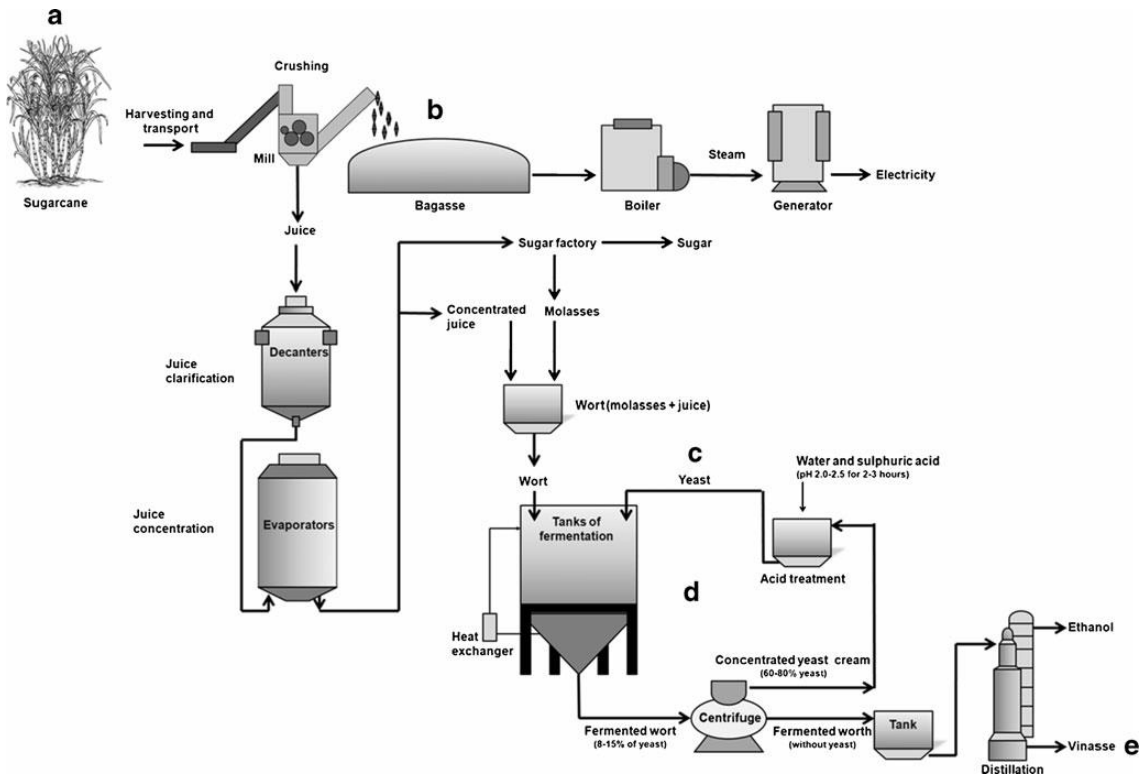

Figura 1 – Ilustração simplificada mostrando a produção de bioetanol. A. Introdução de toletes para moagem. B. Produção do bioetanol através do bagaço. C. Seleção de novas cepas de leveduras mais adaptadas ao processo industrial de fermentação. D. Contaminação do processo fermentativo e reciclagem das células. E. Redução do volume de vinhaça (Amorim et al., 2011)

O processo de fermentação no Brasil ocorre em reatores de grande capacidade (0,5 a 3 milhões de litros) onde é depositado o mosto de cana-de-açúcar ou melaço diluído em água, ou ainda uma mistura dos dois, e o fermento, composto por leveduras em alta densidade celular (10-15% p/v). O processo de fermentação é curto, cerca de 6-12 horas, sendo depois centrifugado o vinho para recuperação das leveduras, que serão utilizadas novamente em um novo ciclo de fermentação, após tratamento com ácido sulfúrico (pH 2.0 – 2.5) (AMORIM et al, 2011).

As fermentações industriais podem ser classificadas em processos descontínuos e contínuos, baseado no tipo de alimentação e desenvolvimento da fermentação. O primeiro processo é empregado em cerca de 85% das usinas e o segundo em 15% (GODOY et al, 2008). Na fermentação descontinuada do tipo batelada alimentada, o processo se inicia com o enchimento da dorna com mosto e fermento e, após o esgotamento do açúcar, há o esvaziamento da dorna e as células recuperadas serão utilizadas em outro reciclo. Já no processo contínuo, as dornas são ligadas em série e o processo ocorre em cascata, onde há um fluxo entre

as dornas de mosto e fermento, sendo que os primeiros tanques possuem maior concentração de açúcar e os últimos maior concentração de etanol. Após sair do último reator, o vinho levedurado é centrifugado e as células retornaram ao processo.

Levando em conta os dois principais componentes da fermentação, cana-de-açúcar e leveduras, avanços na tecnologia destes também foram responsáveis pelo aumento da produção de etanol. A criação do programa de genômica da cana-de-açúcar pela FAPESP no final da década de 90 abriu caminho para estabelecimento de novas empresas de inovações biotecnológicas no setor sucroalcooleiro, principalmente na região de Campinas/SP, que atraíram a atenção de todo o mundo (ARRUDA, 2011).

Além disso, a seleção de linhagens *S. cerevisiae* eficientes e resistentes ao processo fermentativo, foram de extrema importância. Algumas das linhagens comerciais conhecidas, como levedura da Baker, CAT-1 e PE-2, são amplamente utilizadas nas usinas. Entretanto, ainda existe interesse e necessidade de isolar e selecionar linhagens promissoras para o processo fermentativo (BASSO et al, 2008).

1.1.3 Contaminação no processo fermentativo

Durante a moagem, os micro-organismos presentes no colmo da cana são extraídos juntamente com o caldo, onde a sua proliferação pode ocorrer imediatamente pois o meio contém um ambiente muito nutritivo, rico em substâncias orgânicas e inorgânicas. Estes micro-organismos utilizam o açúcar presente como fonte de energia e produzem uma variedade de compostos orgânicos ácidos, açúcares reduzidos, etanol e outros polímeros de cadeia longa que podem interferir negativamente nos passos posteriores da cadeia fermentativa (SOLOMON, 2008).

A maioria do processo industrial de fermentação ocorre na presença de uma quantidade significativa de contaminantes bacterianos. Uma diversidade de bactérias Gram-negativas e positivas já foram isoladas do processo fermentativo, como *Pediococcus, Enterococcus, Acetobacter, Gluconobacter* e *Clostridium* (ROSALLES, 1989; GALLO, 1990; BISCHOFF et al, 2008), sendo que as mais comuns são espécies do gênero *Lactobacillus* (LUCENA et al., 2010). A presença de bactérias láticas ácidas no processo é responsável por fermentação de compostos orgânicos em ácido lático, o que leva a uma redução na produção de etanol, além de poder inibir o crescimento das leveduras (NGANG et al., 1990). Há também a

presença de outros fungos e leveduras selvagens após a moagem da cana (ALLI; FAIRBAIRN; GARCIA, 1983), os mesmos podem interferir no processo fermentativo realizado com maior eficiência pelas leveduras comerciais.

Parte dos micro-organismos contaminantes presentes no processo fermentativo pode ser atribuída aos micro-organismos presentes na cana-de-açúcar. Magnani et al. (2010) fez um levantamento da diversidade de micro-organismos endofíticos cultivados presentes na folha e colmo, chegando a representantes dos grupos *Enterobacteriaceae, Bacilli, Pseudomonadaceae* e um isolado do gênero *Curtobacterium*. Mendes et al. (2007) já havia reportado em seu trabalho a presença de isolados dos gêneros *Pantoea, Pseudomonas, Microbacterium*, sendo que *Burkholderia* foi reportado em abundância. Pillai et al. (2011), por sua vez, estudou a diversidade presente no melaço de cana utilizado na fermentação e isolou micro-organismos dos gêneros bacterianos *Pseudomonas, Bacillus, Escherichia, Satphylococcus* e *Micrococcus* e fúngicos *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* e *Rhizopus,* e, por fim, quatro espécies de leveduras *Saccharomyces cerevisae, Torulopsis glabrata, Candida glabra* e *Candida albicans*.

Porém, estudar apenas os micro-organismos acessados através do cultivo diz muito pouco sobre a realidade uma vez que podem ser influenciadas por muitos fatores e subestimar a diversidade presente (RASCHE et al., 2006; ANDREOTE; AZEVEDO; ARAUJO, 2009), além de representarem uma pequena porcentagem do total de micro-organismos existentes, cerca de 0,1%. Técnicas que utilizam genes conservados e de grande importância para os micro-organismos, como é o caso dos genes que codificam subunidades ribossomais (16S e 18S), ou de regiões destas (ITS em fungos, por exemplo), revelam muita informação relacionada às comunidades presentes em diversos meios, destacando as técnicas de DGGE, pirossequenciamento e, mais recentemente, utilização da tecnologia Illumina (ANDREOTE, 2006; BARTRAM et al., 2011; BUEÉ et al., 2011). Costa et al. (2015) realizaram um levantamento de diferentes pontos do processo fermentativo e analisaram a diversidade de micro-organismos contaminantes através do pirossequenciamento do gene 16S rDNA. Os autores identificaram uma diversidade maior do que a previamente reportada, no entanto, este trabalho não estudou o ambiente da dorna de fermentação propriamente dito.

1.1.5 Estudo de compostos metabólicos

O metabôloma pode ser definido como o conjunto de metabólitos de baixa massa molecular produzidos por uma célula em condições fisiológicas específicas. Mudanças e/ou determinados estados fisiológicos podem ocasionar alterações genéticas – como o silenciamento ou a superexpressão de um gene – e consequentemente alterações nos transcritos e nas proteínas encontradas na célula. Porém, espera-se que o metaboloma seja mais sensível a tais perturbações porque, apesar de mudanças no nível de expressão de uma proteína, poderá ter pouca influência na ação desta, essas mudanças podem, e de fato tem grande efeito nos metabólitos intermediários que são produzidos (KELL et al, 2005).

Existem muitas maneiras de se analisar os metabólitos de um organismo em um dado período e situação, como através de análises alvo, perfil metabólico, *finger* e *footprinting*. O neologismo da Era pós-genômica no contexto da metabolômica é geralmente aceito, porém, muitas vezes, contém diferentes significados (OLDIGES et al, 2007). Com relação ao estudo do metaboloma de micro-organismos, o *fingerprinting* consiste no estudo dos metabólitos produzidos intracelularmente, enquanto que o *footprinting* foca nos que são produzidos extracelularmente (ALLEN et al., 2003).

Análises do conteúdo metabólico intracelular podem apresentar algumas dificuldades, além de muitas vezes demandarem um tempo muito maior que análises do conteúdo extracelular. Sendo um meio mais dinâmico, há a necessidade da realização de um *quenching* muito eficiente para parar o metabolismo celular, além da necessidade da realização de uma separação entre os metabólitos intra e extracelulares. Dessa maneira, esse é um processo que acaba oferecendo baixa reprodutibilidade (VILLAS-BÔAS et al., 2005).

A análise de *footprinting* metabólico mensura a alteração de compostos químicos e bioquímicos provocada por um micro-organismo no ambiente. Uma célula viva secreta ao meio enzimas e metabólitos que interagem com e modificam os componentes do meio, resultando em perfis metabólicos que são altamente específicos para a espécie e/ou *background* genético (ALLEN et al., 2003, LIN et al., 2004).

Além disso, muitos são os processos bioquímicos que podem estar relacionados com o meio extracelular, como por exemplo, a degradação de substratos complexos. Esse é o caso da fermentação, sendo que muito dos caminhos metabólicos e seus principais componentes já são conhecidos, assim o

monitoramento destes metabólitos se torna mais simples (NASCIMENTO; CARDOSO; FRANCO, 2008). Sue et al. (2011) utilizaram-se do *footprinting* para determinar a contaminação da fermentação por microalgas. Observaram que a técnica é capaz de detectar eficientemente os contaminantes e de uma maneira mais sensível que outras técnicas tradicionalmente utilizadas.

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é a metodologia analítica mais utilizada para realizar perfis metabólicos de amostras biológicas. É uma técnica sensível, apresenta boa resolução e permite reprodutibilidade (SUE et al, 2011). Para o estudo das substâncias mais conhecidas relacionadas à fermentação, como etanol, ácido acético, glicerol, açúcares, etc (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996), essa pode ser uma técnica utilizada pois cobrirá esses metabólitos. Além disso, a técnica permite a identificação de um grande espectro de moléculas, o que ajudará a traçar um perfil metabólico mais fidedigno ao que ocorre durante o processo de fermentação. Com a utilização da técnica GC-MS, Howell et al. (2006) estudaram o perfil metabólico de leveduras na fermentação de uva, que revelou a interação entre diferentes espécies de *Saccharomyces* spp. presentes no processo.

Referências

ALLEN, J.; DAVEY, H.M., BROADHURST, D.; HEALD, J.K.; ROWLAND, J.J.; OLIVER, S.G.; KELL, D.B. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 6, p. 692-696, 2003.

ALLI, I.; FAIRBAIRN, R.; BAKER, B.E.; GARCIA, G. The effects of ammonia on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 291-299, 1983.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.

ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 417-432, 2009.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.

ARRUDA, P. Perspective of the sugarcane industry in Brazil. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, n. 1, p. 3-8, 2011.

BARTRAM, A.K.; LYNCH, M.D.; STEARNS, J.C.; MORENO-HAGELSIEB, G.; NEUFELD, J.D. Generation of multimillion-sequence 16S rDNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 3846-3852, 2011.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. **Processo de produção de álcool:** controle e monitoramento**.** 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. p. 46.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, p. 1155–1163, 2008.

BISCHOFF, K.M.; LIU, S.; LEATHERS, T.D.; WORTHINGTON, R.E.; RICH, J. O. (2009). Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 103, p. 117-122, 2009.

BUEE, M.; REICH, M.; MURAT, C.; MORIN, E.; NILSSON, R.H. UROZ, S.; MARTIN, F. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, Cambridge, v. 184, p. 449–456, 2009.

CHAMBERS, P.J.; PRETORIUS, I.S. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. **European Molecular Biology Organization reports**, Oxford, v. 11, p. 914 – 920, 2010.

COSTA, O.Y.; SOUTO, B.M.; TUPINAMBÁ, D.D.; BERGMANN, J.C.; KYAW, C.M.; KRUGER, R.H.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 42, p. 73-84, 2015.

SANTOS, M.H.C. **Alcohol as fuel in Brazil:** an alternative energy policy and politics. 1985. 718p. Tese de Doutorado em Ciências Políticas - Massachusetts Institute of Technology, 1985.

FÖRSTER, J.; FAMILI, I.; FU, P.; PALSSON, B.Ø.; NIELSEN, J. Genome-scale reconstruction of the Saccharomyces cerevisiae metabolic network. **Genome Research**, New York, v. 13, n. 2, p. 244-253, 2003.

GALLO, C.R**. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** 1990. 388p. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos – Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

GODOY, L.M.F; OLSEN, J.V.; COX, J.; NIELSEN, M.L.; HUBNER, N.C.; FRÖHLICH, F. WALTHER, T.C.; MANN, M. Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. **Nature**, London, v. 455, n. 7217, p. 1251-1254, 2008.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, Chicago, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; NASTARI, P.M.; LUCON, O. Ethanol learning curve—the Brazilian experience. **Biomass and Bioenergy**, Inglaterra, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2004.

HOWELL, K.S.; COZZOLINO, D.; BARTOWSKY, E.J.; FLEET, G.H.; HENSCHKE, P.A. Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 91-101, 2006.

KELL, D.B.; BROWN, M.; DAVEY, H.M.; DUNN, W.B.; SPASIC, I.; OLIVER, S. G. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. **Nature reviews microbiology**, London, v. 3, n. 7, p. 557-565, 2005.

LIN, H.; HOFFMANN, F.; ROZKOV, A.; ENFORS, S.O.; RINAS, U.; NEUBAUER, P. Change of extracellular cAMP concentration is a sensitive reporter for bacterial fitness in high-cell-density cultures of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 87, n. 5, p. 602-613, 2004.

LUCENA, B.T.; DOS SANTOS, B.M.; MOREIRA, J.L.; MOREIRA, A.P.; NUNES, A.C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F.L.; DE MORAIS, M.A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC microbiology**, London, v. 10, p. 298, doi:10.1186/1471-2180-10-298, 2010.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F. O., SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, London, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A., ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

NASCIMENTO, E.S.P.; CARDOSO, D.R.; FRANCO, D.W. Quantitative ester analysis in cachaça and distilled spirits by gas chromatography− mass spectrometry (GC− MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 14, p. 5488-5493, 2008.

NGANG, J.J.E.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Stimulation of lactobacilli during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 14, n. 8, p. 741-746, 1992.

OLDIGES, M.;LÜTZ, S.; PFLUG, S.; SCHROER, K.; STEIN, N.; WIENDAHL, C. Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, n. 3, p. 495-511, 2007.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H. V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar. Fermentec**. Piracicaba: FEALQ/ESALQ/USP, 1996. 89p.

PILLAI, J.S., DANESH, N.; PUTTAIAH, E.T.; GIRISH, K. Microbial diversity in solid waste molasses of Sugar Industry, Aranthangi, Tamilnadu. **International Journal of Environmental Sciences**, New York, v. 2, n. 2, p. 723, 2011.

RASCHE, F.; HÖDL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam v. 56, n. 2, p. 219-235, 2006.

ROSALES S.Y.R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica**: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. 1989. 200p. Tese de Doutorado em Microbiologia Aplicada - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquista”, Rio Claro, 1989.

SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar Techology**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 109-123, 2009.

SUE, Tiffany et al. Monitoring microbial contamination in microalgae fermentation processes using metabolic footprint analysis–an exometabolomics approach. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. AEM. 00469-11, 2011.

VILLAS-BÔAS, S.G.;MAS, S.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.;NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 24, n. 5, p. 613-646, 2005.

2 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA CONTAMINANTE DA FERMENTAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Resumo

O Brasil é o maior produtor de etanol de cana-de-açúcar e sua demanda tem aumentado nos últimos anos pois esse é considerado uma alternativa sustentável ao combustível fóssil. O processo de fermentação pode ser operado em usinas em modo batelada alimentada ou contínuo. Uma consequência da produção industrial em larga escala do etanol é a contaminação bacteriana nos tanques de fermentação, que pode ser responsável por perdas econômicas significativas. Desta forma, foi acessado o perfil das comunidades bacterianas de duas usinas no estado de São Paulo: uma que opera em processo descontínuo em batelada alimentada e outra em modo contínuo. As comunidades bacterianas foram acessadas com método independente de cultivo através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA na plataforma Illumina, e o qPCR foi utilizado para quantificar a abundância total de bactérias. Os dois modos de produção de etanol mostraram abundância bacteriana semelhantes, em torno de 10^5 cópias do gene/mL. No entanto, o sequenciamento do gene 16S rDNA mostrou diferenças no perfil bacteriano entre as duas usinas. Foram relatados 219 gêneros pertencentes a 12 diferentes filos, vários deles nunca descritos nesse ambiente. Como esperado, 91% a 99% das sequências eram filiadas ao gênero *Lactobacillus*. A alfa-diversidade só mostrou correlação nos tanques de fermentação em modo contínuo, enquanto a beta-diversidade claramente separou as duas usinas, sendo que as unidades taxonômicas operacionais (UTO) que foram diferencialmente representadas pertenciam principalmente a *Lactobacillus*, onde várias delas eram exclusivas ao modo contínuo. Outras UTOs que ajudaram a explicar essa diferença pertenciam ao gênero *Weissella*, que foi mais abundante na usina de batelada alimentada e *Pediococcus*, *Acetobacter* e *Anaerosporobacter* que foram predominantes na usina em modo contínuo. A análise de predição do metagenômica foi realizada através do PICRUSt e reforçou o agrupamento das usinas. Ela também revelou que várias classes de genes, como o metabolismo de carboidratos e transporte de membrana, foram significativamente diferentes entre as usinas. Os nossos dados sugerem que o gênero *Lactobacillus* pode ser mais importante nesse ambiente do que antes descrito; que as comunidades bacterianas são distintas entre usinas e que elas são persistentes ao longo do tempo.

Palavras-chave: Fermentação; Contaminação bacteriana; 16S rDNA; Diversidade; qPCR

Abstract

Brazil is the largest producer of ethanol from sugarcane and its demand has increased in recent years as it is considered a sustainable alternative to fossil fuel. The fermentation process can be operated in distilleries, either in fed-batch or continuous mode. A consequence of the large scale industrial production of ethanol is bacterial contamination in the fermentation tanks, which is responsible for significant economic losses. Thus, we accessed the profile of bacterial communities from two distilleries in Brazil, one operating in fed-batch and another in continuous

mode to ethanol production. Bacterial communities were accessed through Illumina culture-independent 16S rDNA gene partial sequencing and the qPCR was used to quantify the total bacteria density. Both ethanol production mode showed similar bacterial density, around 10^5 gene copies/mL. However, 16S rDNA sequencing showed differences in the bacterial profile between the two distilleries. It was reported 219 genera that belong to 12 different phyla, several of them never described in this environment. As expected, 91% to 99% of the sequences were affiliated to the *Lactobacillus* genus. Alpha diversity only showed a correlation through the fermentation tanks in continuous mode. Beta diversity clearly separated the two distilleries and the operational taxonomy units (OTU) that were differentially represented belonged mainly to *Lactobacillus*, whereas several of them were unique to the continuous mode. Other OTUs helped to explain these differences, the *Weissella* genus, was more abundant in fed-batch mode and *Pediococcus*, *Acetobacter* and *Anaerosporobacter* were predominant in continuous mode. Predictive gene function was made using PICRUSt and reinforced clustering within the distilleries. It also revealed that several classes of genes, as carbohydrate metabolism and membrane transport, were significantly different between the distilleries. Our data suggests that *Lactobacillus* may be the most important contaminant in this environment than though before, demonstrating that bacterial communities are distinct between distilleries and that they are persistent through time.

Keywords: Fermentation;Bacterial Contamination; 16S rDNA; Diversity; qPCR

2.1 Introdução

O etanol é o biocombustível mais utilizado para o transporte no Brasil e o país é o segundo maior produtor no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. Em 2014 o Brasil produziu 6,1 bilhões de galões (RFA, 2015) que foram consumidos, em sua maioria, pelo mercado interno. A cana-de-açúcar é a matéria-prima utilizada no processo de fermentação das usinas no Brasil, a vantagem dessa sobre outras matérias-primas utilizadas é que a mesma contém quantidades consideráveis de açúcares facilmente fermentecíveis, o que facilita os processos operacionais e diminui os custos (AMORIM et al., 2009; CRAGO et al., 2010).

O processo atual de fermentação foi desenvolvido na década de 1930 por Firmino Boinot, que ficou conhecido como processo Melle-Boinot e consiste em fermentações do tipo batelada alimentada com alta concentração celular, reciclo celular e tratamento ácido. No Brasil, o processo utiliza caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço diluído como substrato para a fermentação (BASSO et al., 2011; GODOY et al., 2008).

Nos anos 1970, apareceram as primeiras versões contínuas do processo desenvolvido por Boinot. Inicialmente, diversos problemas operacionais foram detectados no sistema, como alto nível de contaminação, baixa produtividade, baixo

rendimento e fluxo de sólidos. Nos dias de hoje, o processo contínuo foi otimizado para atingir altos níveis de produtividade, alta flexibilidade e estabilidade no processo, o que pode torná-lo menos caro quando comparado ao processo de batelada alimentada (ZANIN et al., 2000; BRETHAUER; WYMAN, 2009).

Devido à grande concentração de compostos orgânicos e inorgânicos, os tanques de fermentação de cana-de-açúcar são um ambiente com grande concentração de micro-organismos contaminantes. O impacto destes no processo de fermentação está relacionado com o consumo de açúcar e a produção de ácidos orgânicos, que podem afetar a eficiência da fermentação da levedura (SOLOMON, 2008).

Bactérias ácido-lácticas (BAL) são contaminantes comumente encontrados nos tanques de fermentação, no entanto, outros gêneros são encontrados em menor abundância. Não são todos os micro-organismos que são capazes de crescer neste ambiente, uma vez que os tanques de fermentação podem ser muito seletivos por conta de diversos fatores de estresse impostos, como pH baixo, alta concentração de etanol, altas temperaturas, alta pressão osmótica e outros (BASSO et al., 2011). Diversos trabalhos focaram no estudo dessa microbiota, no entanto, basearam-se em bactérias acessadas através de cultivo (LUCENA et al., 2010; SKINNER; LEATHERS, 2004; GALLO, 1990).

No entanto, acessar a comunidade bacteriana somente através de técnicas dependentes de cultivo frequentemente distorce a comunidade presente nesse ambiente (RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003). O sequenciamento Illumina MiSeq do gene 16S rDNA é uma metodologia robusta, barata e de fácil processamento que já foi utilizada em diferentes trabalhos para descrever a comunidade bacteriana (BARTRAM et al., 2011). Além disso, as sequências geradas podem ser utilizadas pelo *Phylogenetic Investigation Communities by Reconstruction of Unobserved States* (PICRUST) que pode prever as funções dos genes presentes naquela comunidade através da comparação das sequênicas geradas com o banco de dados (LANGILLE et al., 2013).

O presente trabalho realizou a análise e caracterização da comunidade bacteriana acessada de forma independente de cultivo do processo de fermentação da cana-de-açúcar para a produção de etanol. Para tal, amostras de duas usinas distintas do estado de São Paulo foram coletadas na safra de 2012-2013. De acordo

com o nosso conhecimento, esta é a primeira análise independente de cultivo dessa microbiota.

2.2 Material e métodos

2.2.1. Coleta das amostras

As amostras foram realizadas em duas usinas do estado de São Paulo durante a safra da cana-de-açúcar de 2012/2013. A primeira usina opera em fermentação contínua (DFC) com quatro dornas conectadas em paralelo, utilizando preferencialmente melaço; a segunda usina opera em fermentação batelada alimentada (DFB) e usa preferencialmente caldo. As duas usinas utilizam solução de ácido sulfúrico diluído no tratamento ácido e antibióticos para o controle bacteriano. Três coletas foram realizadas em quatro reatores em cada usina ao longo da safra (Tabela 1). Todas as amostras foram armazenadas a – 80 °C para análises futuras.

Tabela 1 – Nome das diferentes amostras da usina que opera em fermentação contínua (DFC) e da usina que opera em fermentação batelada alimentada (DFB)

Coletas	DFB	DFC
1ª Coleta	G11	R11
	G12	R12
	G13	R13
	G14	R14
2ª Coleta	G21	R21
	G22	R22
	G23	R23
	G24	R24
3ª Coleta	G31	R31
	G32	R32
	G33	R33
	G34	R34

2.2.2 Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rDNA

Foi usado 1 mL das amostras coletadas para a extração do DNA total pelo *Kit Power Soil DNA Isolation* (MO BIO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A região V4 do gene 16S rDNA foi amplificada utilizando os quatro *primers forward* 16SV4FPCR 5’-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAYTGGGYDTAAAGNG-3’; 5’-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNAYTGGGY

DTAAAGNG-3'; 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNAYT GGGYDTAAAGNG-3'; 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNA YTGGGYDTAAAGNG-3' e quatro *primers reverse*: 16SV4RPCR 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGTCAATTCMTTTRAT-3'; 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCMTTTRAGT-3';5'-GTCTC GTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNCCGTCAATTCMTTTRAGT-3'. O mix do PCR conteve 0,1 µM de cada *primer*, 3,0 mM de MgCl2, 0,3 mM de cada dNTP, 10,0 µg/µL de BSA 1,5 U de Taq DNA polimerase, 1,2 x tampão Taq e volume final de 25 µL. A amplificação da região V4 do gene 16S foi iniciada com denaturação de 3 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 45 s de denaturação a 95 °C, 1 min de anelamento do primer a 57 °C e 45 s de extensão a 72 °C e com período final de extensão por 10 min a 72 °C. As amplificações foram conduzidas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

O DNA 16S amplificado foi sequenciado no Illumina Miseq de acordo com as especificações do fabricante no Laboratório Multiusuários Centralizado Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia na Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo em Piracicaba/SP, Brasil.

2.2.3 Análise das sequências

Inicialmente, as sequências *paired-end* geradas pelo Illumina Miseq foram unidas utilizando FLASh (MAGOČ; SALZBERG, 2011). Em seguida, as análises das sequências foram realizadas utilizando o QIIME (CAPORASO et al., 2010). As sequências Fastq foram filtradas utilizando as configurações padrão de qualidade para o processamento de sequências de Illumina. A unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foram geradas utilizando o método UCLUST (EDGAR, 2010) e considerando o valor de 97% de similaridade para o agrupamento das sequências, sendo que sequências representativas de cada UTO foram selecionadas para a realização das análises taxonômicas. As análises taxonômicas utilizaram o banco de dados *Ribosomal Database Project* (RDP) como referência, considerando 80% de similaridade (COLE et al., 2014). Alpha e Beta-diversidades foram estimadas utilizando a *OTU table* rarefeita. Alpha diversidade foi acessada através dos índices de diversidade e riqueza, Shannon e Chao1, respectivamente e a Beta-diversidade utilizou a distância ponderada *Unifrac* para obter análise principal de coordenadas (PCoA) bi-dimensional. UTOs que apresentaram diferenças estatísticas entre os

grupos foram geradas após a filtragem da *OTU table* após a retirada das UTOs com baixa abundância (0,00005%) e que se apresentavam em pelo menos 25% das amostras de cada região. O diagrama de Venn foi gerado a partir do *Venn diagram plotter jquery.venny*, uma ferramenta desenvolvida pelo Genotoul Bioinfo (http://bioinfor.genotoul.br).

2.2.3 Predição do metagenoma

A predição das famílias de genes abundantes foi realizada com PICRUSt (LANGILLE et al., 2013). Foi utilizado o banco de dados do Greengenes de 18 de maio de 2012 para realizar a anotação referente às OTUs. A acurácia da predição do metagenoma foi medida com o *Nearest Sequence Taxon Index* (NSTI). Foi utilizado o STAMP para a geração do PCoA bi-dimensional e a comparação das classes gênicas (PARKS et al., 2004).

2.2.4 Abundância Bacteriana

Na análise de qPCR o conjunto de *primers* P1 (5' - CCTACGGGAGGCAGCAG - 3') e P2 (5' - ATTACCGCGGCTGCTGG - 3') (MUYZER et al., 1993) foi utilizado para a quantificação da abundância bacteriana em DFC e DFB. A corrida de qPCR foi realizada com o sistema de detecção iCycler iQ Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) utilizando a detecção por meio de corante fluorence SYBR green (Invitrogen, USA). As amplificações ocorreram em reações de 25 µL contendo 5 pmol de cada *primer* (P1/P2), 12,5 µL de *Platinum Syber Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, USA), 0,02 mg/mL de BSA e 5 µL de DNA molde na concentração ng/µL. Os ciclos no termociclador foram os seguintes: denaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 62,5 °C por 30 s e elongação a 72 °C por 30s, onde os dados foram coletados pelo aparelho de qPCR. No final, a temperatura foi aumentada de 72 a 95 °C por 0,5 °C para a construção da curva de *melting*.

As curvas padrão foram construídas utilizando o produto de PCR do gene 16S rDNA. As amplificações do gene 16S rDNA foram realizadas utilizando o conjunto de primers R1387 (5' - CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG – 3') e PO27F (5' – GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'). O mix de PCR, de volume final de 50 µL, continha 5 ng de DNA molde, 0,2 µM de cada primer, 3,75 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 U de Taq DNA polimerase e tampão 1x. As amplificações foram

realizadas no termocicladro Thermal cycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) com desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 62,5 °C por 30 s e elongação a 72 °C por 30s, e elongamento final a 72 °C por 10 min. O produto de PCR foi purificado com a metodologia do Polietileno Glicol de acordo com Lis (1980) e a concentração do DNA foi medida no Qubit, segundo instruções do fabricante. Diluições seriadas foram realizadas e utilizadas para a realização da montagem da curva padrão. Todas as amostras foram quantificadas em triplicatas. A média e o erro padrão do *threshold cycle* (Ct) obtidos nas replicatas técnicas foram calculados e utilizados para medir a abundância bacteriana dentro das amostras.

2.3 Resultados

2.3.1 Abundância da comunidade bacteriana das usinas de fermentação de cana-de-açúcar

A quantificação da abundância das bactérias realizadas através de qPCR, das usinas DFC e DFB, mostraram valores similares de abundância, variando de 10^4 a 10^6 cópias de gene/mL, mas preferencialmente apresentando o valor de 10^5 cópias de gene/mL (Figura 2A, 2B).

2.3.2 Acessando a diversidade bacteriana através de metodologia independente de cultivo

As sequências *paired-end* geradas foram unidas e geraram sequências de cumprimento 367 pb. Depois das filtragens realizadas baseadas em parâmetros de qualidade, sequências foram agrupadas considerando similaridade de 97%, e foram reportadas 31.712 UTOs. Depois da exclusão de sequências referente à Archaea (3) e ao cloroplasto (40), os grupos foram rarificados a 57.383 na tentativa de prevenir o viés que pode ser gerado por grupos com diferentes quantidades de sequências.

Interessantemente, em todas as amostras, de ambas usinas DFC e DBF, 96% ou mais das sequências foram afiliadas ao filo Firmicutes. No entanto, houveram sequências que afiliaram aos filos Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Fusobacteria, OD1, Proteobacteria, Tenericutes, Thermodesulfobacteria, Verrucomicrobia e WS3 (Figura 3). No total, foram reportados 218 gêneros, dos quais, 91% ou mais das sequências afiliaram ao gênero *Lactobacillus* em todas as amostras (Figura 4).

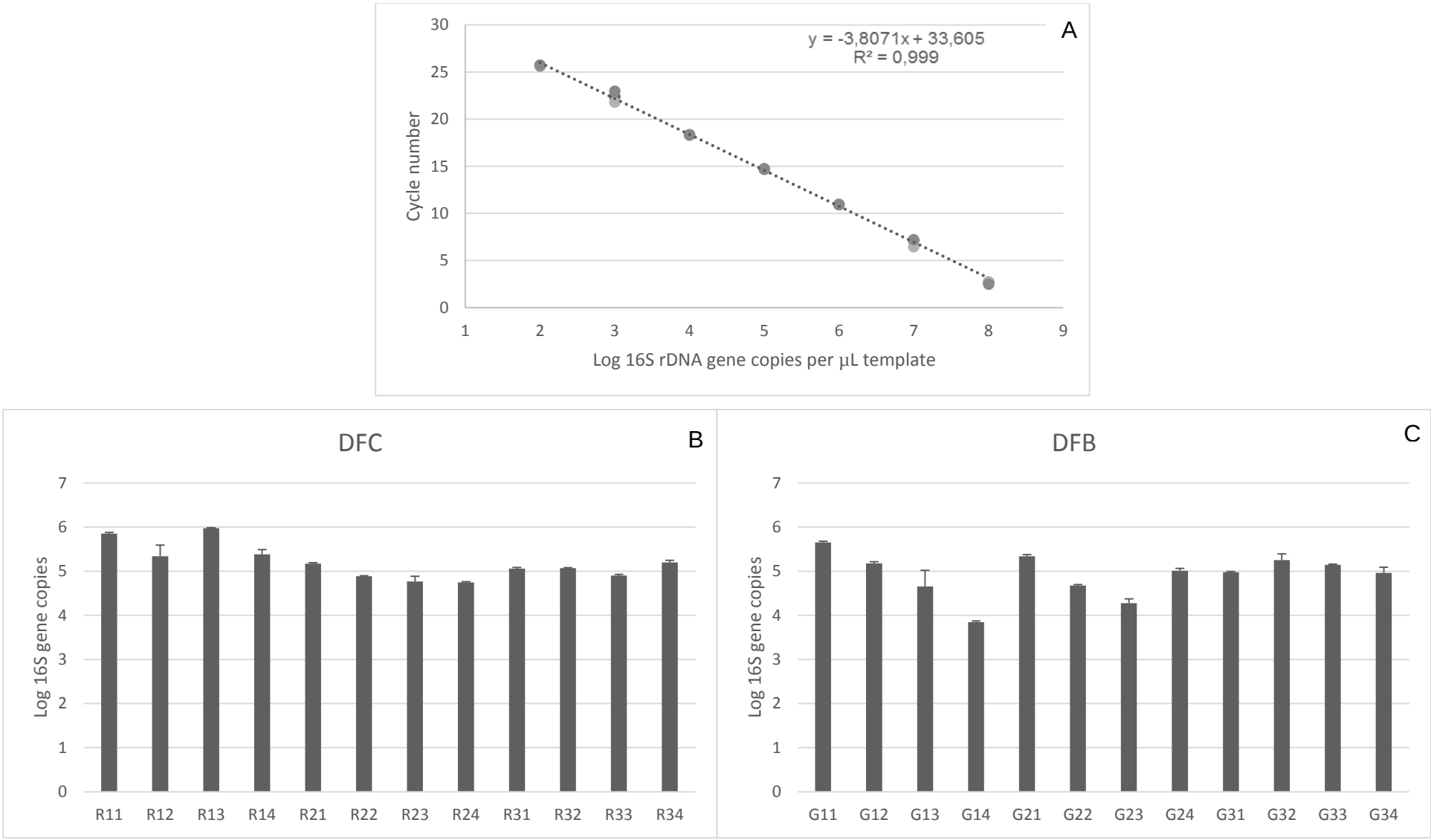

Figura 2 – Análise de qPCR. Curvas padrão para o gene 16S rDNA (A); O gráfico mostra médias e erro padrão de abundância bacteriana de usinas com operação de fermentação em modo contínuo (DFC) e em modo descontínuo alimentado (DFB)

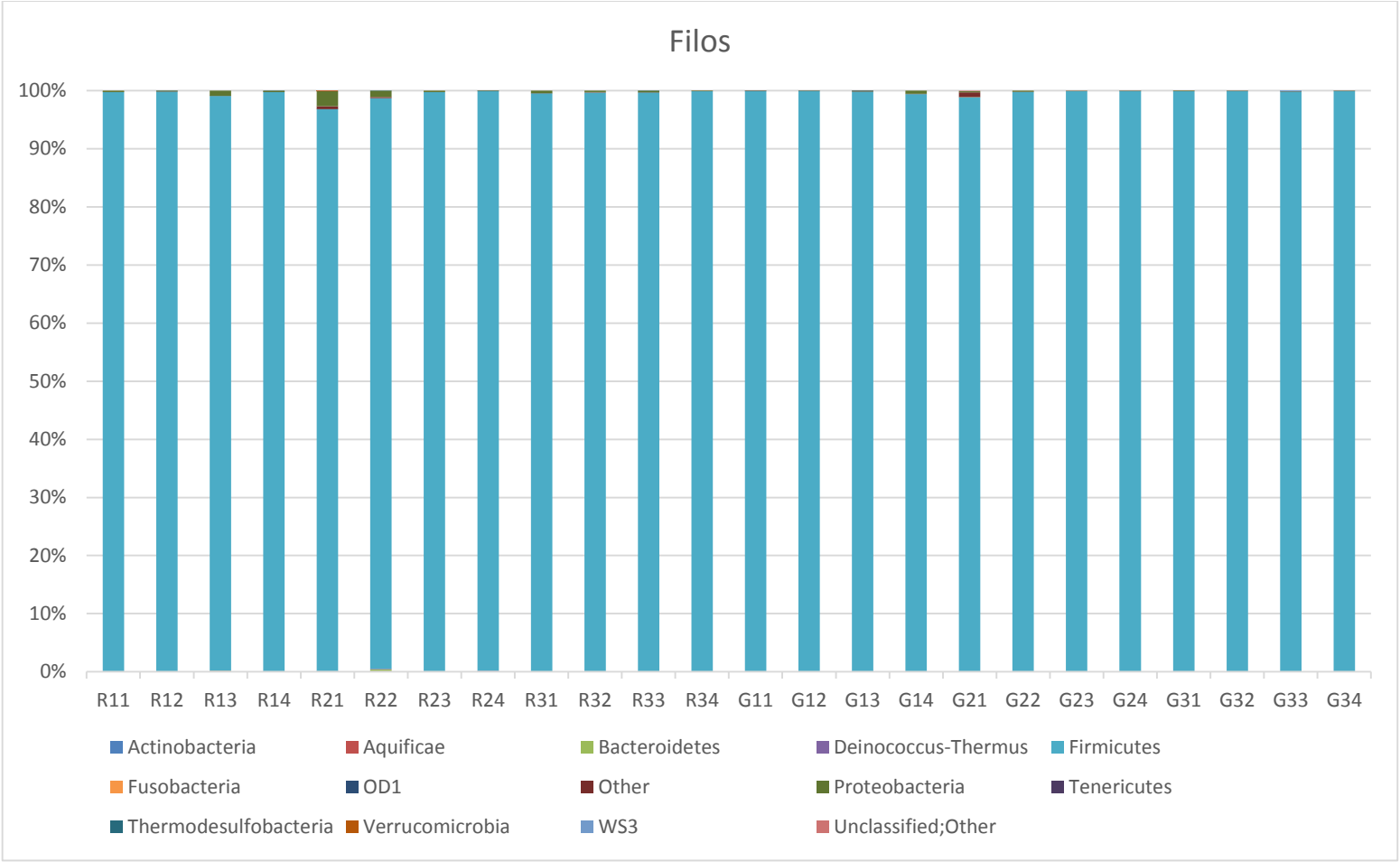

Figura 3 – Filos relatados através do sequenciamento do gene 16 rDNA por Illumina em todas as dornas de fermentação de ambas as usinas com operação de fermentação em modo contínuo (DFC) e em modo descontínuo alimentado (DFB)

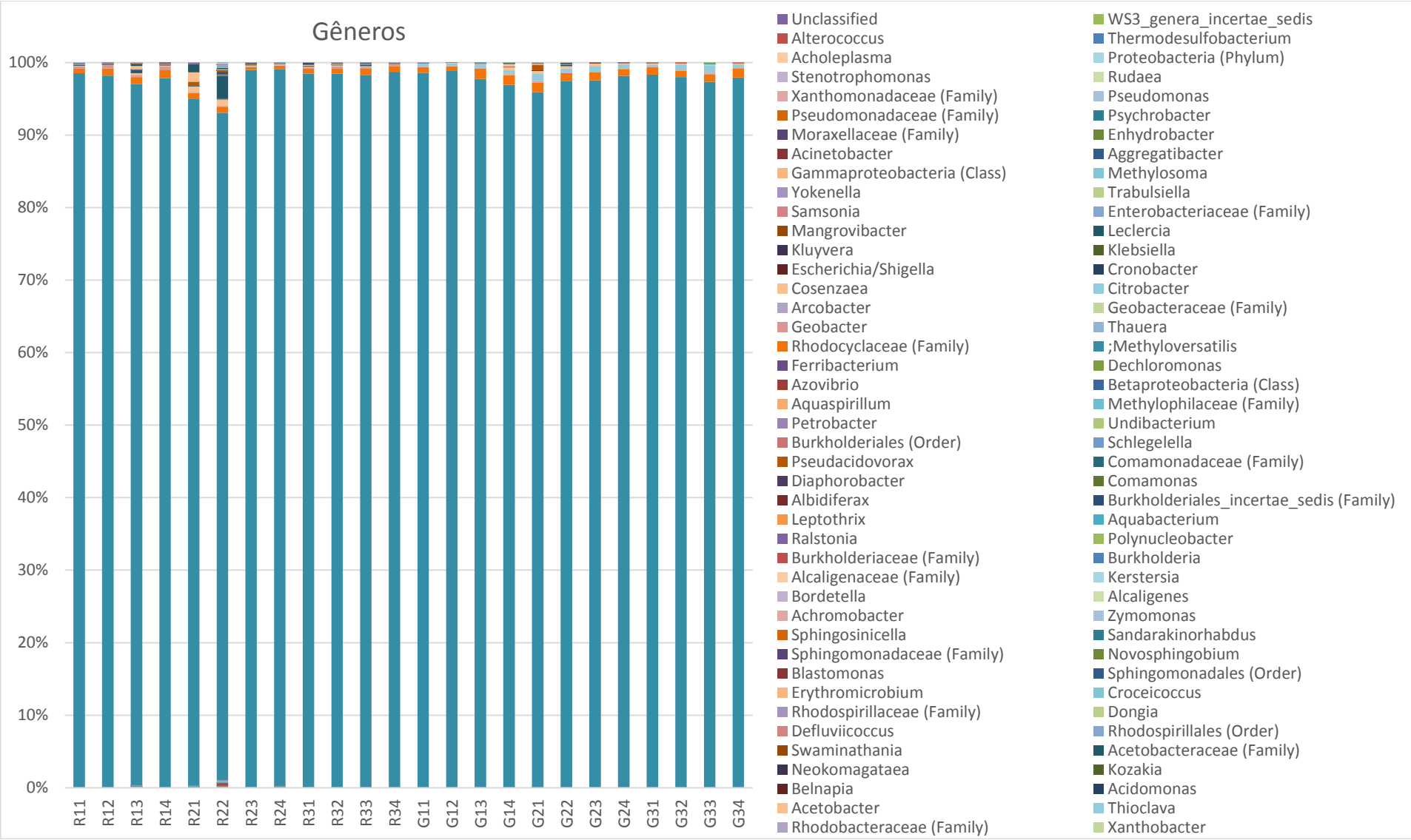

Figura 4 - Gêneros relatados através do sequenciamento do gene 16 rDNA por llumina em todos as dornas de fermentação de ambas as usinas com operação de fermentação em modo contínuo (DFC) e em modo descontínuo alimentado (DFB)

Os índices de riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) variaram entre os tanques de fermentação nas duas usinas, DFC e DFB. Em DFB, cada tanque de fermentação pareceu ter valores de diversidade e riqueza independentes entre si, e variaram de 5674,32 até 8998,43 para o índice de Chao1 e 3,35 até 6,85 para o índice de Shannon. Já em DFC, as amostras coletadas em um mesmo tempo, exibiram um padrão de alpha diversidade ao longo dos tanques de fermentação, onde os índices de riqueza e diversidade atingiram os maiores valores nos segundos e terceiros tanques de fermentação, isso para todos os tempos coletados (Tabela 2).

Apesar da grande similaridade reportada nas análises baseadas na taxonomia, a análise de beta-diversidade separou as amostras das usinas DFC e DFB, sugerindo que há diferenças entre as comunidades bacterianas destas usinas e que essas diferenças são consistentes ao longo do tempo (Figura 5A). A maioria das UTOs diferencialmente abundantes pertencem ao gênero *Lactobacillus*, onde muitas dessas sequências foram exclusivas a apenas uma das usinas (Figura 5B). Outras UTOs que ajudaram a explicar a diferença entre as usinas pertenciam ao gênero *Weissella*, que foi mais abundante em DFB, enquanto que os gêneros *Pediococcus*, *Acetobacter* e *Anaerosporobacter* foram mais abundantes em DFC (Figura 5C).

2.3.3 Predição do metagenoma

PICRUSt foi utilizado como uma ferramenta preditiva de metagenoma e as amostras foram analisadas considerando o nível 2 dos grupos de ortologia do KEGG (KOs). Os valores de NIST de DFB foi de 0,03 ± 0,002 e de DFC foi 0,03 ± 0,006, sendo estes considerados valores baixos de NIST e que, portanto, indicam dados ideais para a predição por PICRUSt (Tabela 2).

Interessantemente, o PCA montado com os dados de famílias de genes reforçou a separação entre as usinas (Figura 6A). Foi possível predizer 29 famílias de genes onde 20 apresentaram diferenças estatísticas significativas entre DFC e DFB (Test-t $p < 0.05$). Famílias de genes relacionados ao processo de fermentação de bactérias contaminantes no processo fermentativo, como metabolismo de carboidrato e transporte de membrana, foram presentes nesta predição (Figura 6B).

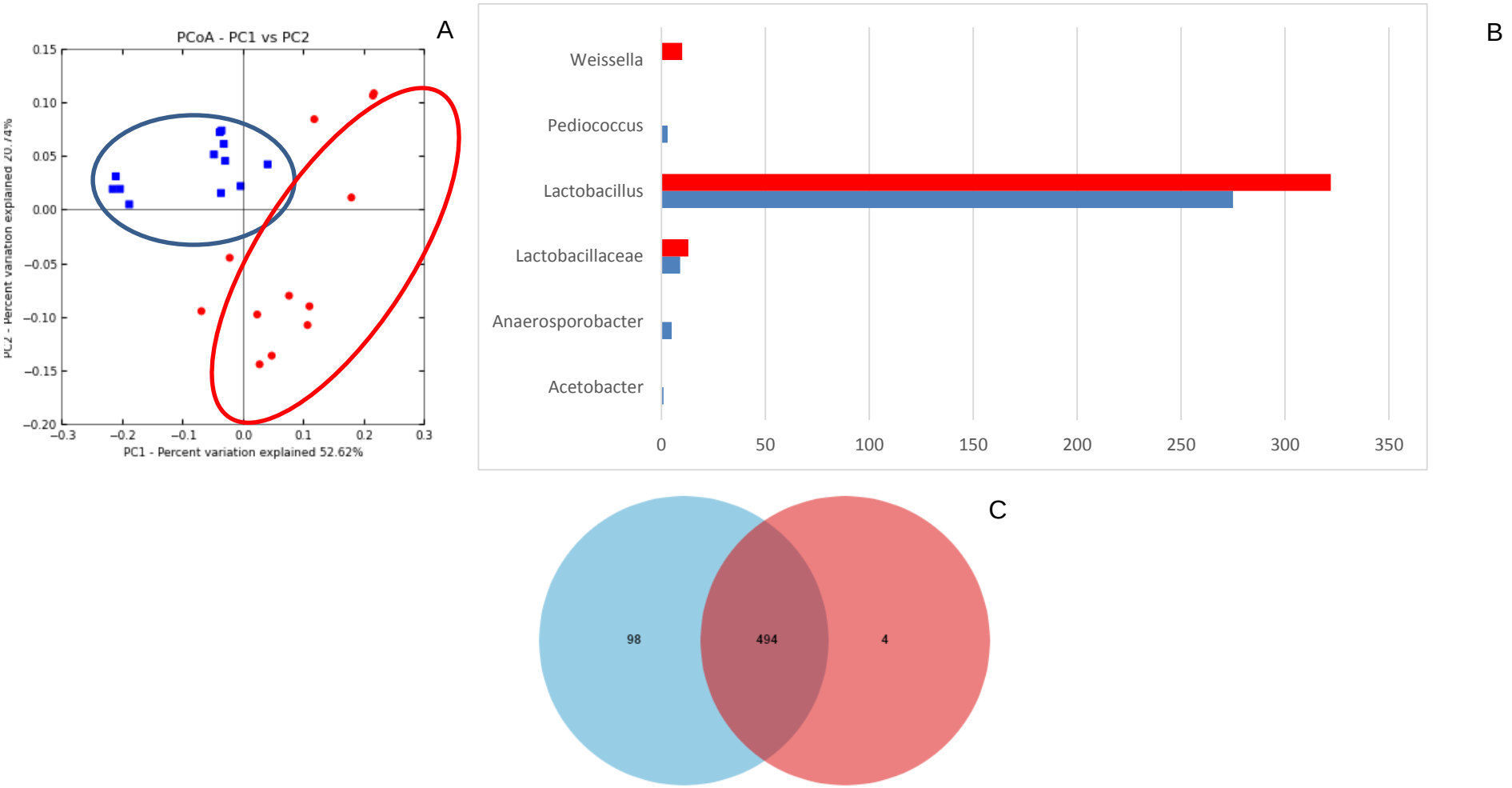

Figura 5 - Beta-diversidade e análise UTOs diferencialmente representados. Análise bidimensional PCoA (A); UTOs diferencialmente representadas (B); diagrama de Venn do UTOs diferencialmente representados, relatando UTOs exclusivas (C). A usina com operação de fermentação em modo contínuo (DFC) está representada em azul e a usina com fermentação em modo descontínuo alimentado (DFB) está representado em vermelho

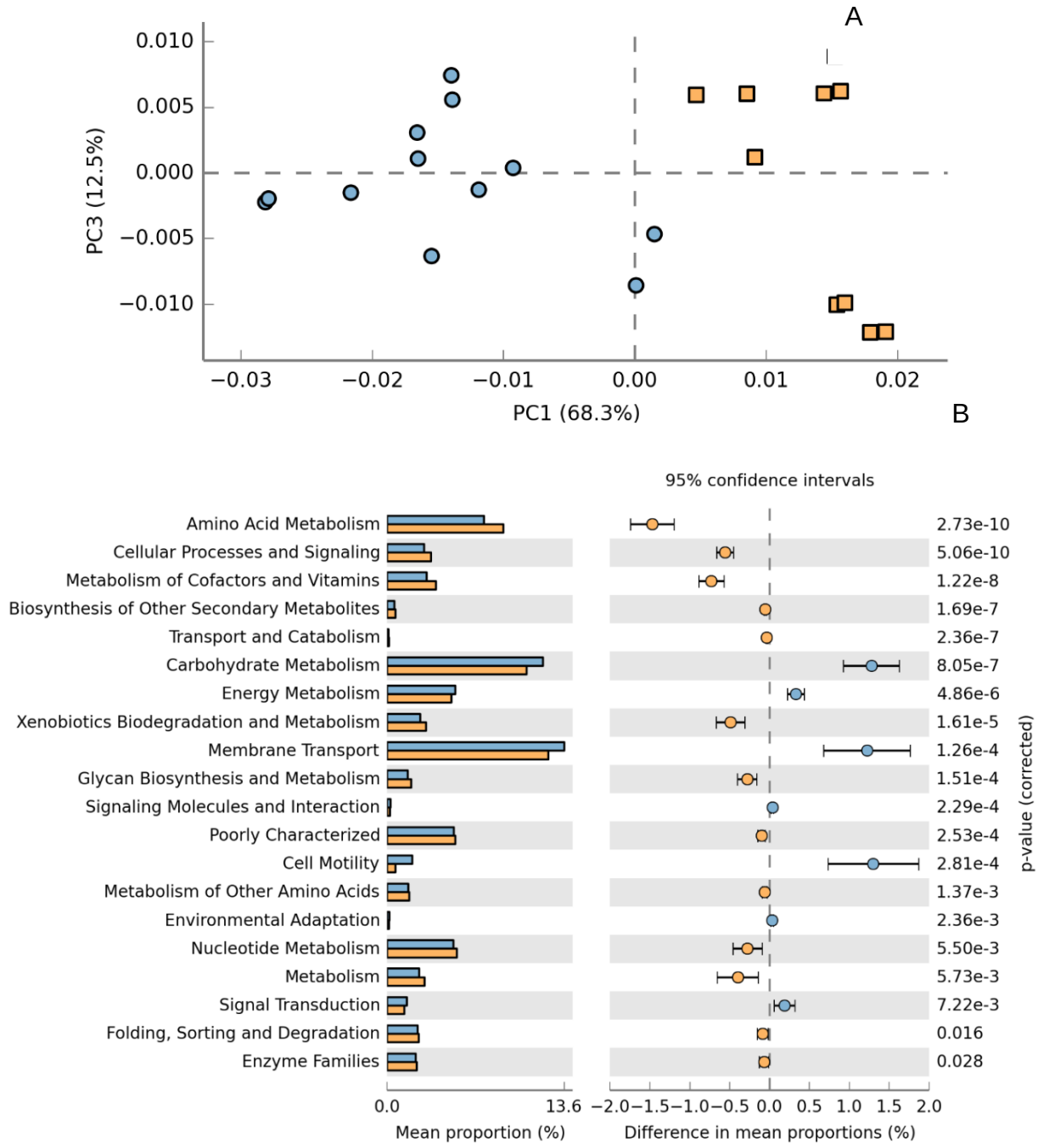

Figura 6 – Dados gerados pelo PICRUSt (A) Análise bidimensional PCoA; (B) As classes de genes que foram estatisticamente diferentes, considerando $p < 0,05$, entre usina com operação de fermentação em modo contínuo (DFC) está representda em laranja e a usina com fermentação em modo descontínuo alimentado (DFB) está representado em azul

Tabela 2 - Análise de sequenciamento do gene 16S rDNA, geradas pelo Illumina, através QIIME e PICRUSt

Samples	Chao1	Shannon	OTU	Coverage (%)	Singles	Doubles	NIST values
R11	7671,73	5,50	4070	96.09	2238	694	0.0412
R12	7820,54	6,34	4382	96.05	2264	744	0.0407
R13	11015,23	7,43	6081	94.33	3250	1069	0.0379
R14	7756,76	5,94	3913	96.22	2166	609	0.0418
R21	10757,58	7,06	5460	94.80	2982	838	0.0267
R22	11314,50	7,51	6321	94.19	3330	1109	0.0343
R23	8681,50	6,84	4922	95.58	2536	854	0.0286
R24	8396,15	6,82	4880	95.72	2454	855	0.0266
R31	6154,70	3,47	2835	97.04	1698	433	0.0448
R32	6316,06	3,82	3059	96.86	1798	495	0.0442
R33	8249,91	5,38	4317	95.78	2418	742	0.0413
R34	6750,42	4,62	3398	96.69	1898	536	0.0427
G11	6506,26	5,69	3539	96.81	1830	563	0.0367
G12	6030,84	4,89	3075	97.03	1699	487	0.0365
G13	6709,36	5,48	3722	96.62	1936	626	0.0372
G14	7910,92	6,25	4336	95.97	2310	745	0.0360
G21	8998,43	6,16	4294	95.67	2483	654	0.0383
G22	7720,49	6,79	4487	96.08	2245	778	0.0336
G23	5864,02	5,19	3352	97.02	1709	580	0.0328
G24	5107,16	3,35	2600	97.43	1474	432	0.0360
G31	6042,36	5,68	3309	96.99	1725	543	0.0390
G32	7702,40	6,85	4481	96.19	2184	739	0.0333
G33	8328,76	6,90	4638	95.81	2400	779	0.0350
G34	5674,32	3,87	2894	97.16	1624	473	0.0358

2.4 Discussão

A contaminação bacteriana é frequentemente apontada como um dos maiores inconvenientes da fermentação alcoólica industrial (BASSO et al., 2011). No entanto, estudos desta comunidade são geralmente realizados através de técnicas dependentes de cultivo que, frequentemente, subestimam a composição da mesma. De fato, no presente trabalho, ao acessar a comunidade bacteriana das dornas de fermentação por métodos independentes de cultivo, foram reportados os filos Aquificae, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, Fusobacteria, OD1, Tenericutes, Thermodesulfobacteria, Verrucomicrobia e WS3 que nunca tinham sido descritos neste ambiente antes, mostrando que a diversidade pode ser ainda maior que a imaginava (ROSALES, 1989; GALLO, 1990; LUCENA et al., 2010). Costa et al. (2015), ao estudar a diversidade bacteriana em diferentes estágios do processo da

usina, reportaram a presença da classe Bacteroidetes no processo, no entanto, esse trabalho não acessou o tanque de fermentação propriamente dito.

O gênero mais abundante em todos os trabalhos que estudaram os tanques de fermentação alcoólica de cana-de-açúcar é *Lactobacillus* e, particularmente neste trabalho, 91 a 99% das sequências afiliaram a esse gênero. A porcentagem encontrada foi consideravelmente maior quando comparada com outros estudos que investigaram as mesmas condições, sendo que eles reportaram 45 a 60% deste gênero (ROSALES, 1989; GALLO, 1990). Em estudos relacionados, Costa et al., (2015) reportaram 62,2% de *Lactobacillus* quando acessaram a diversidade do vinho da fermentação de cana-de-açúcar e Skinner Leathers (2004) reportaram de 69 a 87% de *Lactobacillus* em uma instalação de moagem a seco de milho. Nosso trabalho sugere que a importância desse gênero para a fermentação alcoólica da cana-de-açúcar seja maior do que esperado.

Quanto à abundância bacteriana, nossos resultados sugerem que a infestação bacteriana está próxima de 10^5 cópias de gene/mL nos tanques de fermentação das usinas DFC e DFB. Apesar de a contaminação bacteriana poder acarretar em prejuízos na produção de etanol, o processo pode operar satisfatoriamente com níveis baixos de contaminação. Skinner e Leathers (2004) mostraram que uma população bacteriana de cerca de 10^6 unidades formadoras de colônia/mL, ou até mesmo mais alta, pode não afetar o processo significativamente. Esse é um resultado importante, uma vez que a literatura sugere que sistemas contínuos de fermentação são mais susceptíveis à contaminação bacteriana quando comparado a sistemas em batelada (GODOY et al., 2008). Nosso trabalho sugere que, quando bem gerido, ambos os processos podem operar com baixas abundâncias bacterianas.

Apesar da similaridade de abundância, as diferenças entre as usinas DFC e DBC foram reportadas nas análises de alfa e beta-diversidades. A alfa-diversidade mostrou correlação entre os tanques de fermentação DFC, mas não em DFB e talvez isso esteja relacionado com o fato de em DFC os tanques estarem conectados uns aos outros.

A maior diferença foi reportada através da análise de beta-diversidade que separou a comunidade bacteriana das usinas DBF e DCF. As análises taxonômicas evidenciaram *Lactobacillus* como o gênero mais abundante nas duas usinas, no entanto, UTO considera sequências que compartilham até 97% de similaridade,

portanto, sendo capaz de reportar diferença entre as usinas. Várias UTOs que pertencem ao gênero *Lactobacillus* foram diferencialmente representadas entre as usinas, sendo que DFC apresentou um número maior de UTOs exclusivas. Lucena et al. (2010) coletou amostras de quatro usinas do nordeste do Brasil e observou diferenças na composição da comunidade bacteriana dos tanques de fermentação. A presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* pode afetar a fermentação da levedura através da produção de ácidos orgânicos e competição por nutrientes (NARENDRANATH et al., 1997; NARENDRANATH, 2003), provocando a diminuição da produção de etanol (Basso et al., 2014), a floculação das leveduras (CARVALHO-NETO et al., 2014) e a diminuição da viabilidade da levedura (THOMAS et al., 2001).

Através da análise da comunidade bacteriana independente de cultivo, nosso trabalho mostrou que outros gêneros diferiram significativamente entre as usinas, como *Weissella* que foi mais abundante na DFB, e *Pediococcus*, *Acetobacter* e *Anaeosporobacter* que foram mais abundantes em DFC. Os gêneros *Weissella*, *Pediococcus* e *Acetobacter* já foram reportados neste ambiente antes (ROSALES, 1989; GALLO, 1990) mas *Anaerosporobacter* não foi.

Apesar de essas bactérias já terem sido reportadas como contaminantes bacterianos da fermentação industrial envolvendo *S. cerevisiae*, pouco se sabe sobre a influência destas no metabolismo da levedura. *Weissella* e *Pediococcus* são gêneros da família Lactobacillales e, assim como o *Lactobacillus*, são conhecidos como bactérias ácido-láticas (BAL). Desta forma, a presença delas pode afetar a levedura da mesma maneira que o *Lactobacillus* afeta. *Acetobacter*, por sua vez, pertence às bactérias ácido-acéticas (BAA) e a produção desse ácido, aliado ao baixo pH, reduz a produção de etanol pelas leveduras (GRAVES et al., 2006). Finalmente, apesar de Anaerosporobacter nunca ter sido reportado neste ambiente, esse gênero pertence a ordem Clostridiales, a mesma ordem do gênero Clostridium, que já foi reportado nesse ambiente (SKINNER; LEATHERS, 2004). Anaerosporobacter é um gênero descrito recentemente (JEONG et al., 2007) e pouco foi reportado sobre a sua fisiologia, sendo que, segundo nosso conhecimento, esse é o primeiro relato deste gênero neste ambiente.

A predição do metagenoma realizado pelo PICRUSt também reportou a diferença apontada pela análise de beta-diversidade, ou seja, a análise das famílias de gene também separou as usinas DFC e DFB, sendo que alguma dessas classes estão relacionadas com o processo de fermentação do *Lactobacillus*. Se existem

diferenças no metabolismo, o controle que é usualmente feito com a aplicação de antibiótico de largo espectro - que pode acarretar altos gastos para as usinas e também levar à resistência bacteriana (MUTHAIYAN et al., 2010) - pode ser mudado para uma abordagem mais específica e pode ser mais econômica.

Finalmente, o agrupamento entre as usinas, persistente ao longo do tempo, indica que a comunidade bacteriana pode ser característica da usina, mesmo havendo muitos fatores que podem provocar variações ao longo do tempo. Essa hipótese foi levantada pela primeira vez por Skinner e Leathers (2004) quando estudaram a comunidade pertencente a instalações de moagem de milho a seco ou com água para fermentação, e verificaram que as diferentes instalações pareciam ter comunidades características sendo que este fator poderia estar relacionado com infecções endêmicas persistentes. Isso indica que as usinas devem prestar mais atenção à limpeza e descontaminação dos equipamentos.

Além do processo de fermentação *per se*, sabe-se que a comunidade contaminante bacteriana pode ser influenciada por outros fatores. A cana-de-açúcar contém diferentes microbiotas dependendo do lugar onde foi cultivada (MENDES et al., 2007; MAGNANI et al., 2010); clima é outro fator que está relacionado com a alteração da microbiota de plantas e solo (CHAZARENC et al., 2010; BOSSIO et al., 1998). Não obstante, manutenção e limpeza dos equipamentos é crucial para o aparecimento ou a reinfestação dos contaminantes (AMORIM et al., 2011). Isto sendo dito, outros trabalhos devem focar em como essas variáveis podem afetar a contaminação bacteriana das usinas.

Ao acessar a comunidade bacteriana contaminante do processo de fermentação da cana-de-açúcar para produção de etanol, através de técnicas independentes de cultivo, nós pudemos observar que o gênero *Lactobacillus* pode ser ainda mais importante para esse ambiente que antes descrito, que cada uma das usinas pareceu ter uma comunidade bacteriana distinta, considerando tanto UTO quanto a predição das famílias de gene, e que essa comunidade parece persistir ao longo do tempo. Esses resultados sugerem que o estudo da microbiota contaminante de uma usina em particular pode fornecer soluções customizadas e mais baratas para controlá-los.

Referências

AMORIM, H.V.;BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. 5th. ed. In: INGLEDEW, W.M.; KELSALL, D.R.; AUSTIN, G.D.; KLUHSPIES, C. **The Alcohol Text Book.** Nottingham: Nottingham University Press: 2009. p. 39-46.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.V.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

BARTRAM, A.K.; LYNCH, M.D.; STEARNS, J.C.; MORENO-HAGELSIEB, G.; NEUFELD, J.D. Generation of multimillion-sequence 16S rDNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 3846-3852, 2011.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: BERNARDES, M.A.S. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. InTech. ISBN: 978-953-307-478-8, 2011.

BASSO, T.O.; GOMES, F.S.; LOPES, M.L.; DE AMORIM, H.V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L.C. Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van leeuwenhoek**, Amstrerdam, v. 105, p. 169-177, 2014.

BOSSIO, D.A.; SCOW, K.M.; GUNAPALA, N.; GRAHAM, K.J. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 1-12, 1998.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C.E. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, Inglaterra, v. 101, p. 4862-4874, 2010.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, New York, v. 7, p. 335-336, 2010.

CARVALHO-NETTO, O.V.; CARAZZOLLE, M.F.; MOFATTO, L.S.; TEIXEIRA, P.J.; NORONHA, M.F.; CALDERÓN, L.A.; MIECZKOWSKI, P.A.; ARGUESO, J.L.; PEREIRA, G.A. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprograming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial Cell Factories**, London, v. 14, p. 1, 2015.

CHAZARENC, F.; BRISSON, J.; MERLIN, G. Seasonal and spatial changes of microorganism communities in constructed wetlands: a community level physiological

profiling analysis. **International journal of chemical engineering**, New York, doi:10.1155/2010/490240, 2010.

COLE, J.R.; WANG, Q.; FISH, J.A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D.M.; SUN, Y.; BROWN, C.T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C.R.; TIEDJE, J.M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rDNA analysis. **Nucleic Acids Research,** Oxford, doi: 10.1093/nar/gkt1244, 2014.

COSTA, O.Y.; SOUTO, B.M.; TUPINAMBÁ, D.D.; BERGMANN, J.C.; KYAW, C.M.; KRUGER, R.H.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** Hampshire, v. 42, p. 73-84, 2015.

CRAGO, C.L.; KHANNA, M.; BARTON, J.; GIULIANI, E.; AMARAL, W. Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compared to US corn ethanol. **Energy Policy**, Surrey, v. 38, p. 7404-7415, 2010.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, D.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 23, p. 130-135, 1960.

GALLO, C.R**. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** 1990. 388p. Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos – Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

GODOY, A.; AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, A.J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 110, p. 175–181, 2008.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N.V.; DAWSON, K.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by Saccharomyces cerevisiae in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire v. 33, p. 469-474, 2006.

INGRAM, L.O. Ethanol tolerance in bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Ratón, v. 9, p. 305-319, 1989.

JEONG, H.; LIM, Y.W.; YI, H; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; CHUN, J. Anaerosporobacter mobilis gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 1784-1787, 2007.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing gram-positive rods. In SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E., HOLT, J.G. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore:The Williams & Wilkins,: 1986. v. 2. p. 1208-1234.

KASHKET, E.R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 46, p. 233–244, 1987.

LANGILLE, M.G.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J.A.; CLEMENTE, J.C.; BURKEPILE, D.E.; THURBER, R.L.V.; KNIGHT, R.; BEIKO, R. G. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rDNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 814-821, 2013.

LEBERTA, I.; LEROYA, S.; GIAMMARINAROA, P.; LEBERTB, A.; CHACORNACA, J.P.; BOVER-CIDC, S.; VIDAL-CAROUC, M.C.; TALONA, R. Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. **Meat Science**, Barking, v. 76, p. 112-122, 2007.

LUCENA, B.T.; DOS SANTOS, B.M.; MOREIRA, J.L.; MOREIRA, A.P.; NUNES, A.C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F.L.; DE MORAIS, M.A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC microbiology**, London, v. 10, p. 298, doi:10.1186/1471-2180-10-298, 2010.

MAIFRENI, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; BUIATTI, S.; PICON, S.; MARINO, M. Bacterial biofilm as a possible source of contamination in the microbrewery environment. **Food Control**, Guildford, v. 50 p. 809-814, 2015.

MAGOČ, T.; SALZBERG, S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, p. 2957-2963, 2011.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 250-258, 2010.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7259-7267, 2007.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 37, p. 351-370, 2011.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

NARENDRANATH, N.V.; HYNES, S.H.; THOMAS, K.C. INGLEDEW, W.M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4158-4163, 1997.

NARENDRANATH, N.V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K.A., LYONS, T.P., KELSALL, D.R. 4. Ed. **The Alcohol Textbook.** Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2003. p. 287–298.

NARENDRANATH, N.V., POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of Lactobacilli and Saccharomyces cerevisiae during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 2239-2243, 2005.

PARKS, D.H.; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R.G. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, p. 3123-3124, 2014.

RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 369-394, 2003.

RFA (2015). **Renewable Fuels Association**. In: Statistics. Acesso: 12 maio 2015. Disponível em: http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production.

ROSALES S.Y.R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica**: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. 1989, 200p.Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquista", Rio Claro, 1989.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 31, p. 401-408, 2004.

SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar Technology**, Amsterdam, v. 11, p. 109-123, 2009.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. In: BARTLETT, J.M.S. **PCR protocols**. New York: Humana Press,2013. p. 53-54.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p. 41-54, 2003.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. (2001). Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 819-828, 2001.

ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.; GIORDANO, R.C.; DE MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; NETO, C.C.C.; IMACEDO, I.C.; FO, D.L.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84, p. 1147–1161, 2000.

3 Estabelecimento da metodologia de análise de metabólitos de fermentação por GC-MS

Resumo

O processo de fermentação alcoólica realizado pela *Saccharomyces cerevisiae* tem grande importância para a produção do etanol combustível. Desta forma, a compreensão da fisiologia da levedura durante a fermentação é fundamental para a obtenção de melhores resultados do processo. Além disso, o processo fermentativo que ocorre em escala industrial submete as leveduras à diferentes situações de estresse que podem interferir em sua fisiologia. Considerando esses aspectos, o presente trabalho visou estabelecer uma metodologia de *footprinting* metabólico acessada através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para o estudo da fisiologia da levedura durante a fermentação. Para tal, foram realizados ensaios fermentativos com a *S. cerevisiae* CAT-1 simulando as condições industriais e o vinho delevedurado foi utilizado para estabelecimento de metodologias eficientes de extração e de análise através de GC-MS. A extração considerou diferentes volumes de amostra. Os parâmetros das análises foram testados de acordo com O'Hagan et al. (2005), Villas-Bôas et al. (2005) e Gulberg et al. (2004). Os seguintes fatores foram considerados para a análise dos resultados: (1) Qualidade do pico cromatográfico: formato do pico, linha de base e sobreposição de picos; (2) Número de metabólitos identificados; (3) Custo-benefício: relação entre o tempo de aquisição com o número de metabólitos identificados. Levando em conta esses parâmetros, o melhor resultado foi obtido com volume de amostra de 200 µL e com a metodologia de Gulberg et al. (2004), onde foi possível reportar 261 metabólitos, sendo a maioria classificado como *Unknown* (43%) e as três classes mais abundantes foram *Carbohydrates and carbohydrate conjugates* (16%), *Carboxylic acids and derivatives* (12%) e *Fatty Acyls* (5%). Com essa metodologia, muitos estudos podem ser feitos quanto à fisiologia da levedura em diferentes condições.

Palavras-chave: Metodologia; GC-MS; Metabólitos; Fermentação

Abstract

The fermentation process performed by the *Saccharomyces cerevisiae* has great importance for the production of ethanol fuel. Thus, an understanding of the yeast physiology during fermentation is critical to obtain the best results in the process. Moreover, the fermentation process that occurs in industrial scale can be very stressful to yeasts which may interfere with their physiology. Considering these aspects, the present study aimed to establish a metabolic *footprinting* methodology accessed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) to study the physiology of yeast during fermentation. To this end, fermentation tests were performed with the *S. cerevisiae* CAT-1 simulating the industrial conditions and fermentation wine was used to establish efficient methods of extraction and analysis by GC-MS. The extraction considered different sample volumes. The parameters of the analysis were tested according to O'Hagan et al. (2005), Villas-Boas et al. (2005) and Gulberg et al. (2004). The following factors were considered: (1) Quality of chromatographic peak: peak shape, baseline and overlapping peaks; (2) Number of

identified metabolites; (3) Cost-benefit: relationship between the time of acquisition with the number of identified metabolites. Given these parameters, the best result was obtained with sample volume of 200 µL and with the Gulberg et al. (2004) methodology, where it was possible to report 261 metabolites, the majority classified as Unknown (43%) and the three most abundant classes were Carbohydrates and carbohydrate conjugates (16%), Carboxylic acids and derivatives (12%) and Fatty acyls (5%). With this methodology, many studies can be made regarding yeast physiology under different conditions.

Keywords: Methodology; GC-MS; Metabolites; Fermentation

3.1 Introdução

O processo fermentativo realizado por *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol tem grande importância nos dias de hoje, especialmente pelo caráter mais sustentável da obtenção desse combustível. Países como os Estados Unidos e o Brasil são grandes produtores de etanol a partir de matéria vegetal, sendo milho e cana-de-açúcar as duas matérias-primas mais utilizadas. Pela sua importância, muitos estudos são realizados para melhor entender e/ou otimizar o processo fermentativo.

No entanto, o processo fermentativo em larga escala adotado no Brasil submete as leveduras à diferentes condições de estresse – alta concentração de etanol, presença de contaminantes, reciclo celular, entre outros – e a resposta da levedura a essas condições de estresse ainda é muito pouco conhecida (AMORIM et al., 2011).

A fermentação é um processo bioquímico catabólico anaeróbico e, no caso da fermentação alcoólica da cana-de-açúcar, o substrato é o açúcar (sacarose, glicose e frutose) e o principal produto é o etanol. Nesse processo, a levedura transforma o meio em que ela está, não só pela produção de etanol, mas também pela produção de subprodutos, como glicerol, ácido acético, ácido succínico, entre outros (BASSO, ALVES, AMORIM, 1996). E, apesar de a rede metabólica da *S. cerevisiae* permanecer em um estado pseudo-estacionário durante a fermentação, certos conjuntos de metabólitos intracelulares, tais como aminoácidos vacuolares, e a concentração de metabólitos extracelulares podem ser alterados significativamente (SAINZ et al., 2003).

Desta forma, a análise de metabólitos extracelulares é uma abordagem interessante para o estudo do metaboloma da fermentação, sendo a mesma descrita pela primeira vez por Allen et al. (2003) levando o nome de *footpriting* metabólico. A

cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é uma técnica robusta e eficiente para a detecção de metabólitos de baixa massa molecular. Para o estudo das substâncias mais conhecidas relacionadas à fermentação da *S. cerevisiae* (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996), essa pode ser uma técnica utilizada, pois tem como princípio a separação e identificação de misturas cujos constituintes tenham pontos de ebulição de até 300 °C e que são termicamente estáveis. Os estudos já realizados com metabólitos extracelulares de levedura permitiram identificar diferenças no metabolismo de leveduras em diferentes estados fisiológicos e entre mutantes (ALLEN et al., 2003; MO; PALSSON; HERRGARD, 2009).

Desta forma, o presente trabalho visou estabelecer uma metodologia de GC-MS para caracterizar o perfil metabólito da fermentação de mosto de cana-de-açúcar pela levedura *S. cerevisiae*, além da investigação do melhor preparo das amostras. Com os resultados obtidos, pretende-se possibilitar o uso de uma metodologia robusta para estudo do *footprinting* da levedura no processo fermentativo, permitindo o melhor entendimento do processo e abrindo possibilidade para o estudo da levedura sob diferentes condições durante o processo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Condução de ensaios fermentativos

3.2.1.1 Pré-inóculo e inóculo da levedura *S. cerevisiae* CAT-1

A levedura utilizada neste trabalho foi *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gustavo Goldman (USP) ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM).

O pré-inóculo foi realizado em meio YPD, contendo 20 g/L de glicose, 10 g/L de peptona, 10 g/L de extrato de levedura. O meio foi preparado em frascos *erlenmeyer* de 1000 mL contendo 250 mL de meio. A cepa estoque de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, mantida em placas de Petri, foi transferida para o meio de forma asséptica e incubada em agitador por 24 h a 200 rpm e 33 °C.

O inóculo ocorreu em biorreator Bioflo 115 de 3L (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) (Figura 7) que foi esterilizado com água a 121°C por 30 min.

Figura 7 – Biorreator Bioflo 115 de 3L utilizado para realização de ensaios fermentativos

No início, foi utilizado 120 mL de pré-inóculo e completou-se o volume para 1200 mL com o meio para inóculo, cuja composição de nutrientes está especificada na Tabela 3. As condições de crescimento foram 33 °C, sem controle de pH. A agitação e o fluxo de ar foram ajustados dependendo da concentração de oxigênio, de forma a manter a porcentagem superior a 50% de oxigênio dissolvido (O.D.), sendo que a agitação e aeração variaram de 150 rpm e 900 rpm, e 0,1 a 2,0 LPM, respectivamente. O ensaio foi realizado no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM).

Tabela 3 – Concentrações dos nutrientes para a composição do inóculo utilizado para fermentação

Nutriente	Concentração (g/L)
Glicose	15,0
Sacarose	15,0
Extrato de levedura	5,0
KH_2PO_4	1,0
Inóculo	-
KCl	1,0
$CaCl_2$. $2H_2O$	1,0
Oligoelementos	1,0 mL/L
Tiamina	0,003

3.2.1.2 Propagação celular da levedura *S. cerevisiae* CAT-1

O processo de propagação celular ocorreu em biorreator Bioflo 115 de 20L (New Brunswick Scientific Co., USA) que foi esterilizado*, in situ*, a 121°C por 45 min. O meio *Batch* era composto de ureia (5 g/L), fosfato monopotássio (KH_2PO_4) (2 g/L), mosto (30 g/L) no volume final de 10,8 L. O mosto era composto de açúcar e melaço. Todo o volume do inóculo (**3.2.1.1 Pré-inóculo e inóculo da levedura *S. cerevisiae* CAT-1**) foi transferido para o reator com o auxílio de bombas peristálticas. O consumo de açúcar foi monitorado no *Medium infrared* (FT-IR Spectrometer – Alpha, OPUS software, Bruker Optics Co.) e, uma vez consumido por completo, foram adicionados 2L de ureia (5 g/L) e fosfato monopotássio (KH_2PO_4) (2 g/L), e a alimentação de 1L de açúcares de melaço teve uma vazão de 3 g ART/L/h a fim de controlar o substrato limitante, seguindo protocolo de Santos et al. (2015).

As condições de crescimento foram 33 °C, sem controle de pH e a agitação e a vazão de ar foram ajustadas dependendo da concentração de oxigênio, que deveria permanecer sempre superior a 50% de oxigênio dissolvido (O.D.), sendo o mínimo e máximo da agitação 250 rpm e 500 rpm, e o mínimo e máximo do fluxo de ar em 0,1 a 2,0 LPM. O procedimento foi realizado no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM).

Todas as células crescidas foram centrifugadas em centrífuga de alta performance na centrifuga Avanti J26 XP (Beckman Coulter, Inc., Pasadena, US) a 7500 rpm por 30 min, ressuspendidas em 700 g de água estéril.

3.2.1.3 Processo de fermentação

O processo fermentativo foi baseado no processo fermentativo Melle-Boinot e constituiu dos seguintes passos: a) preparação do mosto; b) fermentação alcoólica; c) centrifugação; d) tratamento ácido nas células; e) centrifugação e f) reativação celular (Figura 8).

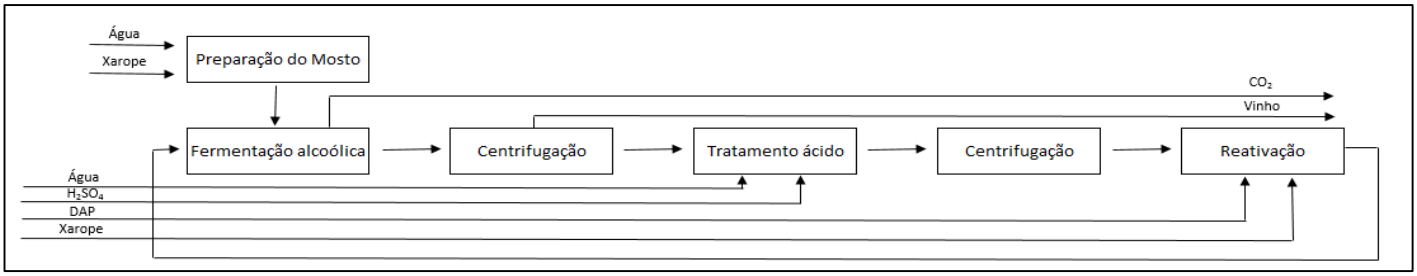

Figura 8 – Diagrama de blocos dos processos fermentativos

As fermentações ocorreram em biorreatores BioFlo® 115 3 L (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ). O biorreator foi esterilizado a 121 °C por 30 min com água. As células ressuspendidas foram transferidas para o biorreator com auxílio de bombas peristálticas. O mosto utilizado continha concentração aproximada de 272 g/L ART e peso total de 1000 g. A alimentação foi realizada de forma a simular a alimentação em batelada de usinas que ocorre de 4-6 h para completar a dorna, desta forma, a vazão foi ajustada para que toda a alimentação do mosto terminasse em 6h. As condições de fermentação foram 200 rpm, 30 °C, sem controle de pH e aeração.

Após o processo fermentativo, o vinho levedurado foi removido de forma estéril do biorreator com o auxílio de bombas peristálticas e centrifugado a 7500 rpm, por 30 min a 10 °C na centrifuga Avanti J26 XP (Beckman Coulter, Inc., Pasadena, US). Após a separação, as células foram ressuspendidas em 700 g de água e transferidas, novamente, para o biorreator de forma asséptica.

Em seguida, o tratamento ácido consistiu na adição de ácido sulfúrico 2 M até que fosse atingindo pH 2,5 ± 0.5 na solução, dentro do biorreator. Esta condição foi

mantida por 30 min, a 30° C, com rotação de 300 rpm e aeração de 1,4 LPM. Após o tratamento ácido, as células foram retiradas de forma asséptica do biorreator com auxílio de bombas peristálticas e centrifugadas 7500 rpm, por 30 min a 10° C na centrifuga Avanti J26 XP (Beckman Coulter, Inc., Pasadena, US) e depois ressuspendidas em 700 g de água. Já a reativação consistiu na adição de Xarope e diamônico fosfato (DAP) nas concentrações finais de 26 g/L e 7 g/L, respectivamente. O processo foi realizado em 1h, a 30° C, com rotação de 300 rpm e aeração de 0,14 vvm. Após esse período, iniciou-se a alimentação de mosto para o reciclo da fermentação, conforme descrito anteriormente.

3.2.1.4 Análises da fermentação

Durante o processo de propagação celular e também durante as fermentações foram realizados monitoramentos dos processos. Este consistiu na amostragem do início e final de cada reciclo. Foi realizada a contagem de células de leveduras no microscópio com a utilização de câmara de Neubauer a fim de determinar as taxas de viabilidade e brotamento da levedura.

Concentrações de levedura foram medidas por análises gravimétricas em triplicata, onde 2 mL de cada amostra serão submetidos a centrifugação (14000 rpm por 5 minutos), ressuspendidas duas vezes em água destilada e encaminhadas a um forno secador de biomassa a 80 °C.

A concentração de sacarose, determinação de açúcares redutores (AR) e etanol foi realizada com a filtragem em filtro Millex 22 µL PVDF e injetadas HPLC (Agilent Infinity 1260, Santa Clara, CA, USA) com coluna Aminex HPX 87H (300 7.8 mm, BIO-RAD, Hercules, CA) nas condições de 35 °C usando como fase móvel H_2SO_4 5 mM com fluxo de 0,6 mL/min.

3.2.1.5 Cálculos dos parâmetros do processo fermentativo

Os parâmetros do processo fermentativo que foram verificados consistiram em rendimento e produtividade (P_p).

Para o rendimento (eq 2.3), considerou-se a razão entre o produto formado em relação ao açúcar consumido ($Y_{P/S}$) em função da conversão estequiométrica (0,511 g/g) de sacarose em etanol.

Reação estequiométrica de inversão de sacarose em glicose e frutose:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \dashrightarrow 2C_6H_{12}O_6 \quad (2.1)$$

Reação estequiométrica de conversão de glicose e frutose em etanol e dióxido de carbono:

$$C_6H_{12}O_6 \dashrightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2 \quad (2.2)$$

$$rendimento(\%) = \frac{[P]-[P]_0}{[S]} \times \frac{100}{0{,}511} \quad (2.3)$$

Onde:

P é a concentração de etanol final (g/L)

P_0 é a concentração de etanol ao termino da fermentação (g/L)

S é a concentração de substrato (sacarose, glicose e frutose) consumidos para a produção de etanol (g/L).

Já para produtividade (P_p) (eq 2.4) foi calculada pelo produto final (P) menos o produto inicial (P_0) dividido pelo tempo total da fermentação (t_f):

$$P_P = \frac{[P]-[P]_0}{t_f} \quad (2.4)$$

3.2.2 Otimização do protocolo de análise de metabólitos da fermentação por GC-MS

3.2.2.1 Extração de metabólitos

Para o estabelecimento do protocolo de extração foram utilizadas as amostras de vinho delevedurado e mosto de alimentação das fermentações. A extração foi realizada, inicialmente com dois volumes amostrais para o vinho: 500 e 200 µL e apenas 500 µL para o mosto. Em tubos de 1,5 mL foram adicionadas as amostras e os solventes de extração, nos volumes de 500 µL de solução 1:1 metanol:água (v/v) e 500 µL de diclorometano. Os tubos foram agitados por 1 min em vortex. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4°C, 12000 *x* g. Foram coletadas as frações polares e apolares e armazenadas em freezer – 80 °C até o momento das análises.

Para as análises por GC-MS, alíquotas de 200 µL, do sobrenadante de amostras de vinho e mosto extraídos, foram transferidas para tubos de vidro. As amostras foram então levadas para concentrador a vácuo por 30 min. Na etapa seguinte, as amostras foram derivatizadas, seguindo o protocolo descrito por Hoffman et al. (2010). Para isso, foram adicionados 30 µL de metoxiamina (15 mg/mL) em piridina, as amostras foram agitadas por 1 min e em seguida mantidas em repouso por 16 h à temperatura ambiente no escuro. A sililacão foi realizada com a adição de 30 µL de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (trimetilclorosilano). As amostras foram mantidas em repouso por 1 h. Posteriormente, foram adicionados 30 µL de Heptano. Nesta etapa, foram utilizadas também amostras controles (brancos) e uma série de alcanos (C_{12} – C_{40}), o que possibilitou o cálculo dos índices de retenção (SCHAUER et al., 2005).

3.2.2.2 Análise por GC-MS e processamento dos dados

Para as análises foi utilizado o equipamento GC x GC-TOFMS (Pegasus 4D, Leco, St. Joseph, US), equipado com duas colunas de sílica fundida, sendo a coluna da primeira dimensão (DB-5) com 20 m de comprimento (0,18 mm diâmetro interno x 0,18 µm de filme) e a coluna da segunda dimensão (RXT-17) de 0,69 m (0,10 mm diâmetro interno x 0,10 µm de filme) (Restek Corporation, Bellefonte, US) foi utilizado para as análises. Os parâmetros das análises foram avaliados de acordo com as Tabelas 4 e 5, descritos em O'Hagan et al. (2005), Villas-Bôas et al. (2005) e Gulberg et al. (2004).

Tabela 4 – Condições do GC-MS

Parâmetros/Referência	**O'Hagan et al. (2005)**	**Villas-Bôas et al. (2005)**	**Gulberg et al. (2004)**
Volume da amostra injetado (µL)	5	2.5	1
Temperatura de injeção (°C)	270	280	280
Modo: s*plit*/*splitless*	*split*:45	*splitless*	*splitless*
Fluxo Hélio (mL/min)	1	0.8	1
***Transfer line* (°C)**	270	280	280
***Aquisition delay* (s)**	250	300	250
Faixa dinânica (*m/z*)	40-800	38-550	40-800
Tempo de corrida (min)	10	40	27

Tabela 5 – Rampa de gradiente de temperatura do GC-MS.

Gradiente de T:	**Gradiente de T (°C/min)**	**Temperatura Alvo (°C)**	**Duração (min)**
O'Hagan et al. (2005)	Inicial	70	2
	28	290	1
Villas-Bôas et al. (2005)	Inicial	45	2
	9	180	5
	40	220	5
	40	280	11,5
Gulberg et al. (2004)	Inicial	80	2
	15	305	10

Posteriormente, os cromatogramas gerados foram exportados para o programa ChromaTOF, versão 4.32 (Leco, St. Joseph, US), no qual foi realizada a correção da linha de base e identificação dos metabólitos. Foram considerados metabólitos válidos apenas aqueles com similaridade igual ou maior a 600 com o banco de metabólitos da NIST v.

3.2.3 Análise dos metabólitos de fermentação por GC-MS

3.2.3.1 Extração de metabólitos

As amostras coletadas do vinho dos reciclos realizados, e do mosto de alimentação foram utilizadas para análise. A extração foi realizada com 500 µL de cada amostra em tubos 1,5 mL com os solventes orgânicos nos volumes de 500 µL de solução metanol:água (v/v) e 500 µL de Diclorometano. Os tubos foram agitados por 1 min em vortex. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C, 12000 *x* g. Foram coletadas as frações polares e armazenadas em freezer – 80 °C para futuras análises.

Para as análises por GC-MS, alíquotas de 200 µL do sobrenadante polar das amostras do vinho e 100 µL do sobrenadante polar de amostras do mosto foram transferidas para *vials* de vidro (1,5 mL). As amostras foram então levadas para concentrador a vácuo à temperatura ambiente por 30 min. Na etapa seguinte, as amostras foram derivatizadas. Para isso, foram adicionados 30 µL de metoxiamina (15 mg/mL) em piridina, as amostras foram agitadas por 1 min e em seguida mantidas em repouso por 16 h à temperatura ambiente. A sililacão foi realizada com a adição de 30 µL de MSTFA (N-metil-trimetilsilil-trifluoroacetamida) e 1% de TMCS (trimetilclorosilano). As amostras foram mantidas em repouso por 1 h. Posteriormente, foram adicionados 30 µL de Heptano. Nesta etapa, foram utilizadas também amostras controles (brancos) e uma série de alcanos (C_{12} – C_{40}), o que possibilitou o cálculo dos índices de retenção (SCHAUER et al., 2005). Além disso, 10 µL dos compostos isotopicamente marcados: ácido succínico (D4, 98% - DLM 584-5), ácido mirístico (1, 2, 3 – $^{13}C_3$, 99% - CLM 3665- 0.5) e ácido palmítico (1, 2, 3, 4 – $^{13}C_4$), preparados na concentração de 1 mg/mL, foram utilizados como padrões externos.

3.2.3.2 Análise por GC-MS e processamento de dados

Amostras derivatizadas (1 µL) foram injetadas, em modo *splitless*, no cromatógrafo gasoso Agilent 7890A (Agilent, Atlanta, GA), equipado com duas colunas de sílica fundidas sendo a coluna da primeira dimensão (DBE) de 20 m comprimento x 0,18 mm diâmetro interno x 0,18 µm e a coluna da segunda dimensão RTX-17 de 0,69 metro × 0,10 mm diâmetro interno x 0,10 µm (Agilent J&W Scientific). As amostras foram analisadas de acordo com Gullberg et al. (2004) com modificações. A temperatura de injeção foi de 280 °C, com fluxo de hélio de 1 mL/min, a temperatura da coluna foi mantida a 80 °C por 5 min e depois aumentou a

uma taxa de 15 °C até 305 °C, sendo mantida nesta temperatura por 10 min. Finalmente, o efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons do equipamento GC x GC/TOF-MS (Pegasus 4D, Leco, St. Joseph). A temperatura da fonte de íons foi de 280 °C, a corrente de ionização de 2,0 mA, voltagem de 70 eV. Foram registrados 20 espectros/s e a voltagem do detector foi de 1500 V. Os primeiros 250 s foram desconsiderados e a faixa de massas foi de *m/z* 40-800.

O processamento de dados foi conduzido em duas etapas. Inicialmente os cromatogramas gerados foram processados no *ChromaTOF*, versão 4.32, onde foi feita a correção da linha de base e todos os arquivos foram transformados para a extensão *netCDF*. Em seguida, foi utilizado o pacote *TargetSearch* (CUADROS-INOSTROZA, 2009) no ambiente R (http://www.R-project.org) para a realização da deconvolução dos picos cromatográficos; a obtenção do índice de retenção (IR); a correção do tempo de retenção (RT); a identificação e alinhamento de picos e identificação de metabólitos. Para esta última etapa foi considerado o desvio de ± 2 s no IR. A biblioteca do *Golm Metabolome Database* (GMD) (http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/) foi utilizada como referência para a identificação dos metabólitos e foram considerados metabólitos válidos apenas aqueles com três ou mais massas características e com similaridade igual ou maior a 600. Finalmente, a intensidade dos metabólitos foi normalizada pela contagem iônica total (TIC) de cada amostra e, no caso do mosto, foi normalizado pelo volume utilizado.

3.2.3.3 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados de GC-MS foram realizadas no programa online *MetaboAnalyst* (XIA et al., 2012, http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/). Inicialmente, os dados foram normalizados pela mediana, seguido da transformação logarítmica (log 2) e do escalonamento por Pareto (VAN DEN BERG; FRIEDLANDER, 2006). O dendrograma foi construído considerando a medida de distância *Euclidean* e o algoritmo utilizado para o agrupamento foi o *Ward*.

3.3 Resultados

3.3.1 Ensaios fermentativos com levedura *S. cerevisiae* CAT-1

A propagação celular gerou a massa celular necessária da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 para a realização das fermentações. Esta foi realizada tentando

simular as condições existentes no processo de batelada alimentada com reciclo de células (Melle-Boinot) realizado na usina, operando com alta densidade celular e tratamento ácido após o final do reciclo.

Quatro ciclos de fermentação em batelada alimentada foram realizados com alta densidade celular, cerca de 50 g/L no final do processo. A viabilidade celular e a taxa de brotamento da *S. cerevisiae* CAT-1 variaram pouco ao longo dos reciclos, de 98% a 95% para a primeira e 8% a 11% para a segunda (Figura 9).

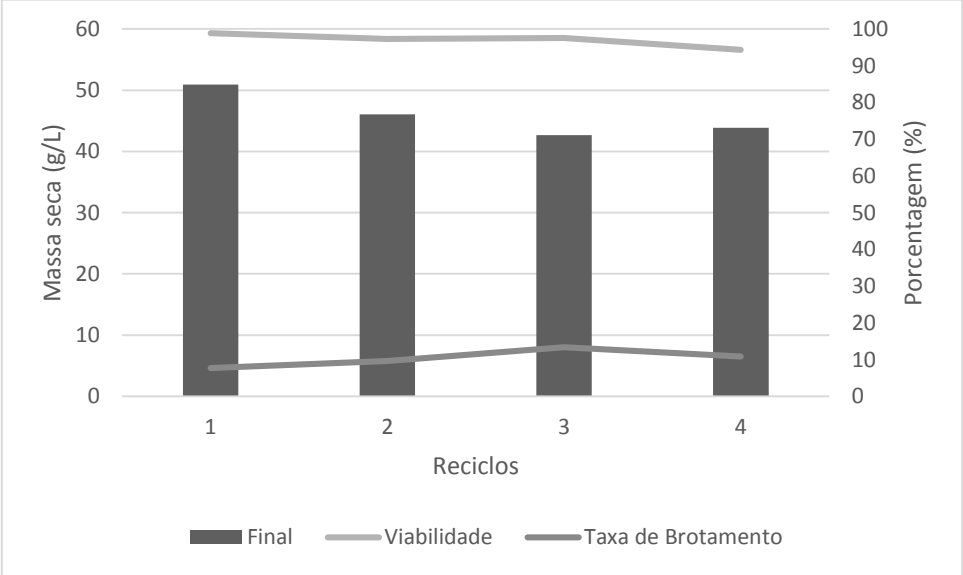

Figura 9 – Concentração celular, viabilidade e taxa de brotamento de *S. cerevisiae* CAT-1 ao longo dos reciclos fermentativos

O rendimento fermentativo foi baseado na eficiência da conversão de açúcar em etanol. Foi possível observar que o rendimento ao longo dos quatro reciclos manteve-se estável, em torno de 85%. (Figura 10).

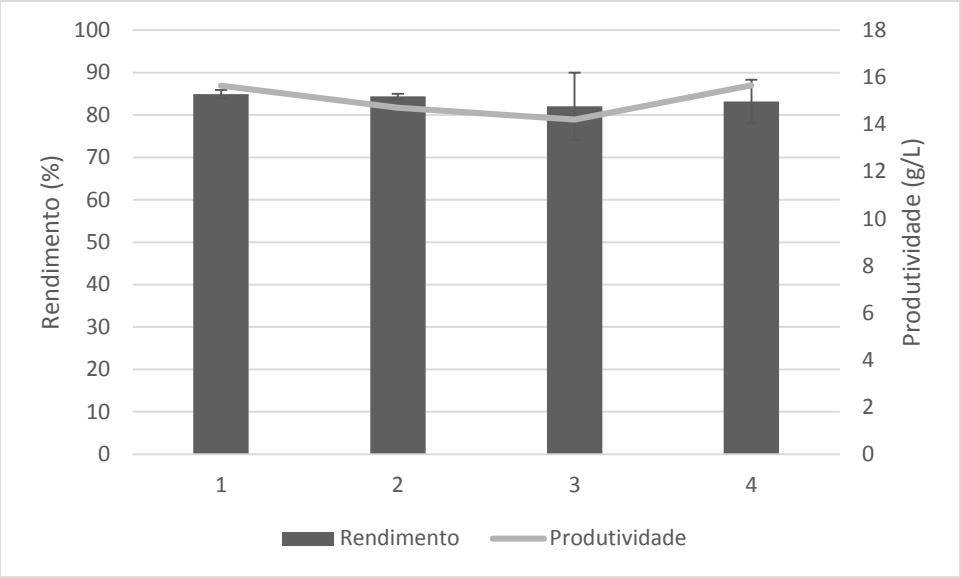

Figura 10 – Rendimento fermentativo e produtividade ao longo dos reciclos

3.3.2 Otimização do protocolo de análise de metabólitos de fermentação por GC-MS

Para a análise dos metabólitos, foi utilizado o aparelho de cromatografia gasosoa acoplado a espectrometria de massas (GS-MS). Para tal, foi necessário avaliar quais parâmetros utilizados no equipamento gerariam os melhores resultados (Tabela 4, 5).

Pela característica complexa do meio utilizado e dos produtos gerados pela levedura, foi realizada a extração de compostos polares e apolares em duas diferentes fases, sendo que cada uma dessas fases foi considerada individualmente na otimização da metodologia.

Foram utilizados como referência três trabalhos: O'Hagan *et al*. (2005) que realizaram a otimização da instrumentação analítica para amostras de leveduras em GC-MS, Villas-Bôas *et al*. (2005) que analisaram o *footprinting* metabólito de leveduras também em GC-MS e Gullberg *et al*. (2004) que desenvolveram uma metodologia robusta para a análise de plantas por GC-MS.

Os parâmetros considerados em cada uma das metodologias afetam a análise por GC-MS de formas distintas. Quanto aos procedimentos realizados até o momento da injeção da amostra na coluna, temos: (1) o volume da amostra que está relacionado com a resolução da amostra, sendo que se deve utilizar o menor volume possível; (2) a temperatura de injeção que deve ser alta o suficiente para volatilizar a amostra rapidamente; (3) a injeção da amostra na coluna que pode ser realizada no

modo *split* ou *splitless*, ou seja, na primeira a válvula *split* está aberta desde o início da injeção da amostra ocasionando a entrada de apenas parte da mesma, já na segunda, a válvula *split* está fechada no início da injeção, o que permitirá a entrada de todo o volume da amostra na coluna.

Com relação aos parâmetros da cromatografia gasosa, temos: (1) o fluxo de hélio, que está relacionado com a eficiência e a qualidade das análises; (2) a rampa de temperatura, que se baseia no conceito de cromatografia gasosa com temperatura programada (CGTP), que reduz a co-eluição e aumenta a definição de picos; (3) a temperatura do *transfer-line* que garante que os metabólitos volatilizados não condensem ao entrar na fonte de ionização (EI) do espectrômetro de massas.

Já com relação ao detector, foram considerados os seguintes fatores: (1) *aquisition delay* a fim de evitar a aquisição do solvente utilizado nas amostras; (2) a escolha da faixa de massa, que está relacionada com a classe de metabólitos que será analisada.

Inicialmente, notou-se que para todas as amostras – vinho da fermentação e mosto – houve um maior número de picos cromatográficos e metabólitos identificados para as frações polares da extração.

A variação de cada um dos parâmetros analisados gerou uma diferenciação no resultado entre as metodologias utilizadas. Os cromatogramas gerados demonstraram que a metodologia utilizada em O'Hagan et al. (2005) e Gulberg et al. (2004) geraram picos em maior quantidade e melhores definidos para amostras de fermentação com mosto de cana-de-açúcar, do que a metodologia de Villas-Bôas et al. (2005) (Figuras 11, 12 e 13).

Analisando os resultados, a metodologia que retornou o maior número de metabólitos polares para todas as amostras de vinho e mosto foi a de Gullberg et al. (2004), já para os metabólitos apolares das amostras de vinho, o protocolo de Villas-Bôas et al. (2005) reportou maior número (Tabela 6 e ANEXO A).

Por fim, também foram considerados os tempos de corrida necessários para cada uma das metodologias, uma vez que isso acarreta em menos tempo de equipamento e economia dos gases e reagentes utilizados. O'Hagan et al. (2005) apresentou a metodologia com menor tempo, cerca de 10 minutos para realização da cromatografia gasosa, seguido de Gullberg et al. (2004) com o tempo de 27 minutos e, por fim, Villas-Bôas et al. (2005) com tempo de CG-MS de 40 minutos.

Tabela 6 – Metabólitos reportados com similaridade maior de 600 nas metodologias testadas

Amostra	Metodologia	Fração	Volume	Metabólitos	
				Total	Sim. > 600
CP_A_200	Gullberg *et al*. (2004)	Vinho Apolar	200	303	209
CP_A_500	Gullberg *et al*. (2004)	Vinho Apolar	500	240	172
CP_P_200	Gullberg *et al*. (2004)	Vinho Polar	200	999	648
CP_P_500	Gullberg *et al*. (2004)	Vinho Polar	500	999	685
CP_M_500	Gullberg *et al*. (2004)	Mosto Polar	500	753	513
OH_A_200	O'Hagan *et al*. (2005)	Vinho Apolar	200	167	127
OH_A_500	O'Hagan *et al*. (2005)	Vinho Apolar	500	114	91
OH_P_200	O'Hagan *et al*. (2005)	Vinho Polar	200	653	412
OH_P_500	O'Hagan *et al*. (2005)	Vinho Polar	500	714	464
OH_M_500	O'Hagan *et al*. (2005)	Mosto Polar	500	351	185
VB_A_200	Villas-Bôas *et al*. (2005)	Vinho Apolar	200	526	354
VB_A_500	Villas-Bôas *et al*. (2005)	Vinho Apolar	500	383	283
VB_P_200	Villas-Bôas *et al*. (2005)	Vinho Polar	200	1000	619
VB_P_500	Villas-Bôas *et al*. (2005)	Vinho Polar	500	1000	603

Sim. – Similaridade

Desta forma, a metodologia que apresentou maior quantidade e melhor definição de picos, que retornou o maior número de metabólitos com similaridade maior ou igual a 600, na maioria das amostras, e que apresentou um tempo intermediário de uso do equipamento foi a de Gullberg et al. (2004).

3.3.3 Classificação dos metabólitos

As amostras do ensaio fermentativo e amostras do mosto foram analisadas com a metodologia de Gullberg et al. (2004) escolhida no processo de otimização. Após o processamento dos dados no pacote *TargetSearch* e identificação das moléculas no banco GMD (http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/), foram reportados 261 metabólitos.

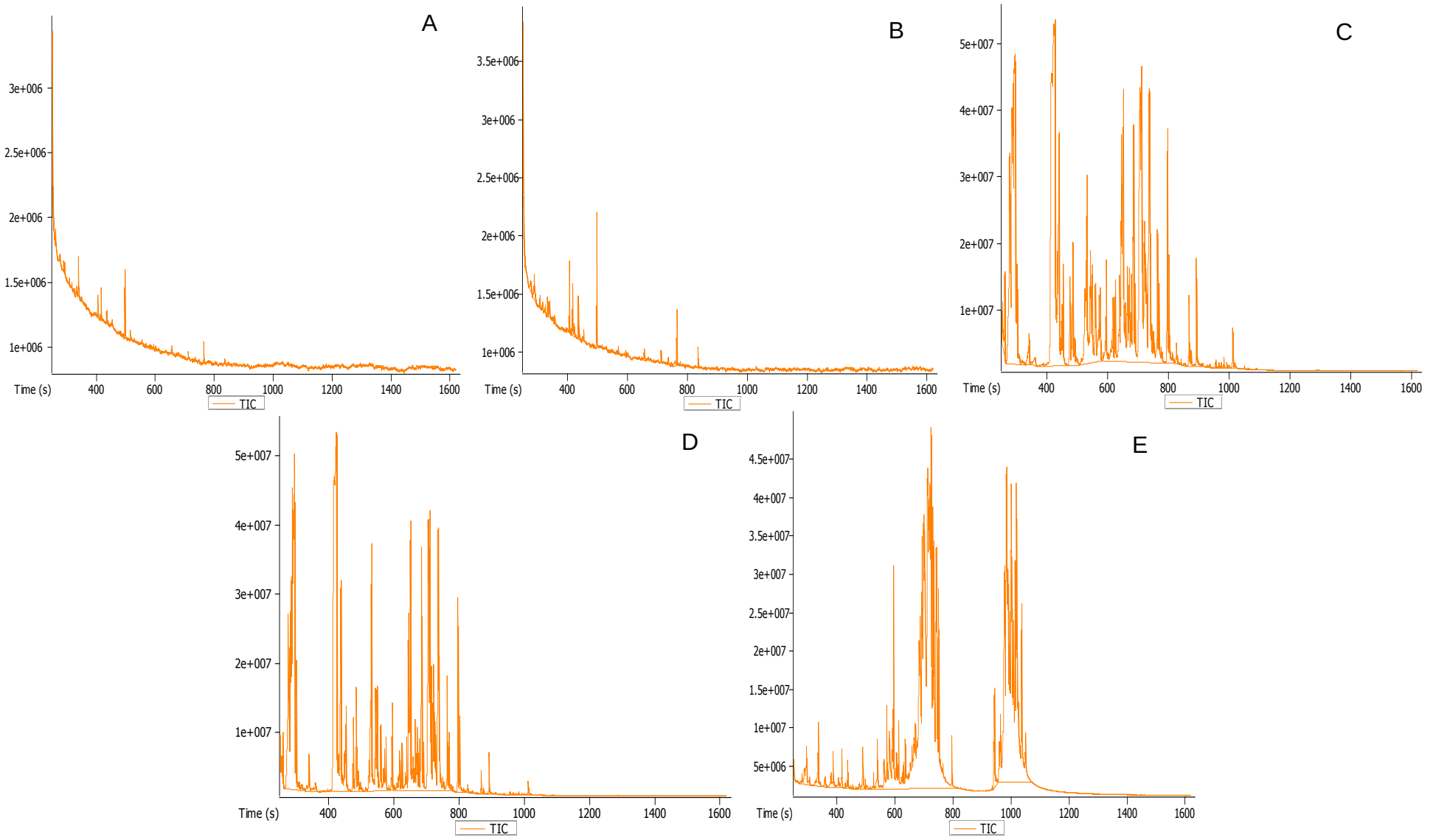

Figura 11 – Cromatogramas Gullberg et al. (2004) (A) Vinho apolar, 500 µL; (B) Vinho apolar, 200 µL; (C) Vinho polar, 500 µL; (D) Vinho polar, 200 µL; (E) Mosto, 200 µL

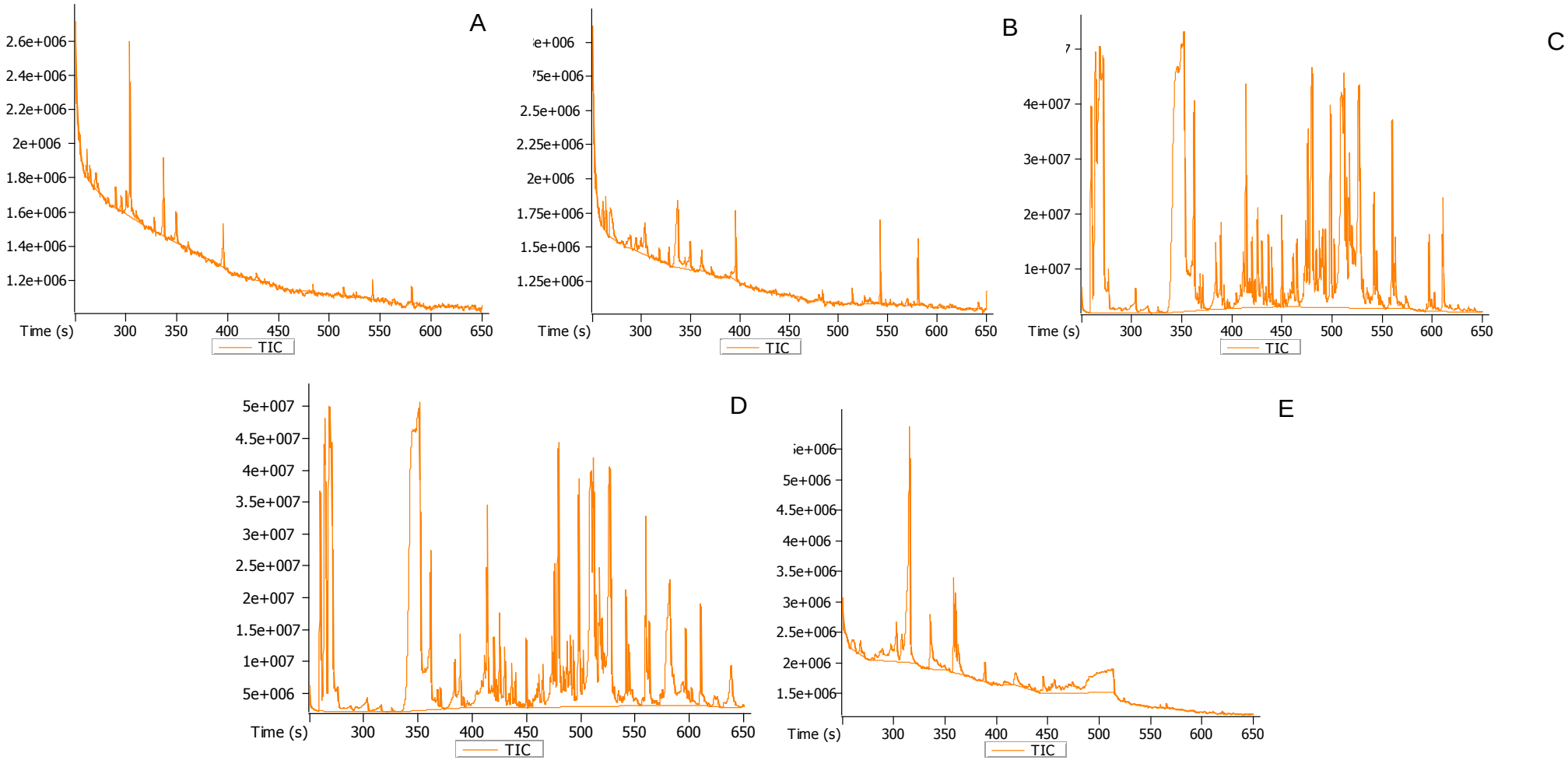

Figura 12 – Cromatogramas O'Hagan et al. (2005) (A) Vinho apolar, 500 µL; (B) Vinho apolar, 200 µL; (C) Vinho polar, 500 µL; (D) Vinho polar, 200 µL; (E) Mosto polar, 200 µL

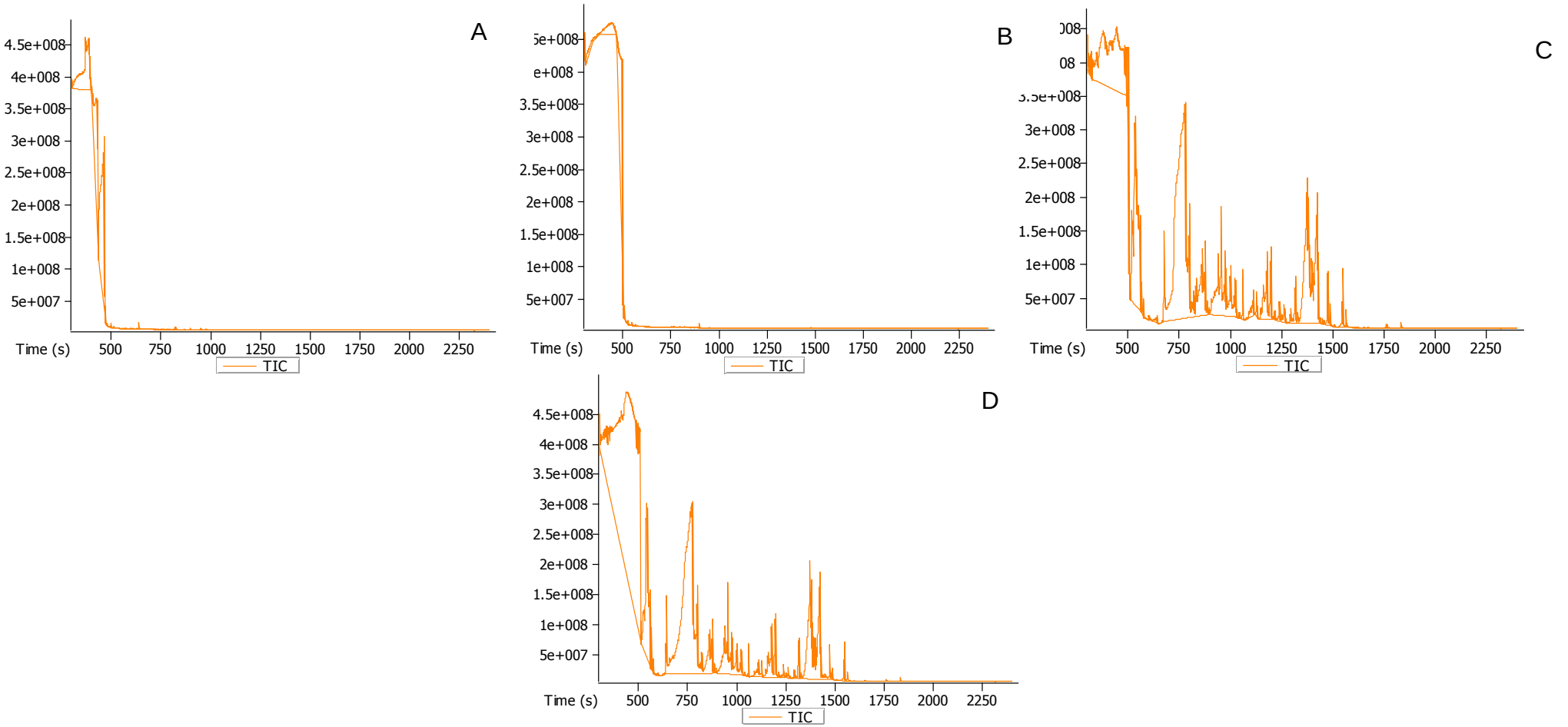

Figura 13 – Cromatogramas Villas-Bôas et al. (2005) (A) Vinho apolar, 500 µL; (B) Vinho apolar, 200 µL; (C) Vinho polar, 500 µL; (D) Vinho polar, 200 µL

A fim de verificar a classificação realizada pelo *TargetSearch*, foram realizadas comparações do espectro de fragmentação e o alinhamento de massas características dos metabólitos. O espectro de fragmentação encontrado foi comparado com o espectro referência do banco de dados do GMD. Já o alinhamento das massas características do metabólito tem de ser referente ao Index de Retenção (RI) do composto.

Inicialmente foi realizada uma triagem para a retirada de metabólitos que poderiam ter sido classificados erroneamente, bem como compostos provenientes da coluna do cromatógrafo. Esses metabólitos foram: hormônio humano (2133), lactose e derivados (1903; 1920; 1949; 1953; 1970; 2009), composto sintético (538; 877) e siloxano e derivados (1576; 1639). Foi também realizada a somatória dos metabólitos que foram classificados com identidades diferentes, porém continham o mesmo nome, como no caso de *Arabinoheptulosonic acid enol, 3-deoxy-* (1262; 1204), *beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose* (1923; 1939), *Isomaltose* (2189; 2145), *Myristic-acid-amide* (2089; 2086) e *Propionic acid, 3-ureido-* (595; 720).

Após as devidas correções, o número total de metabólitos gerados foi de 244. Estes são pertencentes a diferentes classes e, no total, foram afiliados a 28 classes. A maioria dos metabólitos (43%) foi classificada como *Unkown*, ou seja, são metabólitos já reportados em outros orgânicos, cuja função ainda não foi determinada. As três classes mais abundantes foram *Carbohydrates and carbohydrate conjugates* (16%), *Carboxylic acids and derivatives* (12%) e *Fatty Acyls* (5%), todas as outras classes representaram menos de 5% do total (Figura 14).

Os metabólitos identificados e as suas respectivas intensidades normalizadas - pela contagem iônica total (TIC) de cada amostra e, no caso do mosto, normalizado pelo volume utilizado - foram utilizados nas análises estatísticas. O dendograma gerado mostra uma diferença entre o perfil metabólico das amostras de mosto e do vinho da fermentação. Esta separação é importante uma vez que o substrato utilizado para a fermentação é o mosto e, no entanto, os metabólitos característicos da fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1 são outros, e podem ser separados do primeiro (Figura 15).

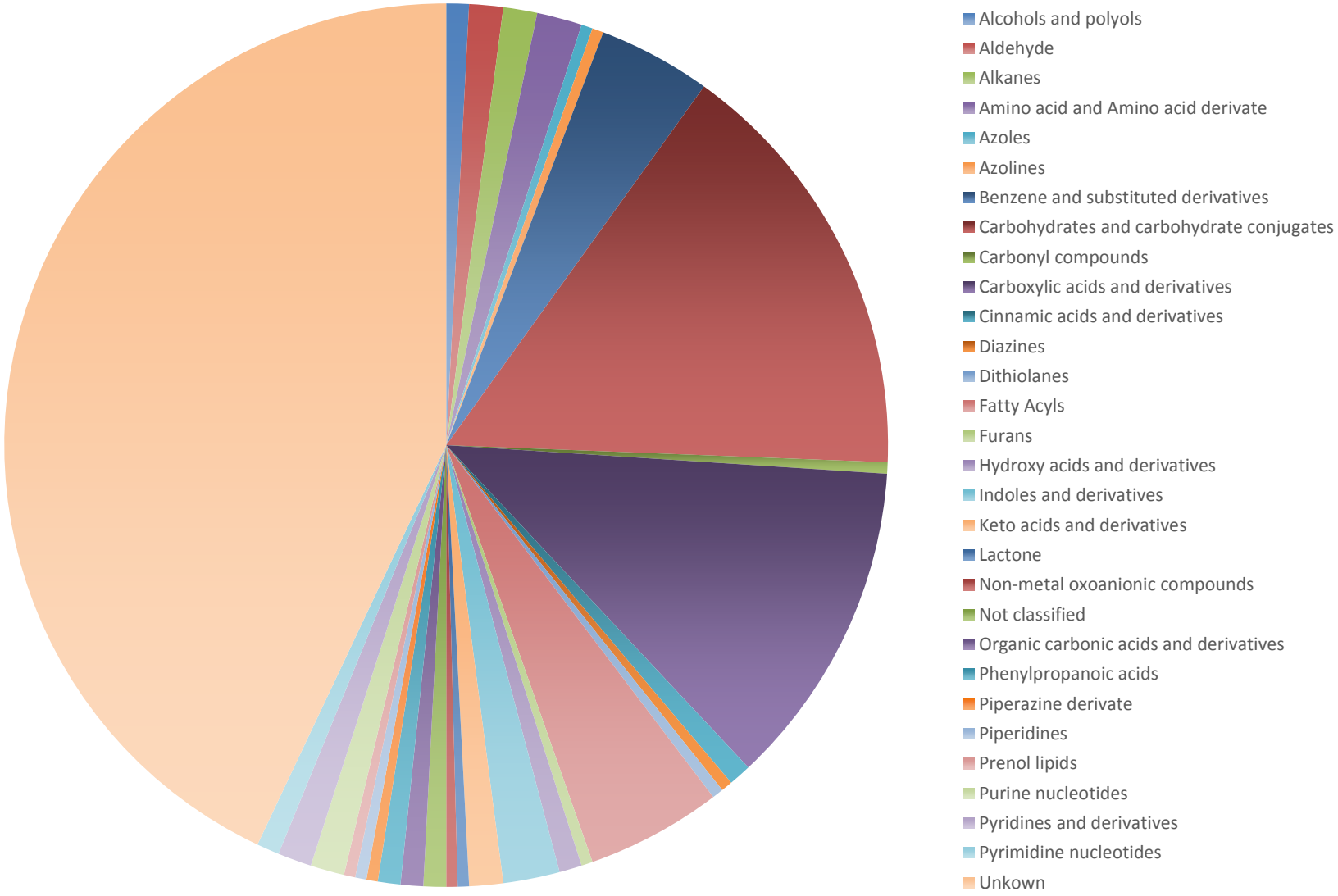

Figura 14 – Classes dos metabólitos reportados na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1

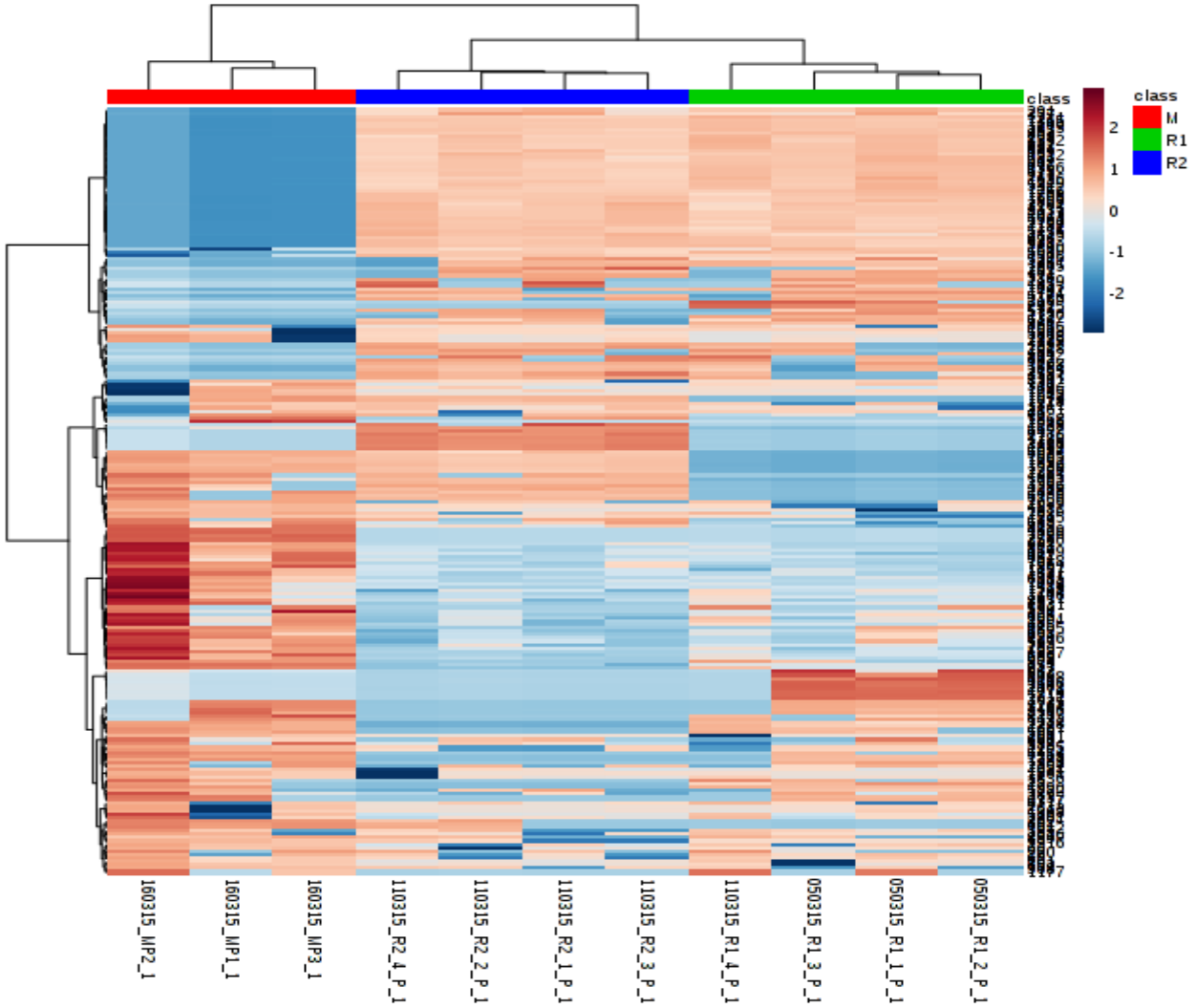

Figura 15 - Dendograma dos metabólitos das amostras de mosto (M) e de vinho da fermentação (R1 e R2) de *S. cerevisiae* CAT-1, sendo que a escala de cor indica abundância, onde vermlho é mais abundante e azul é menos abundante

3.4 Discussão

A metabolômica é uma análise amplamente utilizada para a detecção de um grande número de metabólitos. Muitos estudos utilizaram esta técnica para identificar os metabólitos produzidos durante processo fermentativo de uva por *S. cerevisiae* (HOWELL et al., 2006; CARRAU et al., 2007; RICHTER et al., 2015), além de utilizarem a análise para elucidar diferenças metabólicas de leveduras em diferentes estados fisiológicas (ALLEN et al., 2003).

O presente trabalho visou estabelecer uma metodologia eficiente para o estudo do metaboloma da fermentação de *S. cerevisiae* de mosto de cana-de-açúcar. As fermentações realizadas obtiveram um rendimento aproximado de 85%, estando condizente com a literatura, mesmo sabendo que esta pode atingir valores maiores de rendimento (BASSO et al., 1996).

A abordagem utilizada no presente trabalho foi a de *footprinting* metabólito. Essa técnica, descrita por Allen et al. (2003), analisa os metabólitos extracelulares e leva vantagem sobre a análise de *fingerprinting* - que estuda os metabólitos intracelulares - por, muitas vezes, não necessitar da realização dos passos de *quenching* e extração. No entanto, é necessário apontar que o *footprinting* metabólico não deve ser utilizado como estratégia para descrever o perfil metabólico e sim para identificar metabólitos que efetivamente contribuem para a determinação do estado metabólico estudado (ALLEN et al., 2003, VILLAS-BÔAS et al., 2005b) além de refletir o estado da célula e, portanto, poder ser utilizado como um forte indicador do fenótipo da mesma (CARNEIRO et al., 2011; MO; PALSSON; HERRGAND, 2009).

Os ensaios fermentativos realizados no presente trabalho utilizaram mosto de cana-de-açúcar, desta forma, além da complexidade de compostos produzidos pelos micro-organismos, havia a complexidade do meio. De maneira geral, para melhor determinar a metodologia que possibilitaria a melhor identificação dos compostos presentes em cada amostra, foram considerados alguns fatores: (1) Qualidade do pico cromatográfico: formato do pico, linha de base e sobreposição de picos; (2) Número de metabólitos identificados; (3) Custo-benefício: relação entre o tempo de aquisição com o número de metabólitos identificados.

Dos trabalhos utilizados como referência para a otimização da análise de metabólitos da fermentação, O'Hagan et al. (2005) e Villas-Bôas et al. (2005) trabalharam com amostras de metabólitos de levedura e Gullberg et al. (2004)

trabalharam com amostra de planta. Apesar de diferentes organismos modelo, os trabalhos utilizaram metodologias de análises robustas que resultaram na identificação de diversos metabólitos.

Pela complexidade metabólica da fermentação da *S. cerevisiae* de mosto de cana-de-açúcar (*data not shown*), optou-se por realizar um passo inicial de extração de metabólitos utilizando dois solventes: água:metanol (1:1) e diclorometano na mesma proporção, sendo o primeiro de caráter polar e o segundo de caráter apolar. No trabalho de Villas-Bôas et al. (2005), ao testar diferentes solventes para a extração de metabólitos de levedura, os autores observaram que os melhores resultados foram obtidos quando utilizado metanol puro. Além disso, Allen et al. (2003) mesmo não tendo realizado extração, utilizou o solvente 30:70 v/v metanol:água para diluir as amostras de *footprinting* metabólico de leveduras. Metanol é, de fato, um solvente orgânico utilizado para a extração de metabólitos em plantas e micro-organismos (FIEHN et al., 2002; KOEK et al., 2006). No presente trabalho, nas três metodologias utilizadas, a fração polar da extração gerou picos melhores definidos e, também, maior número de picos. Desta forma, esta fração é mais propícia para análises *footprinting* de metabólitos de fermentação.

As diferenças nos parâmetros estudados, adotados em cada metodologia, resultaram em diferentes resultados gerados pelo GC-MS. Entende-se a dificuldade de mensurar como cada uma das variáveis de fato afetam os resultados, uma vez que eles podem agir sinergicamente. Sendo assim, a contribuição de cada parâmetro foi analisada separadamente.

O volume de amostra injetado variou de 1 a 5 µL entre as metodologias utilizadas. Idealmente, para a obtenção do melhor formato do pico e uma melhor resolução, o menor volume possível deve ser utilizado. Em contrapartida, quanto mais compostos existem em uma amostra, poderá haver a necessidade de utilização de um maior volume. De fato, as amostras de vinho de fermentação e mosto mostraram-se muito complexas. Além disso, a injeção nos modos *split* ou *splitless* está diretamente relacionada com a concentração da amostra que entra na coluna (MCNAIR; MILLER, 2009).

Para amostras de fermentação, o protocolo de Villas-Bôas et al. (2005) que utilizou o maior volume (5 µL) e adotou o modo de injeção *splitless,* mostrou-se menos eficiente na definição dos picos. Já a metodologia de injeção de 2,5 µL adotada por O'Hagan et al. (2005) no modo *splitl*:45, onde apenas 45% do volume

do volátil é injetado na coluna, mostrou-se mais eficiente que a anterior, com o menor volume inserido na coluna, foi possível melhorar a resolução da separação. No entanto, a injeção *split* pode discriminar algumas moléculas, principalmente as de maior massa molecular, além de diminuir a detecção de metabólitos presentes em menor abundância. Por fim, o protocolo adotado por Gullberg et al. (2004) que injetou 1 µL em modo *splitless* gerou cromatogramas com grande abundância de picos e melhor definidos. E a temperatura de injeção poderia ser um fator de influência na injeção, no entanto, todas as três metodologias utilizaram valores muito próximos, garantindo que as amostras volatilizassem assim que injetadas.

O hélio é um gás inerte, cuja a função é carregar as moléculas através da coluna, desta forma, o fluxo constante garante a reprodutibilidade do tempo de retenção das moléculas e evita ruído. De maneira geral, quanto maior o fluxo do hélio, menor a interação da molécula com a coluna e mais rápido ela atravessará a mesma. Apenas Villas-Bôas et al. (2005) utilizou um valor de vazão (0,8 mL/min) menor que as metodologias de O'Hagan et al. (2005) e Gullberg et al. (2004), o que pode ser um dos fatores que explicam um tempo maior para a eluição dos metabólitos, quando comparado aos outros dois trabalhos.

A rampa de temperatura dos metabólitos baseia-se no processo de cromatografia gasosa com temperatura programada (CGTP) que consiste no aumento da temperatura da coluna durante a corrida do GC (MCNAIR; MILLER, 2009). O resultado deste processo, em comparação com a separação isotérmica é a redução da co-eluição e o aumento da definição de picos de amostras complexas. Os três trabalhos utilizaram CGTP, a diferença foi na configuração do programa de temperatura.

Os trabalhos de O'Hagan et al. (2005) e Gullberg et al. (2004) iniciaram com temperaturas iniciais muito semelhantes, 70 e 80 °C, respectivamente. As taxas de aquisição dos dois trabalhos foram diferentes, O´Hagan et al. (2005) empregaram uma taxa de 28 °C/min até 290 °C, o que provocou um deslocamento do cromatograma para a direita, quando comparado com Gullberg et al. (2004). Gullberg et al. (2004) utilizaram uma taxa de 15 °C/min até 305 °C, que por ser quase a metade do valor da temperatura utilizada em O´Hagan et al. (2005), ocasionou em uma eluição mais lenta dos metabólitos, uma vez que o aumento da temperatura tem efeito direto no aumento da pressão de vapor e, consequentemente, na eluição mais rápida do metabólito.

No trabalho de Villas-Bôas *et al*. (2005), três diferentes rampas de aquisição foram utilizadas. A primeira mais lenta de 9 °C/min até 180 °C e as duas últimas de 40 °C/min até 220 °C e depois até 280 °C. No entanto, para as amostras de fermentação, o CGTP adotado neste artigo não foi eficiente, gerando picos com base larga e não definidos, quando comparado com as outras duas metodologias. E, nas três metodologias a temperatura do *transfer line* foi alta e muito similar, garantindo que as amostras não condensassem antes de entrar no detector.

Com relação aos parâmetros do detector, o *aquisition delay* e a faixa dinâmica dos diferentes trabalhos foram comparados. A metodologia de Gullberg et al. (2004) retornou o maior número de metabólitos, seguido de Villas-Bôas et al. (2005) e O´Hagan et al. (2005). Apesar de os trabalhos de Gullberg et al. (2004) e O´Hagan et al. (2005) utilizarem os mesmos valores de *aquisition delay* e de faixa dinâmica, outros fatores, como a rampa de temperatura ou o modo de injeção podem ter influenciado na recuperação dos metabólitos. Da mesma forma, Villas-Bôas et al. (2005) que empregaram o maior tempo no *aquisition delay* e utilizaram a menor faixa dinâmica, reportaram mais metabólitos que o protocolo utilizado por O´Hagan et al. (2005).

Outro parâmetro avaliado foi o tempo de corrida do GC-MS para cada metodologia. Quanto menor o tempo utilizado pelo equipamento na corrida de uma amostra, menores serão os gastos com o equipamento. Desta forma, a metodologia mais dispendiosa foi a de Villas-Bôas et al. (2005), seguida por Gullberg et al. (2004) e, por fim, a de O´Hagan et al. (2005).

Ao avaliar esses três fatores foi possível verificar que a metodologia desenvolvida por Gullberg et al. (2004) foi a que gerou os melhores resultados para as amostras de fermentação. Essa metodologia obteve uma boa qualidade de pico cromatográfico, retornou maior número de metabólitos na fração polar do vinho da fermentação e obteve uma boa relação custo-benefício, pois com um tempo intermediário de corrida cromatográfica retornou grande número de metabólitos. Desta forma, a mesma foi estabelecida como a melhor metodologia a ser utilizada para a análise de metabólitos do processo fermentativo.

Com a metodologia estabelecida, realizou-se um levantamento das classes de metabólitos que puderam ser acessados. Os metabólitos comumente reportados em estudos na fermentação alcoólica da *S. cerevisiae*, como ácido acético, ácido succínico e glicerol (BASSO et al., 1996) pertencem às duas classes mais

abundantes reportadas neste trabalho, *Carboxylic acids and derivatives* e *Carbohydrates and carbohydrate conjugates*, além do etanol, que pertence à classe orgânica *Alcohols and Polyols* também reportada neste trabalho.

A metodologia de estudo de metabólitos por GC-MS é comumente adotada no processo de fermentação para produção de vinho e outras bebidas alcoólicas por conta dos compostos voláteis que estão relacionado com o aroma do mesmo (AZNAR et al. 2001; ANDRADE-SOBRINHO et al., 2002; KISHIMOTO et al., 2005). As moléculas de baixa massa molecular responsáveis pelo aroma possuem diferentes funções, como álcoois, aldeídos, ácidos orgânicos, ésteres, sulfetos orgânicos e compostos de carbonílicos, sendo que são de interesse de estudo pelo impacto na qualidade do produto final (MEILGAARD, 1975). No caso da fermentação realizada por *S. cerevisiae* na produção de etanol, também foram reportadas classes com essas funções orgânicas.

Outros trabalhos também utilizaram essa metodologia para descrever os metabólitos presentes em outros processos fermentativos por *Saccharomyces* spp. Zhao et al. (2011) e Ryan et al. (2011) utilizaram a técnica para reportar os metabólitos produzidos por este gênero de levedura em fermentados de soja e arroz, respectivamente, que tem importância no sabor e aroma desses fermentados. Eles reportaram a presença das classes orgânicas como álcoois, aldeídos, aminoácidos, ácidos orgânicos, dentre outras, demonstrando o potencial desta técnica.

A técnica pode ainda ser aplicada para outros fins. Villas-Bôas et al. (2005) descreveu a diferença nos metabólitos que eram reportados internamente e externamente a célula da levedura *S. cerevisiae*. Os autores observaram a presença de diferentes classes de metabólitos, como aminoácidos, álcoois, ácidos orgânicos, ácido carboxílicos, entre outros, que também foram reportados no presente trabalho, além de afirmarem haver alta correlação entre os metabólitos internos e externos à célula. Ainda Ding et al., 2009 utilizou a técnica para descrever diferenças entre os processos de fermentação em batelada e contínuo pela mesma levedura e reportou as classes de aminoácidos, ácido carboxílico, carboidratos que também foram descritos neste trabalho.

Além de todo o potencial da técnica empregada para o estudo dos metabólitos da fermentação, a metodologia empregada conseguiu separar os metabólitos presentes no mosto de cana-de-açúcar utilizados dos metabólitos produzidos pela fermentação realizada por *S. cerevisiae*.

Desta forma, o presente trabalho estabeleceu uma metodologia mais adequada para a determinação dos metabólitos da fermentação. A metodologia é robusta, permite a identificação de diferentes classes de metabólitos; possui processos simples de preparação de amostra e pré-injeção e pode ser utilizada para a investigação de diversos processos relacionados à fermentação da *S. cerevisiae*. Espera-se que o estudo da metabolômica da fermentação possa gerar avanços nesta área tão importante e relevante para a indústria no sucroalcooleira.

Referências

ALLEN, J.; DAVEY, H.M.; BROADHURST, D.; HEALD, J.K.; ROWLAND, J.J.; OLIVER, S. G.; KELL, D.B. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 6, p. 692-696, 2003.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.V.; BUCKERIDGE, M. S.;GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.

AMORIM, H.V. **Processo de produção de álcool:** controle e monitoramento**.** 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. p. 46. 103p.

ANDRADE-SOBRINHO, L.G.; BOSCOLO, M.; DOS SLIMA-NETO, B.; FRANCO, D.W. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6/B, p. 1074-1077, 2002.

AZNAR, M.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.F.; FERREIRA, V. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 2924-2929, 2001.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. **Processo de produção de álcool:** controle e monitoramento. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. p. 46.

CARNEIRO, S.: VILLAS-BÔAS, S.G.; FERREIRA, E.C.; ROCHA, I. Metabolic footprint analysis of recombinant *Escherichia coli* strains during fed-batch fermentations. **Molecular BioSystems**, London, v. 7, n. 3, p. 899-910, 2011.

CARRAU, F.M.; MEDINA, K.; FARINA, L.; BOIDO, E.; HENSCHKE, P.A.; DELLACASSA, E. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1196-1207, 2008.

CUADROS-INOSTROZA, A. citar todos et al. TargetSearch-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, Chichester, v. 10, n. 1, p. 1, 2009.

DING, M.Z.; CHENG, J.S.; XIAO, W.H.; QIAO, B.; YUAN, Y.J. Comparative metabolomic analysis on industrial continuous and batch ethanol fermentation processes by GC-TOF-MS. **Metabolomics**, New York, v. 5, p. 229-238, 2009.

FIEHN, O. Metabolomics–the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, n. 1/2, p. 155-171, 2002.

GULLBERG, J.; JONSSON, P.; NORDSTRÖM, A.; SJÖSTRÖM, M.;MORITZ, T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 331, n. 2, p. 283-295, 2004.

HOWELL, K.S.; COZZOLINO, D.; BARTOWSKY, E.J.; FLEET, G.H.; HENSCHKE, P.A. Metabolic profiling as a tool for revealing Saccharomyces interactions during wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 91-101, 2006.

KISHIMOTO, T.; WANIKAWA, A.; KAGAMI, N.; KAWATSURA, K. Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 4701-4707, 2005.

KOEK, M.M.; MUILWIJK, B.; VAN DER WERF, M.J.; HANKEMEIER, T. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, New York, v. 78, n. 4, p. 1272-1281, 2006.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J.M. **Basic gas chromatography**. New York:John Wiley , 2011. 239p.

MEILGAARD, M.C. Flavor chemistry of beer. **Master Brewers Association of Americas Technical Quartely**, Saint Paul, v.12, p. 107–117, 1975.

MO, M.L.; PALSSON, B.Ø.; HERRGÅRD, M.J. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. **BMC Systems Biology**, Chichester v. 3, n. 1, p. 1, 2009.

O'HAGAN, S.; DUNN, W.B.; BROWN, M.; KNOWLES, J.D.; KELL, D.B. Closed-loop, multiobjective optimization of analytical instrumentation: gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry of the metabolomes of human serum and of yeast fermentations. **Analytical Chemistry**, New York, v. 77, n. 1, p. 290-303, 2005.

RICHTER, C.L.; KENNEDY, A.D.; GUO, L.; DOKOOZLIAN, N. Metabolomic Measurements at Three Time Points of a Chardonnay Wine Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 66, n. 3, p. 294-301, 2015.

RYAN, E.P.; HEUBERGER, A.L.; WEIR, T. L.; BARNETT, B.;BROECKLING, C. D.; PRENNI, J.E. Rice bran fermented with *Saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 5, p. 1862-1870, 2011.

SAINZ, J.; PIZARRO, F.; PÉREZ-CORREA, J.R.; AGOSIN, E. Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 81, n. 7, p. 818-828, 2003.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREND, K.; ROESSNER-TUNALIE, U.; FORBESE, M.G.; WILLMITZERA, L.; FERNIE, A.R. GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 6, p. 1332-1337, 2005.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. IN: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2, p. 93-122.

VAN DEN BERG, E.; FRIEDLANDER, M. P. Probing the Pareto frontier for basis pursuit solutions. **SIAM Journal on Scientific Computing**, Philadelphia, v. 31, n. 2, p. 890-912, 2008.

VILLAS-BÔAS, S.G.; MOXLEY, J.F.; ÅKESSON, M.; STEPHANOPOULOS, G.; NIELSEN, J. High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts. **Biochemical Journal**, London, v. 388, n. 2, p. 669-677, 2005.

VILLAS-BÔAS, S.G.; HØJER-PEDERSEN, J.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. **Yeast**, Davis, v. 22, n.14, p. 1155-1169, 2005b.

XIA, J. MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. W1, p. W127-W133, 2012.

ZHAO, J.; DAI, X.; LIU, X.; ZHANG, H.; TANG, J.; CHEN, W. Comparison of aroma compounds in naturally fermented and inoculated Chinese soybean pastes by GC-MS and GC-Olfactometry analysis. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 6, p. 1008-1013, 2011.

4 METABOLÔMICA NÃO-ALVO DA FERMENTAÇÃO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CAT-1 NA PRESENÇA DO CONTAMINANTE *LACTOBACILLUS FERMENTUM* (I-2)

Resumo

A fermentação alcóolica da cana-de-açúcar tem uma grande importância para a indústria automotiva no Brasil. No entanto, o processo fermentativo em escala industrial não acontece em condições assépticas e a presença de micro-organismos contaminantes podem influenciar negativamente a fermentação da levedura. Apesar da importância da microbiota contaminante para o processo fermentativo, pouco se sabe sobre os mecanismos de interação entre levedura e micro-organismos contaminantes. Neste contexto, o presente trabalho realizou ensaios fermentativos com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 na ausência e na presença de duas concentrações de *Lactobacillus fermentum* (I-2), 10^6 e 10^8 UFC/mL para estudar a interação destes micro-organismos. Para isso, foram monitorado o rendimento e a produtividade, além da realização de análise de *footprinting* metabólico através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Foi possível verificar que o rendimento e a produtividade foram afetados significativamente na presença de *L. fermentum* (I-2) na concentração de 10^8 UFC/mL, no entanto, a viabilidade e o brotamento não foram afetados em nenhuma concentração do contaminante. Através da análise de metabolômica, foi possível identificar perfis metabólicos diferentes para os três ensaios fermentativos. Foram identificados 208 metabólitos, sendo que 50 foram diferencialmente abundantes. Dos metabólitos que ajudaram a explicar a diferença entre nas fermentações, a via glicolítica pareceu ser reforçada na fermentação de *S. cerevisiae* (CAT-1), já nas fermentações de *S. cerevisiae* (CAT-1) na presença de *L. fermentum* (I-2), a produção de aminoácidos a partir do *glutamate* parece ser importante. O estudo do metaboloma da fermentação pode auxiliar no entendimento da relação levedura com contaminante dentro da dorna de fermentação.

Palavras-chave: Fermentação; *S. cerevisiae*; *L. fermentum*; Metabolômica

Abstract

The alcoholic fermentation of sugarcane is of great importance for the automotive industry in Brazil. However, industrial scale fermentation process does not occur under aseptic conditions and the presence of contaminating microorganisms may adversely affect the yeast fermentation. Despite the importance of microbial contaminants for the fermentation process, little is known about the mechanisms of interaction between yeast and contaminating microorganisms. In this context, the present work performed fermentation assays with *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 in the absence and presence of two concentrations of *Lactobacillus fermentum* (I-2), 10^6 and 10^8 CFU/mL to study the interaction of these microorganisms. The yield and productivity were monitored, in addition to the viability rate and budding of yeast in the fermentation assays, besides of the metabolic footprinting analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). It was verified that the yield and productivity was significantly decreased in the presence *L. fermentum* (I-2) at the concentration of 10^8 CFU/ml, however, the viability and budding were not affected at any concentration of the contaminant. Through metabolomics analysis, it was

possible to identify different metabolic profiles for the three fermentation assays. It was identified 208 metabolites, of which 50 were differentially abundant. Considering the metabolites that helped explain the difference between the fermentation assays, the glycolytic pathway appeared to be reinforced in the *S. cerevisiae* (CAT-1) fermentation and in the fermentations of *S. cerevisiae* (CAT-1) in the presence of *L. fermentum* (I -2), the production of amino acids from glutamate appears to be important. The fermentation metabolome study may help to understand the relationship with yeast contaminant into the fermenter.

Keywords: Fermentation; *S. cerevisiae*; *L. fermentum*; Metabolomics

4.1 Introdução

A espécie de levedura responsável pela produção de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae* que converte o açúcar extraído da cana-de-açúcar em etanol, sendo que o processo visa o maior rendimento fermentativo possível e, segundo Basso et al. (1996) chegando até a 92%. O processo fermentativo da cana-de-açúcar para produção de etanol foi responsável pela produção 30,5 bilhões de litros de etanol, na safra de 2015/2016, onde houve um aumento de 6,3% em relação à safra do ano anterior (CONAN, 2016).

No entanto, em escala industrial, o processo fermentativo não ocorre em condições assépticas e os micro-organismos contaminantes mais importantes para o processo fermentativo da cana-de-açúcar são as Bactérias Ácido Láticas (BAL). A interação dessas bactérias com a levedura no contexto da fermentação alcoólica já foi objeto de estudo em diferentes trabalhos (BISCHOFF et al., 2008; BASSO et al., 2014). De maneira geral, a bactéria pode afetar o rendimento fermentativo da levedura pela competição de nutrientes ou pela produção de ácidos orgânicos, no entanto, aspectos mais detalhados desta interação precisam ser estudados.

Portanto, é imprescindível que a contaminação microbiana seja detectada e controlada no início do processo fermentativo. Do contrário, falhas no processo podem levar a paradas que impactam severamente a economia do processo, chegando ao extremo de necessitar a purga de células das dornas e introdução de novas leveduras ao processo (EBERT, 2007). Nesse sentido, torna-se crítico o desenvolvimento de metodologias que possam ser sensíveis a detecção de contaminantes no processo Muthaiyan e Ricke (2010).

Neste contexto, a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) pode ser aplicada para a detecção de metabólitos de baixa massa molecular e auxiliar na detecção de contaminantes do processo de

fermentação alcoólica. Neste contexto, esta metodologia já foi utilizada para a detecção de compostos voláteis na produção de vinho e outras bebidas alcoólicas (AZNAR et al. 2001; KISHIMOTO et al., 2005), além da sua aplicação nos estudos sobre aspectos do metabolismo da *S. cerevisiae* (VILLAS-BÔAS et al., 2005; DING et al., 2009).

Como visto no Capítulo 3, diversas classes de metabólitos podem ser identificas com a análise de amostras de fermentação por GC-MS. Desta forma, na tentativa de melhor compreender a relação da levedura com os contaminantes bacterianos dentro da dorna de fermentação, foram realizados ensaios fermentativos com a *S. cerevisiae* CAT-1 na ausência e presença de *Lactobacillus fermentum* (I-2), simulando as condições encontradas na usina e as amostras coletadas foram analisadas por GC-MS.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Ensaios fermentativos com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *Lactobacillus fermentum* (I-2)

4.2.1.1 Inóculo e propagação celular de *S. cerevisiae* CAT-1

O inóculo foi produzido em meio *Yeast Peptone Dextose* (YPD) que consistiu de glicose 20 g/L, peptona 10 g/L e extrato de levedura 10 g/L. 250 mL de meio foi preparado em frascos de 1000 mL e *S. cerevisiae* CAT-1 foi inoculada e crescida sob agitação 200 rpm a 33 °C por 24h.

A propagação celular foi conduzida em biorreatores BioFlo® 115 3L (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) que foi esterilizado a 121 °C por 30 min. O meio de propagação foi composto de ureia (5 g/L), fosfato monopotássio (KH_2PO_4) (2 g/L) e açúcares de xarope de cana-de-açúcar (30 g/L) num volume final de 0,9 L. Todo o volume do inóculo foi transferido para o biorreator de forma asséptica. O consumo de açúcar foi monitorado no *Medium infrared* (FT-IR Spectrometer – Alpha, OPUS software, Bruker Optics Co.) e, uma vez consumido por completo, foram adicionados 50 mL de ureia (5 g/L) e fosfato monopotássio (KH_2PO_4) (2 g/L) e a alimentação de 50 mL de açúcares de xarope (30 g/L) foi realizada numa vazão de 3 g/L/h, a fim de controlar o substrato limitante.

As condições de crescimento foram 33 °C, sem controle de pH e a agitação e o fluxo de ar foram ajustados dependendo da concentração de oxigênio, que deveria permanecer sempre em 50% de oxigênio dissolvido (O.D.), sendo o mínimo e

máximo da agitação 200 rpm e 900 rpm, e o mínimo e máximo do fluxo de ar em 0,1 a 2,0 LPM. O ensaio foi realizado no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM).

Após dois ciclos de propagação celular, todo o líquido foi centrifugado de forma asséptica a 8000 rpm, a 4 °C por 30 min na centrifuga Avanti J26 XP (Beckman Coulter, Inc., Pasadena, US). As células foram ressuspendidas em água estéril e mantida a 4 °C até o início do experimento de fermentação.

4.2.1.2 Pré-inóculo e inóculo celular de *L. fermentum* (I-2)

O inóculo de *L. fermentum* (I-2) foi realizado em frascos de 50 mL contendo o 10 mL do meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). Os frascos foram incubados a 200 rpm, a 32 °C por 24h. Após este período, um determinado volume do pré-inoculo foi transferido para frascos de 500 mL contendo 250 mL do mesmo meio, tal qual a concentração inicial celular fosse 0.1 O.D., aproximadamente 10^6 unidade formadora de colônia (UFC) por mL. O inóculo foi acondicionado nas mesmas condições do pré-inóculo. Após 24h, o volume total do inóculo foi centrifugado e ressuspendido em água estéril no volume de 50 mL, para inoculação nos biorreatores.

4.2.1.3 Ensaio fermentativo

A fim de investigar o efeito da bactéria *L. fermentum* (I-2) no processo fermentativo realizado pela levedura *S. cerevisiae* CAT-1, três ensaios foram conduzidos: 1) R1_15 a R5_15: Cinco bateladas alimentadas cíclicas com *S. cerevisiae* CAT-1; 2) R6_15 a R10_15: Cinco bateladas alimentadas cíclicas com *S. cerevisiae* CAT-1 e *L. fermentum* (I-2) na concentração 10^6 UFC/mL e 3) R6_16 a R10_16: Cinco bateladas alimentadas cíclicas com *S. cerevisiae* CAT-1 e *L. fermentum* (I-2) na concentração 10^8 UFC/mL.

Todos os ensaios foram conduzidos em biorreatores BioFlo® 115 1.5 L (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ). O processo de fermentação alimentada conteve os seguintes passos: a) preparação do mosto; b) fermentação alcoólica; c) centrifugação; d) tratamento ácido e e) centrifugação (Figura 16).

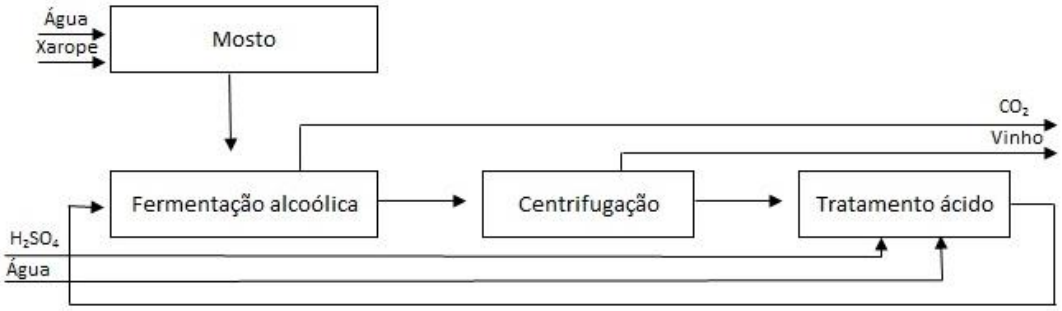

Figura 16 – Diagrama de blocos do processo fermentativo

O mosto foi preparado com xarope de cana-de-açúcar e água numa concentração final de 25° BRIX e foi autoclavado por 20 min a 120 °C em autoclave. A fermentação alcoólica em batelada alimentada teve início após a entrada das células de levedura ou de levedura e bactéria no reator, a depender do ensaio. A alimentação do mosto teve como quociente de vazão 75 g/h. A concentração final de levedura na dorna foi de 34 ± 2,5 g/L. A fermentação foi concluída após 8 h (6h de alimentação e 2h de batelada alimentada estendida) e todas as coletas foram periódicas e realizadas de 2h em 2h horas. As condições da fermentação foram: agitação de 200 rpm, 30 °C e sem aeração.

Após esse período, o vinho levedurado foi removido de forma estéril do biorreator com o auxílio de bombas peristálticas e centrifugado a 7500 rpm, por 30 min a 10° C na centrifuga Avanti J26 XP (Beckman Coulter, Inc., Pasadena, US). Após a retirada do vinho, as células foram ressuspendidas em 350 g de água e transferidas, novamente, para o biorreator de forma asséptica. Antes do início de um novo ciclo fermentativo, foi realizado o tratamento ácido, que consistiu da adição de ácido sulfúrico 2 M até a redução do pH 2,5 ± 0,5 por 30 min, sob aeração (0,14 vvm) e agitação (200 rpm), como previamente mencionado no Capítulo 3.

4.2.1.4 Análises da fermentação

As análises da fermentação foram realizadas de acordo com **3.2.1.4 Análises da fermentação.**

4.2.2 Análise dos metabólitos de fermentação por GC-MS

4.2.2.1 Extração de metabólitos

O protocolo de extração utilizado está de acordo com o **3.2.3.1 Extração de metabólitos.**

4.2.2.2 Análise por GC-MS e processamento de dados

A protocolo de análise por GC-MS e processamento de dados utilizado refere-se ao **3.2.3.2 Análise por GC-MS e processamento de dados**.

4.2.2.3 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados de GC-MS estão de acordo com o **3.2.3.3 Análise estatística dos dados**.

Além disso, foi utilizado o método multivariado de Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA – *Partial-least squares discriminant analysis*) na análise dos dados. A PLS-DA é um dos principais métodos multivariados utilizados na análise estatística e interpretação dos dados gerados nos experimentos de metabolômica. A PLS-DA é um método de regressão linear supervisionado, que permite a classificação ou agrupamento das amostras, e é utilizada para determinar quais são as variáveis responsáveis por predizerem as classes (grupos formados), explicando assim a variabilidade entre os dados (RUBINGH et al., 2006). Nesta análise, considerando-se os valores de R2 que aponta a variação descrita pelo modelo, e Q2, que reporta a acurácia do modelo (SALEK et al., 2008). Finalmente, realizou-se a determinação dos metabólitos diferencialmente abundantes por meio do Índice de Importância da Variável (*variable importance in projection* – VIP).

4.3 Resultados

4.3.1 Ensaio fermentativo com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *Lactobacillus fermentum* (I-2)

Inicialmente, o inóculo e a propagação celular da levedura e o pré-inóculo e inóculo da bactéria geraram, de forma asséptica, as massas celulares necessárias para a realização dos ensaios fermentativos.

Três grupos de ensaios fermentativos foram conduzidos a fim de investigar o efeito de *L. fermentum* (I-2) no processo fermentativo realizado por *S. cerevisiae* CAT-1. A fim de simular as condições industriais empregadas no Brasil, os processos fermentativos foram caracterizados por reciclos de batelada-alimentada com alta densidade celular e tratamento ácido no início de cada ciclo. A diferença

entre os processos fermentativos esteve na ausência e ou presença do contaminante bacteriano e, se presente, na concentração apresentada pelo mesmo.

A Figura 17 apresenta os resultados de produtividade global (g/lh) e rendimento (%) para todas as fermentações realizadas.

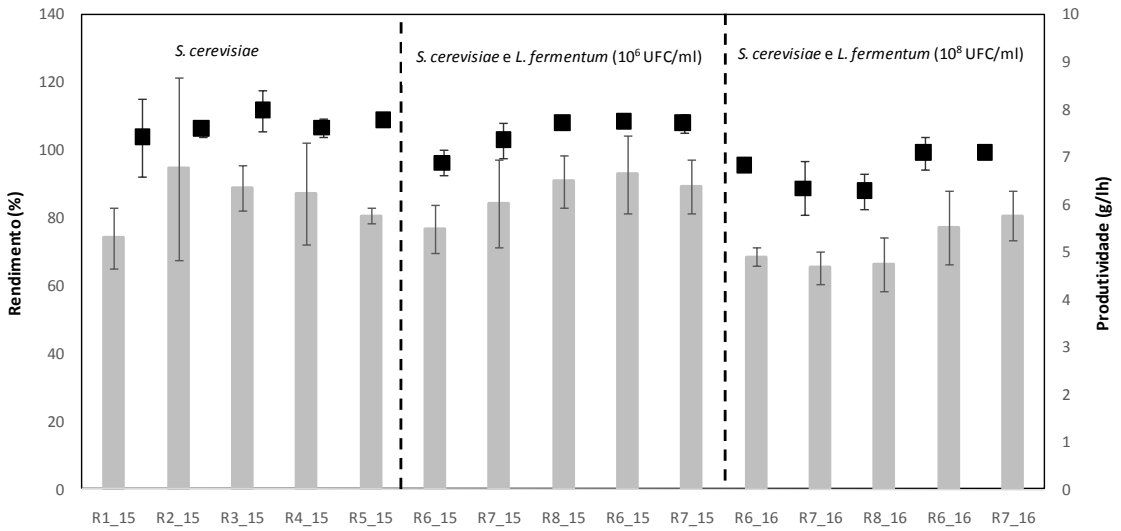

Figura 17 Rendimento (%) e Produtividade global (g/lh) para as fermentações em batelada alimentada cíclica com S. cerevisiae (R1_15 a R5_15), com *S. cerevisiae* e *L. fermentum* com carga inicial de 10^6 (UFC/ml) (R6_15 a R10_15) e com *S. cerevisiae* e *L. fermentum* com carga inicial de 10^8 (UFC/ml) (R6_15 a R10_15)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 17 é possível notar que as fermentações com *S. saccharomyces* (R1_15 a R5_15) apresentaram rendimento entre 94 e 75 % e produtividades volumétricas variaram entre 7,4 e 7,97 g/Lh. Já para as fermentações contaminadas com *L. fermentum* (I-2) com carga inicial de infecção de 10^6 UFC/mL (R6_15 a R10_15), observou-se rendimentos da ordem de 93 a 76 % e produtividades volumétricas variando entre de 7,74 a 6,89 g/Lh. Para o ultimo grupo de fermentações em que a carga de infecção foi da ordem de 10^8 UFC/ml de *L. fermentum* (R6_16 a R10_16) observaram-se rendimentos entre 80,8 a 65,8 % e produtividades globais que variaram entre 7,1 a 6,3 g/Lh.

O rendimento fermentativo e a produtividade foram afetados pela presença da bactéria, no entanto, foram dependentes da concentração em que esta

encontrava-se. Na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1 contaminada com 10^6 UFC/mL de *L. fermentum* (I-2) foi possível observar uma leve redução dos valores de rendimento e produtividade quando comparados com a fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1 na ausência de contaminante. Já na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1 contaminada com 10^8 UFC/mL de *L. fermentum* (I-2), tanto produtividade quanto o rendimento foram consistentemente menores que na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1 que ocorreu na ausência de contaminantes (Figura 17).

Para um melhor entendimento da perda de rendimento e produtividade ao longo das fermentações infectadas com a bactéria *L. fermentum*, foi realizado um balanço de massa global dos grupos de fermentação. Para isto realizou o balanço de massa baseado nas conversões de ART nos produtos etanol, glicerol, ácido acético, ácido lático e biomassa obtidos experimentalmente para todas as fermentações em batelada alimentada realizadas neste trabalho.

A partir dos dados de balanço de massa para cada fermentação, somaram-se os resultados para os três grupos de fermentações (R1_15 a R5_15, R6_15 a R10_15 e R6_16 a R10_16) e extrapolaram-se os resultados das somas para a entrada de 1000 kg de ART no sistema e os correspondentes produtos formados. O mesmo procedimento foi considerado para a biomassa da entrada.

Os resultados dos balanços de massas, baseados nos resultados de conversões obtidos para os três grupos de fermentações (R1_15 a R5_15, R6_15 a R10_15 e R6_16 a R10_16) realizados neste trabalho, estão apresentados na Figura 18.

Na Figura 18 (A) nota-se que o balanço de massa para o primeiro grupo de fermentações (R1_15 a R5_15) resultou na produção de 428,10 kg de etanol para a alimentação de 1000 kg de ART. Os subprodutos obtidos para este grupo de fermentação incluíram ácido acético (2,97 kg) e glicerol (29,14 kg). Não se observou a produção de ácido lático e a massa de biomassa na saída foi igual a 33,70 kg. Nesta mesma figura (Figura 18 (B)) é possível observar uma leve redução na produção de etanol (421,12 kg) em relação ao observado na Figura 3(A) e um aumento na massa de ART residual de 3,23 kg para o grupo de fermentações (R1_15 a R5_15, Figura 18 (A)) em relação ao grupo de fermentações (R6_15 a R10_15, Figura 3(B)) que foi de 13,97 kg. A produção de subprodutos foi de 31,18 kg de glicerol, 2,92 kg de ácido acético, 32,25 kg de biomassa e houve a produção de 3,05 kg de ácido lático. Já na Figura 18 (C) destaca-se que a produção

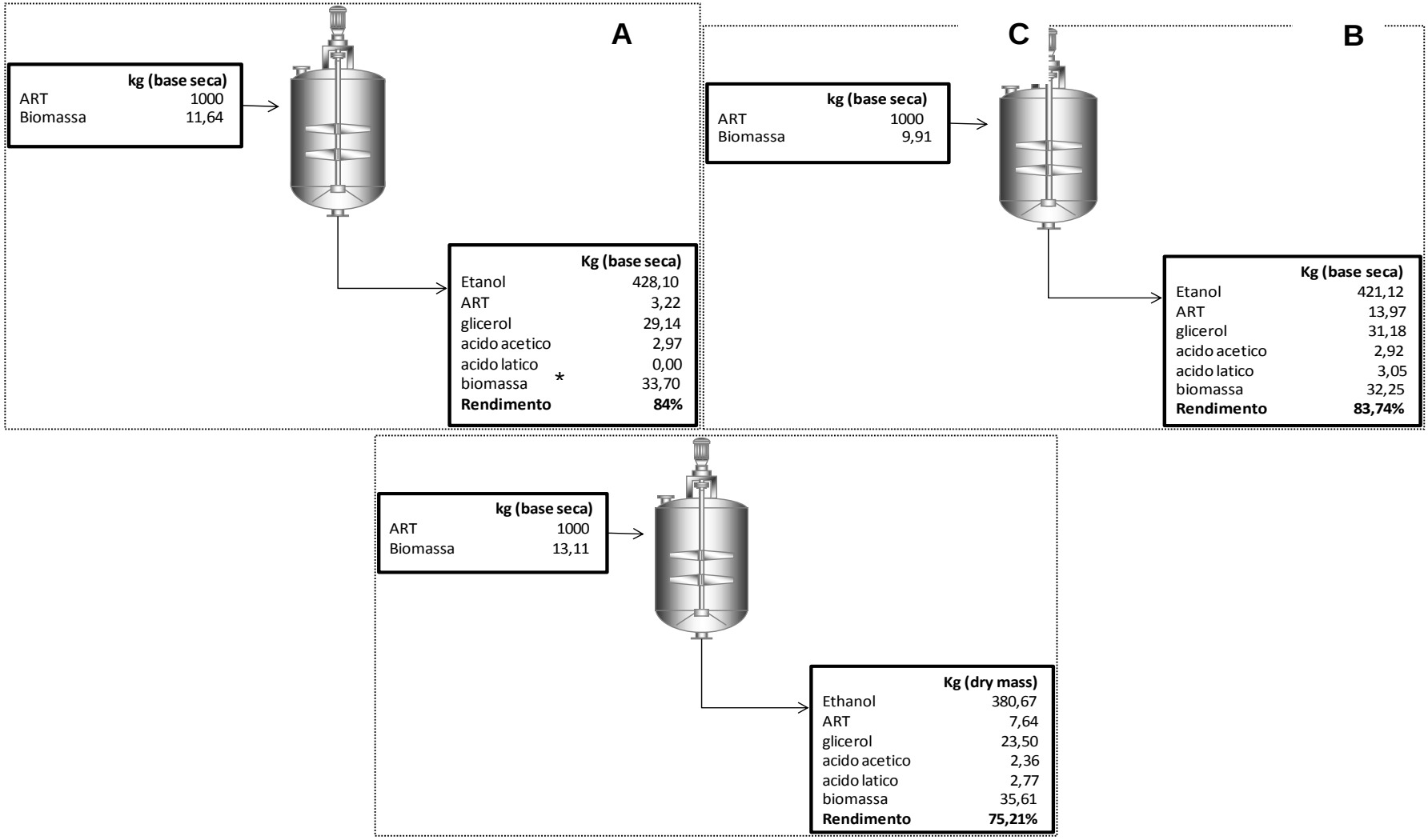

Figura 18 Representação do balanço de massa global para os três grupos de fermentação realizados, (A) R1_15 a R5_15 fermentações em batelada alimentada cíclica com *S. cerevisiae* CAT-1; (B) R6_15 a R10_15 fermentações em batelada alimentada cíclica com *S. cerevisiae* CAT-1 infectadas com 10^6 UFC/ml de *L. fermentum*; (C) R6_16 a 10_16 fermentações em batelada alimentada cíclica com *S. cerevisiae* CAT-1 infectadas com 10^8 UFC/ml de *L. fermentum*; * - não foi calculado

de etanol foi ainda menor e igual a 380,67 kg, glicerol igual a 23,53 kg, ácido acético 2,36 kg, ART residual 7,64 kg, ácido lático 2,77 kg e biomassa 35,61 kg para o grupo de fermentações R6_16 a R10_16. Os rendimentos globais para os balanços de massa dos diferentes grupos de fermentações demonstraram uma redução na produção de etanol sendo observado o rendimento de 84 % para a fermentação com *S. cerevisiae* CAT-1 (R1_15 a R5_15), 83,74 % para a fermentação com *S. cerevisiae* CAT-1 infectada com 10^6 UFC/ml de *L. fermentum* (R6_15 a R10_15) e o rendimento de 75,21 % para as fermentações com *S. cerevisiae* CAT-1 infectada com 10^8 UFC/ml de *L. fermentum*.

4.3.2 Análise dos metabólitos da fermentação através de GC-MS

O processamento de dados da fermentação e identificação das moléculas realizada pelo pacote *TargetSearch*, reportou um total de 224 metabólitos. Com a finalidade de verificar a classificação, foram realizadas comparação do espectro de fragmentação e o alinhamento de massas características dos metabólitos. O espectro de fragmentação encontrado foi comparado com o espectro referência do banco de dados do GOLM (http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/). Já o alinhamento das massas características do metabólito tem de ser referente ao Index de Retenção (RI) do composto.

Inicialmente, foi realizada uma triagem que visou a retirada de metabólitos que poderiam ter sido classificados erroneamente ou então, compostos presentes na coluna do aparelho GC. Entre esses compostos estavam: hormônio humano (1469; 2127), lactose e derivados (1920; 2050; 2085) e siloxano e derivados (198; 1002; 1576; 1842). Também foi necessário realizar a somatória de intensidades dos metabólitos que possuíam uma identidade diferente, porém tinham o mesmo nome, como no caso de *beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose (1MEOX)* (1923; 1939) e *Maltotriose* (2540; 2546).

Por fim, após correções, o número total de metabólitos gerados foi de 208 (ANEXO B), pertencentes a 29 classes químicas. No entanto, a maioria dos metabólitos encontrados (46%) ainda não foram identificados (Unknown). As três classes mais abundantes reportadas foram: *Carbohydrates and carbohydrate conjugates* (16%), *Fatty Acyls* (6,5%) e *Carboxylic acids and derivatives* (5,2%), todas as outras classes apresentaram porcentagem menor que 2% (Figura 19).

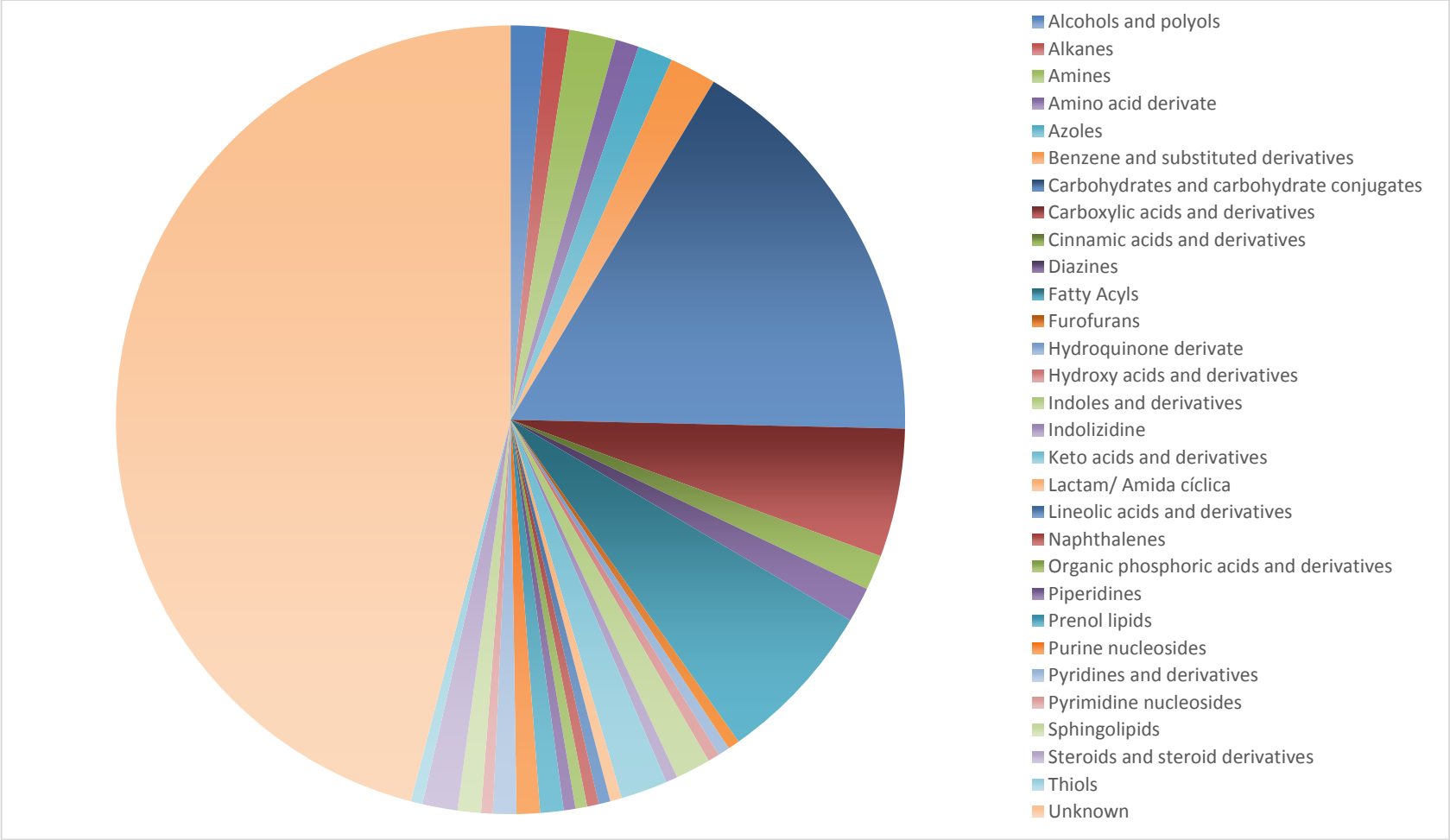

Figura 19 – Classes dos metabólitos reportados nos ensaios fermentativos realizados com *S. cerevisiae* CAT-1 e *L. fermentum* (I-2)

Os metabólitos identificados e as respectivas intensidades normalizadas foram usados para montar as matrizes utilizadas na análise multivariada e seleção de metabólitos diferencialmente abundantes. Através da análise de PLS-DA foi possível observar uma separação clara entre as amostras do mosto utilizado na fermentação e do vinho delevedurado (Figura 20A).

Na análise realizada apenas com as amostras de vinho, observou-se uma separação entre cada ensaio fermentativo, ou seja, na fermentação com *S. cerevisiae* CAT-1 (R1_15 a R5_15); na fermentação com *S. cerevisiae* CAT-1 infectada com 10^6 UFC/mL de *L. fermentum* (I-2) (R6_15 a R10_15) e, finalmente, na fermentação com *S. cerevisiae* CAT-1 e infectada com 10^8 UFC/mL de *L. fermentum* (I-2) (R6_16 a R10_16) (Figura 20B).

O Índice de Importância da Variável (*variable importance in projection* – VIP) foi considerado para valores iguais ou maiores que 1,00 para determinar os metabólitos diferencialmente abundantes entre as amostras. No total, foram reportados 50 metabólitos diferencialmente abundantes. Desses, muitos ajudaram a explicar a diferença entre as fermentações de *S. cerevisiae* CAT-1 na ausência e presença do contaminante, sendo reportados de forma ainda mais abundante na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1 com maior concentração de contaminantes (Figura 21).

Na Tabela 7, estão apresentados os principais parâmetros de validação do PLS-DA, como a Acurácia, R^2 e Q^2. Nessa tabela é importante observar que as três componentes apresentam acurácia igual a 0,91 e 1,0, R^2 igual a 0,98 e 0,99 e Q^2 igual a 0,89 e 0,89 para as análises de fermentação e mosto e apenas fermentação, respectivamente. Esses critérios são importantes porque determinam que a separação dos tratamentos é confiável, ou seja, os tratamentos são diferentes entre si no que diz respeito ao conteúdo metabólico.

No ensaio fermentativo de *S. cerevisiae* CAT-1 na ausência de contaminantes (R1_15 a R5_15), foram reportados 15 metabólitos preferencialmente abundantes. Destes, 6 não foram identificados, ou seja, reportados apenas como *Unknown*. Os metabólitos identificados *Glucose*, *Glyceric acid-3-phosphate* e *Itaconic Acid* podem se relacionar pela via glicolítica (Figura 22). Já os metabólitos *Cinnamic acid, 4-hydroxy-*, *cis-, Cinnamic acid, 3,4,5-trimethoxy-, trans-* são derivados do ácido cinâmico, sendo que o primeiro se relaciona com outros diversos processos metabólicos.

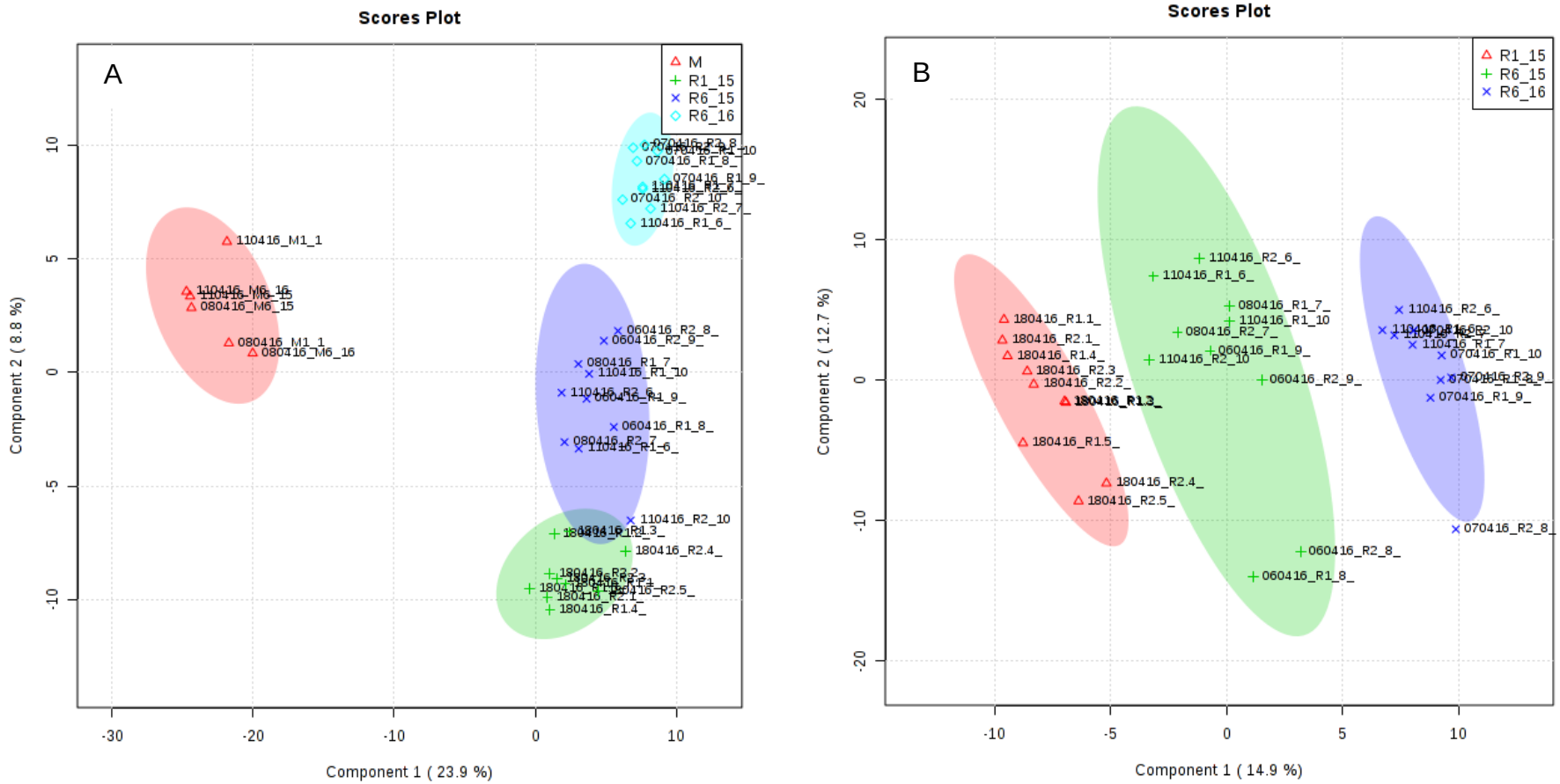

Figura 20 – PLS-DA de perfil metabólico de fermentação de R1_15 a R5_15: Cinco reciclos fermentativos *com S. cerevisiae* CAT-1 (R1_15); R6_15 a R10_15: Cinco reciclos fermentativos com *S. cerevisiae* CAT-1 e *L. fermentum* (I-2) na concentração 106 UFC/mL(R6_15); R6_16 a R10_16: Cinco reciclos fermentativos com *S. cerevisiae* CAT-1 e *L. fermentum* (I-2) na concentração 108 UFC/mL (R6_16), na presença do mosto (M) (A) ou na sua ausência (B).

Nome	ID	VIP	R1_15	R6_15	R6_16
Itaconic acid (2TMS)	251	1,30			
Cinnamic acid, 4-hydroxy-, cis- (2TMS)	944	1,16			
Glyceric acid-3-phosphate (4TMS)	960	1,16			
Galactose 3	1176	1,13			
Glucose (1MEOX) (5TMS) BP	1177	3,33			
NA	1365	1,19			
NA	1703	1,04			
Guanosine, 2'-deoxy- (5TMS)	2065	2,29			
Phenoxyacetic acid, 4-hydroxymethyl-3-methoxy- (2TMS)	1357	1,20			
NA	2107	1,92			
NA	2158	2,58			
NA	2424	2,31			
NA	2491	2,60			
Nicotinic acid, 6-hydroxy- (2TMS)	588	1,00			
Cinnamic acid, 3,4,5-trimethoxy-, trans- (1TMS)	1034	2,77			
NA269016	1961	1,68			
Gentiobiose (1MEOX) (8TMS) MP	2110	2,26			
Docosenoic acid, 13-(Z)- (1TMS)	1907	1,38			
NA	1936	1,06			
Trehalose, alpha,beta- (8TMS)	2017	1,04			
Melezitose 1	2392	1,25			
NA	2402	1,17			
Sphingosine, O-1-beta-galactosyl- (6TMS)	2489	1,20			
NA127015	172	1,05			
Threonine, allo- (2TMS)	182	2,90			
Threonine (2TMS)	217	3,16			
NA	329	1,13			

Nome	ID	VIP	R1_15	R6_15	R6_16
NA	1744	2,15			
NA114009	67	1,24			
Valeric acid, 2-oxo- (1MEOX) (1TMS) MP	94	1,39			
D126702	160	1,29			
Valero-1,5-lactam (1TMS)	189	1,70			
Thiazole, 4-methyl-5-hydroxyethyl- (1TMS)	274	1,36			
NA	331	1,67			
Cytosine, 5-methyl- (2TMS)	550	1,26			
Ethanol, 2-(4-hydroxyphenyl)- (2TMS)	581	1,38			
Histamine (2TMS)	637	1,27			
2-Imidazolidone-4-carboxylic acid (3TMS)	658	1,41			
D165453	689	1,37			
NA	704	1,79			
Hexanedioic acid, hydroxy- (3TMS)	733	1,45			
NA196028 (classified unknown)	1284	2,18			
Prephenic acid (1MEOX) (3TMS)	1441	1,19			
Unknown#sst-cgl-102	1587	1,98			
NA	1836	1,00			
NA	1855	1,07			
4-Hydroxyphenyl-beta-glucopyranoside (5TMS)	1880	1,40			
beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose (1MEOX) (8TMS) MP	1939	1,14			
Cellotriose (1MEOX) (11TMS)	2529	2,55			
NA	2568	1,22			

Figura 21 - Metabólitos diferencialmente abundantes entre as fermentações R1_15: Cinco reciclos fermentativos com *S. cerevisiae* CAT-1; R6_15: Cinco reciclos fermentativos com *S. cerevisiae* CAT-1 e *L. fermentum* (I-2) na concentração 10^6 UFC/mL; R6_16: Cinco reciclos fermentativos com *S. cerevisiae* CAT-1 e *L. fermentum* (I-2) na concentração 10^8 UFC/mL, na presença ou ausência do mosto (M)

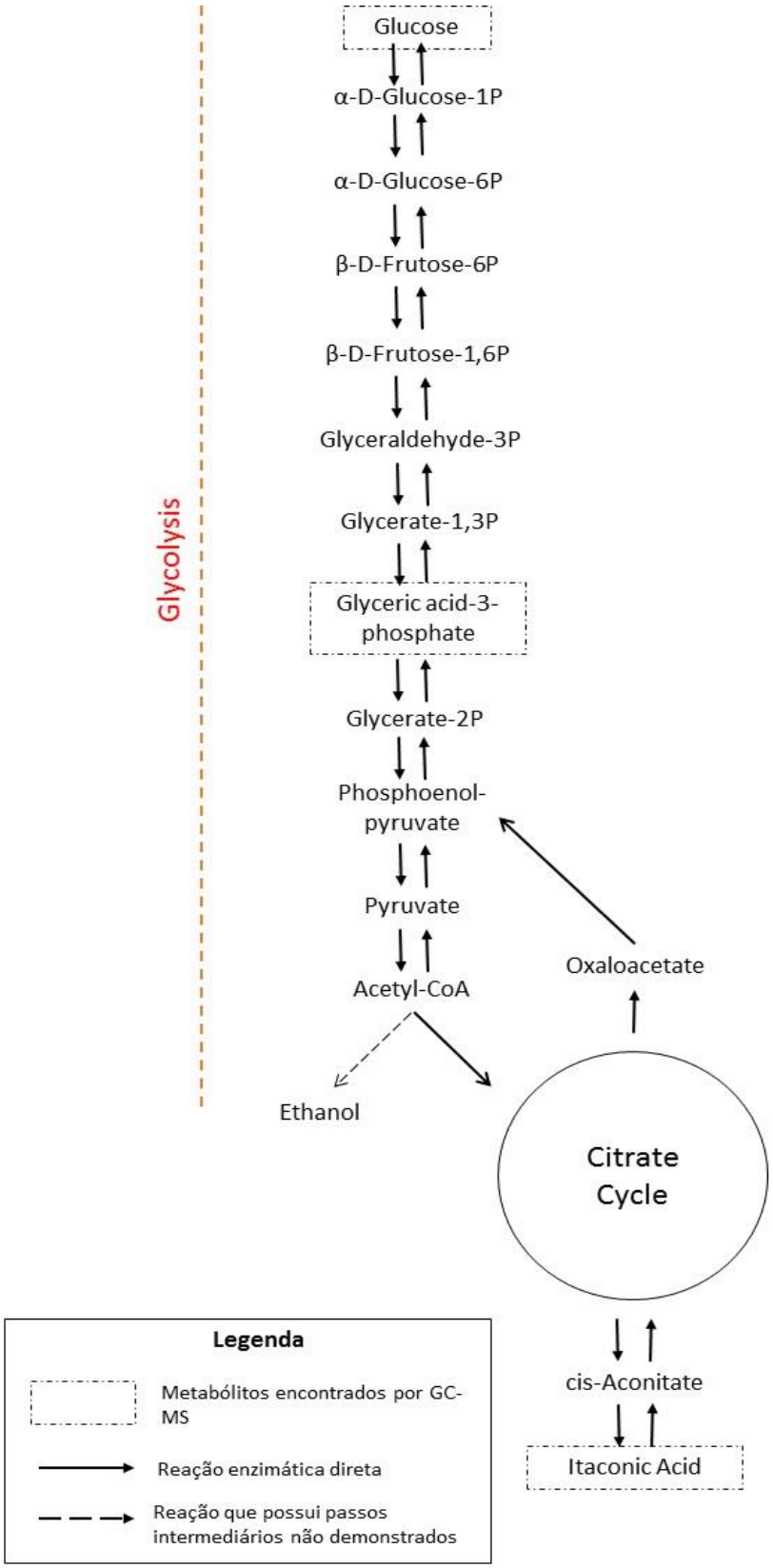

Figura 22 – Vias metabólicas em comum entre os metabólitos reportados como preferencialmente abundantes na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1

Os outros metabólitos reportados como mais abundantes nas fermentações na ausência de contaminante bacteriano parecem não se relacionar diretamente entre si. São estes a *Galactose*, *Guanosine, 2'-deoxy-*, *Phenoxyacetic acid, 4-hydroxymethyl-3-methoxy-* e *Nicotinic acid, 6-hydroxy-* (Figura 23).

Já nas fermentações de *S. cerevisiae* CAT-1 na presença de *L. fermentum* (I-2) foram reportados 27 metabólitos preferencialmente abundantes, sendo que 5 foram mais abundantes na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1 contaminado com *L. fermentum* (I-2) na concentração de 10^6 UFC/mL (R6_15 a R10_15) e os outros 22 foram mais abundantes na concentração de 10^8 UFC/mL do contaminante bacteriano (R6_16 a R10_16). Na fermentação realizada com menor concentração de contaminante, 3 metabólitos não foram identificados (*Unknown*) e os outros dois identificados, referem-se a diferentes formas de *Threonine* (Figura 21).

Tabela 7 - Principais parâmetros de validação do PLS-DA da análise comparativa entre as amostras de fermentação na presença da amostra do mosto (Vinho + Mosto) ou na ausência desta (Vinho – Mosto)

Análise	**Vinho + Mosto**			**Vinho - Mosto**		
Medida	**1 comps**	**2 comps**	**3 comps**	**1 comp**	**2 comp**	**3 comp**
Acurácia	0,16667	0,63889	0,91667	0,66667	0,93333	1,0
R^2	0,67819	0,96376	0,98447	0,9477	0,97495	0,99017
Q^2	0,58373	0,86743	0,89419	0,86136	0,89138	0,89338

*comps = componente

Na fermentação realizada com maior concentração de contaminantes bacterianos (R6_16 a R10_16), 9 metabólitos não foram identificados (*Unknown*). Dentre os que foram identificados, *Prephenic acid* e *Ethanol, 2-(4-hydroxyphenyl)-* participam da via de formação do aminoácido *Tyrosine* e *Valeric acid, 2-oxo-* da via *Valine*. Tanto a *Threonine*, *Tyrosine* e *Valine* são metabólitos sintetizados a partir do *Glutamate*. Neste contexto, o *2-Imidazolidone-4-carboxylic acid* é um inibidor do processo (Figura 8).

Foram encontrados também diversos tipos de açúcares, *4-Hydroxyphenyl-beta-glucopyranoside*, *beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose* e *Cellotriose*. Além disso, ainda foram identificados outros metabólitos como *Valeric acid, 2-oxo-*, *Valero-1,5-lactam*, *Thiazole*, *4-methyl-5-hydroxyethyl-*, *Cytosine, 5-methyl-*, *Histamine*, e *Hexanedioic acid, hydroxy-* (Figura 6).

Além disso, foram encontrados metabólitos que parecem não estarem ligados a presença do contaminante bacteriano, sendo intermediário no ensaio fermentativo só com a levedura *S. cerevisiae*, sendo eles *Gentiobiose, Docosenoic acid, Trehalose, alpha,beta-, Melezitose* e *Sphingosine*, *O-1-beta-galactosyl-*.

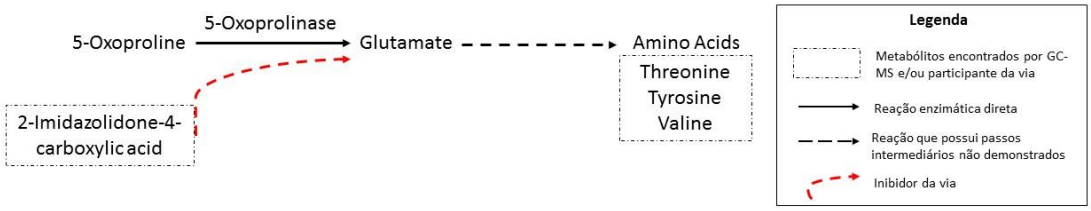

Figura 23 - Via da biossíntese de aminoácidos preferencialmente abundantes na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1 na presença de *L. fermentum* (I-2)

4.4 Discussão

A presença de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica pode afetar a fisiologia da levedura de diferentes formas. No presente trabalho, ao simular as condições existentes no processo fermentativo de larga escala com a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 contaminada com *L. fermentum* (I-2) em dois níveis de infecção, de 10^6 e 10^8 UFC/mL, foi observado que não houve alteração para a taxa de viabilidade e brotamento das leveduras (dados não apresentados). Cherubin (2003) e Basso et al. (2014) também não verificaram alteração em tais parâmetros quando estudaram o efeito de bactérias do gênero *Lactobacillus* na concentração de 10^7 UFC/mL.

No entanto, com relação ao rendimento fermentativo e produtividade, fatores muito importantes para o setor sucroenergético, o presente trabalho verificou que concentrações de 10^6 UFC/mL de *L. fermentum* (I-2) pareceu não afetar significantemente a fermentação da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 com redução do rendimento de 84 % para 83,74 %. No entanto, na concentração de 10^8 UFC/mL de *L. fermentum* (I-2) houve a redução do rendimento 84% para 75,21%. De fato, um processo fermentativo opera em condições “saudáveis” com níveis de contaminação bacteriana de 10^5 UFC/mL (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006). Basso et al. (2014) ao estudarem a contaminação bacteriana de *L. plantarum* FT-230B na concentração de 10^7 UFC/mL, observaram a queda no rendimento fermentativo da levedura também em torno de 5% no quinto reciclo. Já Narendranath, Thomas e Ingledew (2000) verificaram uma queda de 5,84% na

produção de etanol na fermentação contaminada com *L. paracasei* na concentração de 10^7 UFC/mL quando comparado com o controle.

Em todos os ensaios fermentativos da *S. cerevisiae* CAT-1, na presença ou na ausência de contaminantes, observou-se um aumento na produtividade e rendimento ao longo dos reciclos. De fato, as leveduras passam por um processo de adaptação ao processo fermentativo nos reciclos iniciais. Além disso, Thomas, Hyres e Indledew (2001) afirmaram que a grande quantidade de leveduras presentes na dorna pode regular a população de bactérias presentes, isso estaria de acordo com o nosso trabalho, já que os últimos reciclos tiveram os maiores rendimentos em todos os ensaios realizados na presença do contaminante.

O estudo da dinâmica entre as bactérias ácido-láticas (BAL) e as leveduras dentro da dorna de fermentação pode ajudar a desvendar os mecanismos envolvidos neste processo. Diferentes trabalhos que estudaram essa relação, descreveram alguns fatores que estão envolvidos na interferência das BALs na fermentação *S. cerevisiae*, como a produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido lático e acético (BASSO et al., 2014; CHERUBIN, 2003) e a produção de gomas sintetizadas pelas bactérias que provocam floculação (LUDWING et al., 2001).

Além disso, Dong et al. (2015) observaram que quando duas espécies (BALs e leveduras) convivem em um mesmo ambiente, uma delas pode secretar moléculas sinais que regulam a expressão de genes do outro micro-organismo e podem estimular o *quorum sensing* (QS) (ATKINSON; WILLIANS 2009).

Vale ressaltar que a partir dos resultados de balanço de massa global obtidos no presente trabalho, observou-se um aumento na produção de biomassa ao longo dos grupos de fermentação infectadas com *L. fermentum*, quando comparado ao grupo de fermentações com apenas *S. cerevisiae*. De fato, Dong et al. (2015) observaram que a velocidade de reação do ciclo do ácido cítrico das leveduras é aumentada quando a fermentação é infectada com BAL. Outro fator ressaltado pelos autores é de que as enzimas responsáveis pela produção de ácido acético e glicerol não são afetadas pela infecção de dornas por BAL. Isto pode ser observado nos resultados obtidos no presente trabalho em que a massa de glicerol e ácido acético foram muito similares para os três grupos de fermentação.

Com a intenção de estudar melhor a relação entre a levedura e a bactéria contaminante, o presente trabalho acessou o *footpriting* metabólico de ensaios

fermentativos da *S. cerevisiae* CAT-1 na ausência ou presença do contaminante *L. fermentum* (I-2). O levantamento dos metabólitos demonstrou que quase metade não foi identificado (*Unknown*). Um metabólito *Unknown* pode ser definido como uma molécula pequena, cuja detecção e quantificação são reprodutíveis, no entanto, com a sua identidade química ainda não compreendida (KRUMSIEK et al., 2012). Estes metabólitos podem desempenhar papeis importantes na fermentação que ainda precisam ser elucidados e, considerando no contexto da utilização de moléculas utilizadas para a detecção da presença de contaminantes, as moléculas *Unknown* apresentam um grande potencial.

Na fermentação realizada na ausência de contaminante, a presença dos metabólitos diferencialmente abundantes *Glucose*, *Glyceric acid-3-phosphate* e *Itaconic Acid* pode indicar que a via glicolítica está mais ativa nesse ensaio fermentativo, corroborando com os resultados obtidos no trabalho de Dong et al. (2015) que avaliaram a interferência da contaminação de BALs em fermentação alcoólica. A via glicolítica é responsável pela produção de etanol, o produto de maior importância da fermentação alcoólica, desta forma, a presença do contaminante pode acarretar um desvio dessa rota. De fato, a redução do rendimento fermentativo foi observada no presente trabalho e reportado em outros estudos (NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2000; BASSO et al., 2014). No entanto é importante ressaltar que o acúmulo de *Glucose* no final da fermentação pode estar relacionado com a diminuição do rendimento, no entanto, a fermentação com maiores valores de rendimento foi a que ocorreu sem a presença de contaminantes.

O metabólito *Nicotinic acid, 6-hydroxy* faz parte do metabolismo de nicotinato e nicotinamida, sendo que estes são precursores da geração das coenzimas NAD^+ e $NADP^+$, que são cruciais para muitos caminhos metabólitos, como a glicólise, o ciclo do ácido cítrico, biossíntese de ácidos graxos, entre muitos outros (SAUVE et al., 2007). Principalmente considerando a via glicolítica, este metabólito parece estar de acordo com o reforço da via glicolítica na fermentação de *S. cerevisiae* na ausência de contaminantes.

Os metabólitos *Cinnamic acid, 4-hydroxy-*, *cis-, Cinnamic acid, 3,4,5-trimethoxy-, trans-* são descritos em plantas, sendo o primeiro também encontrado em cana-de-açúcar (HE, TERASHIMA 1990), e parecem estar ligados com processos de lignificação (BOUKARI et al., 2011). Estes compostos são degradados por *S. cerevisiae* (EUDES et al., 2011), sendo que *Cinnamic acid, 4-hydroxy-* já foi

descrito como metabólito importante na produção de vinho por ser precursor de fenóis voláteis que tem papel importante no aroma (CHATONNET et al., 1993). No entanto, bactérias do gênero *Lactobacillus* também já foram reportadas como capazes de degradar ácidos cinâmicos (BEEK; PRIEST, 2000). E, apesar de a atividade de degradação destes metabólitos ser menor nas bactérias que nas leveduras, o fato de as bactérias conseguirem degradar pode explicar porque esses metabólitos estão em maior abundância na fermentação na ausência de contaminantes.

A *Galactose* é um açúcar que faz parte da estrutura da parede celular da cana-de-açúcar (SOUZA et al., 2012). Este açúcar é metabolizado pela levedura *S. cerevisiae*. No entanto, de maneira menos eficiente que a glicose (LEE et al., 2011). Além disso, bactérias do gênero *Lactobacillus* metabolizam este açúcar de maneira eficiente (PETERSON, FRED, 1920), desta forma, a presença deste açúcar em maior concentração na fermentação na ausência de contaminante deve ser devida a este fato.

Por fim, foram encontrados os metabólitos *Guanosine, 2'-deoxy* e *Phenoxyacetic acid, 4-hydroxymethyl-3-methoxy-* no ensaio fermentativo na ausência de contaminantes. O primeiro é o nucleosídeo de DNA G com uma hidroxila removida, e está relacionado ao metabolismo das purinas (EL KOUNI, 2003), já o segundo não parece ter uma relação clara com o processo, porém o *Chlorinated phenoxyacetic acid* é um herbicida que já teve sua toxicidade comprovada em *S. cerevisiae* (CABRAL et al. 2003), no entanto os possíveis papeis dessas moléculas no desempenhados no processo fermentativo da levedura precisa ser melhor elucidados.

Os ensaios fermentativos da S. cerevisiae CAT-1 realizados na presença do contaminante *L. fermentum* (I-2), apresentaram outros metabólitos mais abundantes e a maior dificuldade neste contexto é determinar a origem do metabólito. Alguns trabalhos que estudaram a metabolômica do vinho fermentado na presença de mais de uma levedura descreveram a diferença no perfil metabólico quando co-inocularam diferentes *Saccharomyces* spp. (HOWELL et al., 2005; KING et al., 2008), sendo que a diferença de alguns metabólitos preferencialmente abundantes foi discutida. No presente trabalho também houve uma alteração no perfil de metabólitos na fermentação em presença de contaminantes bacterianos, sendo possível, inclusive, determinar a origem de alguns metabólitos.

No ensaio realizado com concentração de 10^6 UFC/mL do *L. fermentum* (I-2), a *Threonine* foi o metabólito mais abundante. A *Threonine* está envolvida em processos metabólicos diferentes, sendo que alguns trabalhos que estudaram a superprodução deste aminoácido por *S. cerevisiae*, observaram que este acúmulo foi atribuído a uma reestruturação do fluxo metabólico ou que o acúmulo dessa molécula interferiu com o metabolismo geral da célula (FARFÁN; CALDERÓN, 2000; KINGSBURY; MCCUSKER, 2010). Já na fermentação com concentração de 10^8 UFC/mL da bactéria, dois participantes da via de biossíntese da *Tyrosine* foram reportados, *Prephenic acid* e *Ethanol, 2-(4-hydroxyphenyl)-* e um participante *Valeric acid, 2-oxo-* da via *Valine* e *Leucine* (VILLAS-BÔAS et al., 2007).

Esses três aminoácidos parecem ser importantes no contexto da fermentação da levedura na presença do contaminante bacteriano e reforçam a presença da via de formação de aminoácidos a partir do *Glutamate*. No entanto, o processo de regulação da biossíntese de aminoácidos é complexa e envolve diferentes fatores (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012), desta forma, é difícil estabelecer quais processos são de fato regulados neste contexto. Porém, é importante ressaltar que *S. cerevisiae* deve ser responsável pela produção destes aminoácidos, uma vez que as BALs têm uma capacidade limitada de produzir aminoácido utilizando fontes inorgânicas de nitrogênio (AXELSSON, 2004).

Neste contexto, a presença de *2-Imidazolidone-4-carboxylic acid*, uma molécula que inibe competitivamente a enzima 5-oxoprolinase, cujo produto final da reação é *Glutamate* (VAN DER WERF et al., 1973), pode agir como regulador do processo. No entanto, não há a descrição da produção dessa molécula por bactérias ou leveduras, apenas da produção de 5-Oxoproline, a molécula análoga (VAN DER WERF; MEISTER, 1974).

O metabólito *Ethanol, 2-(4-hydroxyphenyl)-*, além de participar da via de biossíntese da *Tyrosine*, já foi descrito como molécula responsável pelo processo de *Quorum sensing* em *Candida albicans* (ALBUQUERQUE, CASADEVALL, 2012), sendo que Severin et al. (2008) reportaram que *phenylethanol* está relacionado com o sistema de comunicação intercelular de *S. cerevisiae*, especialmente em condições baixas de nitrogênio, e que essa substância induz processo de apoptose. Um aumento na morte celular das leveduras pode, se em grande quantidade, prejudicar a fermentação.

Já o metabólito *Thiazole*, *4-methyl-5-hydroxyethyl-* é intermediário na síntese de *Thiamine* (vitamina B1), sendo que a mesma é essencial para todos os seres vivos. Bataillon et al. (1995) ao estudarem o efeito da falta de *Thiamine* na fermentação alcoólica de vinho por leveduras *S. cerevisiae* e leveduras contaminantes, observaram que a redução desta vitamina leva a uma redução na fermentação ou, até mesmo, pode cessar o processo. Desta forma, a tentativa de produção desta vitamina, por parte bactéria e da levedura, deve ocorrer para tentar suprimir a sua possível falta.

A metilação do DNA é uma das mais relevantes mudanças epigenéticas e que está relacionado com o controle da transcrição de genes. A metilação de DNA, identificada através da presença do metabólito *Cytosine, 5-methyl-*, ocorre tanto em *S. cerevisiae* (YANG et al., 2012) quanto em *L. fermentum* (EGERVÄRN et al., 2007). Num ambiente de estresse para os dois micro-organismos, que é a dorna de fermentação, mudanças epigenéticas podem indicar uma reconfiguração do funcionamento celular nessa nova situação.

Histamine é uma amina biogênica produzida por LABs como consequência da descarboxilação da histidina, sendo que essa substância está presente em comidas e bebidas fermentadas (LANDETE et al., 2008). Desta forma, esta molécula pode ser utilizada para o monitoramento da bactéria como contaminante do processo fermentativo para produção de etanol, já que foi encontrada no presente trabalho como mais abundante nas fermentações na presença de contaminante.

Além desses metabólitos, três moléculas de diferentes açúcares foram mais abundantes nas fermentações na presença do contaminante bacteriano, são elas *4-Hydroxyphenyl-beta-glucopyranoside*, *beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose* e *Cellotriose*. Açúcares que, de alguma forma não são metabolizados pelas leveduras podem representar uma perda de rendimento no processo fermentativo. Por fim, também foi encontrado o metabólito *Valero-1,5-lactam*, no entanto, este foi somente reportado na saliva humana e sua função ainda não foi descrita (DAME et al., 2015).

O presente trabalho simulou fermentações na condição industrial com levedura *S. cerevisiae* CAT-1 na ausência e presença do contaminante *L. fermentum* (I-2). A bactéria contaminante afetou o rendimento e a produtividade da levedura e, com o estudo do metaboloma da fermentação, foi possível descrever diferentes metabólitos preferencialmente abundantes nas duas condições que reforçaram a

importância da via glicolítica na fermentação na ausência de contaminante. Os resultados obtidos também indicaram a importância da produção de aminoácidos a partir de *glutamate* nas fermentações na presença de contaminante. O emprego da metabolômica no contexto da fermentação alcoólica possibilita o maior entendimento da fisiologia da fermentação realizada pela *S. cerevisiae* em diferentes contextos.

Referências

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi–a review. **Medical Mycology**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.

ANDRIETTA, M.D.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. (2006). Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. **Revista Multiciência:** Construindo a História dos produtos naturais, Campinas, v. 2, p. 1-16, 2006.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. **Food Science and Technology**, New York, v. 139, p. 1-66, 2004.

AZNAR, M.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.F.; FERREIRA, V. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 2924-2929, 2001.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. **Processo de produção de álcool:** controle e monitoramento**.** 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. p. 46.

BASSO, T.O.; GOMES, F.S.; LOPES, M.L.; DE AMORIM, H.V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L.C. Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amstrerdam, v. 105, p. 169-177, 2014.

BATAILLON, M.; RICO, A.; SABLAYROLLES, J.M.; SALMON, J.M.; BARRE, P. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 82, n. 2, p. 145-150, 1996.

BISCHOFF, K.M.; LIU, S.; LEATHERS, T.D.; WORTHINGTON, R.E.; RICH, J. O. (2009). Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 103, p. 117-122, 2009.

CABRAL, M.G.; VIEGAS, C.A.; TEIXEIRA, M.C.; SÁ-CORREIA, I. Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model Saccharomyces cerevisiae: role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population. **Chemosphere**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 47-54, 2003.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.N.; LAVIGNE, V. Synthesis of volatile phenols by Saccharomyces cerevisiae in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 62, n. 2, p. 191-202, 1993.

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.** 2003. 124p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DAME, Z.T; AZIAT, F.; MANDAL, R.; KRISHNAMURTHY, R.; BOUATRA, S.; BORZOUIE, S.; GUO, A.C.; SAJED, T.; DENG, L.; LIN, H.; LIU, P.; DONG, E.; WISHART, D.S. The human saliva metabolome. **Metabolomics**, New York, v. 11, p. 1864-1883, 2015.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, D.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. *23*, p. 130-135, 1960.

DING, M.Z.; CHENG, J.S.; XIAO, W.H.; QIAO, B.; YUAN, Y.J. Comparative metabolomic analysis on industrial continuous and batch ethanol fermentation processes by GC-TOF-MS. **Metabolomics**, New York, v. 5, p. 229-238, 2009.

EGERVÄRN, M.; DANIELSEN, M.; ROOS, S.; LINDMARK, H.; LINDGREN, S. Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, p. 412-418, 2007.

EL KOUNI, M.H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology & therapeutics**, Oxford, v. 99, p. 283-309, 2003.

EUDES, A.; BAIDOO, E.E.; YANG, F.; BURD, H.; HADI, M.Z.; COLLINS, F.W.; KEASLING, J.D.; LOQUÉ, D. Production of tranilast [N-(3′, 4′-dimethoxycinnamoyl)-anthranilic acid] and its analogs in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 89, n. 4, p. 989-1000, 2011.

FARFÁN, M.J.; CALDERÓN, I.L. Enrichment of threonine content in Saccharomyces cerevisiae by pathway engineering. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 9, p. 763-770, 2000.

FRED, E.B. The fermentation of glucose, galactose, and mannose by *Lactobacillus pentoaceticus* n. sp. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 42, p. 273-287, 1920.

HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and structure of lignin in monocotyledons. III. Heterogeneity of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) lignin with respect to the composition of structural units in different morphological regions. **Journal of wood Chemistry and Technology**, Amsterdam, v. 10, p. 435-459, 1990.

HOWELL, K.S.; COZZOLINO, D.; BARTOWSKY, E.J.; FLEET, G.H.; HENSCHKE, P.A. Metabolic profiling as a tool for revealing Saccharomyces interactions during wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 91-101, 2006.

KING, E.S.; SWIEGERS, J.H.; TRAVIS, B.; FRANCIS, I.L.; BASTIAN, S.E.; PRETORIUS, I.S. Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 22, p. 10829-10837, 2008.

KINGSBURY, J.M.; MCCUSKER, J.H. Homoserine toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* homoserine kinase (thr1Δ) mutants. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 9, n. 5, p. 717-728, 2010.

KISHIMOTO, T.; WANIKAWA, A.; KAGAMI, N.; KAWATSURA, K. Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 4701-4707, 2005.

KRUMSIEK, J.; SUHRE, K.; EVANS, A.M.; MITCHELL, M.W.; MOHNEY, R.P.; MILBURN, M.V.; WÄGELE, B.; RÖMISCH-MARGL, W.; ILLIG, T.; ADAMSKI, J.; GIEGER, C.; THEIS, F.J; KASTENMÜLLER, G. Mining the unknown: a systems approach to metabolite identification combining genetic and metabolic information. **PLoS Genetics**, Cambridge, v. 8, n. 10, p. e1003005, 2012.

LANDETE, J.M.; DE LAS RIVAS, B.;MARCOBAL, A.; MUNOZ, R. Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Ratón, v. 48, p. 697-714, 2008.

LJUNGDAHL, P.O.; DAIGNAN-FORNIER, B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Austin, v. 190, n. 3, p. 885-929, 2012.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, DF de. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 33-37,2001.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4187-4192, 2000.

RUBINGH, C.M., BIJLSMA, S.; DERKS, E.P., BOBELDIJK, I.; VERHEIJ, E.R.; KOCHHAR, S.; SMILDE, A.K. Assessing the performance of statistical validation tools for megavariate metabolomics data. **Metabolomics**, New York, v. 2, p. 53-61, 2006.

SALEK, R.M.;COLEBROOKE, R.E.; MACINTOSH, R.; LYNCH, P.J.; SWEATMAN, B.C.; EMSON, P.C.; GRIFFIN, J.L. A metabolomic study of brain tissues from aged mice with low expression of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) gene. **Neurochemical Research**, New York, v. 33, p. 292-300, 2008.

SAUVE, A. NAD+ and vitamin B3: from metabolism to therapies. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 324, n. 3, p. 883-893, 2008.

SEVERIN, F. F. et al. Natural causes of programmed death of yeast Saccharomyces cerevisiae. **Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research,** Amsterdam, v. 1783, n. 7, p. 1350-1353, 2008.

SOUZA, A.P.; LEITE, D.C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M.G.; BUCKERIDGE, M. S. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **Bioenergy Research**, New York, v. 6, n. 2, p. 564-579, 2013.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 819-828, 2001.

VAN BEEK, S.; PRIEST, F.G. Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5322-5328, 2000.

VAN DER WERF, P. STEPHANI, R. A., ORLOWSKI, M., & MEISTER, A. Inhibition of 5-oxoprolinase by 2-imidazolidone-4-carboxylic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 70, n. 3, p. 759-761, 1973.

VAN DER WERF, P.; MEISTER, A. Isolation of 5-oxoprolinase from a prokaryote. **Biochemical and biophysical research communications**, Orlando, v. 56, n. 1, p. 90-96, 1974.

VILLAS-BÔAS, S.G.; HØJER-PEDERSEN, J.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. **Yeast**, Davis, v. 22, n.14, p. 1155-1169, 2005.

VILLAS-BOAS, S.G.; NIELSEN, J., SMEDSGAARD, J.; HANSEN, M.A.; ROESSNER-TUNALI, U. **Metabolome analysis**: an introduction. New York:John Wiley , 2007.p 254, v. 24.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho estudou a comunidade contaminante do processo fermentativo de cana-de-açúcar para a produção de etanol. Inicialmente, foram realizadas coletas em duas usinas do estado de São Paulo para acessar a comunidade bacteriana com metodologia independente de cultivo. Foi possível verificar que o gênero *Lactobacillus* compôs 91 a 99% da comunidade bacteriana em todas as dornas de fermentação amostradas, o que indica a importância deste gênero para o ambiente fermentativo.

Além disso, a comunidade pareceu ser distinta entre as usinas acessadas e persistir ao longo do tempo. O estudo da comunidade bacteriana contaminante do processo fermentativo por metodologia independente de cultivo pode auxiliar a melhor compreender este ambiente.

Na tentativa de compreender a fisiologia da levedura *S. cerevisiae* na presença do contaminante, foi estabelecida uma metodologia para análise de metabólitos através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Os parâmetros do aparelho foram testados e otimizados para amostras de fermentação da *S. cerevisiae* em mosto de cana-de-açúcar. Com a metodologia estabelecida, foi possível identificar 261 metabólitos, sendo que as três classes mais abundantes foram *Carbohydrates and carbohydrate conjugates* (16%), *Carboxylic acids and derivatives* (12%) e *Fatty Acyls* (5%). A metodologia pode ter aplicação para o estudo da fisiologia da levedura em diversas situações.

Neste trabalho, ensaios fermentativos da S. cerevisiae CAT-1 na presença do contaminante *Lactobacillus fermentum* (I-2) foram realizados na tentativa de entender a interação destes micro-organismos na dorna de fermentação. A presença do contaminante bacteriano afetou o rendimento e a produtividade da levedura apenas quando presentes nas maiores concentrações, de 10^8 UFC/mL. E ao acessar o *footpriting* metabólico das amostras de vinho da fermentação, foi possível identificar 208 metabólitos, sendo 50 diferencialmente abundantes. Além disso, a via glicolítica foi reforçada na fermentação da *S. cerevisiae* CAT-1 e a produção de aminoácidos a partir do *glutamate* pareceu ser importante na nas fermentações de *S. cerevisiae* (CAT-1) na presença de *L. fermentum* (I-2).

Uma abordagem polifásica sobre a relação dos micro-organismos contaminantes com a levedura nas dornas de fermentação possibilitou um maior

entendimento sobre a interação destes. A melhor compreensão desta relação faz-se importante na busca de soluções à presença dos contaminantes no ambiente fermentativo.

ANEXOS

ANEXO A – Metabólitos reportados na fermentação da *S. cereveisae* CAT-1

ID	Nome	Mass Count	Score	Classe
503	1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylic-acid	5	970	Carboxylic acids and derivatives
1042	2-Hydroxytetradecanoic acid	4	723	Fatty Acyls
289	2-Oxopiperazine (2TMS)	3	756	Piperazine derivate
473	4-Hydroxybenzaldehyde	4	801	Benzene and substituted derivatives
324	5-Hydroxymethylfurfural (1MEOX) (1TMS) MP	5	651	Carbonyl compounds
653	6-deoxy-Mannopyranose	5	897	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
672	Acetic acid, 4-hydroxyphenyl- (2TMS)	3	838	Benzene and substituted derivatives
42	Acetoacetic acid (1MEOX) (1TMS) BP	3	954	Keto acids and derivatives
862	Aconitic acid, cis- (3TMS)	12	856	Carboxylic acids and derivatives
873	Aconitic acid, trans- (3TMS)	9	824	Carboxylic acids and derivatives
2125	Adenosine, alpha- (4TMS) BP	7	863	Purine nucleosides
2297	Adenosine-5-monophosphate (4TMS) (Derivate not found)	6	788	Purine nucleotides
9	Alanine, beta- (1TMS)	8	960	Carboxylic acids and derivatives
617	Alanyl-alanine (2TMS)	3	746	Carboxylic acids and derivatives
2074	alpha-D-Galactopyranosyl-(1,4)-D-galactopyranoside (1MEOX) (8TMS) BP	20	913	Carboxylic acids and derivatives
2150	alpha-D-Glucopyranosyl-(1,6)-D-glucitol (9TMS) / Isomaltitol	16	808	Fatty Acyls
1262	Arabinoheptulosonic acid enol, 3-deoxy- (5TMS) BP	3	785	Carboxylic acids and derivatives
1204	Arabinoheptulosonic acid enol, 3-deoxy- (5TMS) MP	14	660	Carboxylic acids and derivatives
486	Asparagine [-H2O] (2TMS)	3	779	Carboxylic acids and derivatives
996	Benzoic acid, 3,4-dihydroxy- (3TMS)	4	877	Benzene and substituted derivatives
587	Benzoic acid, 3-hydroxy- (2TMS)	3	976	Benzene and substituted derivatives
1012	Benzoic acid, 4-amino- (2TMS)	3	617	Benzene and substituted derivatives
661	Benzoic acid, 4-hydroxy- (2TMS)	5	946	Benzene and substituted derivatives

1923	beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose (1MEOX) (8TMS) BP	13	717	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1939	beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose (1MEOX) (8TMS) MP	16	710	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1400	beta-D-Galactopyranoside, 1-isopropyl-, 1-thio- (4TMS)	16	648	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1832	beta-Galactopyranosyl-1,3-arabinose, D- (1MEOX) (7TMS)	5	676	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
46	Butanoic acid, 2-hydroxy- (2TMS)	3	819	Fatty Acyls
1312	Cinnamaldehyde, 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-, cis- (1MEOX) (1TMS) MP	3	843	Aldehyde (Phenylpropanoic)
1351	Cinnamaldehyde, 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-, trans- (1MEOX) (1TMS) BP	3	642	Aldehyde (Phenylpropanoic)
944	Cinnamic acid, 4-hydroxy-, cis- (2TMS)	3	915	Cinnamic acids and derivatives
566	Cis,cis-Muconic-acid	4	683	Fatty Acyls
1272	Coniferylaldehyde, trans- (1MEOX) (1TMS) BP	4	753	Aldehyde (Phenylpropanoic)
546	Creatinine (3TMS)	5	807	Azolines
1876	Cytidine-2',3'-cyclic-monophosphate (4TMS)	8	606	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
89	D116201	4	617	Unknown
160	D126702	4	750	Unknown
689	D165453	13	701	Unknown
796	D171803	3	884	Unknown
881	D176099	6	777	Unknown
1337	D200830	15	628	Unknown
1531	D215058	12	726	Unknown
1602	D222462	16	771	Unknown
1673	D230150	3	913	Unknown
1704	D235202	6	751	Unknown
1785	D245834	3	769	Unknown
1868	D256464	10	732	Unknown

2115	D283309	5	778	Unknown
2196	D291398	14	891	Unknown
605	Digitoxose (1MEOX) (3TMS) MP	6	836	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1684	Eicosan-1-ol, n- (1TMS)	4	831	Fatty Acyls
532	Erythronic acid (4TMS)	16	651	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
581	Ethanol, 2-(4-hydroxyphenyl)- (2TMS)	9	840	Benzene and substituted derivatives
1455	Ferulic acid, trans- (2TMS)	3	933	Cinnamic acids and derivatives
268	Fumaric acid (2TMS)	4	955	Carboxylic acids and derivatives
70	Furan-2-carboxylic acid (1TMS)	3	887	Furans
1377	Galactaric acid (6TMS)	8	679	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1228	Galactitol (6TMS)	6	789	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1050	Galactopyranoside, 1-O-methyl-, beta- (4TMS)	3	973	Not classified
1411	Galactosamine, N-acetyl- (1MEOX) (5TMS) MP	6	831	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1176	Galactose	5	709	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1239	Galactose, 2-amino-2-deoxy-, D- (1MEOX) (5TMS)	14	749	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1236	Glucaric acid-1,4-lactone (4TMS)	8	831	Lactone
1323	Gluconic acid (6TMS)	14	739	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1332	Gluconic acid, 2-amino-2-deoxy- (6TMS)	6	773	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1177	Glucose (1MEOX) (5TMS) BP	3	697	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
916	Glucose, 2-deoxy- (1MEOX) (4TMS) MP	9	676	Carbohydrates and carbohydrate

				conjugates
1735	Glucose-6-phosphate (6TMS)	3	865	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1711	Glucose-6-phosphate, 2-amino-2-deoxy- (1MEOX) (6TMS) MP	4	643	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
590	Glutaric acid, 2-hydroxy- (3TMS)	9	832	Fatty Acyls
534	Glutaric acid, 3-oxo- (1MEOX) (2TMS)	9	600	Carboxylic acids and derivatives
131	Glyceraldehyde (1MEOX) (2TMS) BP	3	996	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
370	Glycinamide (2TMS) BP2	4	679	Amino acid derivate
2	Glycine, N,N-dimethyl- (1TMS)	3	630	Carboxylic acids and derivatives
1641	Glycyl-phenylalanine (4TMS)	3	902	Carboxylic acids and derivatives
1161	Gulose (1MEOX) (5TMS) BP	5	692	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1859	Heneicosanoic acid (1TMS)	14	699	Fatty Acyls
1366	Heptadecan-1-ol, n- (1TMS)	15	719	Alcohols and polyols
773	Heptadecane, n-	4	918	Alkanes
1211	Hexadecan-1-ol, n- (1TMS)	5	830	Fatty Acyls
615	Hexadecane, n-	4	914	Alkanes
1059	Homoserine lactone, N-2-oxocaproyl- (1MEOX) (1TMS) MP	3	846	Amino acid derivate
899	Homovanillic acid (2TMS)	3	651	Benzene and substituted derivatives
549	Imidazole-4-acetic acid (1TMS)	5	608	Azoles
499	Iminodiacetic acid (3TMS)+B68B55:BB2:B89	7	609	Carboxylic acids and derivatives
837	Iminodiacetic acid, N-(2-hydroxyethyl)- (3TMS)	5	701	Carboxylic acids and derivatives
1756	Indole-2-carboxylic acid, 5-hydroxy- (3TMS)	8	661	Indoles and derivatives
1418	Indole-3-acetaldehyde acetal (3TMS)	4	988	Indoles and derivatives
1889	Inosine (4TMS)	13	647	Purine nucleosides
168	Isocaproic acid, 2-oxo- (1MEOX) (1TMS) MP	3	924	Keto acids and derivatives
2189	Isomaltose (1MEOX) (8TMS) BP	21	846	Carbohydrates and carbohydrate

				conjugates
2145	Isomaltose (1MEOX) (8TMS) MP	14	673	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
251	Itaconic acid (2TMS)	9	756	Fatty Acyls
1541	Kynurenine (2TMS)	4	612	Benzene and substituted derivatives
25	Lactic acid (2TMS)	8	924	Hydroxy acids and derivatives
593	Lactic acid, 3-phenyl- (2TMS)	3	898	Phenylpropanoic acids
2043	Lactitol (9TMS)	20	640	Not classified
1990	Laminaribiose (1MEOX) (8TMS) MP	21	678	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1568	Lipoamide, alpha- (1TMS)	6	607	Dithiolanes
908	Lyxonic acid (5TMS)	4	811	Carboxylic acids and derivatives
562	Maleamic acid (2TMS) BP	7	910	Carboxylic acids and derivatives
270	Maleic acid, 2-methyl- (2TMS)	10	715	Carboxylic acids and derivatives
1579	Malic acid, 3-oxalo- (1MEOX) (4TMS) MP	4	873	Carboxylic acids and derivatives
298	Malonic acid (3TMS)	7	925	Carboxylic acids and derivatives
2116	Maltitol (9TMS)	18	851	Fatty Acyls
1208	Mannitol (6TMS)	3	932	Carboxylic acids and derivatives
1543	Mannose-1-phosphoric-acid	10	690	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2187	Melibiose	18	866	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
539	Methyl 3,6-anhydro-alpha-D-galactopyranoside (2TMS)	7	770	Unknown
1643	Muramic acid, N-acetyl- (1MEOX) (5TMS) MP	7	672	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1294	Myristic-acid-amide	8	634	Carboxylic acids and derivatives
1390	Myristic-acid-amide	3	918	Carboxylic acids and derivatives
1132	N-(3-Oxohexanoyl)-homoserine-lactone	3	684	Amino acid derivate
28	NA	15	669	Unknown

51	NA	3	935	Unknown
72	NA	10	756	Unknown
294	NA	12	654	Unknown
310	NA	6	638	Unknown
342	NA	4	616	Unknown
392	NA	5	770	Unknown
517	NA	8	816	Unknown
573	NA	9	781	Unknown
600	NA	12	733	Unknown
694	NA	4	976	Unknown
847	NA	4	800	Unknown
848	NA	4	642	Unknown
911	NA	3	825	Unknown
1047	NA	3	776	Unknown
1064	NA	3	759	Unknown
1365	NA	9	747	Unknown
1406	NA	8	730	Unknown
1457	NA	4	905	Unknown
1512	NA	4	628	Unknown
1695	NA	4	741	Unknown
1697	NA	9	701	Unknown
1703	NA	3	660	Unknown
1706	NA	12	753	Unknown
1708	NA	19	738	Unknown
1718	NA	19	689	Unknown
1719	NA	3	951	Unknown
1728	NA	4	649	Unknown
1744	NA	5	706	Unknown

1750	NA	3	915	Unknown
1759	NA	13	675	Unknown
1762	NA	16	638	Unknown
1805	NA	3	767	Unknown
1808	NA	15	735	Unknown
1811	NA	7	684	Unknown
1836	NA	5	669	Unknown
1865	NA	4	937	Unknown
1891	NA	4	760	Unknown
1897	NA	3	764	Unknown
1996	NA	14	691	Unknown
1998	NA	13	661	Unknown
2013	NA	18	687	Unknown
2025	NA	13	801	Unknown
2026	NA	14	739	Unknown
2046	NA	14	744	Unknown
2078	NA	19	796	Unknown
2098	NA	20	621	Unknown
2101	NA	5	896	Unknown
2119	NA	19	629	Unknown
2131	NA	11	767	Unknown
2137	NA	8	874	Unknown
2159	NA	12	857	Unknown
2200	NA	19	704	Unknown
2219	NA	14	657	Unknown
2223	NA	8	800	Unknown
2248	NA	3	994	Unknown
2252	NA	5	939	Unknown

2264	NA	8	720	Unknown
2278	NA	15	693	Unknown
2284	NA	19	800	Unknown
2301	NA	4	693	Unknown
2317	NA	7	672	Unknown
2381	NA	11	842	Unknown
2424	NA	6	761	Unknown
2562	NA	9	855	Unknown
61	NA114002 (classified unknown)	5	829	Unknown
66	NA114008	6	661	Unknown
257	NA135011 (classified unknown]	9	725	Unknown
401	NA145016 (classified unknown)	6	811	Unknown
571	NA157004	4	782	Unknown
652	NA163015 (classified unknown)	17	671	Unknown
751	NA168027	5	815	Unknown
824	NA174001	15	695	Unknown
861	NA176001 (classified unknown)	4	909	Unknown
902	NA177025 (classified unknown)	9	737	Unknown
957	NA180026	3	632	Unknown
958	NA181001	4	839	Unknown
1189	NA192001 (classified unknown)	3	639	Unknown
1665	NA229001	9	847	Unknown
1961	NA269016	10	650	Unknown
2560	NA367002	3	885	Unknown
1413	N-Acetylglucosamine	8	858	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2089	Neuraminic acid, N-glycolyl- (1TMS) (7TMS) BP	14	806	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2086	Neuraminic acid, N-glycolyl- (1TMS) (7TMS) MP	14	701	Carbohydrates and carbohydrate

				conjugates
588	Nicotinic acid, 6-hydroxy- (2TMS)	7	668	Pyridines and derivatives
1626	Octadecanoic acid (1TMS)	20	917	Fatty Acyls
1542	Octanoic acid, 3-hydroxy- (2TMS)	7	634	Hydroxy acids and derivatives
1129	Orotic acid, 4,5-dihydro- (4TMS)	3	779	Carboxylic acids and derivatives
149	Oxamic acid (2TMS)	3	840	Carboxylic acids and derivatives
2155	Palatinose	10	709	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2129	Palatinose (1MEOX) (8TMS)	19	831	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1247	Pentadecanoic acid (1TMS)	6	727	Fatty Acyls
185	Phosphoric acid (3TMS)	7	865	Non-metal oxoanionic compounds
514	Proline, 4-hydroxy-, trans- (3TMS)	7	620	Carboxylic acids and derivatives
316	Propanoic acid, 2-amino-3-ureido- (2TMS)	6	837	Amino acid derivate
595	Propionic acid, 3-ureido- (1TMS)	9	665	Organic carbonic acids and derivatives
720	Propionic acid, 3-ureido- (2TMS)	9	641	Organic carbonic acids and derivatives
1596	Pseudoephedrine glycinamide (3TMS)	10	687	amide
1048	Psicose (1MEOX) (5TMS) BP	3	824	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
853	Putrescine, N-acetyl- (2TMS)	4	873	Carboxylic acids and derivatives
27	Pyridine, 2-hydroxy- (1TMS)	7	962	Pyridines and derivatives
62	Pyridine, 3-hydroxy- (1TMS)	5	924	Pyridines and derivatives
515	Pyroglutamic acid (2TMS)	7	961	Carboxylic acids and derivatives
884	Ribonic acid (5TMS)	12	777	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1788	Saccharopine (4TMS)	14	705	Carboxylic acids and derivatives
1492	Sedoheptulose, 2,7-anhydro-, beta- (4TMS)	3	907	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
377	similar to Aspartic acid (2TMS)	5	814	Carboxylic acids and derivatives

942	similar to Fructose Derivate	5	920	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2034	Sophorose (1MEOX) (8TMS) MP	19	757	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2104	Squalene, all-trans-	5	867	Prenol lipids
240	Succinic acid (2TMS)	8	890	Carboxylic acids and derivatives
1916	Sucrose (8TMS)	15	704	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1745	Tetracosane, n-	5	717	Alkanes
1055	Threitol, dithio- (4TMS)	5	839	Alcohols and polyols
217	Threonine (2TMS)	7	643	Amino acid
2017	Trehalose, alpha,beta- (8TMS)	21	668	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2036	Trehalose, beta,beta'- (8TMS)	19	629	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1540	Tryptamine, 1-methyl- (2TMS)	4	962	Unknown
1804	Tryptamine, 5-hydroxy- (4TMS)	3	971	Indoles and derivatives
1792	Tryptamine, 5-methoxy- (2TMS) MP	7	758	Indoles and derivatives
1229	Tyrosine (3TMS)	5	684	Phenylpropanoic acids
78	Unknown#bth-pae-011	8	687	Unknown
161	Unknown#bth-pae-018	5	879	Unknown
657	Unknown#bth-pae-042	3	701	Unknown
752	Unknown#bth-pae-048	9	699	Unknown
709	Unknown#sst-cgl-046	3	861	Unknown
821	Unknown#sst-cgl-054	4	632	Unknown
1414	Unknown#sst-cgl-093	3	794	Unknown
1705	Unknown#sst-cgl-A08	9	773	Unknown
1646	Unknown#sst-cgl-A16	3	756	Unknown
258	Uracil (2TMS)	4	704	Diazines

163	Urea (2TMS)	3	877	Organic carbonic acids and derivatives
2161	Uridine 5'-monophosphate (5TMS)	3	623	Pyrimidine nucleotides
1783	Uridine, 2'-deoxy- (3TMS) MP	3	857	Pyrimidine nucleosides
58	Valeric acid, 2-oxo- (1MEOX) (1TMS) BP	7	627	Keto acids and derivatives
189	Valero-1,5-lactam (1TMS)	3	997	Piperidines
907	Vanillic acid (2TMS)	7	916	Benzene and substituted derivatives

ANEXO B – Metabólitos reportados na fermentação de *S. cerevisiae* CAT-1 na presença de *L. fermentum* (I-2).

ID	Nome	Mass Count	Score	Classe
138	1,3-Dihydroxyaceton (1MEOX) (2TMS) MP	3	746	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
538	1,4-Naphthoquinone, 2-methyl-	7	723	Naphthalenes
658	2-Imidazolidone-4-carboxylic acid (3TMS)	7	657	Azoles
1105	3-Hydroxytetradecanoic	3	962	Fatty Acyls
114	3-Methyl-2-oxopentanoic-acid	6	846	Keto acids and derivatives
1880	4-Hydroxyphenyl-beta-glucopyranoside (5TMS)	19	667	Hydroquinone derivate
287	5-Methyl-2H-1,2,6-oxadiazin-3(6H)-one (1MEOX) (2TMS)	4	880	Lactam/ Amida cíclica
2150	alpha-D-Glucopyranosyl-(1,6)-D-glucitol (9TMS)	21	803	Fatty Acyls
1163	Altrose (1MEOX) (5TMS) BP	3	897	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2064	Androst-4-en-3,17-dione (2MEOX) MP	4	648	Steroids and steroid derivatives
790	Arabitol (5TMS)	20	676	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
964	Azelaic Acid (2TMS)	5	750	Fatty Acyls
582	Barbituric acid (3TMS)	5	700	Diazines
1923	beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose (1MEOX) (8TMS) BP	16	684	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1939	beta-D-Fructofuranosyl-(2,1)-beta-D-Fructofuranose (1MEOX) (8TMS) MP	17	812	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
358	Butanoic acid, 2,4-dihydroxy- (3TMS)	3	966	Fatty Acyls
385	Cadaverine	8	771	Amines
2529	Cellotriose (1MEOX) (11TMS)	4	704	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
647	Cinnamic acid, 2-methoxy-, cis- (1TMS)	5	605	Cinnamic acids and derivatives

1034	Cinnamic acid, 3,4,5-trimethoxy-, trans- (1TMS)	3	662	Cinnamic acids and derivatives
944	Cinnamic acid, 4-hydroxy-, cis- (2TMS)	3	758	Cinnamic acids and derivatives
1586	Cystineamine (4TMS)	13	795	Thiols
550	Cytosine, 5-methyl- (2TMS)	9	892	Diazines
160	D126702	8	674	Unknown
689	D165453	14	723	Unknown
750	D168614	14	635	Unknown
1206	D192781	6	757	Unknown
1615	D223156	17	828	Unknown
1662	D228685	11	750	Unknown
1673	D230150	16	878	Unknown
1704	D235202	14	823	Unknown
1822	Dihydrosphingosine (3TMS) MP	3	948	Sphingolipids
1466	Dihydroxyphenylalanine	3	833	Benzene and substituted derivatives
1839	Docosenoic acid methyl ester, 13-(Z)-	8	778	Fatty acid
1907	Docosenoic acid, 13-(Z)- (1TMS)	3	831	Fatty Acyls
532	Erythronic acid (4TMS)	16	665	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2127	Estrone, 16alpha-hydroxy- (1MEOX) (2TMS) BP	3	793	Steroids and steroid derivatives
581	Ethanol, 2-(4-hydroxyphenyl)- (2TMS)	5	814	Benzene and substituted derivatives
878	Farnesol (1TMS) BP2	17	639	Prenol lipids
1108	Fructose (1MEOX) (5TMS) BP	3	995	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
843	Fucose (1MEOX) (4TMS) BP	3	958	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1377	Galactaric acid (6TMS)	4	700	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1228	Galactitol (6TMS)	7	893	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1411	Galactosamine, N-acetyl- (1MEOX) (5TMS) MP	18	671	Carbohydrates derivate
1176	Galactose	3	867	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2110	Gentiobiose (1MEOX) (8TMS) MP	4	901	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1236	Glucaric acid-1,4-lactone (4TMS)	3	956	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1323	Gluconic acid (6TMS)	13	759	Carbohydrates and carbohydrate conjugates

1177	Glucose (1MEOX) (5TMS) BP	5	746	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1712	Glucose-6-phosphate, 2-amino-2-deoxy- (1MEOX) (6TMS) BP	3	951	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1197	Glucuronic acid-3,6-lactone (1MEOX) (3TMS) BP	9	677	Furofurans
613	Glutamine [-H2O] (3TMS) MP	6	645	Carboxylic acids and derivatives
960	Glyceric acid-3-phosphate (4TMS)	8	839	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
370	Glycinamide (2TMS) BP2	5	825	Amino acid derivate
1429	Glycylglycylglycine [-H2O] (3TMS)	3	752	Carboxylic acids and derivatives
2065	Guanosine, 2'-deoxy- (5TMS)	3	708	Purine nucleosides
773	Heptadecane, n-	4	652	Alkanes
1894	Hexacosane, n-	4	855	Alkanes
733	Hexanedioic acid, hydroxy- (3TMS)	6	662	Fatty Acyls
1427	Hippuric acid, 2-hydroxy- (2TMS)	3	947	Benzene and substituted derivatives
637	Histamine (2TMS)	3	789	Amines
1310	Homoserine, O-succinyl- (2TMS)	3	827	Amino acid derivate
687	Imidazole-4-acetic acid (2TMS)	9	781	Azoles
1231	Indole-3-acetic acid, 1H- (1TMS)	4	888	Indoles and derivatives
1144	Inositol, allo- (6TMS)	7	616	Alcohols and polyols
2145	Isomaltose (1MEOX) (8TMS) MP	21	780	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
122	Isovaleric acid, 2-oxo- (1MEOX) (1TMS) BP	8	802	Keto acids and derivatives
251	Itaconic acid (2TMS)	6	742	Fatty Acyls
1026	Jasmonic acid (1MEOX) (1TMS)	5	696	Lineolic acids and derivatives
2472	Kestose, 1- (11TMS)	5	757	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
328	Lactic acid dimer (2TMS)	3	718	Carboxylic acids and derivatives
2085	Lactobionic acid (TMS) MP	11	756	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1920	Lactose	4	862	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2050	Lactulose	15	802	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
277	Malic-acid	7	860	Fatty Acyls
2116	Maltitol (9TMS)	11	891	Fatty Acyls
2540	Maltotriose	3	609	Carbohydrates and carbohydrate conjugates

2546	Maltotriose	10	669	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1452	Mannosamine, N-acetyl- (1MEOX) (5TMS) BP	11	702	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2392	Melezitose	3	912	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2187	Melibiose	20	820	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2147	Melibiose (1MEOX) (8TMS) MP	7	935	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
147	NA	4	654	Unknown
294	NA	3	754	Unknown
310	NA	5	682	Unknown
329	NA	6	756	Unknown
331	NA	6	792	Unknown
392	NA	7	691	Unknown
570	NA	7	670	Unknown
574	NA	4	754	Unknown
611	NA	5	783	Unknown
698	NA	3	776	Unknown
704	NA	6	682	Unknown
755	NA	20	823	Unknown
906	NA	4	824	Unknown
930	NA	13	602	Unknown
966	NA	10	738	Unknown
978	NA	7	796	Unknown
1094	NA	8	610	Unknown
1201	NA	17	614	Unknown
1213	NA	6	626	Unknown
1309	NA	6	912	Unknown
1365	NA	3	977	Unknown
1381	NA	4	863	Unknown
1384	NA	9	661	Unknown
1628	NA	19	630	Unknown
1669	NA	14	626	Unknown

1695	NA	13	618	Unknown
1697	NA	18	709	Unknown
1703	NA	3	661	Unknown
1706	NA	17	740	Unknown
1717	NA	15	780	Unknown
1744	NA	12	800	Unknown
1759	NA	21	629	Unknown
1808	NA	15	802	Unknown
1811	NA	13	698	Unknown
1836	NA	3	889	Unknown
1854	NA	13	770	Unknown
1855	NA	8	826	Unknown
1882	NA	3	758	Unknown
1936	NA	18	675	Unknown
1974	NA	20	604	Unknown
2068	NA	19	618	Unknown
2099	NA	6	805	Unknown
2107	NA	3	697	Unknown
2119	NA	3	716	Unknown
2122	NA	18	714	Unknown
2158	NA	7	815	Unknown
2206	NA	12	815	Unknown
2216	NA	9	655	Unknown
2252	NA	15	652	Unknown
2272	NA	4	885	Unknown
2287	NA	5	802	Unknown
2289	NA	10	746	Unknown
2315	NA	11	726	Unknown
2349	NA	10	768	Unknown
2352	NA	3	966	Unknown

2402	NA	4	659	Unknown
2421	NA	4	789	Unknown
2423	NA	5	708	Unknown
2424	NA	7	694	Unknown
2491	NA	3	930	Unknown
2522	NA	3	688	Unknown
2568	NA	4	714	Unknown
66	NA114008	6	678	Unknown
67	NA114009	3	998	Unknown
172	NA127015	7	660	Unknown
384	NA144018 (classified unknown)	12	748	Unknown
432	NA147011 (classified unknown)	10	688	Unknown
502	NA151024	13	620	Unknown
571	NA157004	3	807	Unknown
742	NA168015 (classified unknown)	17	743	Unknown
751	NA168027	4	858	Unknown
819	NA173015	12	790	Unknown
861	NA176001 (classified unknown)	14	692	Unknown
943	NA180004	3	829	Unknown
958	NA181001	7	641	Unknown
1087	NA186027	7	699	Unknown
1284	NA196028 (classified unknown)	11	634	Unknown
1290	NA197007	3	910	Unknown
1319	NA199017	4	704	Unknown
1961	NA269016	8	660	Unknown
1437	N-Acetylmannosamine	5	750	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
588	Nicotinic acid, 6-hydroxy- (2TMS)	8	711	Pyridines and derivatives
2031	Nigerose, D- (1MEOX) (8TMS)	19	741	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1775	Nivalenol (4TMS)	14	806	Prenol lipids
1469	Normetadrenaline (4TMS)	3	615	Benzene and substituted derivatives

1626	Octadecanoic acid (1TMS)	14	823	Fatty Acyls
1379	Ornithine (5TMS)	3	605	Carboxylic acids and derivatives
722	Oxaloacetate (1MEOX) (3TMS) MP	15	628	Keto acids and derivatives
2129	Palatinose (1MEOX) (8TMS)	9	798	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1357	Phenoxyacetic acid, 4-hydroxymethyl-3-methoxy- (2TMS)	3	771	Carboxylic acids and derivatives
602	Phosphoenolpyruvic acid (3TMS)	3	705	Organic phosphoric acids and derivatives
2259	Pregn-4-ene-20alpha-ol-3-one (1MEOX) (1TMS) MP	6	859	Steroids and steroid derivatives
2215	Pregnane-3,20-dione, 5alpha-allo- (2MEOX) MP	9	663	Steroids and steroid derivatives
1441	Prephenic acid (1MEOX) (3TMS)	4	855	Carboxylic acids and derivatives
598	Proline [+CO2] (2TMS)	3	937	Carboxylic acids and derivatives
236	Propane-1,3-diol, 2-hydroxymethyl- (3TMS)	19	610	Alcohol
1077	Propanoic acid, 3-amino-3-(4-hydroxyphenyl)- (2TMS)	6	601	Carboxylic acids and derivatives
93	Pyridine, 4-hydroxy- (1TMS)	8	956	Pyridines and derivatives
2368	Quinic acid, 5-caffeoyl-, trans- (6TMS)	8	733	Unknown
731	Ribose (1MEOX) (4TMS) MP	5	829	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
2298	RL3	19	736	Unknown
1874	Salicylaldehyde-beta-D-glucopyranoside (1MEOX) (4TMS) MP	3	735	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
575	similar to Asparagine Derivate	4	882	Carboxylic acids and derivatives
723	similar to NA (Ribulose like)	3	972	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
1801	Spermidine [+CO2] (5TMS)	20	696	Unknown
2250	Spermine [+CO2] (6TMS)	4	697	Amines
2489	Sphingosine, O-1-beta-galactosyl- (6TMS)	5	699	Sphingolipids
97	Succinic semialdehyde (1MEOX) (1TMS) MP	3	902	Fatty Acyls
1244	Swainsonine (3TMS)	3	980	Indolizidine
968	Synephrine (3TMS)	10	602	Benzene and substituted derivatives
319	Tartronic acid (3TMS)	4	726	Hydroxy acids and derivatives
274	Thiazole, 4-methyl-5-hydroxyethyl- (1TMS)	3	998	Azoles
217	Threonine (2TMS)	17	605	Fatty Acyls
182	Threonine, allo- (2TMS)	18	601	Fatty Acyls
1763	Thymidine (2TMS)	16	721	Pyrimidine nucleosides

439	Thymine, 5,6-dihydro- (1TMS)	9	624	Diazines
2017	Trehalose, alpha,beta- (8TMS)	20	731	Carbohydrates and carbohydrate conjugates
741	Tridecan-1-ol, n- (1TMS)	4	686	Fatty Acyls
603	Tropic acid (2TMS)	4	800	Carboxylic acids and derivatives
1540	Tryptamine, 1-methyl- (2TMS)	12	668	Indoles and derivatives
1792	Tryptamine, 5-methoxy- (2TMS) MP	17	648	Indoles and derivatives
690	Unknown#bth-pae-002	5	720	Unknown
140	Unknown#bth-pae-016	3	611	Unknown
607	Unknown#bth-pae-040	10	703	Unknown
710	Unknown#bth-pae-047	3	908	Unknown
691	Unknown#sst-cgl-044	8	695	Unknown
1587	Unknown#sst-cgl-102	3	732	Unknown
1646	Unknown#sst-cgl-A16	4	695	Unknown
94	Valeric acid, 2-oxo- (1MEOX) (1TMS) MP	4	677	Keto acids and derivatives
189	Valero-1,5-lactam (1TMS)	5	801	Piperidines
1074	Viburnitol (5TMS)	3	714	Alcohols and polyols
1929	Xanthosine (5TMS)	3	854	Purine nucleosides
682	Xylose (1MEOX) (4TMS) MP	17	633	Carbohydrates and carbohydrate conjugates