

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

Interação entre leveduras e bactérias lácticas no contexto da fermentação
alcoólica brasileira: fisiologia, proteômica e metabolômica

Mariane Soares Raposo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciência. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2023

Mariane Soares Raposo
Tecnóloga em Biocombustíveis

Interação entre leveduras e bactérias lácticas no contexto da fermentação alcoólica brasileira:
fisiologia, proteômica e metabolômica
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador: Prof. Dr. **THIAGO OLITTA BASSO**
Coorientador: Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciência. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2023

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

Raposo, Mariane Soares

Interação entre leveduras e bactérias lácticas no contexto da fermentação alcoólica brasileira: fisiologia, proteômica e metabolômica / Mariane Soares Raposo. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

122 p.

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

1. Fermentação alcoólica 2. Bioetanol 3. Bactérias lácticas 4. Proteômica 6. Metabolômica I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador Prof. Dr. Thiago Olitta Basso e Coorientador Prof. Dr. Carlos Alberto Labate pela oportunidade e ensinamentos concedidos durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do laboratório Max Feffer, do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas (ESALQ-USP), por compartilharem seus conhecimentos e algumas horas no café. Em especial, agradeço à Thaís Cataldi e Monica Labate pelo suporte nas análises de metabômica e proteômica e a amiga Eloísa pela amizade e conselhos.

Às colegas Mariana e Thamiris, do laboratório da Engenharia de Bioprocessos, do Departamento de Engenharia Química (POLI-USP), pelo carinho e suporte nas análises de HPLC.

À minha mãe Arlete, meus irmãos Anderson, Maristela e Gabriel e cunhada Daniele pelo suporte que sempre me concederam. Em especial, agradeço ao meu amigo Bê por trazer mais amor para nossa família.

À minha família de Piracicaba Carolina, Lethicia, Luisa, Marcelle, Mariana, Letícia, Renata e Vanessa, responsáveis por tornarem essa caminhada mais leve.

Aos demais amigos de Piracicaba que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ/USP;

À agência CNPq pela bolsa concedida durante o período do doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
Referências.....	14
2 FISIOLOGIA DE BACTÉRIAS LÁTICAS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA BRASILEIRA.....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	17
2.1 Introdução.....	18
2.2 Materiais e Métodos.....	20
2.2.1 Melaço de cana industrial (IM) e Melaço sintético (SM).....	20
2.2.2 Linhagens de bactérias lácticas e levedura.....	20
2.2.3 Propagação dos microrganismos.....	21
2.2.4 Cinética de crescimento em microplaca em meios IM e SM.....	21
2.2.5 Cinética de consumo e produção de metabólitos de bactérias lácticas em batelada alimentada - IM.....	22
2.2.6 Ensaio fermentativo.....	22
2.2.6.3 Fermentação “em etapas”	24
2.2.7 Parâmetros microbiológicos: Microscopia óptica e plaqueamento por gotas.....	25
2.2.8 Parâmetros físico-químicos: Análise de vinho de levedurado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e pHmetro.	26
2.2.9 Análise estatística.....	26
2.3 Resultados.....	26
2.3.1 Cinética de crescimento de bactérias lácticas em melaço de cana (IM).....	26
2.3.2 Cinética consumo e produção de metabólitos de bactérias lácticas – IM.....	28
2.3.3 Melaço sintético (SM) sem suplementação de peptona como substrato de fermentação.....	31
2.3.3.2 Utilização de SM em fermentação alcoólica de levedura na ausência da suplementação de peptona.....	33
2.3.4 Comparação entre cultura pura de bactérias lácticas e cocultivo com levedura em IM.....	36
2.3.5 Interação com baixa disponibilidade de nutrientes em SM.....	39

2.3.6	Metabólitos presentes na fermentação alcoólica como substrato para BAL.....	41
2.4	Discussão.....	43
	Referências.....	45
	Tabela Suplementar.....	50
3	PROTEÔMICA E METABOLÔMICA INTRACELULAR DE LEVEDURA PARA ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BACTÉRIAS LÁTICAS DURANTE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	51
	Resumo.....	51
	Abstract.....	51
3.1	Introdução.....	52
3.2	Materiais e Métodos.....	54
3.2.1	Material biológico.....	54
3.2.2	Propagação.....	54
3.2.3	Fermentação.....	55
3.2.4	Parâmetros microbiológicos.....	56
3.2.5	Análise de vinho de levedurado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	57
3.2.6	Protônica intracelular.....	57
3.2.7	Metabolômica intracelular.....	59
3.2.8	Análise de dados.....	60
3.3	Resultados.....	61
3.3.1	Parâmetros fermentativos.....	61
3.3.2	Proteômica intracelular de levedura.....	68
3.3.3	Metabolômica intracelular.....	77
3.4	Discussão.....	83
	Referências.....	86
	Tabelas Suplementares.....	91
	ANEXO.....	113

RESUMO

Interação entre leveduras e bactérias lácticas no contexto da fermentação alcoólica brasileira: fisiologia, proteômica e metabolômica

O bioetanol consiste em um dos principais combustíveis líquidos utilizados no Brasil e se destaca por ser renovável e alternativo para aqueles de origem fóssil. Devido às características da indústria, a etapa de fermentação alcoólica fica susceptível à presença de microrganismos contaminantes, entre eles, o grupo das bactérias lácticas (BAL) com perfil metabólico homofermentativo obrigatório, heterofermentativo obrigatório e homofermentativo facultativo são as mais abundantes. Durante a coexistência entre levedura e bactérias lácticas, ocorre constante interação, comprometendo o rendimento de produção da indústria. As técnicas de proteômica e metabolômica não alvo têm sido importantes ferramentas para estudo da interação entre leveduras e bactérias lácticas, permitindo a identificação de mecanismos de regulação de vias, respostas a estresse, biossíntese de moléculas, entre outros. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo a compreensão da interação entre leveduras e bactérias lácticas homo e heterofermentativas no contexto da fermentação alcoólica brasileira para produção de bioetanol. Para isso, o estudo detalhado da fisiologia das bactérias quando na presença da levedura e em substrato composto de melão de cana foi realizado. Para identificar em mais detalhes os efeitos dos contaminantes, foram empregadas as técnicas de proteômica e metabolômica intracelular não alvo de levedura. Os resultados obtidos mostram que bactérias lácticas apresentam crescimento e produção de ácido láctico em melão de cana-de-açúcar, entretanto, na presença da levedura, ocorre redução de ambos os parâmetros. Isso indica ser a competição por nutrientes e produção de metabólitos com ação inibidora importantes mecanismos de interação entre esses microrganismos. Além disso, foi observado que o proteoma e metaboloma da levedura apresenta regulação quando bactérias lácticas estão presentes na fermentação. A bactéria homofermentativa mostrou ser capaz de regular a produção de glicerol da levedura, devido ao aumento da abundância da proteína Dak1 (Dihidroxiacetona quinase), responsável por metabolizar a dihidroxiacetona em dihidroxiacetona fosfato. Além disso, proteínas e metabólitos da via das pentoses mostraram regulação como resposta a presença das bactérias lácticas, possivelmente para manter o balanço redox celular e produção de nutrientes como resposta ao esgotamento do substrato.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica, Bioetanol, Bactérias lácticas, Proteômica, Metabolômica

Abstract

Interaction between yeasts and lactic acid bacteria in the context of Brazilian alcoholic fermentation: physiology, proteomics and metabolomics

Bioethanol is one of the main liquid fuels used in Brazil and stands out for being renewable and alternative to those of fossil origin. Due to the characteristics of the industry, the alcoholic fermentation stage is susceptible to the presence of contaminating microorganisms, among them, the lactic acid bacteria group (LAB) with an obligatory homofermentative, obligatory heterofermentative and facultative homofermentative metabolic profile. During the coexistence between yeast and lactic acid bacteria, constant interaction occurs, compromising the production yield of the industry. Proteomics and non-target metabolomics techniques have been important tools for studying the interaction between yeast and lactic acid bacteria, allowing the identification of pathway regulation mechanisms, stress responses, biosynthesis of molecules, among others. Therefore, the present study aimed to understand the interaction between yeasts and homo and heterofermentative lactic acid bacteria in the context of Brazilian alcoholic fermentation to produce bioethanol. For this, a detailed study of the physiology of bacteria when in the presence of yeast and in a substrate composed of sugarcane molasses was carried out. In order to identify in more detail, the effects of the contaminants, non-target yeast intracellular proteomics and metabolomics techniques were employed. The results obtained show that lactic acid bacteria present growth and lactic acid production in sugarcane molasses, however, in the presence of yeast, there is a reduction of both parameters. This indicates that competition for nutrients and production of metabolites with inhibitory action are important interaction mechanisms between these microorganisms. Furthermore, it was observed that the yeast proteome and metabolome are regulated when lactic acid bacteria are present in fermentation. The homofermentative bacteria showed to be capable of regulating the production of glycerol in the yeast, due to the increase in the abundance of the Dak1 protein (Dihydroxyacetone kinase), responsible for metabolizing dihydroxyketone into dihydroxyacetone phosphate. Furthermore, proteins and metabolites of the pentose pathway showed regulation in response to the presence of lactic acid bacteria, possibly to maintain cellular redox balance and nutrient production in response to substrate depletion.

Keywords: Alcoholic fermentation, Bioethanol, Lactic acid bacteria, Proteomics, Metabolomics

1. INTRODUÇÃO

O bioetanol consiste em um dos principais combustíveis líquidos utilizados no Brasil e se destaca por ser renovável e alternativo para aqueles de origem fóssil (MOHD AZHAR et al., 2017). O país é o segundo maior produtor e o primeiro entre os países que utilizam a cana-de-açúcar como matéria-prima. Na safra de 2021/2022 foram produzidos em torno de 27,55 bilhões de litros entre etanol anidro e hidratado (UNICA, 2022).

Para obtenção do álcool etílico, as destilarias brasileiras realizam a fermentação de carboidratos advindos em sua maioria, do caldo extraído da cana-de-açúcar e do melaço proveniente da indústria de açúcar refinado (ALI et al., 2019; LOPES et al., 2016). Nessa etapa do processo, utiliza-se cepas selecionadas de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que apresentam alta eficiência na conversão de carboidratos a etanol, além de persistência e dominância no processo (BASSO et al., 2008).

Devido as características da indústria, como o grande volume processado (LOPES et al., 2016) e a qualidade da matéria-prima (SOLOMON, 2009), o processo fica susceptível a inevitável presença de contaminantes bacterianos, ocasionando na queda de produção. O processo de fermentação Melle-Boinot é amplamente utilizado em usinas de bioetanol no Brasil e consiste na lavagem da biomassa de levedura utilizando ácido sulfúrico com a finalidade de reduzir a população de bactérias durante toda a safra de cana de açúcar, com duração em torno de 245 dias (BOINOT, 1937; GODOY et al., 2008; LOPES et al., 2016).

A maior parte das usinas brasileiras utilizam o processo de batelada alimentada, no qual a fermentação é conduzida em apenas um tanque e com entrada de mosto (substrato contendo açúcares) ao longo da fermentação, que pode durar em torno de 6 a 11 horas (Figura 1). Ao final de cada fermentação, a biomassa úmida é recuperada por centrifugação e destinada ao tratamento, podendo ser utilizada no próximo processo fermentativo (GODOY et al., 2008). Apesar do tratamento ácido eliminar parte dos contaminantes, somente a sua utilização não é suficiente em altas infecções (valores superiores a 10^7 UFC.ml⁻¹) (LOPES et al., 2016), sendo necessária a intervenção com substâncias químicas, como antibióticos, dióxido de cloro e extrato vegetal que apresentam ação antibacteriana (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011)(GALLO, 1990; LOPES et al., 2016).

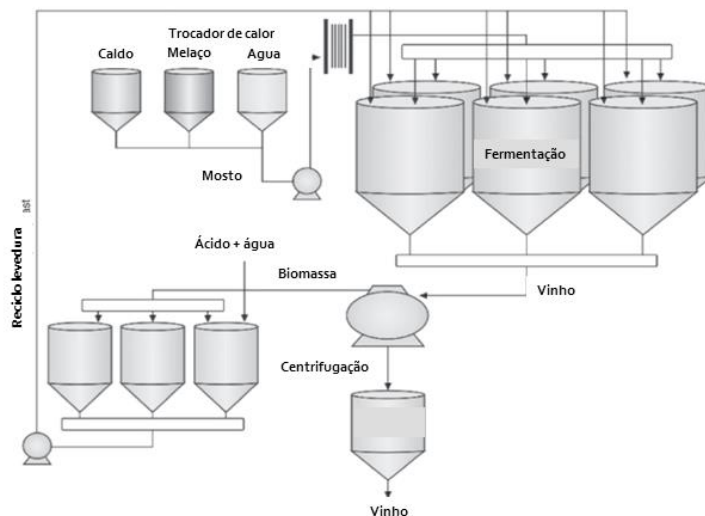


Figura 1. Processo em batelada alimentada com reciclo celular da fermentação alcoólica no Brasil. Adaptado e traduzido de Lopes et al. (2016).

A diversidade de microrganismo das dornas de fermentação tem sido estudada a fim de conhecer os principais contaminantes. O grupo das bactérias lácticas (BAL) é relatado com principal, dando destaque para as espécies *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, entre outros (BONATELLI et al., 2017; LUCENA et al., 2010; SENNE DE OLIVEIRA LINO et al., 2021).

Espécies deste grupo são classificadas como homofermentativa obrigatória, heterofermentativa obrigatória e homofermentativa facultativa. (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2016). Bactérias homofermentativas obrigatórias são caracterizadas por utilizarem a via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para produção de piruvato, a ser convertido a ácido láctico pela enzima lactato desidrogenase. Bactérias com esse perfil apresentam rendimento de 2 moles de ATP (Adenosina trifosfato) a partir da fosforilação ao nível de substrato. Bactérias homofermentativas facultativas utilizam a via EMP, porém quando em aerobiose e condições limitantes de glicose, realizam a produção de acetato, etanol e CO₂ (MOZZI et al., 2010) (Figura 2). Em processos que mimetizam a fermentação em laboratório, bactérias com metabolismo facultativo são relatadas produzindo somente ácido láctico (BASSO et al., 2014; COSTA et al., 2008).

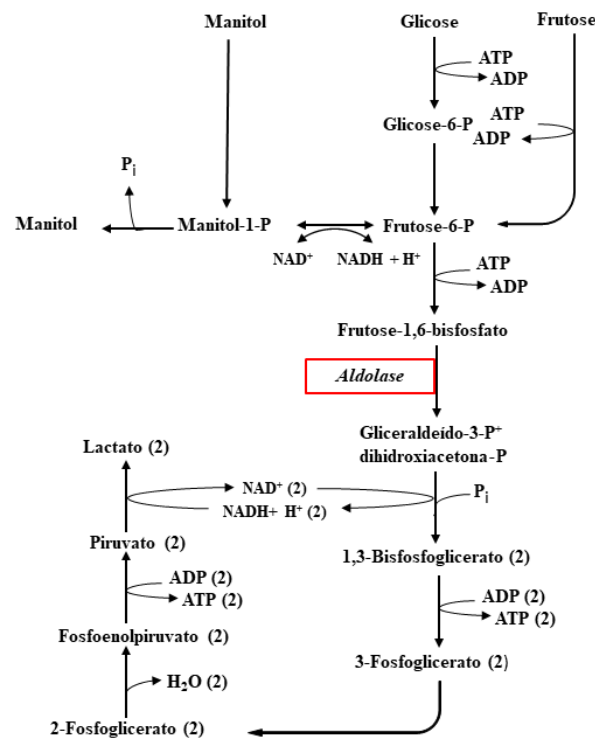


Figura 2. Via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) utilizada por bactérias lácticas homofermentativas. Adaptado. (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2016; KANDLER, 1983; WISSELINK et al., 2002).

As bactérias heterofermentativas obrigatórias utilizam a via fosfoctolase (PKP) para metabolizar açúcares a lactato, alternando a produção entre etanol e acetato. Nesta via também ocorre produção de CO_2 pela degradação do 6-P-gluconato. A enzima D-xilulose-5P fosfatoquetolase é responsável por catalisar a reação de xilulose-5P em gliceraldeído fosfato e acetil-fosfato, produzindo lactato e acetato/etanol respectivamente. Para manter o balanço redox durante a oxidação da glicose, a frutose é utilizada como aceptor de elétrons reduzindo a manitol. Este perfil metabólico apresenta como rendimento 1 mol de ATP por mol de glicose metabolizada. Quando produzem acetato ao invés de etanol, produzem 1 molécula de ATP a mais (MOZZI et al., 2010) (Figura 3).

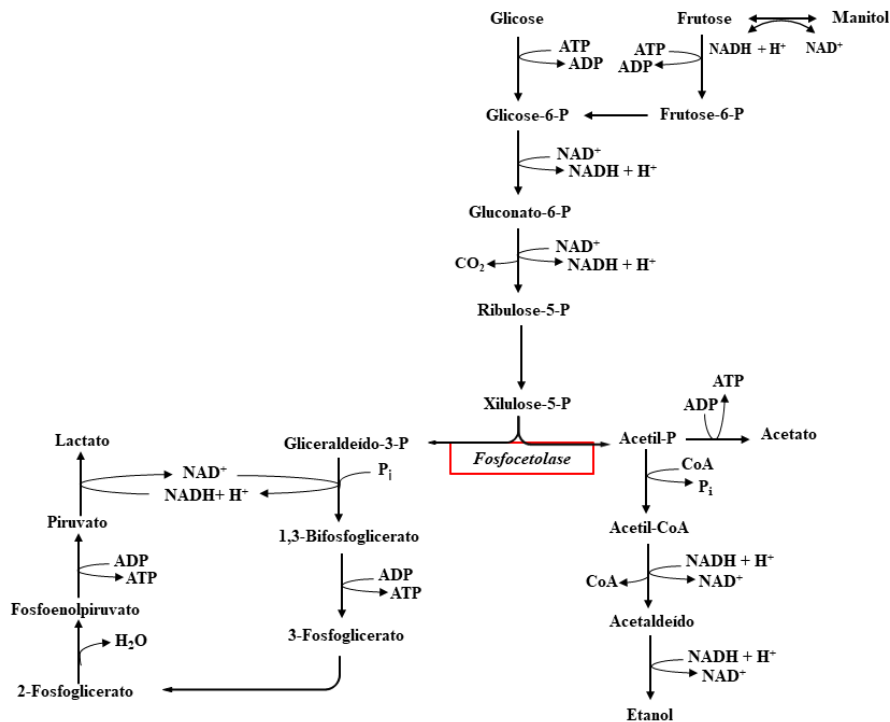


Figura 3. Via Fosfocetolase (PKP) utilizada por bactérias lácticas heterofermentativas obrigatórias e homofermentativas facultativas. Adaptado. (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2016; KANDLER, 1983; WISSELINK et al., 2002).

Em decorrência da interação entre leveduras e bactérias lácticas contaminantes na fermentação alcoólica, o rendimento de produção da indústria pode apresentar redução em até 3%, quando a população de contaminantes atinge concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ (AMORIM et al., 2011; LOPES et al., 2016). A interação desses organismos tem sido estudada com o objetivo de identificar os fatores responsáveis por afetar a fermentação (COLLOGRAI et al., 2021; REIS et al., 2018). A produção do ácido láctico e acético por bactérias lácticas foi relatado como responsável por acidificar o vinho (produto da fermentação), como também o citoplasma celular da levedura. Isso ocorre devido à entrada dos ácidos no meio intracelular, que ao sofrerem dissociação, liberam íons H⁺. Ao ser acumulado no citoplasma, a viabilidade de células de levedura é comprometida (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011; SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005).

Outro fator importante a ser levado em consideração é a competição por nutrientes presentes no meio (BAYROCK; INGLEDEW, 2004). BAL são organismos fastidiosos e por este motivo estão em constante competição com a levedura por nutrientes (PONOMAROVA et al., 2017). Dessa forma, durante a fermentação, os metabólitos a serem utilizados pela levedura ficam limitados, reduzindo a viabilidade, metabolismo e multiplicação celular. (BAYROCK; INGLEDEW, 2004).

Além disso, as bactérias apresentam efeitos distintos na levedura de acordo com seu perfil metabólico. Basso e colaboradores (2014) identificaram ao simular a fermentação industrial, que bactéria com perfil heterofermentativo foi responsável pela queda de rendimento em decorrência do desvio de fonte de carbono para produção de metabólitos, como o manitol e ácidos orgânicos, além de promover aumento de glicerol por parte da levedura. Já as bactérias homofermentativas foram responsáveis por reduzir a viabilidade celular devido a maior concentração de ácido lático produzido.

Para ampliar os conhecimentos acerca da interação entre leveduras e bactérias lácticas e seus efeitos no rendimento de fermentação, as técnicas de proteômica e metabolômica têm sido utilizadas. De forma específica, a proteômica possibilita o estudo da expressão, função e modificação de proteínas em determinado estágio celular ou em resposta a estímulos externos (ASLAM et al., 2017). Já a metabolômica permite identificar alterações no perfil metabólico, complementando as informações obtidas com a proteômica (BAKER, 2011; PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). A identificação global de proteínas e metabólitos permite obter informações sobre regulação de vias, respostas a estresse, biossíntese de moléculas, entre outros (NYHOLM et al., 2020). O estudo do proteoma e metaboloma tem possibilitado a identificação de mecanismos de interação, como foi relatado por PONOMAROVA et al. (2017), que identificaram o beneficiamento por parte das leveduras para o crescimento de bactérias lácticas durante cocultivo.

O estudo de moléculas diferencialmente produzidas entre levedura-bactéria apresenta potencial de ir além da compreensão de mecanismos envolvidos na interação, mas também na identificação de componentes importantes a serem futuramente estudados, visando o controle e/ou eliminação de bactérias contaminantes indesejáveis durante a fermentação alcoólica. (BRAGA; DOURADO; ARAÚJO, 2016).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo a compreensão da interação entre leveduras e bactérias lácticas homo e heterofermentativa no contexto da fermentação alcoólica brasileira para produção de bioetanol. Para isso, o estudo detalhado da fisiologia das bactérias quando na presença da levedura e em substrato composto de melão de cana foi realizado a fim de verificar se ocorre o beneficiamento dos contaminantes no processo. Para identificar em mais detalhes os efeitos dos contaminantes quando presentes na fermentação, foram empregadas as técnicas de proteômica e metabolômica intracelular não alvo de levedura, para estudo de alterações na produção de proteínas e regulações de vias quando bactérias lácticas homo- e heterofermentativas estão presentes.

Referências

- ALI, S. E. et al. Profiling Metabolites and Biological Activities of Sugarcane (*Saccharum officinarum* Linn.) Juice and its Product Molasses via a Multiplex Metabolomics Approach. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 934, 2019.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.
- ASLAM, B. et al. Proteomics: Technologies and Their Applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 2, p. 182–196, 1 fev. 2017.
- BAKER, M. Metabolomics: from small molecules to big ideas. **Nature Methods**, v. 8, n. 2, p. 117–121, 28 fev. 2011.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 1 nov. 2008.
- BASSO, T. O. et al. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 169–177, 2014.
- BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: Nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.
- BECHTNER, J. et al. Proteomic Analysis of *Lactobacillus nagelii* in the Presence of *Saccharomyces cerevisiae* Isolated From Water Kefir and Comparison With *Lactobacillus hordei*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 325, 2019.
- BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.
- BOINOT, F. **Process for carrying out industrial alcoholic fermentations. United States Patent Office.** Melle, 1937.
- BONATELLI, M. L. et al. Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 17, 15 set. 2017.
- BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W. L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 86–98, 1 dez. 2016.
- COLLOGRAI, K. C. et al. Secretome analysis as a tool to elucidate bacterial contamination influence during second-generation ethanol production in a Melle-Boinot process. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 3, 1 maio 2021.
- COSTA, V. M. et al. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido lático por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 503–509, abr. 2008.
- DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. *Lactobacillus* SPP.: General Characteristics. **Reference Module in Food Science**, n. September, 2016.
- GALLO, C. R. **Determinação de microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 1990.
- GODOY, A. et al. Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. v. 110, n. 1311, p. 175–181, mar. 2008.
- KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 49, n. 3, p. 209–224, 1983.

- LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 47 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 64–76, dez. 2016.
- LUCENA, B. T. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.
- MOHD AZHAR, S. H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 10, p. 52–61, jul. 2017.
- MOZZI, F. et al. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: FERNANDA MOZZI, RAÚL R. RAYA, AND G. M. V. (Ed.). . **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. 2. ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2010. v. 1p. 33.
- MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 3, p. 351–370, 1 jun. 2011.
- NYHOLM, L. et al. Holo-Omics: Integrated Host-Microbiota Multi-omics for Basic and Applied Biological Research. **iScience**, v. 23, n. 8, 21 ago. 2020.
- PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 263–269, 22 abr. 2012.
- PONOMAROVA, O. et al. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. **Cell Systems**, v. 5, n. 4, p. 345- 357.e6, 2017.
- RAPOSO, M. S. **Metabólitos excretados na fermentação alcoólica como possíveis substratos para o crescimento do gênero Lactobacillus**. [s.l.] Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, jul. 2018.
- REIS, V. R. et al. Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 23, 16 fev. 2018.
- SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1–3, p. 70–78, 1 jan. 2005.
- SENNE DE OLIVEIRA LINO, F. et al. Complex yeast–bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. **Nature Communications 2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 8 mar. 2021.
- SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 11, n. 2, p. 109–123, 2009.
- UNICA. **Safra 2021/2022 processa 523 milhões de toneladas de cana - UNICA**. Disponível em: <<https://unica.com.br/noticias/safra-2021-2022-processa-523-milhoes-de-toneladas-de-cana/>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- WISSELINK, H. W. et al. Mannitol production by lactic acid bacteria : A review. v. 6946, n. October 2016, p. 151–161, 2002.

2 FISILOGIA DE BACTÉRIAS LÁTICAS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA BRASILEIRA

Resumo

As bactérias lácticas (BAL) com perfil metabólico homo e heterofermentativo são amplamente estudadas devido a sua importância em processos biotecnológicos, e na indústria de bioetanol são consideradas contaminante. Apesar de apresentarem tolerância a ampla faixa de pH, altas concentrações de etanol e elevadas temperaturas, as BAL são fastidiosas e tem seu crescimento e metabolismo limitados quando em substrato deficiente de nutrientes e fatores de crescimento. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a influência de levedura PE-2 e do melaço de cana no crescimento e metabolismo de linhagens de bactérias lácticas da espécie *Lactiplantibacillus plantarum* e *Limosilactobacillus fermentum* com perfil homo-e heterofermentativo respectivamente. Com os resultados obtidos foi identificado que ambas as linhagens de bactérias em cultura pura são capazes de crescer e produzir ácido láctico em melaço de cana-de-açúcar. Ainda, foi observado que a levedura apresenta ação antagonista quando em cocultivo com bactérias lácticas, resultando na inibição de crescimento e metabolismo dos contaminantes, independente do contato célula-célula. Sendo assim, o presente estudo indica ser a competição por nutrientes e a produção de metabólitos com ação inibidora, fatores chave durante a interação entre bactérias lácticas e levedura no contexto da fermentação alcoólica das indústrias brasileiras de bioetanol.

Palavras-chave: Bactérias lácticas; Melaço de cana-de-açúcar; Fermentação alcoólica; Bioetanol

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) with a homo and heterofermentative metabolic profile are widely studied due to their importance in biotechnological processes, and in the bioethanol industry they are considered a contaminant. Despite being tolerant of a wide pH range, high ethanol concentrations and high temperatures, LAB are fastidious and have limited growth and metabolism when in a substrate deficient in nutrients and growth factors. Thus, the present study aimed to analyze the influence of PE-2 yeast and sugarcane molasses on the growth and metabolism of lactic bacteria strains of the species *Lactiplantibacillus plantarum* and *Limosilactobacillus fermentum* with homo and heterofermentative profile respectively. With the results obtained, it was identified that both strains of bacteria in pure culture can grow and produce lactic acid in sugar cane molasses. Furthermore, it was observed that yeast has an antagonistic action when co-cultivated with lactic acid bacteria, resulting in inhibition of growth and metabolism of contaminants, regardless of cell-cell contact. Therefore, the present study indicates that the competition for nutrients and the production of metabolites with inhibitory action are key factors during the interaction between lactic acid bacteria and yeast in the context of alcoholic fermentation in the Brazilian bioethanol industries.

Keywords: Lactic acid bacteria; Sugar cane molasses, Homofermentative; Heterofermentative; Alcoholic fermentation; Bioethanol

2.1 Introdução

O grupo das bactérias lácticas (BAL) corresponde aos microrganismos que compartilham semelhanças metabólicas e fisiológicas e tem o ácido láctico como principal metabólito produzido durante a fermentação de carboidratos. O gênero *Lactobacillus* pertencia ao grupo e abrangia mais de 250 espécies. No ano de 2020 foi proposta a alteração da taxonomia devido à heterogeneidade genotípica, fenotípica e ecológica das espécies. A alteração entrou em vigor no ano de 2022, distribuindo as espécies em 25 gêneros, sendo 23 novos (ZHENG et al., 2020). Entre as espécies reclassificadas, estão a anteriormente denominada “*Lactobacillus plantarum*”, passando a ser denominada *Lactiplantibacillus plantarum* e a espécie “*Lactobacillus fermentum*” classificada como *Limosilactobacillus fermentum*.

Tais espécies são categorizadas com relação à via utilizada para metabolizar açúcares. *L. plantarum* possui metabolismo homofermentativo facultativo e faz uso da via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). Nesta via ocorre a produção de piruvato a ser convertido a ácido láctico pela enzima lactato desidrogenase. Na via ocorre a utilização de 2 moles de ATP (Adenosina trifosfato) e produção de 4 moles de ATP, resultando em rendimento de 2 moles. Existem bactérias com perfil homofermentativo facultativo, produzindo além de ácido láctico, acetato ou etanol. Isso ocorre em condições de aerobiose e concentração limitante de glicose, (MOZZI et al., 2010). Já a espécie *L. fermentum* possui metabolismo heterofermentativo obrigatório e utiliza a via fosfoctolase (PKP) durante a fermentação, metabolizando os açúcares a lactato e etanol ou acetato. Nesta via também ocorre produção de CO₂ e manitol a partir da redução da frutose. Bactérias com esse perfil metabólico apresentam como rendimento 1 mol de ATP por mol de glicose metabolizada, pois consomem 1 mol de ATP (etapa de fosforilação da glicose) e produzem 2 moles de ATP por fosforilação ao nível de substrato. Quando produzem acetato ao invés de etanol, apresentam rendimento de 2 moles de ATP (MOZZI et al., 2010).

No processo de produção do bioetanol, as espécies foram identificadas dentre os principais contaminantes na etapa de fermentação alcoólica (BONATELLI et al., 2017; LINO, 2019; LUCENA et al., 2010) e estão relacionadas com a redução de rendimento de produção (BASSO et al., 2014; LOPES et al., 2016). Isso ocorre devido a constante interação entre os contaminantes e a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, responsável por realizar a metabolização de carboidratos a etanol. Dentre os fatores identificados estão a competição por nutrientes, produção de metabólitos com ação inibidora e a floculação celular da levedura (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011). A competição por nutrientes foi relatada como responsável por reduzir a presença de elementos traços no substrato fermentativo e causar inibição da levedura (BAYROCK; INGLEDEW, 2004). Apesar de apresentarem tolerância ao

ambiente fermentativo com alto teor alcoólico (7-11%), elevada temperatura e baixo pH (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011), espécies pertencentes ao grupo BAL são organismos fastidiosos e quando em substrato deficiente de aminoácidos e vitaminas, apresentam limitações de crescimento e metabolismo (JUTURU; WU, 2016). Apesar de apresentar vias completas para biossíntese de aminoácidos, espécies pertencentes ao grupo apresentam auxotrofia para arginina, glutamato, triptofano, isoleucina, leucina e valina, necessitando assim da suplementação de substrato durante crescimento (CORSETTI; CIARROCCHI; PRETE, 2016).

O agravante para a competição está no fato de que, o principal substrato utilizado na fermentação em usinas brasileiras é o melão de cana-de-açúcar, oriundo da produção de açúcar cristal e que apresenta baixa disponibilidade de nutrientes. Nele estão contidas a sacarose, glicose e frutose a serem metabolizadas a etanol. Também estão presentes ácidos orgânicos, ácido fenólico, flavonóides, compostos nitrogenados, ácidos graxos, esteróis entre outros. Apresenta cerca de 0,25 a 1,5 g.kg⁻¹ de nitrogênio (V. AMORIM; L.C. BASSO; M.L. LOPES, 2009) e os aminoácidos valina, alanina foram relatados em concentração de 0,87 e 1,67 µg.mg⁻¹ respectivamente (ALI et al., 2019). Bactérias lácticas foram estudadas utilizando o melão como substrato, seja para a produção de biomassa para indústria de probióticos ou para a produção de ácido láctico para indústria química. Em ambos os casos ocorreu a necessidade de suplementação do meio com fonte de nitrogênio devido à baixa disponibilidade (DUMBREPATIL et al., 2008; PAPIZADEH et al., 2020).

Em 2018 foi proposto por Lino e colaboradores (2018) o melão sintético (SM) com composição semelhante ao melão de cana industrial. O meio apresenta formulação semi-definida, pois em sua formulação contém fonte complexa de nutrientes proveniente da peptona. O uso do SM se faz interessante, pois possibilita mimetizar as condições da fermentação industrial com reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. Os autores destacam ainda sua utilização em estudos que tem como objetivo avaliar impactos nutricionais no metabolismo e na determinação de condições de crescimento de linhagens.

Durante a fermentação em cocultivo, as BAL foram relatadas como sendo beneficiadas em decorrência da produção de aminoácidos e nutrientes provenientes do metabolismo da levedura. Ponomarova e colaboradores (2015) realizaram um notável estudo, onde identificaram a ocorrência de “*cross-feeding*” entre levedura e a espécie *L. plantarum*. Os pesquisadores observaram que a levedura foi capaz de produzir e excretar aminoácidos de forma espontânea, e que seguidamente foram transportados ao meio intracelular de bactéria homofermentativa, promovendo seu crescimento.

Com isso, foi levantada a hipótese de que isto poderia ocorrer também no ambiente de fermentação alcoólica para produção de bioetanol, onde as bactérias contaminantes teriam disponíveis os fatores de crescimento provenientes do metabolismo da levedura e aqueles presentes no melão de cana-de-açúcar. Sendo assim, o presente estudo visou identificar os efeitos no crescimento e metabolismo de bactérias lácticas quando inoculadas em melão de cana, como também na presença da linhagem de levedura PE-2.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Melão de cana industrial (IM) e Melão sintético (SM)

O melão industrial (IM) de cana-de-açúcar com concentração de 58% de ART (Açúcares Redutores Totais) foi cedido por Usina localizada no Estado de São Paulo durante a safra de 2018/2019. O melão foi diluído em água ultrapura, submetido à centrifugação em 10.000 g, durante 10 minutos a 4 °C para retirada de impurezas. Posteriormente, foi realizada a esterilização durante 20 minutos, a 120 °C e 1atm.

A produção do melão sintético foi realizada conforme proposto por Lino et al. (2018) (Tabela suplementar 1). O meio foi utilizado com e sem adição de peptona, como forma de verificar a possível suplementação do meio durante metabolismo da levedura. No presente estudo, o melão sintético foi utilizado com e sem a suplementação de peptona, conforme apresentado na tabela suplementar 1. Para os açúcares, foi utilizada a mesma concentração apresentada no melão industrial.

2.2.2 Linhagens de bactérias lácticas e levedura

As linhagens de bactérias lácticas I4a (Homofermentativa – *Lactiplantibacillus plantarum*) e I3a (Heterofermentativa – *Limosilactobacillus fermentum*) foram isoladas de dorna de Usina do Estado de São Paulo, identificadas a nível de espécie e caracterizadas quanto ao perfil metabólico (RAPOSO, 2018). A linhagem de levedura PE-2 é comercializada e amplamente utilizada em usinas de bioetanol (BASSO et al., 2008).

Para preservação das bactérias foi utilizado o meio seletivo Man Rogosa & Sharpe Merck (MRS) (Peptona de caseína 10 g.L⁻¹; Extrato de carne 8,0 g.L⁻¹, extrato de levedura 4,0 g.L⁻¹; D(+)-glicose 20 g.L⁻¹; hidrogenofosfato dipotássico 2 g.L⁻¹; Tween 80 1 g.L⁻¹; hidrogênio citrato de diamônio 2 g.L⁻¹; acetato de sódio 5 g.L⁻¹; sulfato de magnésio 0,2 g.L⁻¹; sulfato de manganês 0,04 g.L⁻¹) (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).

A levedura foi armazenada em meio YPD Yeast extract – Peptone – Dextrose (YPD) (Extrato de levedura 10 g.L⁻¹; D-glicose 20 g.L⁻¹; Peptona 2 g.L⁻¹).

O armazenamento foi realizado em microtubo de 2 ml contendo 20 % de glicerol (concentração final) em ultra freezer com temperatura de -80 °C.

2.2.3 Propagação dos microrganismos

Bactérias lácticas: A propagação foi realizada em meio MRS líquido em condições estáticas, incubação a 32°C, durante 12 horas (DO 1,0 - final da fase log). A determinação da fase log foi feita a partir da análise em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. Após propagação, todo o volume de cultivo foi submetido a centrifugação durante 15 minutos, a 8.000 g e a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa ressuspendida em água ultrapura esterilizada para ser utilizada com inóculo.

Levedura: Foi utilizado o meio YPD para propagação, a qual teve duração de 16 horas sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C. O cultivo foi transferido por completo para mosto composto de IM cana, livre de sujidades, diluído para concentração de 10 % ART e esterilizado. Após 24 horas, transferiu-se todo o conteúdo para volume 10x maior. O procedimento foi realizando conforme a necessidade de biomassa. Ao final da propagação, todo o conteúdo foi centrifugado a 8.000 g, durante 15 minutos em 4 °C para obtenção de biomassa úmida (RAGHAVENDRAN et al., 2017).

2.2.4 Cinética de crescimento em microplaca em meios IM e SM

O crescimento dos microrganismos (bactérias e leveduras) foi conduzido em microplaca de 96 poços de fundo chato, incubada sem tampa e com filme selador, conduzido em leitor multifuncional de microplacas (Tecan, modelo Infinite M200) com acompanhamento periódico da densidade óptica a 600 nm. Para inóculo, foram utilizados 10 µL em 160 µL de substrato, obtendo DO entre 0,1 - 0,2. O crescimento foi realizado em MRS (controle), IM e SM com e sem peptona, todos com concentração de 2 % de ART. Para MRS, o açúcar presente foi a glicose e para os demais meios a concentração está dividida entre sacarose, glicose e frutose. Apesar de apresentar distinta fonte de carbono dos demais meios, o MRS foi empregado para identificar o crescimento das linhagens em condições nutricionais ideais. O crescimento foi monitorado durante 24 horas com temperatura de 32°C. Agitações orbitais foram realizadas durante os 5 minutos que antecederam cada leitura em 5 pontos distintos do poço. Os dados de média foram utilizados para determinar a densidade óptica de cada poço. A determinação da velocidade máxima específica μ_{\max} (h^{-1}) foi a partir do coeficiente angular da reta a partir da correlação \ln (DO) x tempo.

2.2.5 Cinética de consumo e produção de metabólitos de bactérias lácticas em batelada alimentada - IM

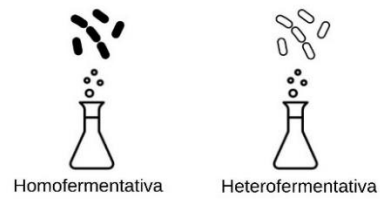
Para análise do consumo dos açúcares e produção de ácidos orgânicos, as linhagens homo-e heterofermentativa foram submetidas ao cultivo em cultura pura durante batelada alimentada com IM. O cultivo foi conduzido em tubo cônico de 50 ml com incubação estática a 32 °C. Para ambas as bactérias foram realizadas três repetições biológicas. A alimentação de mosto com concentração de 17 % ART foi conduzida a partir da adição em três porções iguais em volume de 9,33 ml nos tempos 0, 2 e 4 horas de fermentação, totalizando 28 ml de mosto adicionado. Foi utilizado inóculo com concentração final de 3×10^8 UFC.ml⁻¹, ressuspendido em 2 ml de água ultrapura. Sendo assim, o volume total de fermentação foi de 30 ml. Durante 8 horas de cultivo foram feitas amostragens com volume de 1ml a cada 2 horas em microtubo de 1,5 ml e imediatamente centrifugadas em 8.000 g, durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e armazenado em ultra freezer com temperatura de -80°C para posterior análise.

2.2.6 Ensaio fermentativos

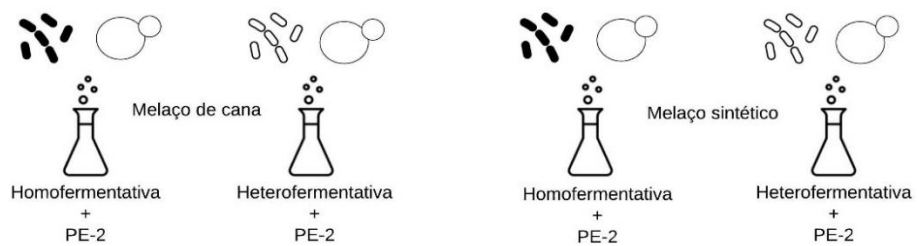
Os ensaios de fermentação a serem descritos neste item foram realizados em cultura pura de bactéria, cocultivo entre levedura e bactéria e “em etapas” (Figura 1). A fermentação em cultura pura de ambas as linhagens de bactérias foi realizada em batelada alimentada em melaço IM (fermentação 1, figura. 1). O cocultivo com a levedura foi realizado em meio IM e em SM na ausência de peptona (fermentação 2, figura. 1). Por último, foram realizadas fermentações denominadas de “em etapas”, com o objetivo de analisar o crescimento e metabolismo de bactérias na presença dos metabólitos produzidos pela levedura durante fermentação (fermentação 3, figura.1). Ao final de todos os experimentos, foram realizadas amostragens para análise de parâmetros microbiológicos e parâmetros físico-químicos descritos nos itens 2.2.7 e 2.2.8.

1- Cultura pura em Batelada alimentada

Melaço de cana



2- Cocultivo em Batelada Alimentada



3- Fermentação "em etapas"

3.1 - Batelada Alimentada

Melaço de cana



Centrifugação

Vinho
delevedurado

Cicloheximida
10ppm

3.2 - Batelada Mosto "pré-fermentado"

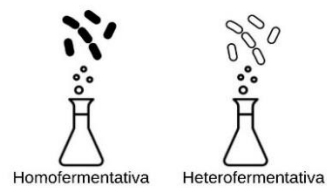


Figura 1. Ilustração de experimentos de fermentação. 1 – Fermentação em cultura pura; 2 – Cocultivo com levedura PE-2; 3 – Fermentação “em etapas”.

2.2.6.1 Cultura pura de BAL em IM durante regime de batelada alimentada

A fermentação em cultura pura (fermentação 1, figura 1) foi realizada conforme descrito no item 2.2.5, alterando o tempo de fermentação para 24 horas. A amostragem (1 ml) para parâmetros microbiológicos (**item 2.2.7**) foi realizada antes da centrifugação e para análise físico-química foi realizada a partir do vinho centrifugado (**item 2.2.8**) conforme já descrito.

2.2.6.2 Fermentação em cocultivo entre levedura e BAL em IM e SM mimetizando o processo industrial

2.2.6.2.1 Levedura em SM em regime de batelada alimentada

Antes de utilizar o meio SM em experimento de cocultivo, foi realizada a validação do meio SM sem peptona para a levedura. Para isso, a mimetização do processo de fermentação industrial em batelada alimentada foi realizada conforme Raghavendran e colaboradores (2017) com modificações. A fermentação foi conduzida em tubos cônicos de 50 ml em triplicata biológica e incubação estática de 32°C. O preparo de pé-de-cuba consistiu na utilização de biomassa úmida de levedura em 10 % (m.v⁻¹) (aproximadamente 4 g) em relação ao volume final de fermentação (40 ml). Para obtenção do volume final, além do mosto e biomassa, foram acrescidos 2 ml de vinho obtidos na propagação e 6 ml de água ultrapura esterilizada, simulando a eficiência da centrifugação da indústria. A alimentação do mosto foi realizada conforme descrito no item 2.2.5. A cada 1 hora de fermentação, os tubos foram pesados para analisar desprendimento de CO₂.

2.2.6.2.2 Cocultivo em IM e SM

A fermentação em cocultivo, tanto para IM quanto para SM foi realizada conforme descrito no item 2.2.6.2.1, alterando somente a adição de contaminante em concentração de 3x10⁸ UFC.ml⁻¹ (fermentação 2, figura.1). Para isso, a biomassa das linhagens de bactérias lácticas foi ressuspensa em 6 ml água ultrapura a ser utilizada para preparo de pé-de-cuba.

2.2.6.3 Fermentação “em etapas”

Para a fermentação “em etapas” foi realizada a batelada alimentada em IM, conforme item 2.2.6.2.1 entretanto, com volume total de fermentação duplicado (80 ml). Após 7 horas de fermentação da levedura, foi realizada a interrupção do processo fermentativo com a centrifugação em 16.000 g, durante 15 minutos a 0 °C. A centrifugação foi realizada em baixa temperatura com o objetivo de cessar a fermentação. O tempo escolhido para a interrupção foi

levando em consideração o não esgotamento dos açúcares, permitindo que ambas as bactérias tivessem, além dos metabólitos produzidos pela levedura, fonte de carbono.

O vinho de levedurado (sobrenadante) recuperado (72 ml) foi acrescido com cicloheximida em concentração final de 10 ppm. O antifúngico foi utilizado para eliminar as células de levedura que permaneceram mesmo após centrifugação. A concentração utilizada foi a mesma empregada para inibir crescimento de levedura em meio sólido. A eficiência da retirada das células de levedura foi avaliada a partir do plaqueamento por espalhamento em meio YPD contendo Ágar (1,5%). As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas. Até a confirmação do não crescimento de leveduras, o vinho foi mantido em temperatura de -20 °C. Para o cultivo das bactérias, foram utilizados 28 ml de vinho em única alimentação em frascos de 50 mL para cada linhagem. O inóculo de ambas as bactérias foi realizado a partir de biomassa ressuspensa em 2 ml de água estéril para obtenção de 3×10^8 UFC.ml⁻¹ com relação ao volume final do cultivo. A incubação foi estática em temperatura de 30 °C. Amostras do vinho foram realizadas antes (tempo 0 horas) do cultivo das bactérias e ao final da fermentação (24 horas). O cultivo foi realizado com 3 repetições biológicas para ambas as linhagens.

2.2.7 Parâmetros microbiológicos: Microscopia óptica e plaqueamento por gotas

Para todas as fermentações na presença da levedura foi realizada a determinação da concentração de célula (cel.ml⁻¹), viabilidade (%) e brotamento (%). A análise foi executada a partir de contagem em microscópio óptico com objetiva de 40x, utilizando corante eritrosina como forma de diferenciar células viáveis de células inviáveis, onde células inviáveis são coradas.

Para cálculo, foram empregadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Cel.ml}^{-1} = ((\text{Células viáveis} \times 4000) / \text{Total de retículos contados}^{-1}) \times 1000 \times D$$

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = ((\text{Células viáveis} / (\text{Células viáveis} + \text{Células inviáveis})) \times 100$$

$$\text{Brotamento (\%)} = (\text{Brotos viáveis} / \text{Célula viáveis}) \times 100$$

Onde: D = diluição

O plaqueamento por gotas foi conduzido para determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC.ml⁻¹) em amostras na presença de BAL. As amostras foram submetidas a diluição seriada em água ultrapura esterilizada. Uma alíquota de 10 µL foi inoculada em placa de Petri contendo meio MRS acrescido de 1,5% de ágar e cicloheximida (10 ppm). Para cada repetição biológica foram realizadas 3 repetições técnicas. As placas foram incubadas a 32 °C

durante 24 horas. Após crescimento, foram realizadas as contagens de colônias e a concentração calculada através da fórmula:

$$\text{UFC.ml}^{-1} = ((\text{Média de triplicata técnica}) \times \text{volume de diluição}^{-1}) \times D$$

Onde: D = diluição

2.2.8 Parâmetros físico-químicos: Análise de vinho de levedurado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e pHmetro.

As amostras de vinho final foram analisadas quanto ao pH utilizando pHmetro de bancada. Para HPLC, o vinho de levedurado foi submetido a filtração em membrana de 0,22 μm e diluído com razão de 1:9 (amostra:água). A análise foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (Shimadzu Prominence) com detector index refrativo. Para análise de ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, glicerol e etanol foi utilizada coluna Bio-Rad HPX-78H a 60 °C com H_2SO_4 (5 mM) como eluente e quociente de vazão de 0,6 ml.min^{-1} . Para análise dos açúcares sacarose, frutose e glicose foi utilizada a coluna Bio-Rad HPX-87C a 85 °C com água ultrapura como eluente e quociente de vazão de 0,6 ml.min^{-1} .

2.2.9 Análise estatística

Os dados de parâmetros fermentativos foram testados quanto à existência de diferença significativa utilizando o pacote Agricolae no software RStudio, para análise de variância (ANOVA) seguido do Teste Tukey com $p \leq 0,05$.

2.3 Resultados

2.3.1 Cinética de crescimento de bactérias lácticas em melão de cana (IM)

O crescimento das linhagens homo e heterofermentativa foi analisado em meio de laboratório (MRS) e em meio formulado com substrato industrial (IM), ambos contendo a mesma concentração de açúcares (2% de ART). Embora o meio MRS apresente em sua composição somente a glicose como fonte de carbono, se faz importante usá-lo como comparativo, devido a sua seletividade e uso disseminado para o cultivo de bactérias lácticas. Ao comparar as curvas de crescimento de ambas às linhagens em IM com MRS, foi possível observar que o crescimento foi reduzido no meio composto de melão industrial de cana (IM) (Figura 2). As linhagens analisadas apresentam exigências de sais, aminoácidos, peptídeos, vitaminas e ácidos graxos (SUGAHARA et al., 2021), e o melão de cana normalmente é deficiente de tais

compostos, principalmente de fonte de nitrogênio, podendo explicar o baixo crescimento (PAPIZADEH et al., 2020).

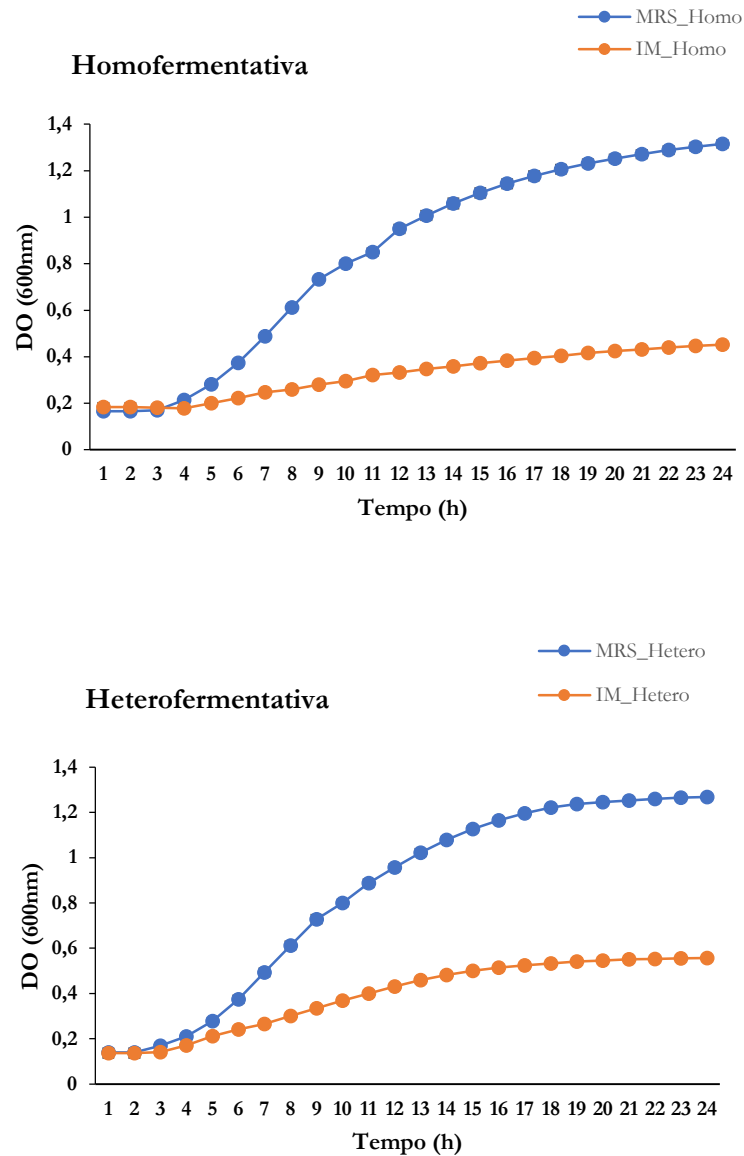


Figura 2. Crescimento de linhagem homo e heterofermentativa em MRS 2% (Glicose - ART). (Azul) e melão de cana (IM) 2% (ART) (Laranja). O crescimento foi realizado em três repetições biológicas e monitorado a cada 1 hora durante 24 horas. No gráfico foram reportados os valores obtidos a partir da média das repetições e seus respectivos desvios.

A velocidade específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) (h^{-1}) é obtida durante fase exponencial e indica alterações no crescimento em diferentes condições de cultivo, como o meio empregado para tal (TSUCHIYA et al., 2018). Os meios apresentaram diferença significativa para as duas linhagens neste parâmetro. Os resultados indicam que a heterofermentativa apresenta

crescimento (DO máxima de 0,55) e velocidade ($0,2 \text{ h}^{-1}$) superior quando comparada com a homofermentativa (DO máxima de 0,45) e velocidade de ($0,14 \text{ h}^{-1}$) (Tabela 1).

Tabela 1. Velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) (h^{-1}) em MRS e IM. As velocidades foram calculadas para cada repetição biológica e as médias apresentadas. As letras minúsculas em cada valor representam o resultado de teste de média, sendo a comparação realizada entre os substratos para cada linhagem. Distinção entre as letras significa que houve diferença significativa entre os tratamentos com $p \leq 0,05$.

$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	MRS	R ²	IM	R ²
Homofermentativa	$0,37 \pm 0,00a$	0,94	$0,14 \pm 0,01b$	0,96
Heterofermentativa	$0,38 \pm 0,00a$	0,94	$0,20 \pm 0,00b$	0,96

2.3.2 Cinética consumo e produção de metabólitos de bactérias lácticas - IM

Por outro lado, em condições que mimetizam o processo industrial, ou seja, com mosto preparado com altos teores de açúcares (17 % ART), elevada carga de bactérias contaminantes ($10^8 \text{ UFC. ml}^{-1}$), e em regime de batelada alimentada (BASSO et al, 2008; AMORIM et al, 2011), as linhagens bacterianas não foram capazes de consumir a sacarose (Figura 3 e 4). Linhagens pertencentes as espécies *L. delbrueckii* sp. *delbrueckii*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. plantarum* e *L. casei* foram relatadas como capazes de utilizar o dissacarídeo como fonte de carbono para produção de ácido láctico e ATP (ABEDI; HASHEMI, 2020). Levando em consideração de que as linhagens estudadas foram isoladas de destilaria, na qual apresenta alta disponibilidade de monossacarídeo durante todo o tempo de fermentação, é possível que a pressão adaptativa imposta no ambiente resultou na incapacidade de metabolizar o açúcar. Isso pode estar relacionado com o processo de evolução do genoma, com a perda e ganho de genes, o qual é de extrema importância para a adaptação a condições do ambiente em longo prazo (CEAPA et al., 2015).

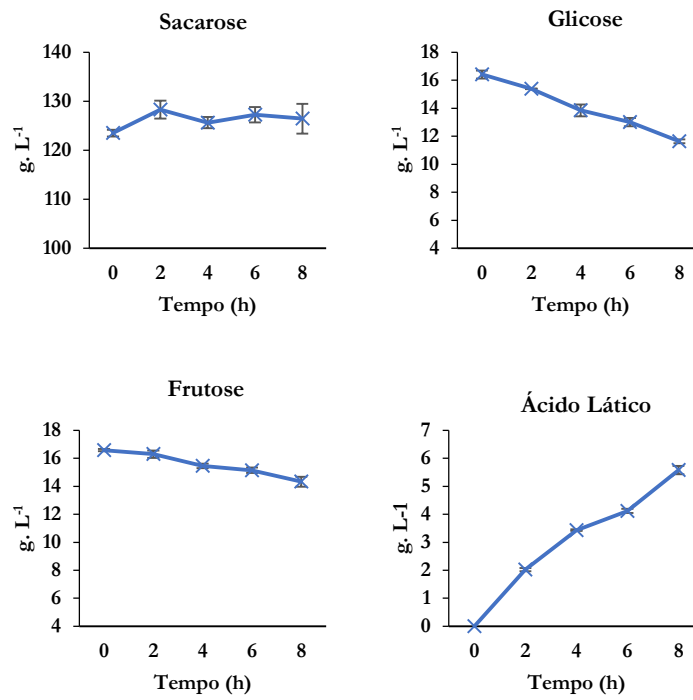


Figura 3. Cinética de consumo de sacarose, glicose e frutose e produção de ácido láctico de linhagem homofermentativa durante 8 horas de fermentação em IM com concentração de 170 g.L⁻¹ (17 %ART). Os valores reportados são referentes as médias de três repetições biológicas com seus respectivos desvios.

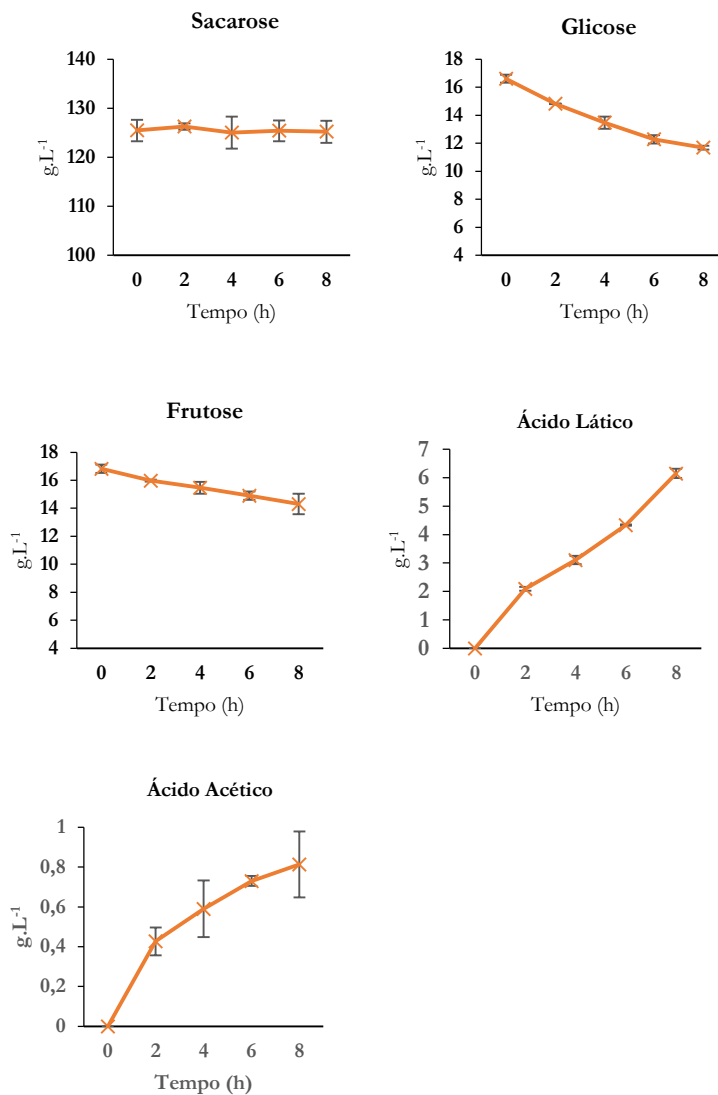


Figura 4. Cinética de consumo de sacarose, glicose e frutose e produção de ácido láctico de linhagem heterofermentativa durante 8 horas de fermentação em IM com concentração de 170 g.L⁻¹ (17 %ART). Os valores reportados são referentes as médias de três repetições biológicas com seus respectivos desvios.

No entanto, apesar de não ter sido observado o consumo de sacarose, tanto glicose e frutose foram consumidas por ambas as bactérias, sendo a glicose o açúcar preferencial. Apesar disso, os açúcares na concentração utilizada não foram esgotados no tempo de fermentação. A ausência de aceptores de elétrons, responsáveis por manter o balanço redox celular, pode vir a impossibilitar o funcionamento das vias metabólicas e por consequência, a metabolização de açúcares (MCFEETERS; CHEN, 1986). Entretanto, a linhagem heterofermentativa, que apresenta a capacidade de utilizar a frutose comoceptor ao reduzi-la a manitol (VON WEYMARN; HUJANEN; LEISOLA, 2002) não aumentou o consumo de fonte de carbono, permitindo supor serem outros fatores responsáveis por isso.

A presença de substâncias inibidoras (ácido cítrico, magnésio, zinco, manganês, cálcio e ferro) (KOTZAMANIDIS; ROUKAS; SKARACIS, 2002; PAPIZADEH et al., 2020) em conjunto com o esgotamento ou baixa disponibilidade de nutrientes e o acúmulo de metabólitos produzidos durante a fermentação (PAPADIMITRIOU et al., 2016), podem ter resultado em perturbações ao metabolismo, crescimento e fosforilação ao nível de substrato quando em IM (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2016).

Bactérias homofermentativas apresentam rendimento de 2 moles de ácido láctico para cada 1 mol de glicose, enquanto bactérias heterofermentativas apresentam rendimento de 1 mol de ácido láctico para cada 1 mol de glicose. Além do ácido láctico, bactérias heterofermentativas realizam a produção de ácido acético e etanol. Na figura 4 é possível observar que ocorreu produção do metabólito, e em consequência disto, não houve a produção de etanol. Isso venha a ser estratégico para a bactéria no ponto de vista energético, visto que a produção de acetato leva a produção de 1 mol de ATP (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2016).

2.3.3 Melaço sintético (SM) sem suplementação de peptona como substrato de fermentação

2.3.3.1 Crescimento de bactérias lácticas na ausência de suplementação com peptona em meio SM

Nessa etapa do trabalho, o objetivo foi avaliar o crescimento de bactérias homo e heterofermentativas em melaço sintético na presença e ausência de peptona, fonte complexa que faz parte do referido meio de cultivo, permitindo analisar a influência de fonte de nitrogênio e aminoácidos para o crescimento das linhagens. (Figura 5). . A peptona bacteriológica é produzida a partir de hidrolisado enzimático de carne e consiste em fonte de fatores de crescimento facilmente disponíveis para microrganismos. Segundo fabricante (Sigma-Aldrich), a peptona utilizada no presente estudo apresenta 12 % de nitrogênio total e de 3-4,5 % de aminoácidos.

A ausência de peptona interferiu de forma negativa para ambas as linhagens, mostrando a dependência por fontes de nitrogênio e aminoácidos presentes no meio. Sendo assim, ambas as linhagens possivelmente apresentam auxotrofia para a produção e aminoácidos essenciais, o que pode estar relacionada com o processo de evolução em ambientes ricos nutricionalmente (Figura 5) (HAYEK et al., 2013).

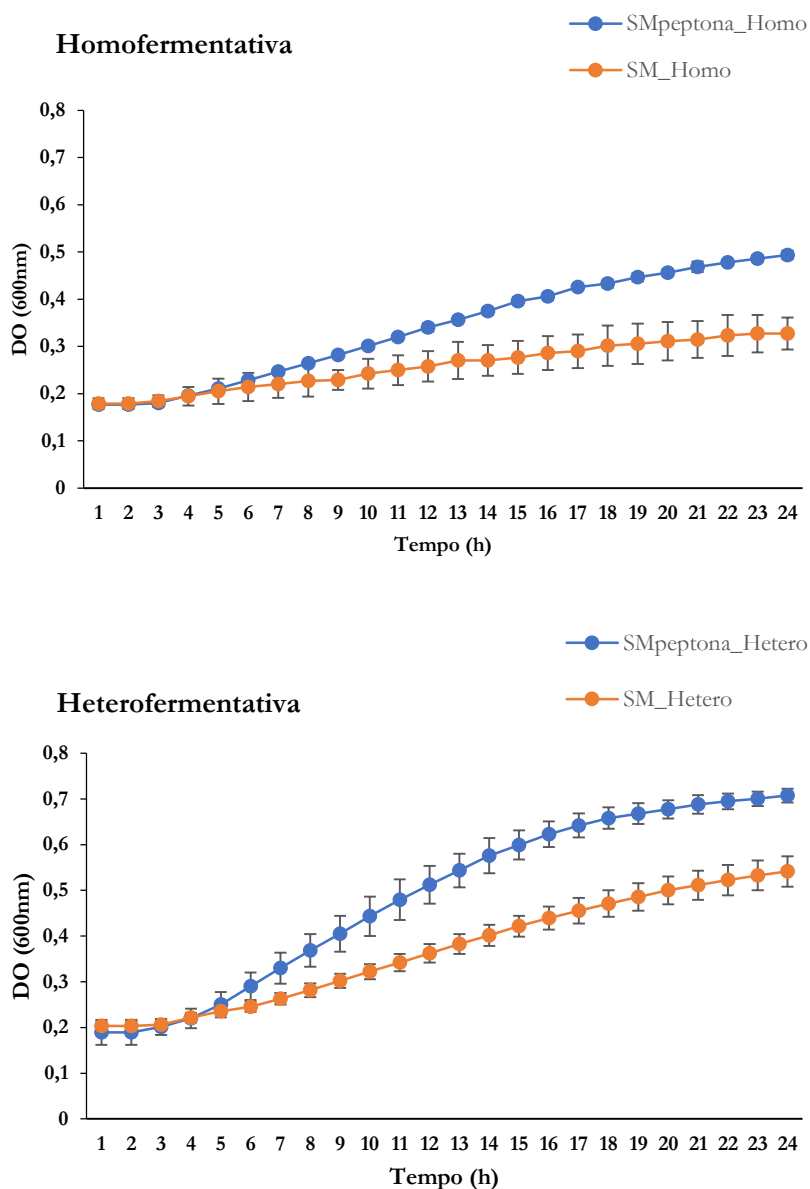


Figura 5. Crescimento de linhagem homo-e heterofermentativa durante 24 horas em microplaca contendo SM com e sem a suplementação de $4,9 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona bacteriológica. O experimento foi conduzido com 3 repetições biológicas. Somente as médias de crescimento com seus respectivos desvios foram reportados.

A DO máxima (0,58) em SM sem suplementação de peptona para a linhagem heterofermentativa foi semelhante a observada em IM (0,55) (Figura 2.). No caso da homofermentativa, a população máxima apresentou valores de 0,38 em SM sem peptona (Figura 5) e 0,48 em IM (Figura 2). Isso enfatiza a maior resistência da linhagem heterofermentativa em meios pobres nutricionalmente. Durante crescimento com adição de peptona, a heterofermentativa apresentou DO máxima de 0,76 e a bactéria homofermentativa apresentou DO de 0,58 (Figura 5). Esses valores evidenciam que a fonte de nitrogênio é fator importante para promover crescimento de ambas as linhagens.

O $\mu_{\text{máx}}$ foi influenciado quando a peptona não foi adicionada ao meio, principalmente para a linhagem homofermentativa (Tabela 2). O parâmetro apresentou redução quando comparado com SM com peptona (Tabela 2) e IM (Tabela 1).

Tabela 2. Velocidade máxima específica de crescimento $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) em SM com adição de peptona e SM sem a adição de peptona, obtida a partir do coeficiente angular da reta obtida a partir da correlação LN x tempo. As letras para cada valor são referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa.

$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	SM peptona	R ²	SM	R ²
Homofermentativa	0,12 ± 0,00a	0,99	0,063 ± 0,00b	0,98
Heterofermentativa	0,16 ± 0,00a	0,98	0,11 ± 0,00b	0,99

2.3.3.2 Utilização de SM em fermentação alcoólica de levedura na ausência da suplementação de peptona

O tipo da fonte de nitrogênio durante a fermentação alcoólica pode influenciar no crescimento microbiano, como também no consumo de açúcares e na produção de etanol (KEMSAWASD et al., 2015). Sendo assim, a levedura PE-2 foi cultivada em meio SM sem adição de peptona e em meio IM, como forma de validar a mimetização do processo industrial utilizando o melaço sintético. Na figura 6, a cinética de crescimento mostra que a DO máxima obtida foi de $0,79 \pm 0,03$, dado semelhante ao observado em SM, o qual apresentou valor médio de $0,75 \pm 0,07$. Sendo assim, a ausência de suplementação de fonte de nitrogênio não teve influência para a linhagem.

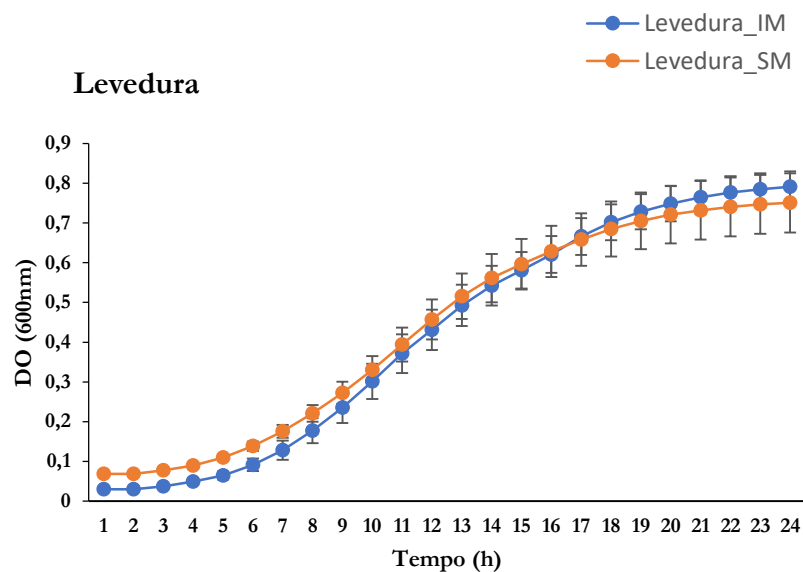


Figura 6. Cinética de crescimento de linhagem de levedura PE-2 durante 24 horas em microplaca contendo IM (Azul) e SM sem a suplementação de peptona (laranja). O experimento foi conduzido com 3 repetições biológicas. Somente as médias de crescimento foram reportadas com seus respectivos desvios.

Ao avaliar a velocidade específica de crescimento, observou-se redução em SM quando comparado com IM (Tabela 3). Isso possivelmente ocorreu já que a linhagem PE-2 é adaptada ao melaço de cana (BASSO et al., 2008).

Tabela 3. Levedura em mosto composto de IM e SM sem suplementação de peptona. Os valores são referentes a média de 3 repetições biológicas e seus respectivos desvios. As letras para cada valor são referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa.

$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	IM	R ²	SM	R ²
Levedura	0,50 ± 0,01a	0,97	0,38 ± 0,00b	0,99

No desprendimento de CO₂ não foram observadas diferenças entre os dois meios de cultivo avaliados (Figura 7). Na tabela 4 é possível observar que a frutose residual foi superior nos dois meios quando comparado com a glicose, devido à preferência da levedura *S. cerevisiae* por glicose (MARQUES et al., 2016). Comparando os meios com relação aos açúcares consumidos, em SM as fontes de carbono foram praticamente exauridas do meio, enquanto no meio IM houve maior concentração de açúcares residuais. Adicionalmente, observou-se diferença significativa na produção de glicerol entre os dois meios. A produção deste metabólito ficou entre 2,44 g.L⁻¹ em IM e 3,02 g.L⁻¹ para SM. Lino, Basso e Sommer (2018) observaram para a mesma linhagem de levedura (PE-2) a produção de 6,5 g.L⁻¹ em melaço sintético e 5,5 g.L⁻¹ em melaço de cana. Os autores justificam que diferenças na concentração de açúcares nos meios podem resultar em diferenças na produção do glicerol e conseqüentemente na produção dos demais metabólitos da fermentação. Ao observar as concentrações de etanol, ácido acético e ácido succínico (tabela 4) foi observado também maior concentração. Além disso, vale observar que o aumento de ácido acético e succínico é diretamente proporcional com o aumento de glicerol. Isso é explicado pelo fato de que a produção dos dois ácidos orgânicos ocorre para manter o balanço redox durante a produção de glicerol (BASSO; DE AMORIM; ALVES, 1997).

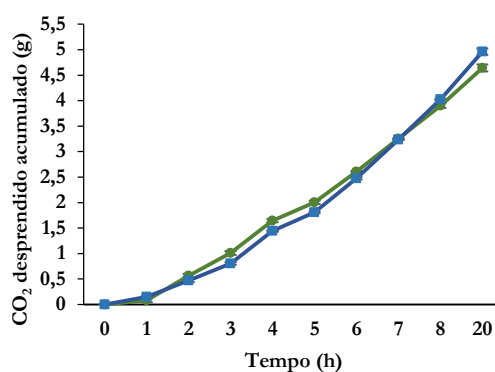


Figura 7. Velocidade de fermentação de levedura PE-2 em mosto composto de IM e SM sem suplementação de peptona. Os valores são referentes a média de três repetições biológicas. A pesagem foi realizada a cada hora durante 8 horas e ao final da fermentação (24 horas). Verde: Melaço de cana; Azul: Melaço sintético (SM)

Tabela 4. Açúcares residuais (AR %), principais metabólitos produzidos durante a fermentação. Os valores são referentes a média de três repetições biológicas. As letras para cada valor são referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa.

Meio	Sacarose AR (%)	Glicose AR (%)	Frutose AR (%)	Etanol (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Ácido Acético (g.L ⁻¹)	Ácido Succínico (g.L ⁻¹)
IM	0,0	0,04	0,20	53,0	2,44	1,19	0,51
	±0,0a	±0,05a	±0,0a	±0,086b	±0,00b	±0,00a	±0,05a
SM	0,0	0,009	0,066	57,8	3,02	1,7	0,67
	±0,0a	±0,05b	±0,015b	±0,983a	±0,02a	±0,91a	±0,10a

Tabela 5. dados de microscopia óptica. Os valores são referentes a média de três repetições biológicas. As letras para cada valor são referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa.

Meio	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	Cel.ml ⁻¹ (10 ⁹)
IM	99,35	0,90	1,2
	±1,12a	±0,34 ^a	±0,13 ^a
SM	89,92	0,0	1,05
	±8,22a	±0,0b	±0,18a

No caso da viabilidade e concentração celular (Tabela 5), a levedura apresentou redução desses dois parâmetros quando em SM, contudo sem diferença significativa. Para valores de brotamento, em SM não foi constatado ao final da fermentação. A biomassa de levedura apresentou aumento em IM de $3,79 \pm 0,02$ g para $4,17 \pm 0,09$ g e em SM foi de $3,80 \pm 0,07$ para $4,11 \pm 0,06$ g. Isso corrobora com os dados de cinética de crescimento, mostrando que a linhagem apresentou a capacidade de crescer de forma semelhante entre os meios.

2.3.4 Comparação entre cultura pura de bactérias lácticas e cocultivo com levedura em IM

No intuito de avaliar a interferência da levedura no crescimento e metabolismo das bactérias, foi realizada a comparação entre cultura pura (bactéria) e cocultivo (bactéria + levedura), ambos em meio IM.

A partir de inóculo bacteriano de 3×10^8 UFC. ml⁻¹ para as duas bactérias, a linhagem heterofermentativa atingiu concentração de $1,4 \times 10^9$ UFC. ml⁻¹ após 24 h em cultura pura e de $6,4 \times 10^8$ UFC. ml⁻¹ na presença da levedura, enquanto a homofermentativa apresentou concentração de $1,0 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹ em cultura pura, e $5,07 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ em cocultivo (Tabela 6). Esses resultados são de grande importância, pois mostram que a levedura é responsável por restringir o crescimento dos contaminantes.

Na literatura, a espécie *S. cerevisiae* foi relatada como capaz de produzir metabólitos durante a fermentação com efeito inibitório (BRANCO; DINIZ; ALBERGARIA, 2022; JOUHTEN et al., 2016) e como responsável por competir por nutrientes ao nível de impactar o crescimento de outros microrganismos (RENAULT; ALBERTIN; BELY, 2013). Nissen, Nielsen e Arneborg (2003), observaram que a espécie *S. cerevisiae*, quando inoculada em alta densidade celular (5×10^7 células. ml⁻¹), foi capaz de cessar o crescimento de leveduras não *Saccharomyces*.

Tabela 6. Valores de UFC.ml⁻¹ de BAL em cultura pura e cocultivo com levedura obtidos a partir de plaqueamento por gota realizado em triplicata técnica para cada repetição biológica. Os valores são referentes a concentração final após 24 horas de fermentação. Em todos os tratamentos, o inóculo inicial foi em média de 3×10^8 . As letras para cada valor são referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa.

UFC.ml ⁻¹	Cultura pura IM	Cocultivo IM
	(10 ⁸)	(10 ⁸)
Homo	10.4 ±4.35a	5.07 ±3.07b
Hetero	14.7 ±0.58a	6.4 ±0.40b

Cabe destacar que os resultados apresentados na Figura 8 mostram que as concentrações de ácido láctico ao final do cultivo corroboram com os resultados de crescimento. Os mesmos foi observado por Narendranath e Power (2005) ao analisar as bactérias lácticas durante estresse osmótico, onde ocorreu redução de crescimento e produção do metabólito, mostrando existir correlação paralela entre ambos.

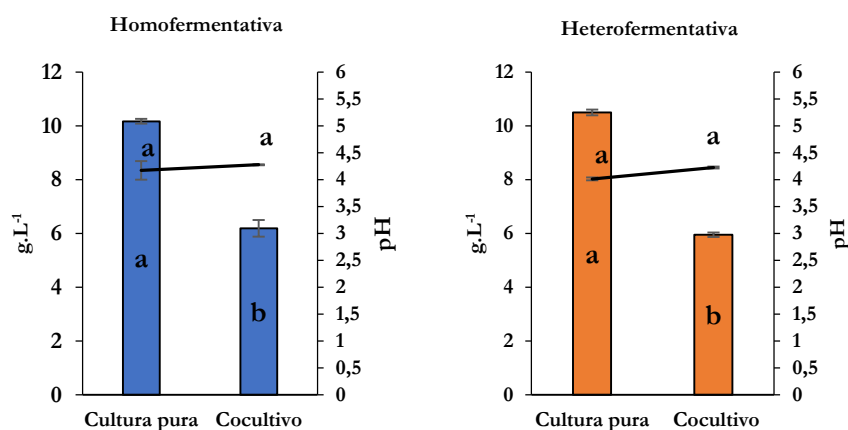


Figura 8. Ácido láctico produzidos por BAL e pH do vinho ao final da fermentação para os tratamentos em cultura pura e cocultivo em meio IM. Os valores reportados referem-se a média e desvio padrão obtido de três repetições biológicas. Gráfico de barras são referentes ao ácido láctico. Valores representados por reta são referentes ao pH. As letras para cada valor são referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa.

Nos cultivos com as duas bactérias, a concentração de ácido láctico obtida no tratamento em cocultivo foi menor quando comparada ao tratamento em cultura pura. Conforme relatado por Abedi e Hashemi (2020), a produção do ácido orgânico depende de fatores como, pH de 3,5 – 9,6, temperatura entre 5-45 °C e presença de aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e vitaminas. Levando em consideração de que tanto os valores de pH (em torno de 4,5), quanto de temperatura (32 °C) estavam entre os valores citados, é possível afirmar que a competição por fatores de crescimento em sinergismo com os metabólitos da levedura, resultou na queda de produção.

É interessante notar que as concentrações de ácido láctico foram semelhantes entre as bactérias homo e heterofermentativas, tanto nos ensaios em cultura pura (10,2 e 10,5 g.L⁻¹, respectivamente), como nos ensaios em cocultivo (6,2 e 6,0 g.L⁻¹, respectivamente). Tal fato indica que o metabolismo heterofermentativo parece ser mais bem adaptado ao processo industrial baseado em mostos compostos por melão de cana, uma vez que é sabido que apenas 1 mol de ácido láctico é produzido pela dissimilação de 1 mol de hexose por bactérias heterofermentativas, ao passo que o dobro (2 moles) é formado no caso das homofermentativas (Kandler, 1986).

Para valores de pH não ocorreu alteração entre os tratamentos, mesmo com a diferença significativa entre a produção do ácido orgânico, podendo ser explicado devido a ação tamponante que o melão apresenta. Dumbrepatil e colaboradores (2008) observaram o mesmo ao realizarem a fermentação para produção de altas concentrações de ácido láctico com mutante Uc-3 da espécie *L. desbrueckii*, onde a produção de 166 g.L⁻¹ do ácido orgânico reduziu o pH de

6,0 para 5,3, quando o melaço de cana foi utilizado como substrato. Ao realizarem a mesma fermentação utilizando meio sintético, observaram queda do pH de 6,8 para 4,5.

A concentração de etanol produzido pela levedura foi de 53,9 g.L⁻¹ quando na presença da homofermentativa e 51,3 g.L⁻¹ com a heterofermentativa. Tal concentração pode não ser fator responsável pela queda de crescimento e metabolismo, visto que durante a fermentação industrial, o processo pode atingir em torno de 7 a 11 % (v.v⁻¹) de etanol (55,2 a 86,8 g.L⁻¹) e ainda assim as bactérias proliferam nessas condições, tanto em experimentos em laboratório como nas dornas industriais. Ainda com relação a concentração de etanol, é possível observar que a bactéria heterofermentativa reduziu a concentração do metabólito, que apresentou diferença significativa com relação a homofermentativa (Tabela 7). Este resultado está de acordo com o observado na literatura, onde bactérias heterofermentativas apresentam maior interferência no rendimento da fermentação de mosto a base de cana-de-açúcar (BASSO et al., 2014).

Tabela 7. Metabólitos de levedura analisados em vinho após 24 horas de fermentação durante cocultivo com homo- e heterofermentativa. As médias de três repetições biológicas foram reportadas com seus respectivos desvios padrões. As letras para cada valor são referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa.

Tratamento	AR%		g.L ⁻¹			
	Glicose	Frutose	Etanol	Glicerol	Ácido Acético	Ácido Succínico
Levedura+Homo	0,04±0,00a	0,20±0,01a	53,93±0,24a	2,35±0,01a	1,03±0,00b	0,46±0,00a
Levedura+Hetero	0,04±0,00a	0,19±0,00a	51,28b±0,19b	3,20±0,00b	1,98±0,00a	0,49±0,0a

Os açúcares residuais (AR%) presentes no vinho foram semelhantes para ambas as fermentações, mostrando que possivelmente a presença de contaminantes não interferiu no consumo de açúcares da levedura. Quando analisado o consumo de açúcares das bactérias em cultura pura, foi observado que ocorreu significativa concentração de açúcares residuais. Assim como observado na cinética de consumo e produção de metabólitos, as bactérias não foram capazes de esgotar nas condições estudadas (Item 2.3.2). Collograi, da Costa e Ienczak (2019) somente observaram o esgotamento de glicose e frutose, além do consumo de sacarose da espécie *L. fermentum* em melaço de cana em fermentação com 48 horas de duração e sob agitação. (figura 9).

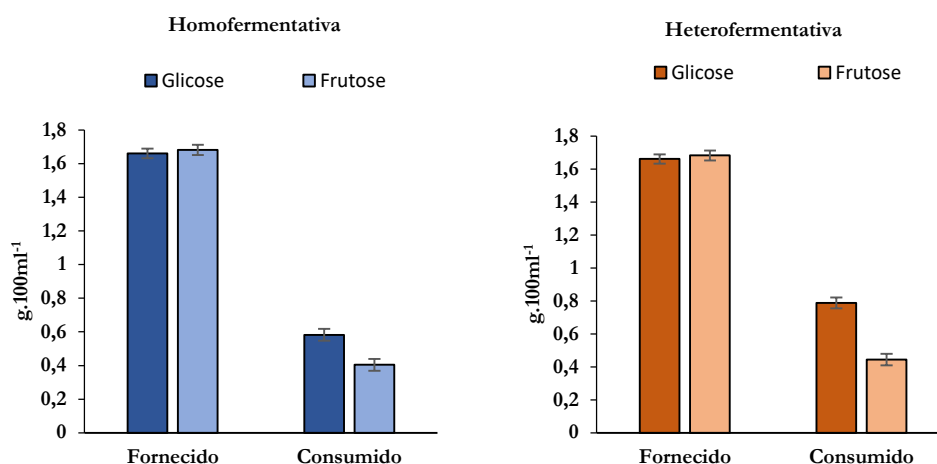


Figura 9. Glicose e frutose (%) fornecidas e consumidas durante 24 horas de fermentação em cultura pura com homo- e heterofermentativa. As médias de três repetições biológicas foram reportadas com seus respectivos desvios padrões. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa, referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Laranja: Homofermentativa; Azul: Heterofermentativa.

O ácido succínico também foi analisado e não apresentou diferença significativa entre os cocultivos (Tabela 7). O ácido consiste em metabólito secundário da fermentação e associado a produção de glicerol. Durante a fermentação, foi identificado com ação antibacteriana em sua forma dissociada, controlando assim o crescimento de bactérias lácticas contaminantes. A ação antagonista das leveduras pode não se limitar a produção do ácido, mas sim do sinergismo entre ácido succínico + etanol + competição por nutrientes (BASSO; DE AMORIM; ALVES, 1997).

O glicerol foi produzido em maior concentração durante o cocultivo com a bactéria heterofermentativa se comparado com a homofermentativa (Tabela 7). Resultado semelhante foi observado por Basso et al (2014), que associaram essa diferença de concentração entre as linhagens em decorrência do possível consumo do metabólito por parte da homofermentativa. Entretanto, a linhagem I4a (homofermentativa), utilizada no presente estudo, foi analisada quando na presença de glicerol, como fonte única de carbono ou associado a glicose. Em nenhum dos casos foi observado o uso do metabólito, seja como fonte de carbono ou acceptor de elétrons, levantando a hipótese de que possivelmente, bactérias homo e heterofermentativas interferem de forma distinta na produção do metabólito (RAPOSO, 2018).

2.3.5 Interação com baixa disponibilidade de nutrientes em SM

O processo chamado de *cross-feeding* consiste na interação nutricional a partir da produção e transporte de metabólitos essenciais entre microrganismos que ocupam o mesmo nicho (KAPETANAKIS et al., 2021). A espécie *S. cerevisiae* foi relatada como sendo capaz de produzir e excretar glutamina, glutamato, arginina, histidina, triptofano, metionina e prolina e que

foram assimilados pela espécie *L. hordei* em substrato deficiente de nitrogênio e ácidos graxos (XU et al., 2019), como também em meios ricos nutricionalmente (PONOMAROVA et al., 2017). A presença de aminoácidos no exometaboloma foi relatada como responsável por suprir a demanda de bactérias lácticas durante a fermentação (KAPETANAKIS et al., 2021; PONOMAROVA et al., 2017).

Sendo assim, foi realizada a fermentação em SM (sem a suplementação de peptona) durante o cocultivo com a levedura, com o objetivo de analisar se durante a ausência da suplementação de peptona ocorre a produção de fatores de crescimento capazes de estimular as bactérias lácticas. Na tabela 8 são apresentados os parâmetros de crescimento e produção de ácido láctico analisados após 24 horas de fermentação.

Tabela 8. Concentração de UFC.ml⁻¹, ácido láctico e pH analisados após 24 horas de fermentação durante cocultivo de levedura com BAL homo- e heterofermentativa. As médias de três repetições biológicas reportadas com respectivos desvios padrões. As letras para cada valor são referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa.

Tratamento	UFC. ml ⁻¹ (10 ⁴)	Ác. Láctico g.L ⁻¹	pH
Levedura + Homo	6.40±2.77a	2,12±0.00a	4.02±0.07a
Levedura + Hetero	6.20±3.12a	2,33±0.01a	3.87±0.02a

É possível observar que durante o cocultivo, a levedura não foi capaz de estimular o crescimento de ambas as linhagens, ocorrendo até mesmo a queda da população de 3×10^8 UFC.ml⁻¹ a $6,4 \times 10^4$ e $6,2 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹ para homofermentativa e heterofermentativa respectivamente. Isso permite supor que a levedura não foi capaz de suplementar o meio durante o cocultivo.

Dessa forma, durante a fermentação, não ocorre o processo de *cross-feeding*, possivelmente devido as condições da fermentação alcoólica (linhagem de levedura competitiva, alta densidade celular (10% m.v⁻¹), melão de cana e altas concentrações de açúcares e etanol). A diferença de concentração entre os microrganismos pode ser fator importante a ser levado em consideração. A espécie *L. hordei* foi capaz de utilizar aminoácidos produzidos pela levedura somente quando ambas apresentavam a mesma concentração celular (XU et al., 2019). A produção do ácido láctico ocorreu em baixas concentrações devido ao baixo crescimento, entretanto, foi observada queda do pH superior ao observado no cocultivo com IM (4,28 e 4,23 para homo- e heterofermentativa respectivamente), evidenciando a ação tamponante já relatada do melão de cana.

Na tabela 9 são apresentados os dados de parâmetros fermentativos e os principais metabólitos da fermentação.

Tabela 9. Metabólitos analisados em vinho após 24 horas de fermentação durante cocultivo com homo- e heterofermentativa. As médias de três repetições biológicas foram reportadas com seus respectivos desvios padrões. As letras para cada valor são

Tratamento	AR (%)		g.L ⁻¹			
	Glicose	Frutose	Etanol	Glicerol	Ác. Acético	Ác. Succínico
Levedura+Homo	0.00±0.00b	0,06±0,00b	58,79±0,22a	2,97±0,01a	0,89±0,01a	0,64±0,00b
Levedura+Hetero	0,01±0,001b	0,06±0,00b	59,98±0,26a	3,17±0,01a	0,97±0,01a	0,59±0,00b

referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$. Letras distintas referem-se a valores com diferença significativa.

Curiosamente, mesmo não apresentando diferença significativa, o etanol foi produzido em maior concentração quando na presença da bactéria heterofermentativa quando comparado com a homofermentativa. Bactérias com perfil metabólico heterofermentativa são capazes de alternar a produção de ácido acético e etanol, sendo que o ácido acético promove ganho de 1 mol de ATP e o etanol regenera NAD^+ (STOLZ; VOGEL; HAMMES, 1995). Sendo assim, é interessante supor que a produção de etanol pode estar relacionada a não utilização da frutose como acceptor de elétron, resultando no aumento de produção de etanol para regenerar NAD^+ .

2.3.6 Metabólitos presentes na fermentação alcoólica como substrato para BAL

O cultivo consistiu na realização da fermentação prévia pela levedura e posteriormente, o inóculo de bactérias lácticas em cultura pura. Na tabela 10 é possível observar a concentração de metabólitos após 7 horas de fermentação da levedura e utilizado para o inóculo das BAL (0h).

Tabela 10. Metabólitos analisados em 0 e 24 horas de fermentação em etapas com homo e heterofermentativa. As médias de três repetições biológicas foram reportadas com seus respectivos desvios padrões. As letras para cada valor são referentes ao teste Tukey com $p \leq 0,05$.

0 h	Açúcares fornecidos %		g.L ⁻¹			
	Glicose*	Frutose*	Etanol	Glicerol	Ác. Acético	Ác. Succínico
Homo	3.68±0.02a	4.31±0.03a	35,26±0,27a	5,99±0,02a	0,88±0,02a	0,74±0,00a
Hetero	3.71±0.01a	4.34±0.00a	33,69±0,31a	5,91±0,01a	0,92±0,00a	0,78±0,00a

24 h	Açúcares consumidos %		g.L ⁻¹			
	Glicose**	Frutose**	Etanol	Glicerol	Ác. Acético	Ác. Succínico
Homo	0,03±0,00b	0,02±0,03	35,32±0,36a	5,90±0,00a	0,83±0,00a	0,72±0,0a
Hetero	0,12±0,0a	0,05±0,05	33,80±0,45a	5,96±0,01a	0,85±0,0a	0,73±0,0a

*Açúcares residuais

**Açúcares consumidos

Trabalhos que tiveram como objetivo estudar a interação entre microrganismos sem o contato físico entre as células utilizaram metodologia semelhante ao empregado no presente estudo (ENGLEZOS et al., 2019; PONOMAROVA et al., 2017). Diferente dos estudos relatados, os quais realizaram filtração do substrato para retirada das células, para o presente estudo não foi possível, visto a alta concentração de sólidos solúveis no melaço de cana-de-açúcar. Por este motivo, a retirada das células de levedura foi realizada a partir de ultracentrifugação e uso de antifúngico cicloheximida, como forma de garantir a ausência de células viáveis, conforme metodologia no item 2.2.6.3.

O crescimento foi analisado após 24 horas e as linhagens tiveram redução da população ao ponto de apresentarem valores abaixo do limite da metodologia. Segundo Cherubin (2003), a contagem apresenta limite de 4 unidades formadoras de colônia na média da triplicata técnica, o que não ocorreu nos plaqueamentos, entretanto, foi observado que a população apresentava valores abaixo de 10^4 UFC.ml⁻¹. (Tabela 11).

Tabela 11. Concentração de UFC.ml⁻¹, ácido láctico e pH analisados após 24 horas de fermentação durante cocultivo de levedura com homo e heterofermentativa. As médias de três repetições biológicas reportadas com seus desvios padrões. Valores em vermelho para UFC.ml⁻¹ representam valores de unidades formadoras de colônia inferiores a metodologia (CHERUBIN, 2003).

Tratamento	Cel. ml ⁻¹	Ác. Láctico (gL ⁻¹)	pH
Homo	<10 ⁴	2,07±0.01a	5±0.05a
Hetero	<10 ⁴	2,23±0.00a	5±0.056a

Com os resultados, é possível confirmar que o metabolismo da levedura inibiu o crescimento de bactérias, possivelmente em decorrência da produção de metabólitos tóxicos, como também em consequência do esgotamento de nutrientes. Foi também constatado que o contato célula-célula não se fez necessário durante o antagonismo. Resultado semelhante foi observado por Taillandier e colaboradores (2014), que identificaram o efeito inibidor de *S. cerevisiae* ao crescimento da espécie *Torulaspota delbrueckii* em decorrência da produção de metabólitos, sem que houvesse interação física entre as células.

Observa-se também na tabela 11 que o ácido láctico foi produzido em baixas concentrações e em consequência disto, o pH não foi alterado. Na tabela 10, foi observado que mesmo com a disponibilidade de fonte de carbono fermentescível (glicose e frutose), não ocorreu consumo por parte das bactérias. Isso pode estar ligado a não presença de fontes de nitrogênio. Linhagem isolada de leite de búfalo, pertencente à espécie *L. fermentum*, teve crescimento influenciado mesmo na presença de 30 g.L⁻¹ de glicose, devido à não disponibilidade de fonte nitrogenada (D'AMBROSIO et al., 2022).

Os metabólitos etanol, glicerol, ácido acético e succínico não apresentaram alterações após cultivo das bactérias. A associação do etanol e o esgotamento de nutrientes foi relatada como responsável em reduzir a população das BAL (RENAULT; ALBERTIN; BELY, 2013). Levando em consideração de que durante a fermentação alcoólica na indústria, a concentração de etanol atinge valores entre 7 e 11% (LOPES et al., 2016), pode-se presumir que a concentração presente no vinho “pré-fermentado” (35,26 g.L⁻¹ para homofermentativa e 33,694 g.L⁻¹ para heterofermentativa) não foi responsável de forma isolada pela inibição observada. Outros metabólitos produzidos por levedura podem influenciar no crescimento e metabolismo microbiano, entre eles, ácidos graxos de cadeia curta, proteínas, glicoproteínas, ácido acético, acetaldeído toxina *Killer* e SO₂ (RENAULT; ALBERTIN; BELY, 2013).

2.4 Discussão

O estudo da interação entre bactérias lácticas e leveduras é de suma importância devido a sua ocorrência em diversos processos industriais. (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011). A sustentação do crescimento das bactérias lácticas em virtude dos nutrientes produzidos e excretados pela levedura foi observada durante fermentações em cocultivo (BECHTNER et al., 2019; PACZIA et al., 2012; PONOMAROVA et al., 2017). Entretanto, não existem ainda estudos que mostrem que isso ocorra em ambiente de fermentação alcoólica para produção de bioetanol.

O melão sintético desenvolvido por Lino, Basso e Sommer (2018) consiste em interessante substrato a ser utilizado durante a mimetização da fermentação alcoólica em cultura pura de levedura. Entretanto, devido à suplementação de peptona como fonte de nitrogênio, o meio não simula o melão de cana em experimentos com bactérias lácticas, pois beneficia seu crescimento além do que ocorre em IM. Em contrapartida, ao analisar a não suplementação de fonte de nitrogênio em SM, foi possível identificar que a levedura apresentou crescimento e fermentação semelhante quando comparado com IM. Ao analisar os dados de cocultivo neste substrato, foi constatado que ao contrário do que relata a literatura (PONOMAROVA et al., 2017), ambas as linhagens não foram beneficiadas com a suplementação do meio por parte da levedura, com redução da população de 108 para 104 UFC.ml⁻¹ e inibição de produção do ácido láctico. O mesmo resultado foi observado durante a fermentação “em etapas”, onde a população de BAL apresentou níveis abaixo de concentração celular (104 UFC.ml⁻¹) quando em substrato “pré-fermentado” por levedura. Estes resultados evidenciam ser o esgotamento de nutrientes fator chave para compreender a ação antagonista das leveduras durante fermentação (TAILLANDIER et al., 2014).

Para avaliar se em melaço de cana ocorre o beneficiamento, as linhagens de contaminantes foram analisadas em cultura pura e cocultivo com levedura durante batelada alimentada com IM. O melaço de cana é proveniente da indústria de açúcar, onde é obtido a partir do processo de evaporação e centrifugação para separação de cristais de sacarose. Nesta etapa são produzidos os melaços A, B e C classificados de acordo com o nível de seu esgotamento. Quanto mais esgotado o melaço, menor será a concentração de nutrientes e sacarose (DE AMORIM; BASSO; LOPES, 2009). Os resultados indicaram que o melaço de cana promoveu crescimento e metabolismo de bactérias lácticas, mesmo sem terem esgotado a glicose e a frutose. Entretanto, quando na presença da levedura, os contaminantes apresentaram redução do crescimento e produção de ácido láctico. Os resultados indicam que a levedura apresentou ação antagonista durante o cocultivo. Isso mostra que possivelmente ocorra constante competição por aminoácidos presentes no melaço de cana.

A competição por nutrientes durante a fermentação foi relatada como um dos principais fatores que resultam na queda de rendimento da fermentação e pode resultar na queda da viabilidade celular da levedura, interferindo em seu crescimento e metabolismo, e conseqüentemente, na produção de etanol. (BAYROCK; INGLEDEW, 2004; 47 NARENDRANATH et al., 1997). Collograi, da Costa e Ienczak (2019) ao analisarem a bactéria *L. fermentum* com concentração de 108 UFC.ml^{-1} interagindo com a levedura da espécie *Saccharomyces passalidarum*, observaram que a bactéria não foi passível de promover a redução da produção de etanol, sendo a deficiência nutricional do meio sintético utilizado um dos possíveis motivos. Sendo assim, presume-se que a presença de nutrientes, principalmente de fontes de nitrogênio é fator limitante para os contaminantes durante a interação.

Semelhante aos autores citados, a redução de etanol somente foi observada quando a bactéria apresentou crescimento e não teve metabolismo inibido. Em cocultivo de IM, onde ocorreu crescimento e produção de ácido láctico, a concentração de etanol foi de $53,93 \text{ g.L}^{-1}$ na presença de homo e $51,28 \text{ g.L}^{-1}$ na presença da heterofermentativa. Ao comparar com o cocultivo em SM (sem peptona) a concentração de etanol foi de $58,79 \text{ g.L}^{-1}$ na presença da homo e $59,98 \text{ g.L}^{-1}$ na presença da heterofermentativa. Vale ainda destacar nestes resultados a redução da produção de etanol quando a levedura estava na presença da bactéria heterofermentativa. Bactérias com esse perfil metabólico tem sido relatada como competitivas durante os ciclos fermentativos para mimetização do processo de fermentação brasileiro, reduzindo a produção de etanol e aumentando sua população ao longo de ciclos fermentativos (BASSO et al., 2014).

Possivelmente, não só a competição por nutrientes ocorra durante a fermentação. A produção de metabólitos com ação inibidora por parte das leveduras pode ter ação antagonica

durante a interação com BAL (BASSO; DE AMORIM; ALVES, 1997; DA SILVA-NETO et al., 2020). Apesar do etanol ter ação inibidora, bactérias lácticas apresentam tolerância a altas concentrações do metabólito. Da Silva-Neto et al. (2020) avaliaram o uso de etanol para inibir o crescimento de bactérias lácticas durante o processo Melle-Boinot e observaram que a queda da viabilidade celular só ocorreu quando o etanol estava em concentração de 22%. Para que houvesse redução de viabilidade em concentração de 5% de etanol, foi necessária a adição em conjunta com o ácido sulfúrico para redução do pH para 2,0. Durante a fermentação em cocultivo em IM e SM, como também para a fermentação “em etapas” a concentração de etanol não excedeu a 6%, sendo assim, somente a presença do metabólito não explica a inibição dos contaminantes. A literatura relata outros metabólitos produzidos por leveduras e que podem apresentar-se como tóxicos para microrganismos. Peptídeos excretados por leveduras podem alterar o pH intracelular e a permeabilidade da membrana das bactérias (BRANCO et al., 2015), já 48 compostos voláteis orgânicos foram relatados como inibidores para microrganismos. (BRANCO et al., 2015; JOUHTEN et al., 2016).

Os dados reportados no presente estudo mostram que bactérias lácticas com perfil metabólico homo e heterofermentativo apresentam crescimento e metabolismo influenciados quando em substrato deficiente de fonte de nitrogênio e aminoácidos. Ainda, o metabolismo da levedura durante a fermentação não realiza a suplementação do meio com nutrientes e fatores de crescimento para beneficiamento das bactérias lácticas contaminantes. Além disso, a interação entre ambas as linhagens de bactérias contaminantes e a cepa de levedura ocorre independente do contato físico célula-célula, sendo a competição por nutrientes e a produção de metabólitos com potencial ação inibidora, fatores-chaves para compreensão da interação durante fermentação no contexto das indústrias brasileiras de bioetanol.

Referências

- ABEDI, E.; HASHEMI, S. M. B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, v. 6, n. 10, p. e04974, 1 out. 2020.
- ALI, S. E. et al. Profiling Metabolites and Biological Activities of Sugarcane (*Saccharum officinarum* Linn.) Juice and its Product Molasses via a Multiplex Metabolomics Approach. *Molecules*, v. 24, n. 5, p. 934, 2019.
- BASSO, L.; BASSO, T.; ROCHA, S. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. [s.l.] InTech, 2011.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 1 nov. 2008.
- BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; ALVES, D. M. . The antibacterial of succinic acid produced by yeast during fermentation. *Revista de Microbiologia*, p. 77–82, 1997.

- BASSO, T. O. et al. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 169–177, 2014.
- BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: Nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.
- BECHTNER, J. et al. Proteomic Analysis of *Lactobacillus nagelii* in the Presence of *Saccharomyces cerevisiae* Isolated From Water Kefir and Comparison With *Lactobacillus hordei*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 325, 2019.
- BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.
- BONATELLI, M. L. et al. Characterization of the contaminant bacterial communities in sugarcane first-generation industrial ethanol production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 17, 15 set. 2017.
- BRANCO, P. et al. Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 112–118, 16 jul. 2015.
- BRANCO, P.; DINIZ, M.; ALBERGARIA, H. Evaluation of the Biocontrol Potential of a Commercial Yeast Starter against Fuel-Ethanol Fermentation Contaminants. **Fermentation**, v. 8, n. 5, p. 233, 2022.
- CEAPA, C. et al. Correlation of *Lactobacillus rhamnosus* Genotypes and Carbohydrate Utilization Signatures Determined by Phenotype Profiling. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5458–70, 15 ago. 2015.
- CHERUBIN, R. A. Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminação Bacteriana na Fermentação Alcoólica. **Escola Superior de Agricultura Luiz da QUEIROZ**, v. 1, p. 124, 2003.
- COLLOGRAI, K. C.; DA COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Effect of contamination with *Lactobacillus fermentum* I2 on ethanol production by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 12, p. 5039–5050, 15 jun. 2019.
- CORSETTI, A.; CIARROCCHI, A.; PRETE, R. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. In: **Reference Module in Food Science**. Elsevier, 2016.
- D'AMBROSIO, S. et al. *Limosilactobacillus fermentum* from buffalo milk is suitable for potential biotechnological process development and inhibits *Helicobacter pylori* in a gastric epithelial cell model. **Biotechnology Reports**, v. 34, n. April, p. e00732, 2022.
- DA SILVA-NETO, J. M. et al. Can ethanol partially or fully replace sulfuric acid in the acid wash step of bioethanol production to fight contamination by *Lactobacillus fermentum*? **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 2, p. 323–332, 1 jun. 2020.
- DE AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M. et al. (Eds.). **The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries**. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p. 39–46.
- DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. *Lactobacillus* SPP.: General Characteristics. **Reference Module in Food Science**, n. September, 2016.

- DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1960.
- DUMBREPATIL, A. et al. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 333, jan. 2008.
- ENGLEZOS, V. et al. Cell-to-cell contact mechanism modulates *Starmerella bacillaris* death in mixed culture fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 289, n. May 2018, p. 106–114, 2019.
- HAYEK, S. A. et al. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n. 11, p. 73–87, 1 nov. 2013.
- JOUHTEN, P. et al. *Saccharomyces cerevisiae* metabolism in ecological context. **FEMS yeast research**, v. 16, n. 7, 2016.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial production of lactic acid: the latest development. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 967–977, 2016.
- KAPETANAKIS, G. C. et al. Overlapping Roles of Yeast Transporters Aqr1, Qdr2, and Qdr3 in Amino Acid Excretion and Cross-Feeding of Lactic Acid Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. November, p. 1–12, 2021.
- KEMSAWASD, V. et al. Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. **APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY**, v. 99, p. 10191–10207, 2015.
- KOTZAMANIDIS, C.; ROUKAS, T.; SKARACIS, G. **Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130**. [s.l: s.n.].
- LINO, F. S. D. O.; BASSO, T. O.; SOMMER, M. O. A. A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 11 ago. 2018.
- LINO, S. D. O. Unravelling the microbiome of industrial sugarcane biorefineries Unravelling the microbiome of industrial sugarcane biorefineries Felipe Senne de Oliveira Lino. 2019.
- LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 47 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 64–76, dez. 2016.
- LUCENA, B. T. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.
- MARQUES, W. L. et al. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. fov107, 1 fev. 2016.
- MCFEETERS, R. F.; CHEN, K. H. Utilization of electron acceptors for anaerobic mannitol metabolism by *Lactobacillus plantarum*. Compounds which serve as electron acceptors. **Food Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 73–81, 1986.
- MOZZI, F. et al. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: FERNANDA MOZZI, RAÚL R. RAYA, AND G. M. V. (Ed.). **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2010. v. 1p. 33.
- NARENDRANATH, N. V. et al. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4158–4163, 1997.

- 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**, v. 71, n. 5, p. 2239–43, 1 maio 2005.
- NISSEN, P.; NIELSEN, D.; ARNEBORG, N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. **Yeast**, v. 20, p. 331–341, 2003.
- PACZIA, N. et al. Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 11 set. 2012.
- PAPADIMITRIOU, K. et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 837–890, 2016.
- PAPIZADEH, M. et al. Screening for efficient nitrogen sources for overproduction of the biomass of the functionally probiotic *L. plantarum* strain RPR42 in a cane molasses-based medium. **AMB Express**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- PONOMAROVA, O. et al. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. **Cell Systems**, v. 5, n. 4, p. 345- 357.e6, 2017.
- RAGHAVENDRAN, V. et al. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 110, n. 7, p. 971–983, 1 jul. 2017.
- RAPOSO, M. S. **Metabólitos excretados na fermentação alcoólica como possíveis substratos para o crescimento do gênero *Lactobacillus***. Piracicaba Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, jul. 2018.
- RENAULT, P. E.; ALBERTIN, W.; BELY, M. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. **APPLIED MICROBIAL AND CELL PHYSIOLOGY**, v. 97, p. 4105–4119, 2013.
- STOLZ, P.; VOGEL, R. F.; HAMMES, W. P. Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung** 1995 201:4, v. 201, n. 4, p. 402–410, jul. 1995.
- SUGAHARA, H. et al. D- and L-amino acid concentrations in culture broth of *Lactobacillus* are highly dependent on the phylogenetic group of *Lactobacillus*. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 27, n. March, p. 101073, 2021.
- TAILLANDIER, P. et al. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 1959–1967, 2014.
- TSUCHIYA, K. et al. A decay effect of the growth rate associated with genome reduction in *Escherichia coli*. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, 3 set. 2018.
- V. AMORIM; L.C. BASSO; M.L. LOPES, H. . Sugar cane juice and molasses , beet molasses and sweet sorghum : Composition and usage. **The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**, v. Vi, n. March 2017, p. 39–46, 2009.
- VON WEYMARN, N.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1207–1213, 2002.

- XU, D. et al. Label-free quantitative proteomic analysis reveals the lifestyle of *Lactobacillus hordei* in the presence of *Sacchomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 294, p. 18–26, 2 abr. 2019.
- ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 15 abr. 2020.

Tabela suplementar

Tabela 1. Composição e concentração de fonte de carbono e nutrientes utilizados para produção de melão sintético. A solução de vitamina foi esterilizada a partir de filtração em membrana com poro de 0,22µm de diâmetro. (LINO; BASSO; SOMMER, 2018)

Categoria	Nutriente	g.L⁻¹
Açúcares	Sacarose	140*
	Glicose	15*
	Frutose	15*
Nitrogênio	Peptona	4,9**
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ ·4H ₂ O	1,42
Ácido orgânico	Ácido trans-aconítico	2
	Ácido málico	1
	Ácido cítrico	0,01
Sais minerais	NaCl	0,5
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,002
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,06712
	KCl	0,012
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0004
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0004
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,017
	Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0,031
	KI	0,012
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0004
	H ₃ BO ₃	0,0005
	Vitaminas	Inositol
Ácido Nicotínico		0,01
Pantotenato de Calcio		0,001
Biotina		0,00001
Cloridrato de Piridoxina		0,00004
Cloridrato de Tiamina		0,00004
Ácido para-Aminobenzóico		0,002

* Concentração de acordo com melão de cana

** Usada somente quando houve necessidade de suplementação

3 PROTEÔMICA E METABOLÔMICA INTRACELULAR DE LEVEDURA PARA ESTUDO DA INTERAÇÃO COM BACTÉRIAS LÁTICAS DURANTE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Resumo

A indústria de bioetanol tem o grupo das bactérias lácticas (BAL) como um dos principais contaminantes da fermentação alcoólica. Quando presentes na dorna de fermentação, bactérias lácticas com metabolismo homo e heterofermentativo interagem com a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, resultando na queda de rendimento fermentativo. Enquanto bactérias homofermentativas são responsáveis por afetar a viabilidade celular e reduzir a produção de glicerol, bactérias heterofermentativas interferem no rendimento de fermentação e aumentam a produção de glicerol. A técnica de proteômica e metabolômica não alvo tem sido empregadas para estudo da interação entre leveduras e bactérias lácticas em diversos ambientes, possibilitando identificar regulação de vias, biossíntese de metabólitos entre outros processos biológicos. A competição por nutrientes e a produção de ácido láctico pelos contaminantes são relatados como principais fatores que interferem na fermentação, entretanto, somente tais efeitos não explicam a queda de rendimento observada na indústria. Sendo assim, o presente estudo teve como finalidade estudar o proteoma e metaboloma da levedura quando interagindo com bactérias lácticas homo e heterofermentativa. Os resultados indicaram que a produção de glicerol é regulada quando na presença da bactéria homofermentativa pela enzima diidroxiacetona quinase (DAK1), responsável pela metabolização da diidroxiacetona a diidroxiacetona fosfato, reduzindo o acúmulo tóxico deste metabólito em meio intracelular. O desvio de glicose-6-fosfato para a via das pentoses mostrou ser maior do que em relação ao controle (cultura pura de levedura), possivelmente para manter o balanço redox celular e devido a necessidade de biossíntese de nutrientes, resultante do esgotamento nutricional. Por fim, ambas as espécies de bactérias inoculadas simultaneamente não surtiram efeitos em parâmetros fermentativos, indicando a possível interação entre bactérias lácticas a ser investigada em futuros estudos.

Palavras-chave: Leveduras, Bactérias lácticas, Proteômica; Metabolômica; Fermentação alcoólica; Bioetanol

Abstract

The bioethanol industry has the group of lactic acid bacteria (LAB) as one of the main contaminants of alcoholic fermentation. When present in the fermentation tank, lactic acid bacteria with homo and heterofermentative metabolism interact with the yeast of the *Saccharomyces cerevisiae* species, resulting in a decrease in fermentative yield. While homofermentative bacteria are responsible for affecting cell viability and reducing glycerol production, heterofermentative bacteria interfere with fermentation yield and increase glycerol production. Proteomics and non-target metabolomics techniques have been used to study the interaction between yeast and lactic acid bacteria in different environments, making it possible to identify pathway regulation, metabolite biosynthesis and other biological processes. Competition for nutrients and the production of lactic acid by contaminants are reported as the main factors that interfere with fermentation, however, these effects alone do not explain the drop in yield observed in the industry. Therefore, the present study aimed to study the proteome and metabolome of yeast when interacting with homo and heterofermentative lactic acid bacteria. The results indicated that the production of glycerol is regulated when in the presence of the homofermentative bacteria by the enzyme dihydroxyacetone kinase (Dak1), responsible for the metabolism of dihydroxyacetone, reducing the accumulation of intra- and extracellular glycerol. The shift of glucose-6-phosphate to the pentose pathway was shown to be greater than that of the control (pure

yeast culture), possibly due to oxidative stress and the need for amino acid biosynthesis. Finally, the presence of bacteria inoculated simultaneously had no effects during fermentation, indicating an antagonistic relationship between the contaminants.

Keywords: Yeasts, Lactic bacteria, Proteomics; Metabolomics; Alcoholic fermentation; bioethanol

3.1 Introdução

O processo de fermentação alcoólica na indústria de bioetanol apresenta susceptibilidade à presença de contaminantes bacterianos, dos quais, o grupo das bactérias lácticas é o principal responsável em reduzir o rendimento de produção quando interagindo com a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011; LUCENA et al., 2010). As espécies pertencentes ao grupo são classificadas com relação à via metabólica utilizadas para fermentação de carboidratos. Bactérias homofermentativas obrigatórias utilizam a via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) e tem o ácido láctico como principal metabólito da fermentação. A via fosfoquetolase (PKP) é utilizada por bactérias heterofermentativas obrigatórias durante a fermentação de hexose, produzindo ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂. Existem ainda espécies que apresentam ambos os metabolismos e são classificadas como homofermentativas facultativas (ABEDI; HASHEMI, 2020; KANDLER, 1983), entretanto, durante a fermentação alcoólica somente foi observado à presença do metabolismo homofermentativo (VITAL, 2013).

Apesar de a levedura apresentar dominância neste ambiente (ALBERGARIA; ARNEBORG, 2016), características como, o rápido crescimento, tolerância ao baixo pH e as altas concentrações de etanol, resultam na persistência dos contaminantes no processo (BISCHOFF et al., 2009). Estudos que buscaram compreender a interação entre leveduras e BAL deram destaque a dois fatores principais: produção de ácidos orgânicos pelas bactérias e a competição por nutrientes (BAYROCK; INGLEDEW, 2004; BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011).

A produção do ácido láctico e acético foi reportada como responsável pela acidificação do meio extra e intracelular, resultando na queda da viabilidade de levedura (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011; SCHNÜRER; MAGNUSSON, 2005). A competição por nutrientes resulta do fato de que as bactérias lácticas são organismos fastidiosos, e necessitam de substratos com disponibilidade de nutrientes, ocorrendo alta demanda por aminoácidos, fontes de nitrogênio e vitaminas (BAYROCK; INGLEDEW, 2004). Todavia, quando tais fatores foram analisados isoladamente, não apresentaram efeitos deletérios para as leveduras, permitindo supor que isso

ocorra apenas quando estão em sinergismos entre eles e demais fatores ainda desconhecidos (BAYROCK; INGLEDEW, 2004).

Basso e colaboradores (2014) constataram que bactérias com perfis homo e heterofermentativo interagem de forma distinta com a levedura. A bactéria heterofermentativa foi responsável pela queda de rendimento devido ao desvio dos açúcares para produção de metabólitos, como o manitol e ácidos orgânicos, além de induzir a produção de glicerol. Quando a levedura estava na presença da homofermentativa ocorreu maior impacto na viabilidade celular, possivelmente pela alta produção de ácido láctico, e ainda, ocorreu a redução da produção de glicerol.

Com o avanço de novas tecnologias, as técnicas de proteômica e metabolômica não-alvo tem permitido identificar mecanismos de interação quando BAL e leveduras quando em mesmo ambiente. A utilização da proteômica permite o estudo da produção, estrutura, função, interação e modificação de proteínas em determinado estágio celular ou em resposta a estímulos externos (ASLAM et al., 2017). No caso da metabolômica, é possível realizar a leitura funcional da bioquímica celular e identificar alterações no perfil metabólico quando o organismo é exposto a condições distintas (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

O estudo da interação entre leveduras e BAL tem tido interessantes avanços com a utilização de ambas as técnicas. Foi possível identificar que as bactérias apresentam alterações quanto ao metabolismo de carboidratos e em reações de homeostase de $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$. Além disso, foi observado o beneficiamento das bactérias por parte das leveduras com a produção e excreção de aminoácidos (BECHTNER et al., 2019). Ponomarova et al. (2017) identificaram o processo de *cross-finding* de aminoácidos entre leveduras e BAL durante cocultivo. Recentemente, Collograi et al. (2021) estudaram o secretoma de bactéria heterofermentativa quando interagindo com a levedura *Spathaspora passalidarum* durante a fermentação para produção de bioetanol de segunda geração. Os pesquisadores relataram que durante o cocultivo, proteínas envolvidas no metabolismo de carboidrato foram observadas no meio extracelular.

Durante a interação entre levedura *Saccharomyces* e não-*Sacchaormyces*, o uso da metabolômica possibilitou identificar alterações metabólicas em decorrência da exposição a fatores de estresse em decorrência do contato físico entre as células. LI e colaboradores (2012) identificaram a partir da técnica a inibição da via glicolítica e redução da fermentação de carboidratos em levedura quando exposta a diferentes concentrações de etanol.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo utilizar as técnicas de proteômica e metabolômica intracelular não-alvo como forma de identificar os efeitos em leveduras quando na

presença de bactérias lácticas homo e heterofermentativa durante a fermentação alcoólica no contexto das indústrias brasileiras de bioetanol.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Material biológico

As linhagens de bactérias lácticas I4a (Homofermentativa – *Lactiplantibacillus plantarum*) e I4a (Heterofermentativa – *Limosilactobacillus fermentum*) foram isoladas de dorna de Usina do Estado de São Paulo, identificadas a nível de espécie e caracterizadas quanto ao perfil metabólico (RAPOSO, 2018). A linhagem de levedura PE-2 é comercial e amplamente utilizada em usinas de bioetanol (BASSO et al., 2008).

Para preservação das bactérias foi utilizado o meio seletivo Man Rogosa & Sharpe Merck (MRS) (Peptona de caseína 10 g.L⁻¹; Extrato de carne 8,0 g.L⁻¹; Extrato de levedura 4,0 g.L⁻¹; D(+)-glicose 20 g.L⁻¹; hidrogenofosfato dipotássico 2 g.L⁻¹; Tween® 80 1 g.L⁻¹; hidrogênio citrato de diamônio 2 g.L⁻¹; acetato de sódio 5 g.L⁻¹; sulfato de magnésio 0,2 g.L⁻¹; sulfato de manganês 0,04 g.L⁻¹) (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). A levedura PE-2 foi armazenada em meio YPD Yeast extract – Peptone – Dextrose (YPD) (Extrato de levedura 10 g.L⁻¹; D-glicose 20 g.L⁻¹; Peptona 2 g.L⁻¹).

O armazenamento foi realizado em microtubo de 2 ml contendo 20% de glicerol (concentração final) em ultra freezer com temperatura de -80 °C.

3.2.2 Propagação

Bactérias lácticas: A propagação foi realizada em meio MRS líquido em condições estáticas, incubação a 32°C, durante 12 horas (Densidade óptica (DO) 1,0 = 4 x10⁸ UFC.ml⁻¹). A determinação da DO foi feita a partir da análise em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. Após propagação, todo o volume de cultivo foi submetido à centrifugação durante 15 minutos, a 8.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa ressuspendida em água ultrapura esterilizada para utilização como inóculo.

Levedura: Foi utilizado o meio YPD para propagação a qual teve duração inicial de 16 horas sob agitação de 150 rpm e temperatura de 32 °C. O cultivo foi transferido por completo para mosto de cana, livre de sujidades (centrifugação a 10.000 g durante 15 minutos), diluído para concentração de 10% ART e esterilizado. O cultivo teve as mesmas condições mencionadas, entretanto, com duração de 24 horas. Ao final, todo o conteúdo foi transferido para mosto fresco com volume 10x maior e encubado nas mesmas condições mencionadas. O procedimento foi realizado conforme a necessidade de biomassa. Ao final da propagação, todo o conteúdo foi

centrifugado a 8.000 g durante 15 minutos a 4 °C para obtenção de biomassa úmida (RAGHAVENDRAN et al., 2017).

3.2.3 Fermentação

Foram realizadas fermentações para quatro tratamentos: **Controle (Levedura); Levedura + Heterofermentativa; Levedura + Homofermentativo; Levedura Heterofermentativa + Homofermentativa.** Para cada tratamento foram realizadas três repetições biológicas. A mimetização da fermentação foi conduzida conforme Raghavendran e colaboradores (2017) com modificações. O preparo de pé-de-cuba consistiu na utilização de aproximadamente 8 g de biomassa úmida obtida na propagação de levedura (Item 3.2.2) para concentração de 10% (m.v⁻¹) em relação ao volume final de fermentação (80mL). Na biomassa foram acrescentados 4 ml de vinho de propagação para reciclo 1 e vinho da fermentação anterior para reciclos 2, 3 e 4. Além disso, 12 ml de água ultrapura esterilizada foram adicionadas. Tanto a adição do vinho quanto a adição de água simulam a eficiência da centrífuga na indústria. Para os tratamentos com contaminação, a água utilizada foi proveniente da ressuspensão de biomassa obtida na propagação das bactérias (Item 3.2.2) (somente para o reciclo 1), para obtenção da concentração de 3x10⁸ UFC.ml⁻¹ com relação ao volume final da fermentação. Para tratamento na presença de ambas as bactérias foram utilizados 6 ml de água para cada linhagem contendo biomassa ressuspendida. Esta concentração de células foi utilizada com o objetivo de simular o processo industrial quando em infecções consideradas prejudiciais ao rendimento de fermentação (AMORIM et al., 2011). O tratamento da biomassa, antes de iniciar a fermentação, foi realizado para os reciclos 2, 3 e 4 empregando ácido sulfúrico (2 M) para obter pH de 3,0. O material permaneceu nessas condições durante 1 hora. O preparo do pé-de-cuba foi realizado em tubos de fundo cônico de 50 ml. Após tratamento ácido, o material foi homogeneizado e transferidos para tubos do tipo schott com capacidade de 100 ml para dar início a fermentação.

A alimentação de mosto com concentração de 17 % ART foi conduzida em regime de batelada alimentada, com adição de mosto em três porções iguais em volume de 18,66 ml em proveta volumétrica nos tempos 0, 2 e 4 horas de fermentação, totalizando 56 ml de mosto adicionado. A fermentação foi conduzida de forma estática, em temperatura de 32 °C durante 8 horas. Para cada hora de fermentação os frascos foram submetidos a pesagens para cálculo do desprendimento de CO₂. Após este período, os frascos foram deixados em temperatura ambiente para finalizar o consumo de açúcares. Após 2 horas do início da fermentação, foram realizadas amostragens de 1 ml para análise microbiológica (A ser explanado em mais detalhes no item 3.2.4.1). O pH do vinho foi determinado no vinho total de levedurado obtido a partir da

centrifugação a 8.000 g, durante 15 minutos a 4 °C. Do mesmo material, foi coletado 1 ml para análise de metabólitos em HPLC (A ser explanado em mais detalhes no item 3.2.4.2).

Para o reciclo 4 foram realizadas amostragens (1 ml) para todas as repetições biológicas para análise de proteômica (A ser explanado em mais detalhes no item 3.2.6) e metabolômica (A ser explanado em mais detalhes no item 3.2.7). Amostras para metabolômica foram obtidas nos tempos de 0, 6 e 24 horas e para proteômica foram realizadas ao final da fermentação (24 horas). Após centrifugação nas mesmas condições para análise de HPCL, o sobrenadante (vinho) foi separado e a biomassa armazenada imediatamente em ultrafreezer -80 °C para os procedimentos de extração (Item 3.2.6 e 3.2.7).

O rendimento de fermentação foi calculado conforme Raghavendran e colaboradores (2017):

$$\text{Rendimento (\%)} = K \times ((V_w + 0,7 \times P) \times ET - (V_p + 0,7 \times P_p) \times ET_p)$$

$$K = ((10,000 / (64,75 \times V_s \times TRS))$$

V_w = Volume de vinho delevado (mL);

P = Biomassa úmida (g);

ET = Etanol vinho centrifugado (%v/v);

V_p = Volume vinho centrifugado pé-de-cuba – Reciclo anterior (mL);

P_p = Biomassa - reciclo anterior (g);

ET_p = Etanol vinho centrifugado - reciclo anterior (%v/v);

V_s = Volume substrato;

TRS : Açúcar redutor total (g.100mL⁻¹);

64,75 = Fator de conversão, considerando 0,51 g etanol/g ART fornecido.

3.2.4 Parâmetros microbiológicos

3.2.4.1 Microscopia óptica

A determinação da concentração (Cel.mL⁻¹), viabilidade (%) e brotamento (%) celular de levedura foi realizada a partir da contagem em microscopia óptica com objetiva de 40x. Foi empregado o corante eritrosina em tampão fosfato como forma de diferenciar células viáveis de células inviáveis, onde células inviáveis apresentam coloração rósea.

Os valores foram utilizados para cálculo dos parâmetros empregando as seguintes fórmulas:

$$\text{Cel.mL}^{-1} = ((\text{Células viáveis} \times 4000) \times \text{Total de retículos contados}^{-1}) \times \text{Células inviáveis} \times 100$$

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = ((\text{Células viáveis} \times (\text{Células viáveis} + \text{Células inviáveis})) \times 100$$

$$\text{Brotamento (\%)} = (\text{Brotos viáveis} \times \text{Célula viáveis}) \times 100$$

3.2.4.2 Plaqueamento por gota

O plaqueamento por gota foi conduzido para determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹) de bactérias lácticas conforme proposto por Cherubin, (2003) em amostras de inóculo e de fermentação. As amostras foram submetidas a diluição seriada em água ultrapura esterilizada. Uma alíquota de 10 µl em forma de gota foi inoculada em placa de Petri contendo meio MRS acrescido de 1,5% de ágar e cicloheximida (10ppm). Para cada repetição biológica foram realizadas três repetições técnicas. As placas foram incubadas a 32 °C durante 24 horas. Após crescimento, foram realizadas as contagens de colônias e a concentração calculada através da fórmula:

$$\text{UFC.ml}^{-1} = ((\text{Média da replicata técnica}) \times (\text{volume de diluição}^{-1}) \times (\text{D}))$$

Onde:

D = Diluição.

3.2.5 Análise de vinho delevedurado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O vinho delevedurado foi submetido à filtração em membrana de 0,22 µm e diluído com razão de 1:9 (amostra:água). A análise foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (Shimadzu Prominence) com detector index refrativo. Para análise de ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, glicerol e etanol foi utilizada coluna Bio-Rad HPX-78H a 60°C com H₂SO₄ (5mM) como eluente e quociente de vazão de 0,6 mL.min⁻¹. Para análise dos açúcares sacarose, frutose e glicose foi utilizada a coluna Bio-Rad HPX-87C a 85°C com água ultrapura como eluente e quociente de vazão de 0,6 mL.min⁻¹.

3.2.6 Protônica intracelular

Aproximadamente 50 mg de biomassa úmida obtida da fermentação (item 3.2.3) foi utilizada para extração conforme proposto por Hurkman e Tanaka, (1986) com modificações. As amostras foram homogeneizadas a 4 °C por 30 min em 15 ml de tampão de extração (0,5 M TrisHCl, pH 7,5; 0,1 M KCl; 0,05 M EDTA; 0,7 M Sacarose; 2% v.v⁻¹ 2-mercaptoetanol; 2 mM PMSF; 1 % p.v⁻¹ de polivinilpirrolidona). Volume semelhante de tampão (TrisHCl 10 mM, pH 8,0) e fenol saturado foram adicionados às amostras. Após 30 minutos de agitação a 4 °C, as fases foram separadas por centrifugação (10.000 g, 30 min, 4°C). A fase fenólica foi recuperada e extraída com igual volume de tampão de extração. As proteínas foram precipitadas da fase fenólica pela adição de 30 ml de acetato de amônio 0,1 M em metanol e incubadas por 1 h a -20°C, seguida de centrifugação (16.000 g, 30 min, 4°C). O pellet obtido foi lavado três vezes com

acetato de amônio em metanol e uma vez em 30 mL de acetona fria (100%), incubado a -20°C por 1 h, seguido de centrifugação (16.000 g, 30 min, 4°C). O pellet resultante foi seco e solubilizado em 800 μL de tampão TCT (7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 10 mM de DTT e 0,1% (v.v⁻¹) Triton X-100). A solubilização completa da proteína foi alcançada agitando vigorosamente com vórtex. Os extratos proteicos foram dessalinizados por filtro Amicon®Ultra-0,5 mL 3K-NMWL (Millipore).

A concentração de proteína foi determinada usando o ensaio de Bradford (MM, 1976) e confirmada por eletroforese SDS PAGE (LAEMMLI, 1970). Cinquenta microgramas de amostra de proteína foram desnaturados com 25 μL de 0,2% RapiGest SF (Waters) a 80°C por 15 min; reduzido com 2,5 μL de ditiotreitol 100 mM (GE Healthcare) a 60°C por 30 min; e alquilado com 2,5 μL de 300 mM de iodoacetamida (GE Healthcare) à temperatura ambiente por 30 min no escuro. As amostras foram então digeridas enzimaticamente com tripsina (tripsina modificada com grau de sequenciação, Promega) a uma razão enzima: proteína de 1:100 (p.p⁻¹). Após a digestão, 10 μL de ácido trifluoroacético a 5% foram adicionados à mistura digerida. As amostras digeridas foram então incubadas a 37°C durante 90 min para hidrolisar o RapiGest. Após a digestão, a mistura de peptídeos foi dessalinizada utilizando o ZipTip Reversed-Phase ZipTip C18, de acordo com o fabricante (Millipore) e secas em concentrador à vácuo (Concentrador 5301, Eppendorf) e armazenadas em -80°C até o momento da análise.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas com o auxílio do sistema cromatográfico *nanoElute nanoflow*, da Bruker Daltonics, Bremen, Germany, acoplado *online*, a um espectrômetro de massas *hybrid trapped ion mobility spectrometry-quadrupole time-of-flight mass spectrometer-timsTof Pro*, da Bruker Daltonics. Uma alíquota (1 μL) de amostra, equivalente a 200 ng de peptídeos digeridos foi injetada em uma coluna *Aurora 2 C18 trap column* (1.6 μm , 250mm x 75 μm), da ionOpticks, Austrália. Um gradiente típico RP (Solvente A: 0.1% AF, 99.9% H₂O MilliQ; Solvente B: 0.1% AF, 99.9% CH₃CN) foi estabelecido em um sistema de *nanofluxo* de cromatografia líquida e separado a uma taxa de fluxo de 250 nL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida a 50°C . A corrida cromatográfica foi de 120 min (2% a 15% do Solvente B durante 60 min; elevada a 25% aos 90 min; elevada a 37% aos 100 min; elevada a 95% aos 110 min e finalmente 95% por 10 min para lavagem da coluna) (MACRON et al., 2020).

A coluna foi acoplada, *online*, a um timsTOF-Pro com uma fonte de íons *CaptiveSpray*, ambos da Bruker Daltonics GmbH. A temperatura da linha de transferência capilar de íons foi ajustada para 180°C . O acúmulo de íons, por 123 ms e a separação por mobilidade foram obtidos com uma rampa de potencial de entrada de -160V a -20V dentro dos 123s.

Durante à aquisição, para habilitar o método PASEF, *i.e.*, o acúmulo paralelamente à fragmentação dos íons, as informações de precursor de m/z e mobilidade foram primeiro derivadas de um experimento de *full scan Tims-MS*, com uma faixa de m/z de 100-1700. Precursores monocarregados foram excluídos por sua posição no plano m/z -*ion* de mobilidade, e os precursores que atingiram o valor alvo de 20.000 *a.u.* foram dinamicamente excluídos por 0,4 min. O processamento dos dados, a identificação de proteínas e as análises de quantificação relativa foram realizadas utilizando-se o *Software MaxQuant Version 2.1.3.0*.

Os parâmetros de processamento incluíram: carbamidometilação da cisteína como modificação fixa de aminoácidos. Já a oxidação da metionina e acetilação da região N-terminal, foram consideradas como variações variáveis. A tripsina foi utilizada como enzima proteolítica, com o máximo de 3 possíveis erros de clivagem. Uma máxima taxa de falso positivos (*False Discovery Rate* - FDR) de 1% foi utilizada para identificação de peptídeos e proteínas, considerando-se como critério, ao menos um peptídeo único para identificação de proteínas. Todas as proteínas foram identificadas com um grau de confiança $\geq 95\%$, utilizando-se o algoritmo do MaxQuant *Software* e busca dentro da base de dados de proteínas de *Lactiplantibacillus plantarum* (NCBI), *Limosilactobacillus fermentum* (NCBI) e *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI). Análise subsequente, foi realizada com auxílio do Software Perseus (*Version 2.0.6.0*). Os arquivos *proteinGroups.txt* gerados pelo processamento do MaxQuant foram utilizados para as análises, e todas as linhas listadas como sendo: *Reverse*, *Only identified by site* e *Potential contaminat*, foram removidas. Somente as proteínas identificadas em $>50\%$ das três repetições biológicas, de pelo menos um grupo amostral, foram consideradas para a análise estatística (Item 3.2.8).

3.2.7 Metabolômica intracelular

Os metabólitos intracelulares foram analisados seguindo Smart e colaboradores (2010) com pequenas modificações. A extração foi iniciada com aproximadamente 100 mg de biomassa úmida em microtubo previamente tratado com metanol. Volume de 400 μL de solução extratora composta de clorofórmio:água :metanol (1:1:3) contendo ácido succínico (D4, 98%), ácido mirístico (1,2,3- $^{13}\text{C}_3$, 99%) e ácido palmítico (1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$, 98%) como padrões internos foram adicionados. Posteriormente, as amostras foram submetidas à sonicador durante 15 min em gelo + água para garantia da integridade do material. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4 °C e 16.000 g. Este procedimento foi repetido por três vezes

Para análise, um dia anterior, 100 μL da amostra foi liofilizado a -50 °C durante 4 horas. A derivatização e metoxiaminação foram conduzidas de acordo com Budzinski et al., (2016). Para análise foi utilizado 1 μL de amostra injetada no modo splitless em um cromatógrafo gasoso

7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), acoplado a um processador automático Comb-Xt (Leap Technologies, Carrboro, EUA). A injeção a temperatura foi de 280 °C e a vazão de purga do septo foi de 20 mL min⁻¹ com duração de 60 segundos. O fluxo de hélio a velocidade através da coluna foi de 1 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida a 80 °C por dois minutos e então aumentou 15 °C a cada minuto até atingir a temperatura de 305°C, que foi mantida por mais 10 minutos. O efluente da coluna foi inserido em uma fonte de ionização de cromatografia gasosa com espectrometria de massa de tempo de voo 81 (Pegasus 4D, Leco Corp., St. Joseph, EUA) composto por duas colunas de sílica fundida - coluna de primeira dimensão (Agilent DB-5) 20 m de comprimento (diâmetro interno de 0,18 mm x filme de 0,18 µm); coluna de segunda dimensão 0,96 m (RXT-170,10 mm interior diâmetro x filme de 0,10 µm). A temperatura da linha de transferência e da fonte de íons foram 280 e 250 °C, respectivamente. Um feixe de elétrons de 70 eV gerou íons em uma corrente de ionização de 2,0 mA, e 10 espectros s⁻¹ foram registrados na massa faixa de 45-800 m/z. O software ChromaTOF v.4.51 (Leco Corp., St. Joseph, EUA) foi usado para realizar correção e exportar todos os arquivos MS em formato NetCDF.

Correção da linha de base, detecção de pico, alinhamento do tempo de retenção (parâmetros definidos como linha de base 1, largura de pico 2, s/n 250) e correspondência de biblioteca, definindo similaridade mínima de 700, foram realizados com NIST Database v.11, utilizando o software Leco ChromaTOF (versão 3.25). As intensidades de metabólitos foram normalizadas por TIC (soma da contagem total de íons). Siloxanos e metabólitos ausentes em pelo menos metade das amostras em um grupo foram excluídos. A análise de dados foi realizada conforme item 3.2.8.

3.2.8 Análise de dados

Os dados de parâmetros fermentativos foram testados quanto à existência de diferença significativa utilizando o pacote *Agricolae* no software RStudio, para análise de variância (ANOVA) seguido do Teste Tukey com $p \leq 0,05$.

Para as análises de proteômica e metabolômica foram obtidas as matrizes contendo os valores de abundância de três repetições biológicas. A análise univariada foi realizada no Software *MetaboAnalyst 5.0* (XIA et al., 2009; CHONG et al., 2018) (Disponível em <https://www.metaboanalyst.ca/>). Os dados não pareados foram normalizados, transformados em log₁₀(p) e dimensionados em Pareto. A análise estatística foi realizada por Volcano plot, e análise de *Fold Change e threshold* (FC) (limite de 2) e teste-t FDR $p \leq 0,05$. As proteínas com abundância significativa (*Down e up*) foram utilizadas na obtenção do Heatmap para visualização

do contraste entre as proteínas para cada tratamento. Os dados reportados são referentes à média de abundâncias de três repetições biológicas. As abundâncias totais de metabólitos para cada horário em cada tratamento foram submetidas à Análise de Componentes Principais (PCA).

Para acesso ao termo GO para identificação dos processos biológicos e função molecular de cada proteína foi utilizado o banco de dados *Saccharomyces Genome Database* disponível em <https://www.yeastgenome.org/>. Para a identificação das classes e subclasses de metabólitos, foi utilizado o banco de dados *Yeast Metabolome Database* disponível em <http://www.ymdb.ca/> e *The Human Metabolome Database* disponível em <https://hmdb.ca/>.

3.3 Resultados

3.3.1 Parâmetros fermentativos

Para avaliar a influência das bactérias lácticas em fermentações de mosto composto de melão de cana, foram realizados ensaios em cocultivos, ou seja, cultivos com a levedura na presença das BAL de dois tipos metabólicos (homo e heterofermentativa). Para tal, nos cocultivos, as BAL foram inoculadas separadamente (apenas um tipo metabólico) e simultaneamente (ambos os tipos metabólicos, em igual proporção), na concentração inicial de cerca de 10^8 UFC. ml⁻¹. Foi realizado também ensaio controle, inoculado apenas com a levedura. Assim, os tratamentos foram os seguintes: Levedura + Heterofermentativa (*L. fermentum*), Levedura + Homofermentativa (*L. plantarum*), Levedura + Heterofermentativa + Homofermentativa. A razão pela qual foram realizados cocultivos com BAL inoculadas simultaneamente (ambos os tipos metabólicos), deve-se ao fato de que os dois tipos coexistem no contexto industrial (COSTA et al., 2008; GALLO, 1990; LINO, 2019).

Os parâmetros fermentativos foram analisados ao final de cada fermentação ao longo de 4 ciclos. Nas Figuras 1 e 2, são apresentados o rendimento da fermentação e a cinética de evolução de CO₂ (estimado por pesagens) ao longo de cada ciclo fermentativo.

O rendimento quando na presença da bactéria heterofermentativa apresentou redução durante os ciclos 1, 2 e 4, sendo neste último ciclo o menor rendimento observado (77,7%, em relação ao rendimento estequiométrico máximo da fermentação de cerca de 0,51 g etanol/g ART fornecido). Quando a homofermentativa foi inoculada separadamente, a redução ocorreu somente no primeiro e último ciclo. No caso do tratamento na presença das duas bactérias em cocultivo, o parâmetro não foi influenciado de forma expressiva. O desprendimento de CO₂ apresentou redução somente quando na presença de ambas as bactérias e para o tratamento com a heterofermentativa isoladamente. Apesar de interferir no rendimento fermentativo, não foi observada influência quanto ao desprendimento de CO₂ na presença da homofermentativa.

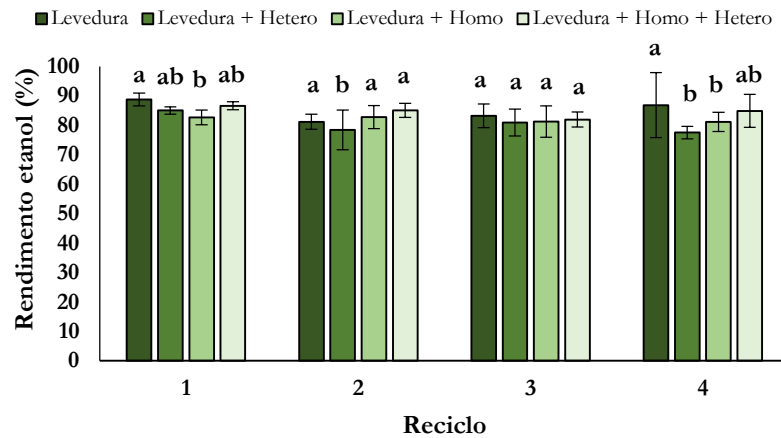
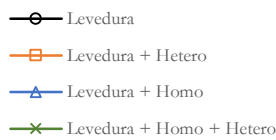
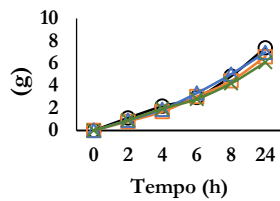
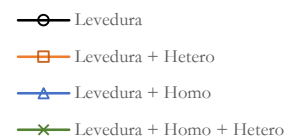
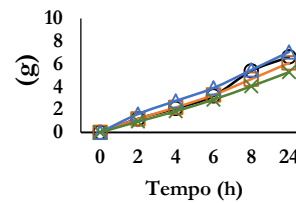


Figura 1. Rendimento de fermentação (%). As análises foram realizadas em 3 repetições biológicas e os valores de média foram reportados com seus respectivos desvios. Letras minúsculas apresentadas no gráfico referem-se ao resultado obtido em teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

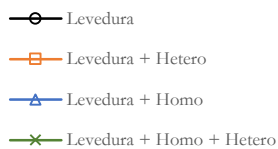
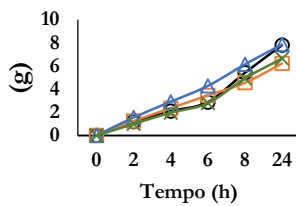
Reciclo 1



Reciclo 2



Reciclo 3



Reciclo 4

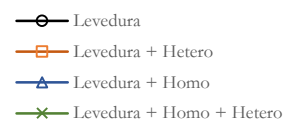
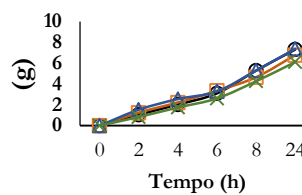


Figura 2. Velocidade de fermentação obtida a partir do CO_2 desprendido acumulado durante 4 reciclos. Os valores foram obtidos a partir da diferença de peso dos frascos da fermentação. Preto: Levedura (controle); Laranja: Levedura + Hetero; Azul: Levedura + Homo; Verde: Levedura + Homo + Hetero. As análises foram realizadas em 3 repetições biológicas e os valores de média foram reportados com seus respectivos desvios.

O glicerol mostrou ter sua produção influenciada de formas distinta para cada perfil metabólico de bactéria, mostrando ser importante no estudo da presença de contaminantes

durante a fermentação (Tabela 1). Para a bactéria homofermentativa, o vinho apresentou concentração inferior ao controle em todos os ciclos, diferente disto, a concentração na presença da heterofermentativa foi superior se comparado quando a levedura estava em cultura pura na fermentação. Para o tratamento na presença de ambas, a concentração foi intermediária, o que evidencia os resultados obtidos quando as bactérias estavam separadas. As bactérias lácticas homo e heterofermentativas foram relatadas como responsáveis em interferir na concentração do metabólito presente no vinho fermentativo (BASSO et al., 2014). Apesar da literatura reportar que bactérias heterofermentativas podem produzir glicerol (DEMOSS; BARD; GUNSALUS, 1951) e de que bactérias homofermentativas podem levar à menor produção de glicerol pelas leveduras (SENNE DE OLIVEIRA LINO et al., 2021), não se tem conhecimento sobre os fatores que levam a isso no contexto da fermentação alcoólica brasileira.

A produção do glicerol pela levedura pode ser resultado de outros processos metabólitos que ocorrem durante a fermentação alcoólica. O dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) excedente, oriundo tanto da produção do ácido succínico, como do crescimento da levedura, é oxidado através da formação de glicerol, com o intuito de manter o balanço redox da célula em condições anaeróbicas (BASSO; DE AMORIM; ALVES, 1997; WANG et al., 2001). O ácido succínico teve sua concentração superior para a heterofermentativa durante os ciclos 2 e 4, entretanto, para a homofermentativa não mostrou interferência (tabela 1). É interessante notar que a biomassa úmida de levedura ao longo dos ciclos foi levemente maior (porém sem diferença estatística) no tratamento com a bactéria homofermentativa, quando comparada à condição controle (Tabela 2), talvez resultado do menor desvio da fonte de carbono para a formação de glicerol pela levedura na primeira condição (Tabela 2).

Tabela 1. Açúcares residuais (AR %), principais metabólito da levedura e pH do vinho de levedurado ao final da fermentação para os 4 tratamentos durante 4 ciclos. As análises foram realizadas em 3 repetições biológicas e os valores de média foram reportados com seus respectivos desvios. Letras minúsculas apresentadas ao lado de cada valor referem-se ao resultado obtido em Teste de Tukey com $p < 0,05$. Letras semelhantes apresentaram valores sem diferença significativa e letras distintas apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

Tratamento	Reciclo	Glicerol (g.L ⁻¹)	Ác. Succínico (g.L ⁻¹)	Ác. Acético (g.L ⁻¹)	pH
Levedura	1	4.33±0.01ab	0.37±0.00b	1.03±0.02b	4.89±0.15a
Levedura + Hetero		4.59±0.04a	0.84±0.01a	3.33±0.14a	4.50±0.14a
Levedura + Homo		4.00±0.09b	0.37±0.01b	1.63±0.07ab	4.40±0.07a
Levedura + Hetero + Homo		4.35±0.04ab	0.32±0.01b	1.97±0.03ab	4.49±0.42a
Levedura	2	4.14±0.12ab	0.29±0.17a	1.40±0.26bc	4.90±0.01a
Levedura + Hetero		4.31±0.04a	0.34±0.01a	2.77±0.49a	4.21±0.0b
Levedura + Homo		3.93±0.03b	0.32±0.04a	1.00±0.95c	4.42±0.1b
Levedura + Hetero + Homo		3.69±0.01b	0.25±0.02b	1.64±2.48b	4.39±0.1b
Levedura	3	4.24±0.02b	0.19±0.01c	1.37±0.06c	4.82±0.02a
Levedura + Hetero		4.91±0.05a	0.35±0.02a	3.77±0.17a	3.83±0.0d
Levedura + Homo		4.23±0.07b	0.21±0.02b	1.90±0.07c	4.22±0.0b
Levedura + Hetero + Homo		4.20±0.04b	0.27±0.03ab	2.33±0.06b	3.99±0.01c
Levedura	4	4,36±0,3ab	0.62±0.00b	1.37± 0.01c	4,84±0,05a
Levedura + Hetero		5,59±0.08a	0.87±0.01a	5.44±0.01a	3,75±0,05c
Levedura + Homo		3,521±0.04b	0.67±0.00b	1.43±0.01c	4,28±0,0b
Levedura + Hetero + Homo		4,15±0.03b	0.64±0.00b	2.59±0.01b	3,74±0,06c

Durante os ciclos, o ácido acético apresentou aumento de concentração quando na presença de bactérias heterofermentativa. Cabe destacar, que o aumento da concentração de ácido acético quando se comparara o quarto ciclo com o primeiro ciclo, foi de 63 % (de 3,33 para 5,44 g. L⁻¹, respectivamente) nos cultivos com a bactéria heterofermentativa, e de apenas 31 % (de 1,97 para 2,59 g. L⁻¹, respectivamente) nos cultivos inoculados com as duas bactérias. Talvez isso seja um indicativo de que as duas bactérias tenham uma relação de antagonismo entre si, podendo estar associado ao balanço redox, uma vez que bactérias heterofermentativas produzem o ácido acético, como forma de gerar mais ATP, quando o balanço redox não precisa ser ajustado pela produção de etanol (PIGGOT et al., 2003; VAN NIEL et al., 2012) (Tabela 1).

Tabela 2. Biomassa úmida (g), Cel.mL⁻¹ e viabilidade celular de levedura para os 4 tratamentos durante 4 reciclos. As análises foram realizadas em 3 repetições biológicas e os valores de média foram reportados com seus respectivos desvios. Letras minúsculas apresentadas ao lado de cada valor referem-se ao resultado obtido em Teste de Tukey com p<0,05. Letras semelhantes apresentaram valores sem diferença significativa e letras distintas apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

Tratamento	Reciclo	Biomassa úmida (g)	Cel.mL ⁻¹ (10 ⁶)	Viabilidade (%)
Levedura	1	8.03±0.14a	15,8±12,3a	95.00±4.36b
Levedura + Hetero		7.94±0.10a	21,6±10,5a	94.67±3.06ab
Levedura + Homo		8.18±0.11a	15,4±12,8a	94.17±4.54ab
Levedura+ Hetero + Homo		8.02±0.05a	7.83±2.02b	97.33±2.08a
Levedura	2	8.16±0.13a	16,7±18,5b	98.67±0.58a
Levedura + Hetero		8.14±0.05a	20,7±297b	92.33±0.58c
Levedura + Homo		8.24±0.14a	31,3±28,0a	94.83±1.26bc
Levedura + Hetero + Homo		8.20±0.15a	15,3±12,8b	96.00±2.00ab
Levedura	3	8.31±0.03a	9.33±1.15b	94.67±0.58a
Levedura + Hetero		8.26±0.10a	24,0±26,9a	89.00±7.94a
Levedura + Homo		8.32±0.13a	28,0±23,1a	93.33±2.52a
Levedura + Hetero + Homo		8.27±0.15a	17,7±22,5b	90.33±1.53ab
Levedura	4	8.03±0.14a	7.50±2.1a	91.33±4.04a
Levedura + Hetero		7.94±0.10a	4.33±1.26a	83.33±3.79b
Levedura + Homo		8.18±0.11a	5.67±0,57a	89.67±0.58a
Levedura + Hetero + Homo		8.02±0.05a	7.43±0,40a	86.67±7.64ab

A viabilidade celular da levedura apresentou redução em todos os reciclos quando as bactérias estavam presentes, possivelmente em decorrência da presença de ácido láctico e acético no meio, como também por outros metabólitos tóxicos para a levedura (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011) (Tabela 2). O ácido láctico foi produzido somente nos tratamentos em que ocorreu a presença das bactérias (Figura 3), o qual resultou na queda drástica do pH do vinho final em todos os reciclos (Tabela 2). Ao comparar a produção das duas bactérias quando

inoculadas separadamente, a concentração do ácido foi superior quando a heterofermentativa estava presente, podendo estar relacionado com o aumento da sua população (Figura 3).

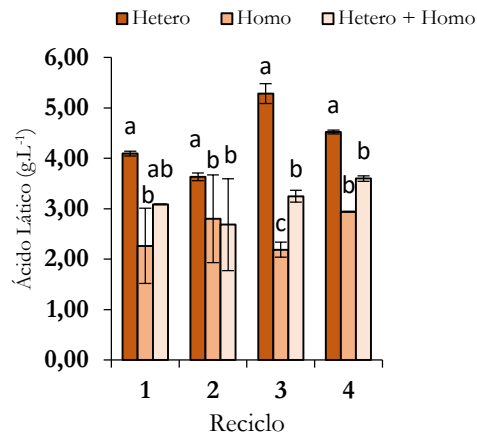


Figura 3. Produção de ácido láctico ao longo dos ciclos fermentativos por bactérias lácticas homo e heterofermentativa. As análises foram realizadas ao final da fermentação em 3 repetições biológicas e os valores de média foram reportados com seus respectivos desvios. Letras apresentadas em cada barra referem-se ao resultado obtido em Teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

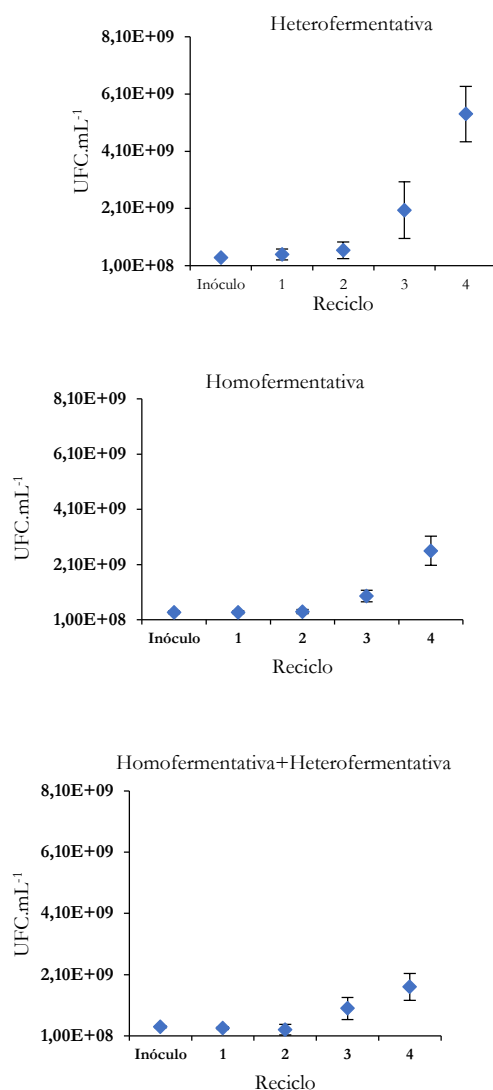


Figura 4. Unidades Formadoras de Colônia de bactérias lácticas (UFC.mL⁻¹) determinada por plaqueamento de gotas ao final da fermentação para os 3 tratamentos com contaminação. As análises foram realizadas em 3 repetições biológicas e os valores de média foram reportados com seus respectivos desvios.

O inóculo das linhagens ao início do reciclo 1 foi de aproximadamente $3,0 \times 10^8$ em todos os tratamentos. Ao longo dos reciclos, foi observado que as linhagens aumentaram sua população. Isso mostra que os isolados da indústria são resistentes ao tratamento ácido e as condições da fermentação. Além disso, foi observado crescimento superior para a bactéria heterofermentativa quando comparado com o crescimento da homofermentativa. Isso leva a supor bactérias heterofermentativas são mais resistentes às condições da fermentação alcoólica e por consequência disto são mais prejudiciais a fermentação (BASSO et al., 2014). Quando ambas as bactérias estavam presentes foi observado crescimento inferior aos demais tratamentos durante os reciclos, possivelmente pode estar relacionado à diferente capacidade de crescimento de cada linhagem durante a fermentação

3.3.2 Proteômica intracelular de levedura

No total, foram identificadas 1336 proteínas intracelulares da espécie *S. cerevisiae*, somando todos os tratamentos e controle. Todas as proteínas com suas respectivas abundâncias foram submetidas a análise de Volcano plot, e Análise de *Fold Change* (FC) (FC limite de 2) e teste-t (FDR $p \leq 0,05$). Nas tabelas suplementares 1, 2 e 3 constam os valores de $\log_2(FC)$ e $\log_{10}(p)$ para as proteínas que apresentam diferença significativa. Valores de FC positivos são para aquelas que apresentaram alta abundância (up) e aquelas com FC negativo consistem em proteínas com baixa abundância (down). A análise foi realizada comparando par a par entre controle e cada tratamento. Na figura 5 são apresentados os diagramas de venn, ilustrando as proteínas que não apresentaram diferença significativa (interseção do círculo), aquelas que apresentaram maior abundância (up) e as que apresentaram menor abundância (down).

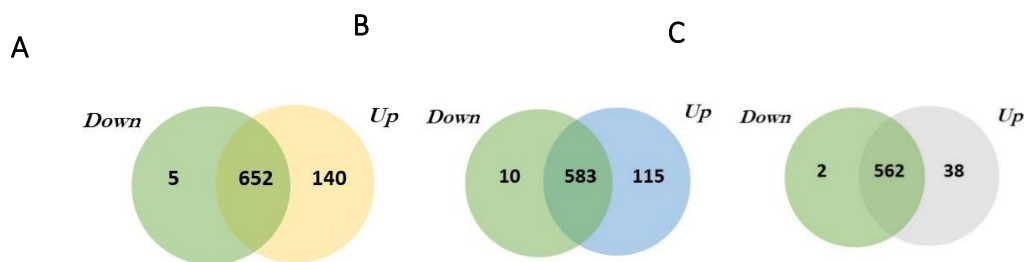


Figura 5. Diagrama de Venn de proteínas totais identificadas para cada tratamento e analisadas par a par em Volcano plot, e análise de *Fold Change* threshold (FC) (limite de 2) e teste-t FDR $p \leq 0,05$. Valores apresentados separadamente em cada círculo indicam número de proteínas com abundância significativa (*up* e *down*). Valores na interseção mostram proteínas com abundância sem diferença significativa entre os tratamentos. **A:** Levedura + Heterofermentativa; **B:** Levedura + Homofermentativa; **C:** Levedura + Homofermentativa + Heterofermentativa.

O cocultivo com a bactéria heterofermentativa apresentou 140 proteínas com aumento de abundância e somente 5 proteínas tiveram sua abundância reduzida. A bactéria homofermentativa apresentou 115 proteínas em abundância e 10 com abundância reduzida, mostrando que possivelmente interfere em quantidade menor de proteínas quando comparada com a heterofermentativa. Curiosamente, o tratamento com ambas as linhagens de bactérias apresentou somente 38 proteínas em maior abundância e 2 em menor abundância. Este resultado parece ter sido corroborado pelos parâmetros fermentativos (Item 3.3.1), mostrando que a presença simultânea das duas linhagens de bactéria foi menos deletéria ao processo do que o observado nos tratamentos em que cada bactéria foi inoculada separadamente (como no rendimento da fermentação, por exemplo, Figura 1). Isso pode ser um indicativo de uma relação de antagonismo entre as duas bactérias, tornando-as assim menos competitiva em relação à levedura (LONVAUD-FUNEL; JOYEUX, 1993; VITAL, 2013).

Somando as proteínas com diferença significativa (up e down) em todas as comparações entre controle e tratamento, foram obtidas 199 proteínas (Tabela suplementar 1, 2 e 3). Para permitir a visualização geral das proteínas reguladas com diferença significativa, foi construído o heatmap com a média de abundância de três repetições biológicas (Figura 6). Foi constatado que ocorreu diferença para a abundância das proteínas quando as bactérias foram inoculadas isoladamente. O caso do tratamento na presença de ambas as linhagens, conforme visto no diagrama de venn (Figura 5), poucas proteínas apresentaram diferença significativa com relação ao controle.

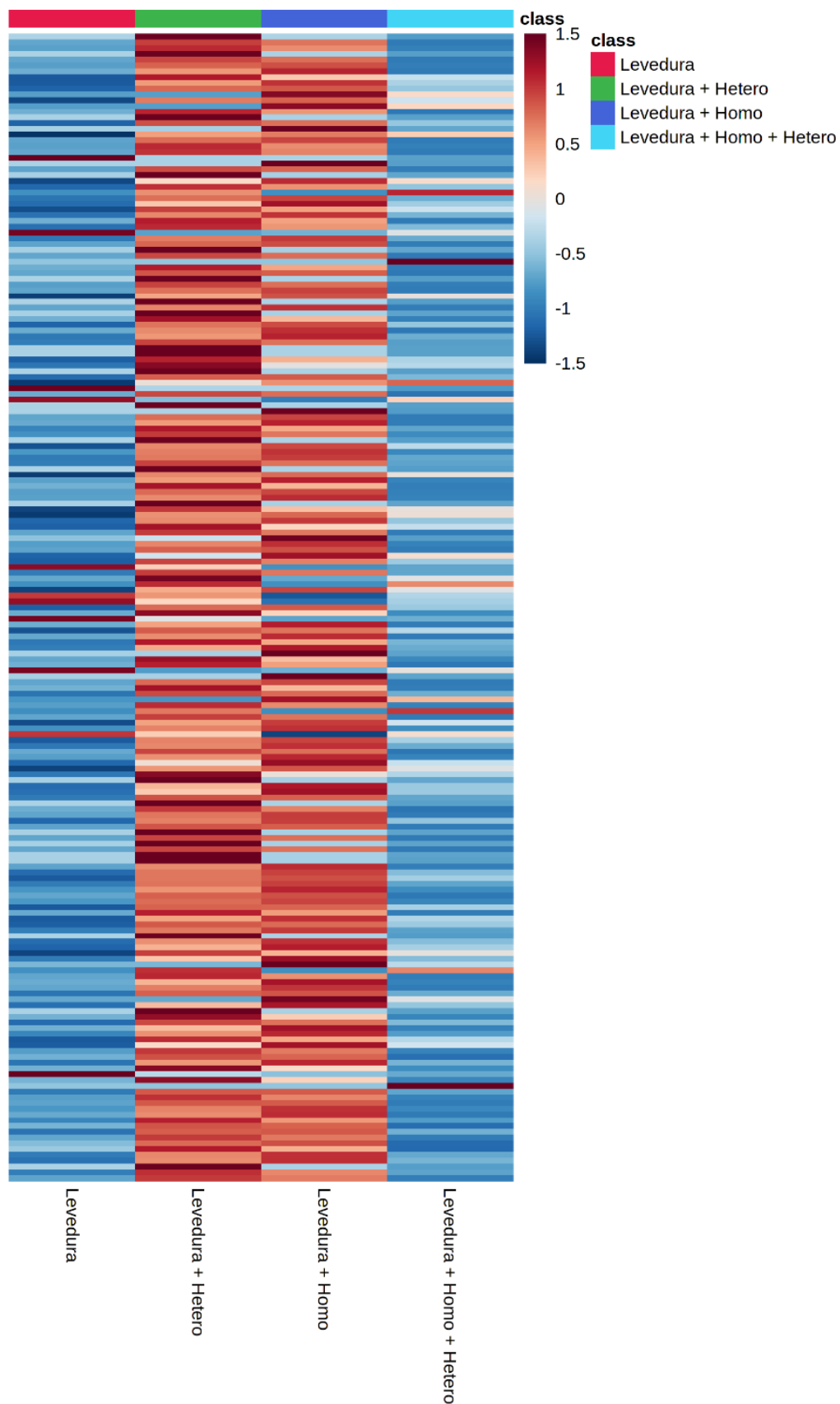


Figura 6. Heatmap com 199 proteínas que apresentaram diferença significativa em todos os tratamentos e controle. A variação de cor está relacionada com a abundância de cada proteína, onde vermelho escuro indica maior abundância e azul escuro menor abundância. Rosa: Levedura; Verde: Levedura+ Hetero; Azul escuro: Levedura + Homo; Azul Claro: Levedura + Homo + Hetero.

As proteínas com diferença significativa em maior e menor abundância (Tabela suplementar 1, 2 3) foram identificadas e agrupadas quanto ao processo e função biológica na qual estão envolvidas, utilizando o banco de dados *Saccharomyces Genome Database*. Cada processo biológico contém os valores em porcentagem de proteínas envolvidas (Figura 7). Nas tabelas suplementares 4, 6 e 8 é possível verificar cada proteína envolvida em cada processo biológico. As funções biológicas e as respectivas proteínas envolvidas podem ser conferidas nas tabelas suplementares 5, 7 e 9.

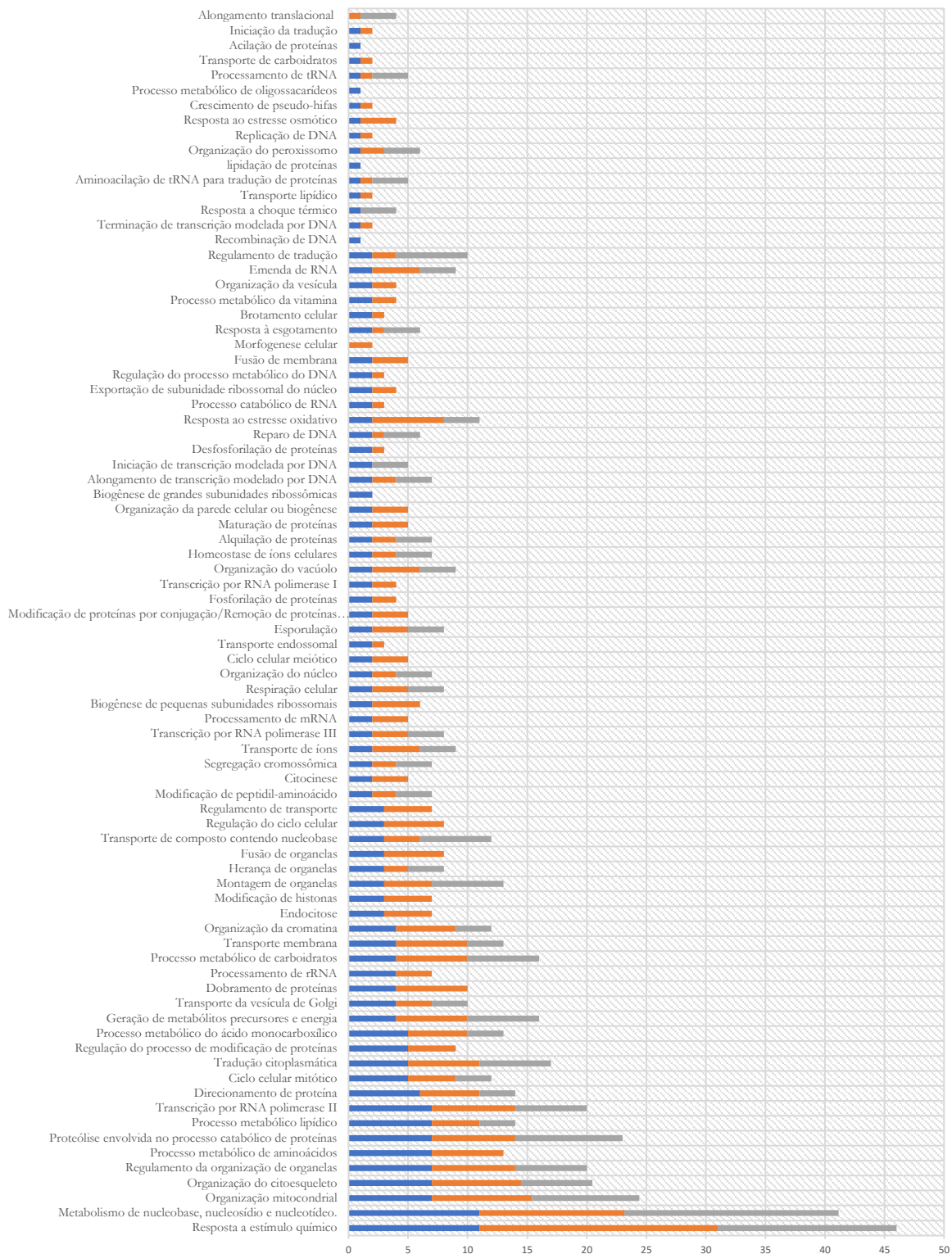


Figura 7. Porcentagem de proteínas e seus respectivos processos biológicos. Foram utilizadas apenas as proteínas que apresentaram diferença significativa para mais ou para menos com relação a sua abundância (199 proteínas). O agrupamento de proteínas com relação ao processo biológico foi realizado com o banco de dados *Saccharomyces Genome Database*. Azul: Levedura + Hetero; Laranja: Levedura + Homo; Cinza: Levedura + Homo + Hetero.

Os dois processos biológicos com o maior número de proteínas envolvidas foram os mesmos para os três tratamentos de cocultivo, sendo eles: Resposta a estímulo químico (GO:0042221) (Heterofermentativa: 11%; Homofermentativa: 19,63%; Hetero+Homofermentativa 14,71%); Metabolismo de nucleobase, nucleosídeo e nucleotídeo (GO:0055086) (Heterofermentativa: 11%; Homofermentativa: 12,15%; Hetero+Homofermentativa 17,65%) (Figura 7).

Proteínas envolvidas no processo de estímulo químico foram agrupadas também em processos relacionados à resposta ao estresse osmótico (GO:0006970) e oxidativo (GO:0006979). A tiorredoxina mitocondrial (Trx3p) foi observada com aumento de abundância em todos os tratamentos em cocultivo e tem como função manter o balanço redox da célula quando em estresse oxidativo. Duas proteínas interessantes foram identificadas em maior abundância durante tratamentos em cocultivo: A glicose-6-fosfato desidrogenase (Zwf1p) durante o cocultivo das bactérias heterofermentativa e homofermentativa isoladamente e a 6-fosfoglutano-dehidrogenase (Gnd1p) durante o cocultivo com homofermentativa. Ambas atuam no ramo oxidativo da via das pentoses-fosfato, e são importantes fontes de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). O aumento de ambas as proteínas indica que ocorreu maior desvio de glicose-6-fosfato da glicólise para a via das pentoses. A via oxidativa pode estar desempenhando papel importante para manter a homeostase celular na presença de contaminantes (BERTELS; MURILLO; HEINISCH, 2021)(Figura 8).

Além do balanço redox, o aumento da utilização da via das pentoses também está relacionada a importantes fatores de crescimento para a levedura, sendo indício de esgotamento de nutrientes quando na presença de contaminantes (BERTELS; MURILLO; HEINISCH, 2021). A proteína Tal1p, envolvida no processo biológico de metabolismo de nucleobase, nucleosídeo e nucleotídeo, foi observada em abundância na presença da bactéria homofermentativa e participa do ramo não oxidativo da via das pentoses para produção de frutose-6-fosfato e eritrose-1-fosfato, precursor da produção de aminoácidos aromáticos, a partir de sedoheptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato (Figura 8).

de aminoácido (CAI et al., 2001), evidencia que a presença de contaminantes reduziu a concentração de aminoácidos presentes no meio extracelular. A proteína Aspartil protease vacuolar (Proteinase A) (Pep4p) apresentou maior abundância quando na presença da bactéria heterofermentativa, a proteína de ligação à ubiquitina (Cue5p) foi observada nos tratamentos com cada bactéria isolada e a Carboxipeptidase vacuolar S (Cps1p) presente durante o cocultivo de ambas as bactérias. Essas proteínas apresentam como função a hidrólise de proteínas, indicando que ocorreu a reciclagem de nitrogênio para atender a escassez de fonte nitrogenada (BIEDERER; VOLKWEIN; SOMMER, 1997; MARQUES et al., 2006). Foi observado para os três tratamentos o processo de pseudo-hifa (GO:0007124) devido a presença da proteína de ligação a GTP (Ras2) em abundância. A produção de pseudo-hifa está relacionada às condições nutricionais limitantes (Figura 7 e Tabela suplementar 1, 2 e 3) (GIMENO et al., 1992).

O processo metabólico de lipídeo (GO:0006629) foi observado para os três tratamentos. A Lanosterol 14-alfa-3-beta-ol (Erg11p) foi observada quando na presença dos contaminantes isolados. A Delta(24)-esterol C-metiltransferase (Erg6p) foi observada em abundância somente na presença da hetero. Já a Mevalonato quinase (Erg12p) estava em abundância durante o cocultivo das bactérias. As três proteínas participam da via de produção de ergosterol, o qual desempenha papel fundamental para manter a integridade, fluidez e transporte da membrana (JORDÁ; PUIG, 2020; PARKS; SMITH; CROWLEY, 1995). O processo metabólico de vitamina (GO:0006766) foi observado quando as bactérias foram inoculadas isoladamente. Em ambos os casos houve produção das proteínas Fms1p, Rib5 responsável pela produção do ácido pantotênico e riboflavina (Vitamina B12) respectivamente.

Proteínas envolvidas no processo de metabolismo de carboidratos (GO:0005975) foram observadas durante ausência e presença das bactérias (Figura 7). A glicogênio fosforilase (Gph1p), envolvida no catabolismo do glicogênio e a glicogênio sintetase (Gsy2p), responsável pela síntese do carboidrato, apresentaram abundância durante o cocultivo com a bactéria heterofermentativa (Tabela 2). Ambas as proteínas são produzidas como resposta a estresse. Ainda para o mesmo processo biológico, a proteína fosfoglucomutase (Pgm2), responsável por catalisar a conversão de glicose-1-fosfato para glicose-6-fosfato apresentou abundância reduzida quando na presença da bactéria heterofermentativa (Tabela 2). A baixa atividade de fosfoglucomutase é necessária para manter altos níveis de glicose-1-fosfato intracelular a ser utilizado em diversas reações anabólicas, como a produção de glicogênio, importante fonte de carbono de reserva (AIELLO et al., 2002). Outras duas proteínas Coa6p e Pet9p também tiveram sua abundância reduzida quando na presença das bactérias, agora para os três tratamentos. A proteína Coa6p participa dos processos de organização mitocondrial

(GO:0007005) e homeostase de íons celulares (GO:0006873). Já a proteína Pet9 está relacionada a transporte de membrana (GO:0055085), transporte de composto contendo nucleobase (GO:0015931) e transporte de íons (GO:0006811) (Figura 7). A proteína hexoquinase isoenzima 1 (Hxk1) responsável pela fosforilação da glicose teve abundância inferior quando na presença da bactéria homofermentativa (Tabela suplementar 2).

Quando a homofermentativa estava presente, foi observada maior abundância da proteína dihidroxiacetona quinase (Dak1p) (Tabela suplementar 2), responsável por uma via alternativa do catabolismo do glicerol (via da dihidroxiacetona) para geração de intermediários da via glicolítica, produzindo dihidroxiacetona fosfato como resposta ao acúmulo intracelular de dihidroxiacetona (DHA), sob condições microaeróbicas (Figura 9). Essa condição é particularmente interessante, pois em cultivos na presença de bactérias homofermentativas, observa-se menores teores de glicerol do que cultivos controle (apenas com a levedura) ou com a bactéria heterofermentativa (Tabela 1) (BASSO et al., 2014). O papel dessa é apontado como forma de: i) regulação fina dos teores de glicerol intracelulares, ii) regulação dos níveis de ATP, iii) atividade de trans-hidrogenase, e iv) mecanismo para detoxificação de DHA (COSTENOBLE et al., 2000; MOLIN; NORBECK; BLOMBERG, 2003).

O processo de estresse osmótico foi constatado somente quando as bactérias foram inoculadas separadamente (Figura 7 e Tabela suplementar 4 e 6), onde para o tratamento com a homofermentativa ocorreu maior número de proteínas envolvidas, entre elas, a subunidade da ATPase V0 vacuolar (Tabela 2), responsável por transportar íons de hidrogênio do citoplasma para o vacúolo, promovendo o controle de pH do citoplasma e tornando ácido o pH vacuolar, podendo ser devido à alta concentração de ácidos orgânicos quando ambas estão presentes (Figura 3) (ABE; HORIKOSHI, 1998).

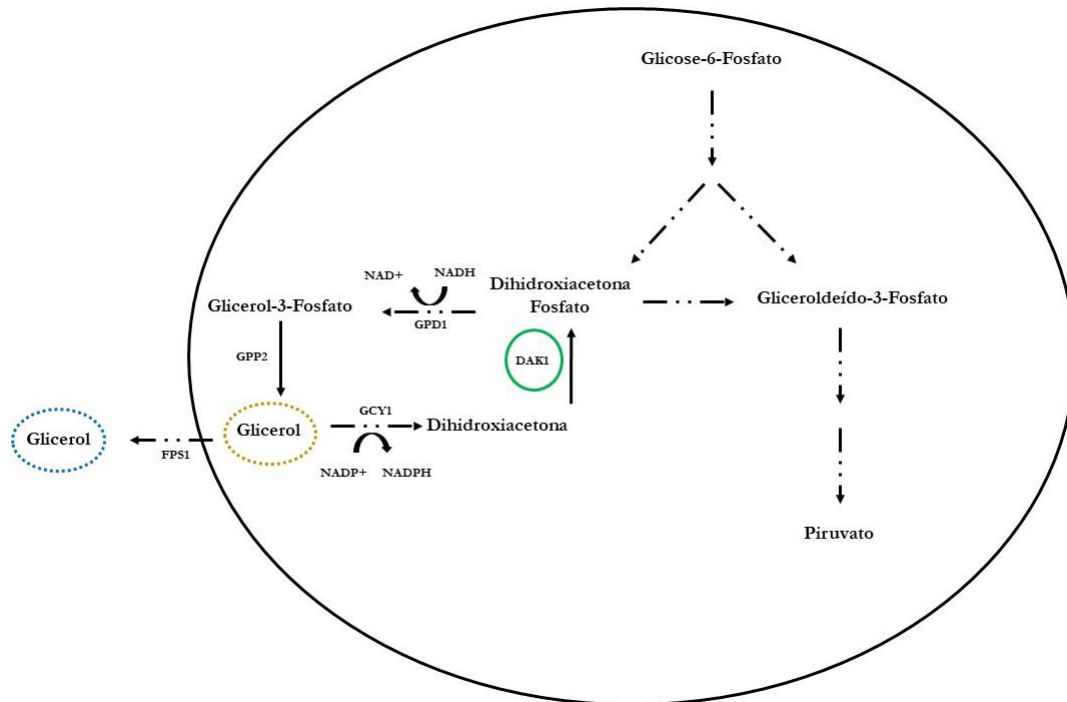


Figura 9. Metabolismo central da levedura quando na presença da bactéria homofermentativa. Enzima Dihidroxiacetona quinase (DAK1) ao metabolizar a Dihidroxiacetona a Dihidroxiacetona fosfato. Também é apresentado o glicerol analisado a partir da metabolômica intracelular e análise de vinho fermentado em HPLC. Enzima e metabólito circulado representa aqueles identificados durante a fermentação. Verde: Proteômica intracelular. Amarelo: Metabolômica intracelular; Azul: Análise de vinho em HPLC. Linhas tracejadas representam parte da via não observadas nas análises. Círculos tracejados representam metabólito com baixa abundância (Metabolômica intracelular) e baixa concentração (HPLC) (NORBECK; BLOMBERG, 1997; YU; KIM; HAN, 2010).

3.3.3 Metabolômica intracelular

Com o objetivo de identificar alterações no perfil metabólico intracelular da levedura quando na presença dos contaminantes ao longo da fermentação, foram realizadas amostragens nos tempos 0, 6 e 24 horas para o reciclo 4. Somando os três tempos para os 4 tratamentos, foram identificados 228 metabólitos a partir de análise de metabolômica não-alvo. Apesar de ser importante ferramenta para estudo de interação, a técnica apresenta limitações quanto a determinação da origem do metabólito. Sendo assim, o presente estudo procurou identificar possíveis metabólitos pertencentes à levedura, comparando controle/tratamento e com o auxílio do banco de dados *Yeast Metabolome Database* (YMDB). Para possibilitar a análise de maior número de metabólitos, o banco *Human Metabolome Database* (HMDB) foi utilizado de forma complementar. Primeiramente, foi realizada a análise do perfil geral do metaboloma. Para isso, os 228 metabólitos identificados (Anexo A) e suas respectivas abundâncias foram utilizados para Análise de Componentes Principais (PCA), comparando-se de forma pareada tratamento (cocultivos com bactérias inoculadas separadamente ou simultaneamente) e controle (levedura) nos três tempos já mencionados (Figura10).

Nas figuras 10A, é possível observar a comparação entre levedura em cultura pura (rosa) e levedura na presença da bactéria heterofermentativa (verde). A figura 10B contém a comparação entre levedura em cultura pura (rosa) e levedura na presença da bactéria homofermentativa (verde). Na figura 10C, estão as comparações entre levedura em cultura pura (rosa) e levedura na presença da bactéria homo- e heterofermentativa (verde). Foi possível observar que ao início da fermentação (0h) houve clara separação entre o controle e os três tratamentos. Entretanto, para o tempo de 6h, somente a presença da bactéria heterofermentativa isoladamente mostrou diferenciar-se do controle (Figura 10A-6h), isso pode indicar que bactérias com este perfil metabólico apresentam maior influência nos metabólitos produzidos durante a fermentação. Para o final da fermentação, curiosamente, foi observada novamente a separação para todos os tratamentos.

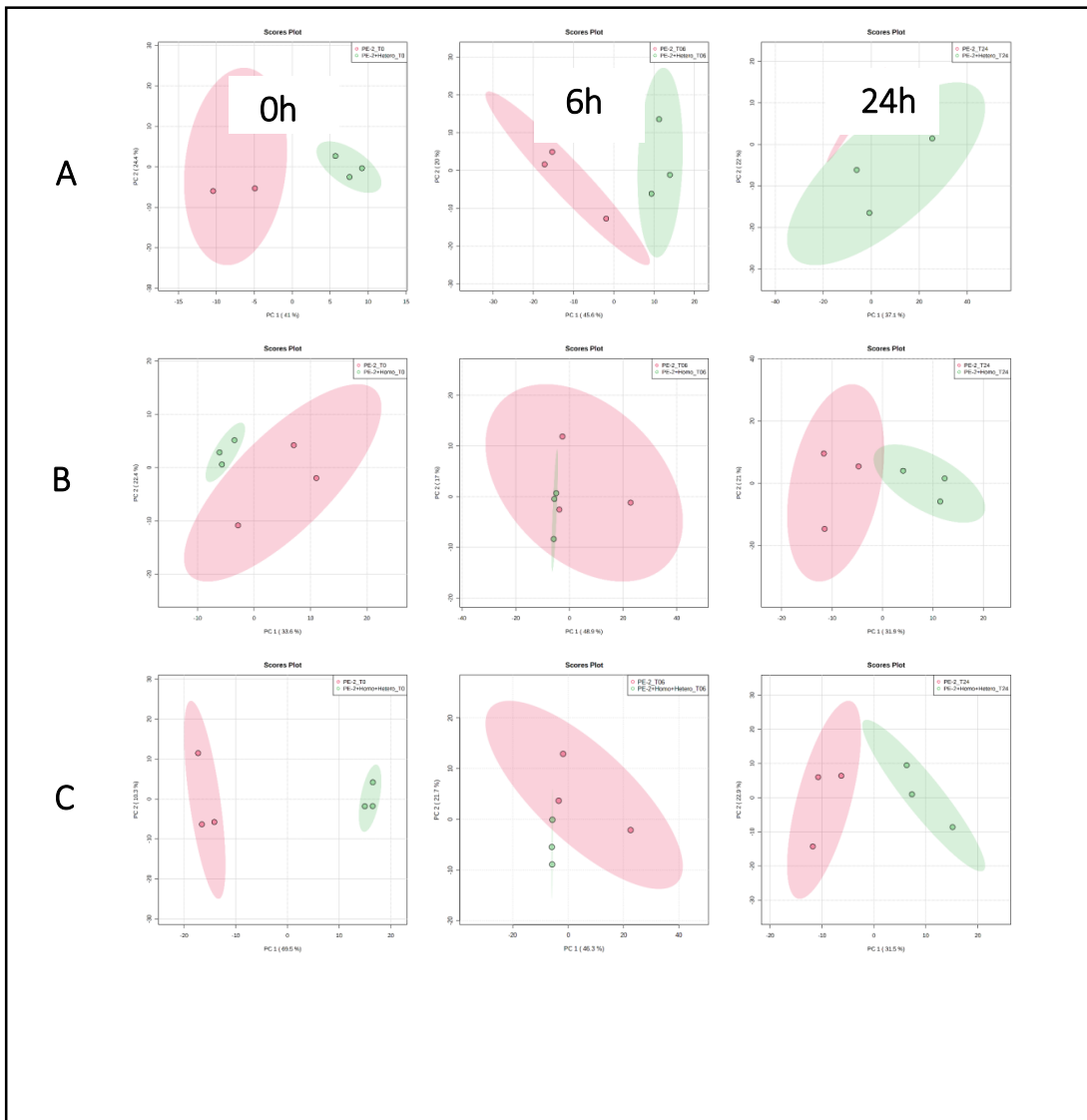


Figura 10. PCA de metabólitos totais das fermentações em cocultivo (verde) comparadas par a par com o controle (cultura pura da levedura) (rosa). Para cada tratamento foram realizados 3 PCA nos tempos de 0, 6 e 24 horas de fermentação. **A:** Levedura (PE-2) + Heterofermentativa; **B:** Levedura (PE-2) + Homofermentativa. **C:** Levedura (PE-2) + Homo-e heterofermentativa.

Como forma de identificar os metabólitos com diferença significativa para cada fermentação em cocultivo em relação ao controle, foi realizada a análise de Volcano plot, com *Fold Change* threshold (limite de 2) e test-t com FDR $p \leq 0,05$. Com isso é possível identificar metabólitos que apresentaram maior e menor abundância na presença das bactérias em comparação com o controle (cultura pura). Os metabólitos com diferença significativa e seus valores de $\log_2(FC)$ e $\log_{10}(p)$ são apresentados nas tabelas suplementares 10, 11 e 12. Valores positivos de $\log_2(FC)$ referem-se a metabólitos em maior abundância na presença das bactérias, e valores negativos são para aqueles em menor abundância na presença da das bactérias. No total, foram encontrados 52 metabólitos com diferença significativa. Desse total, 25 estavam presentes

no tratamento com a heterofermentativa, 15 para o tratamento com a homofermentativa, e 31 metabólitos para o tratamento em que ambas as bactérias estavam presentes.

As abundâncias dos 52 metabólitos foram utilizadas para construção do gráfico de heatmap (Figura 11). Nele constam todos os tratamentos (controle e cocultivo) nos três tempos de fermentação (0, 6 e 24 horas). A intensidade da cor é referente ao valor da média de abundância de três repetições biológicas para cada tratamento/tempo. Metabólitos em abundância são representados em valores maiores que 0 (vermelho) e metabólitos em baixa abundância são representados com valores menores que 0 (azul). Os metabólitos foram agrupados a partir de suas subclasses acessadas no banco de dados YMDB e HMDB (Figura 11).

Para o tempo de 0h, ocorreu maior identificação de metabólitos com diferença significativa para o tratamento com ambas as bactérias. No tempo de 6 horas, a maior parte dos metabólitos foram identificados para o tratamento com heterofermentativa. Esse resultado está de acordo com o observado na Figura 10A, onde o tratamento apresentou separação com relação ao controle, enquanto os outros tratamentos mostraram não se diferenciar neste tempo. De forma geral, ao final do ciclo fermentativo (24 h), foi possível observar um aumento na abundância da maioria dos metabólitos para todos os tratamentos, incluindo o controle (Figura 11).

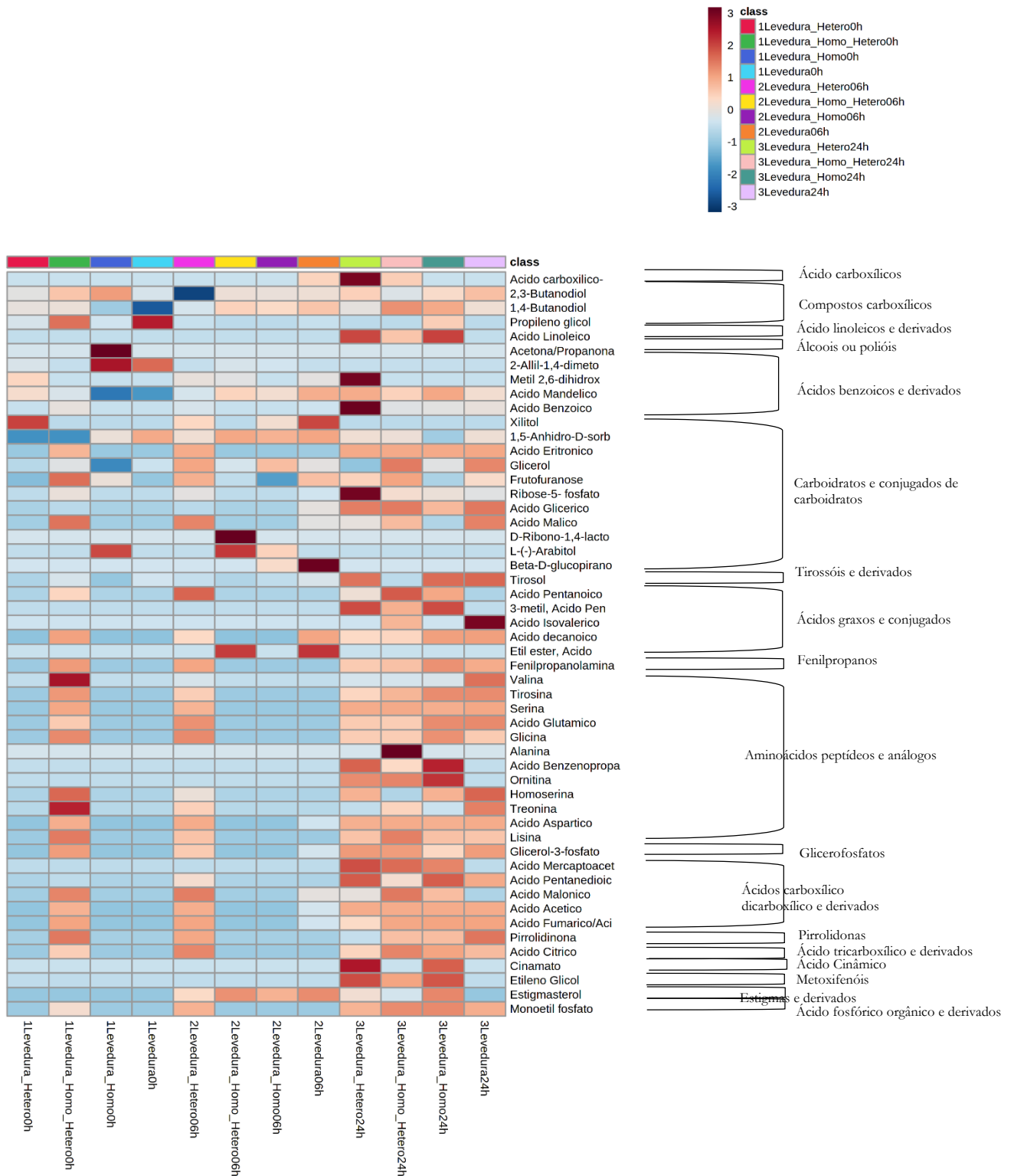


Figura 11. Heatmap contendo a média de abundância de metabólitos que apresentaram diferença significativa quanto a abundância em três repetições biológicas para quatro tratamentos nos tempos 0, 6 e 24 horas de fermentação. o. Os metabólitos foram classificados quanto a subclasse obtida no banco de dados YMDB e HMDB.

Outro fator a ser levado em consideração é a excreção de metabólitos do ambiente intracelular para o meio extracelular. No início da fermentação, o aumento de metabólitos no meio extracelular, como os ácidos orgânicos, por exemplo, ocorre quando a glicose está em altas

concentrações. Ao final, a levedura pode reabsorver esses metabólitos para serem utilizados em reações de biossíntese (anabólicas) quando a fonte de carbono é esgotada (SALMON; VEZINHET; BARRE, 1987; WHITING, 1976). Além disso, excreções de metabólitos podem também estar relacionados a desequilíbrios de vias metabólicas, como também para manter a homeostase (SON et al., 2022).

A maior parte dos metabólitos identificados pertencem a classe dos aminoácidos, principalmente ao final da fermentação. Neste período da fermentação, ocorreu maior abundância de aminoácidos para todos os tratamentos, incluindo o controle. O aumento intracelular de aminoácido pode estar relacionada a degradação de proteínas em resposta ao esgotamento do meio extracelular (PACZIA et al., 2012). Metabólitos relacionados a biossíntese de aminoácidos também foram identificados em abundância. É interessante notar que nos cultivos com a heterofermentativa, foi observada uma maior quantidade de aminoácidos (valina, tirosina, serina, ácido glutâmico, glicina e alanina, (Tabela suplementar 10) diferencialmente abundantes do que os observados nos cultivos com a homofermentativa (tirosina e ornitina – derivada da arginina (Tabela suplementar 11). No tempo de 24 horas para todos os tratamentos, incluindo o controle, foi observado o ácido cítrico, precursor da síntese de aminoácidos (WIEBE et al., 2008), o metabólito estava em abundância também às 6 horas para o tratamento na presença da heterofermentativa. O 1-Ciclohexano-1-Ácido carboxílico foi identificado em abundância ao final da fermentação quando na presença da bactéria heterofermentativa e consiste em importante intermediário para a biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano.

O álcool aromático tirosol tem sua produção a partir do aminoácido aromático tirosina através da via Ehrlich e tem como função a sinalização durante o processo de *quorum sensing* em fungos para controle de densidade celular quando em condições limitantes de nitrogênio (GONZÁLEZ et al., 2018). O metabólito foi observado ao início da fermentação em menor abundância com diferença significativa na presença da bactéria homofermentativa (Tabela suplementar 11). O ácido isovalérico também foi identificado ao final da fermentação quando a levedura estava em cultura pura e consiste em metabólito intermediário da biossíntese da valina (indicar onde está esse dado e comentar se ele foi mais abundante ou menos abundante em relação ao controle) (HOLMBERG; LITSKE PETERSEN, 1988).

A subclasse de carboidratos e conjugados foi a segunda subclasse com maior número de metabólitos identificados. O ácido málico foi observado em maior abundância no tempo 0h e em menor abundância ao final da fermentação na presença da homofermentativa (Tabela suplementar). Sua síntese e acúmulo ocorre no citosol a partir da redução do ácido oxaloacético. Apesar da sua função biológica ser desconhecida, ocorre quando na presença de glicose em altas

concentrações (YE et al., 2007). O xilitol estava em maior abundância na presença da homofermentativa no tempo 0 horas da fermentação e no tempo de 6 horas em menor abundância (Tabela suplementar 11). Apesar de não ser capaz de metabolizar o xilitol a etanol, a levedura *S.cerevisiae* possui atividade das enzimas trifuncional aldehído redutase, xilose redutase e glucose-1 dehidrogenase para a produção de xilitol a partir da xilose (VERAS et al., 2019). A ribose-5-fosfato apresentou aumento quando a heterofermentativa estava presente ao final da fermentação (Tabela suplementar 10). O metabólito está presente na etapa de biossíntese da via das pentoses e atua como precursor para a produção de pirimidina, purina, triptofano e histidina (BERTELS; MURILLO; HEINISCH, 2021).

Interessantemente, o glicerol apresentou baixa abundância no tempo de 24 horas para o tratamento com a homofermentativa em relação ao controle (Tabela suplementar 11). O metabólito também foi observado em menor concentração quando o meio extracelular foi analisado (Tabela 1). Aparentemente, tanto no ambiente intracelular como no meio extracelular, o metabólito foi mantido em níveis baixos devido à ação da enzima Dak1p (Figura 9), detectada nas análises proteômicas (Tabela Suplementar 2).

Metabólitos com potenciais atividades antimicrobianas também foram identificadas. O ácido pentanóico, conhecido como ácido valérico e o ácido cinamato foram observados somente quando os contaminantes estavam presentes. Segundo relatado por Kovanda et al. (2019) o ácido pentanóico apresenta forte ação antimicrobiana em bactérias gram-positiva. Já o ácido cinamato, apresenta ação antimicrobiana com ação em diversos microrganismos (SHEN et al., 2020).

3.4 Discussão

A interação entre leveduras e bactérias lácticas tem sido amplamente estudada devido à coexistência desses organismos no meio ambiente, como também em indústrias alimentícia, de bebidas e bioetanol (BREXÓ; SANT'ANA, 2017; CHEN et al., 2017; XU et al., 2021). Para a indústria de bioetanol, inevitavelmente as bactérias lácticas estão presentes como contaminantes e sua interação com a levedura resulta na queda de rendimento fermentativo (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011). Os efeitos da contaminação na fisiologia e bioquímica da fermentação, independente da matéria-prima utilizada como substrato, mostram que os principais fatores são a produção de ácidos orgânicos (NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2001), competição por nutrientes (BAYROCK; INGLEDEW, 2004) e floculação de células de levedura (GIBSON et al., 2007). Apesar de apresentarem efeitos claros na eficiência fermentativa, somente eles não explicam a queda de produção durante a fermentação industrial (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001).

No ambiente fermentativo, a levedura é submetida a diversas condições de estresse resultantes da presença de contaminantes, entre elas, oxidativa, osmótica, esgotamento nutricional e baixo pH (EARDLEY; TIMSON, 2020). A utilização das técnicas de proteômica e metabolômica tem sido grande aliada na compreensão dos mecanismos de interação entre leveduras e contaminantes.

No presente estudo, a atenção foi voltada para a interação entre os dois perfis metabólicos de bactérias lácticas homo e heterofermentativa. Durante a mimetização da fermentação industrial, o perfil metabólico heterofermentativo é relatado como o principal responsável pela queda da eficiência fermentativa da levedura (BASSO et al., 2014; COLLOGRAI et al., 2021). Contudo, ao analisar a diversidade de microrganismos em amostras da indústria, a bactéria homofermentativa está presente, o que leva a presumir que esse perfil também apresenta importante papel como contaminante nas dornas industriais (LUCENA et al., 2010; SENNE DE OLIVEIRA LINO et al., 2021).

Apesar disso, os resultados obtidos no presente estudo mostram que o tratamento em que ambas as linhagens estavam simultaneamente na fermentação não ocorreu interferência no rendimento (Figura 1) e no proteoma da levedura (Figura 6). Além disso, foram observados crescimentos inferiores ao longo do ciclo quando comparado com os cultivos em que as bactérias foram inoculadas separadamente. Uma hipótese levantada é de que possa ocorrer relação antagônica entre os contaminantes quando em fermentações na presença das duas linhagens, tornando-a menos competitiva durante a interação com a levedura. (LONVAUD-FUNEL; JOYEUX, 1993), entretanto se faz necessário futuros estudos para verificar tal hipótese.

A produção de glicerol pela levedura mostrou ser regulada de forma distinta na presença dos dois perfis metabólicos. Durante a fermentação, o glicerol tem como função a reoxidação de NADH, gerado com a produção de metabólitos e biomassa, a partir da redução de dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato. Além disso, o metabólito tem como função manter a homeostase celular durante estresse osmótico (MODIG et al., 2007). Para o cocultivo em que a bactéria homofermentativa estava presente, o meio extracelular apresentou concentração inferior ao final da fermentação em relação aos demais tratamentos e controle, corroborando com dados apresentados por outros pesquisadores (BASSO et al., 2014; THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001). Quando o meio intracelular foi analisado, foi observada a baixa abundância do metabólito também ao final da fermentação, o que permitiu presumir ser a levedura responsável por regular a produção como resposta à presença da bactéria homofermentativa (GIBSON et al., 2007; MOLIN; NORBECK; BLOMBERG, 2003).

Surpreendentemente, ao analisar o proteoma ao final da fermentação para o mesmo tratamento, foi identificada a enzima Dihidroxiacetona quinase (DAK1) em alta abundância. Norbeck e Blomberg analisaram a ação da enzima quando a levedura foi submetida ao crescimento na presença de NaCl e identificaram que o estresse osmótico induziu o aumento da concentração intracelular do glicerol, devido a sua ação osmorreguladora. Contudo, quando em altas concentrações, o metabólito pode ser tóxico, ocorrendo a sua metabolização a diidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase e posteriormente fosforilada pela Dak1. Isso permite presumir que a diferença de produção de glicerol deva-se a ação desta enzima (Figura 9).

Para o cocultivo com bactéria heterofermentativa, o glicerol estava presente em concentração superior no meio extracelular (Tabela 1), podendo ser indicio de estresse osmótico e/ou desbalanço redox (GIBSON et al., 2007). Este perfil metabólico tem sido associado ao aumento de glicerol e conseqüentemente a queda de rendimento fermentativo em decorrência do desvio de carbono (BASSO et al., 2014)(Figura 1). Durante a fermentação neste tratamento, foi observada alta concentração do ácido acético (Tabela 1). Levando em consideração de que bactérias heterofermentativas também produzem o metabólito, não é possível afirmar que esse aumento teve participação da levedura. Porém, é de ser levado em consideração que, para cada mol de ácido acético produzido, são necessários 2 moles de glicerol para reoxidar o NADH e assim manter o balanço redox (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986).

Outra suposição relatada na literatura seria o estresse osmótico devido à alta concentração de ácido láctico produzidos por bactérias heterofermentativas (Figura 3). Na presença do metabólito, a levedura demandaria maior concentração de glicerol para manter a integridade celular (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001). Yu, KIM e Han (2010) observaram que ao deletar os genes glicerol-3-fosfato desidrogenase a fim de não ocorrer a produção de glicerol a partir da diidroxiacetona fosfato, ocorreu a diminuição no acúmulo de glicerol e conseqüentemente a suscetibilidade ao estresse osmótico. Já Modig et al. (2007) relataram que a necessidade de aumento de glicerol durante estresses osmótico pode ocasionar no desbalanço redox da célula, aumentando a produção de ácido acético, ácido succínico e biomassa devido a necessidade de NADH. (tabela 2).

A via das pentoses mostrou também ter interferência quando os contaminantes estavam presentes. Para ambos os perfis, foram identificados metabólitos e proteínas da via das pentoses em maior abundância. A via é dividida na etapa oxidativa e de biossíntese, onde a primeira está relacionada ao estresse oxidativo, devido a demanda de NADPH e a segunda para a síntese de aminoácidos aromáticos e nucleotídeos quando a levedura está em crescimento ou em meios com baixa disponibilidade nutricional (BERTELS; MURILLO; HEINISCH, 2021). O desvio de

glicose-6-fosfato da glicólise para a via das pentoses ocorre durante a fermentação, entretanto, em meios com baixa disponibilidade de nutrientes e/ou estresse oxidativo o desvio é intensificado. (BERTELS; MURILLO; HEINISCH, 2021).

O esgotamento de nutrientes ficou evidente quando ambas as bactérias estavam presentes, onde proteínas relacionadas a anabolismo e catabolismo de aminoácidos, hidrólise de proteínas, como também resposta ao esgotamento nutricional foram observadas (Figura 7). As bactérias lácticas utilizadas no estudo apresentam-se extremamente exigentes quanto a presença de nutrientes ao meio extracelular, sendo esse um dos motivos que levam ocuparem o mesmo nicho que as leveduras (KIBEOM; HO-JIN; SANG-KYU, 2014). Sendo assim, a competição de nutrientes, principalmente de fontes de nitrogênio e aminoácidos pode ter resultado no aumento de biossíntese por parte da levedura para atender sua demanda. Ponomarova e colaboradores (2017) identificaram que a levedura, apesar de produzir e excretar aminoácidos que suprem as necessidades de bactérias lácticas durante a interação, não tem sua produção regulada pela presença desses organismos. Isso possibilita indagar de que a escassez desses metabólitos no meio extracelular seria o responsável por regular o metabolismo levedura e não a presença em si dos contaminantes, podendo isso ocorrer em cultura pura da levedura em meio com escassez nutricional. (BIANCHI et al., 2019)

Com os resultados obtidos no presente estudo foi possível iniciar a compreensão da regulação de produção de glicerol quando na presença de bactérias homo e heterofermentativo, mostrando ser a enzima DAK1 responsável por regular o metabólito na presença da homofermentativa. Além disso, o desbalanço redox e o esgotamento de nutrientes podem ser responsáveis em aumentar o desvio de glicose-6 fosfato para a via das pentoses durante a fermentação. E por fim, a presença de ambos os contaminantes simultaneamente não interferem na fermentação da levedura, mostrando indícios de ocorrer relação antagônica entre as bactérias durante a fermentação.

Referências

- ABE, F.; HORIKOSHI, K. Analysis of intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under elevated hydrostatic pressure: a study in baro- (piezo-) physiology. **Extremophiles : life under extreme conditions**, v. 2, n. 3, p. 223–228, ago. 1998.
- ABEDI, E.; HASHEMI, S. M. B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. **Heliyon**, v. 6, n. 10, p. e04974, 1 out. 2020.
- AIELLO, D. P. et al. Intracellular glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate levels modulate Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 45751–45758, 2002.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.

- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 1 nov. 2008.
- BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; ALVES, D. M. . The antibacterial of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, p. 77–82, 1997.
- BASSO, T. O. et al. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 169–177, 2014.
- BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: Nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.
- BECHTNER, J. et al. Proteomic Analysis of *Lactobacillus nagelii* in the Presence of *Saccharomyces cerevisiae* Isolated From Water Kefir and Comparison With *Lactobacillus hordei*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 325, 2019.
- BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.
- BERTELS, L. K.; MURILLO, L. F.; HEINISCH, J. J. The Pentose Phosphate Pathway in Yeasts—More Than a Poor Cousin of Glycolysis. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, 1 maio 2021.
- BIANCHI, F. et al. Regulation of Amino Acid Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 83, n. 4, 20 nov. 2019.
- BIEDERER, T.; VOLKWEIN, C.; SOMMER, T. Role of Cue1p in Ubiquitination and Degradation at the ER Surface. **Science**, v. 278, n. 5344, p. 1806–1809, 5 dez. 1997.
- BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423–434, 1 jun. 2017.
- BUDZINSKI, I. G. F. et al. Integrated analysis of gene expression from carbon metabolism, proteome and metabolome, reveals altered primary metabolism in *Eucalyptus grandis* bark, in response to seasonal variation. **BMC plant biology**, v. 16, n. 1, 1 jul. 2016.
- CAI, H. et al. Identification of the Gene and Characterization of the Activity of the trans-Aconitate Methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*†. **Biochemistry**, v. 40, n. 45, p. 13699–13709, 13 nov. 2001.
- CHEN, Y. et al. Effects of mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in alcoholic fermentation on the physicochemical and sensory properties of citrus vinegar. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 753–763, 2017.
- CHERUBIN, R. A. Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminação Bacteriana na Fermentação Alcoólica. **Escola Superior de Agricultura Luiz da QUEIROZ**, v. 1, p. 124, 2003.
- COLLOGRAI, K. C. et al. Secretome analysis as a tool to elucidate bacterial contamination influence during second-generation ethanol production in a Melle-Boinot process. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 3, 1 maio 2021.
- COSTA, V. M. et al. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido láctico por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 503–509, abr. 2008.
- COSTENOBLE, R. et al. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast (Chichester, England)**, v. 16, n. 16, p. 1483–1495, 1 dez. 2000.

- DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1960.
- DEMOSS, R. D.; BARD, R. C.; GUNSALUS, I. C. The mechanism of the heterolactic fermentation; a new route of ethanol formation. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 4, p. 499–511, out. 1951.
- DICKINSON, J. R.; SALGADO, L. E. J.; HEWLINS, M. J. E. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8028–8034, 7 mar. 2003.
- EARDLEY, J.; TIMSON, D. J. **Yeast Cellular Stress: Impacts on Bioethanol Production** Fermentation MDPI, , 1 dez. 2020.
- GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na fermentação alcoólica. 1990.
- GIBSON, B. R. et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 5, p. 535–569, set. 2007.
- GIMENO, C. J. et al. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. **Cell**, v. 68, n. 6, p. 1077–1090, 20 mar. 1992.
- GONZÁLEZ, B. et al. The production of aromatic alcohols in non-*Saccharomyces* wine yeast is modulated by nutrient availability. **Food Microbiology**, v. 74, p. 64–74, 1 set. 2018.
- HOLMBERG, S.; LITSKE PETERSEN, J. G. Regulation of isoleucine-valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics** 1988 13:3, v. 13, n. 3, p. 207–217, mar. 1988.
- HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant physiology**, v. 81, n. 3, p. 802–806, 1 jul. 1986.
- JORDÁ, T.; PUIG, S. Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, v. 11, n. 7, p. 1–18, 1 jul. 2020.
- KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 49, n. 3, p. 209–224, 1983.
- KIBEOM, L.; HO-JIN, K.; SANG-KYU, P. Amino acids analysis during lactic acid fermentation by single strain cultures of lactobacilli and mixed culture starter made from them. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 28, p. 2867–2873, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LI, H. et al. Metabolic responses to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* using a gas chromatography tandem mass spectrometry-based metabolomics approach. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 7, p. 1087–1096, 2012.
- LINO, S. D. O. Unravelling the microbiome of industrial sugarcane biorefineries Unravelling the microbiome of industrial sugarcane biorefineries Felipe Senne de Oliveira Lino. 2019.
- LONVAUD-FUNEL, A.; JOYEUX, A. Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. **Food Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 411–419, 1 out. 1993.
- LUCENA, B. T. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.
- MACRON, C. et al. Exploration of human cerebrospinal fluid: A large proteome dataset revealed by trapped ion mobility time-of-flight mass spectrometry. **Data in Brief**, v. 31, p. 105704, 1 ago. 2020.

- MARQUES, M. et al. The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 152, n. 12, p. 3595–3605, 1 dez. 2006.
- MM, B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- MODIG, T. et al. Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 2, p. 289–296, 2 maio 2007.
- MOLIN, M.; NORBECK, J.; BLOMBERG, A. Dihydroxyacetone kinases in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1415–1423, 17 jan. 2003.
- NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 171–7, mar. 2001.
- NORBECK, J.; BLOMBERG, A. Metabolic and Regulatory Changes Associated with Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 9, p. 5544–5554, 28 fev. 1997.
- PACZIA, N. et al. Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 11 set. 2012.
- PARKS, L. W.; SMITH, S. J.; CROWLEY, J. H. Biochemical and physiological effects of sterol alterations in yeast—A review. **Lipids**, v. 30, n. 3, p. 227–230, 1995.
- PIGGOT, R. et al. **The Alcohol Textbook 4th edition**. [s.l.: s.n.].
- PONOMAROVA, O. et al. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. **Cell Systems**, v. 5, n. 4, p. 345–357.e6, 2017.
- RAGHAVENDRAN, V. et al. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 110, n. 7, p. 971–983, 1 jul. 2017.
- RAPOSO, M. S. **Metabólitos excretados na fermentação alcoólica como possíveis substratos para o crescimento do gênero *Lactobacillus***. [s.l.] Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, jul. 2018.
- SALMON, J. M.; VEZINHET, F.; BARRE, P. Anabolic role of l-malic acid in *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobiosis during alcoholic fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 42, n. 2–3, p. 213–220, 1 jul. 1987.
- SENNE DE OLIVEIRA LINO, F. et al. Complex yeast–bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. **Nature Communications** 2021 12:1, v. 12, n. 1, p. 1–12, 8 mar. 2021.
- SHEN, Y. P. et al. Recent Advances in Metabolically Engineered Microorganisms for the Production of Aromatic Chemicals Derived From Aromatic Amino Acids. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 407, 5 maio 2020.
- SMART, K. F. et al. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 10, p. 1709–1729, 2010.
- SON, S.-H. et al. Metabolite trafficking enables membrane-impermeable-terpene secretion by yeast. **Nature Communications** volume, v. 13, p. 1–9, 2022.

- 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**, v. 90, n. 5, p. 819–828, 18 maio 2001.
- VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 3–4, p. 199–224, 1 abr. 1986.
- VAN NIEL, E. W. J. et al. The potential of biodetoxification activity as a probiotic property of *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 206–210, 16 jan. 2012.
- VERAS, H. C. T. et al. Metabolic flux analysis for metabolome data validation of naturally xylose-fermenting yeasts. 2019.
- VITAL, S. **Relações tróficas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus* sp. nas condições da fermentação alcoólica industrial**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 16 out. 2013.
- WANG, Z. et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201–223, 1 jun. 2001.
- WHITING, G. C. ORGANIC ACID METABOLISM OF YEASTS DURING FERMENTATION OF ALCOHOLIC BEVERAGES—A REVIEW. v. 82, p. 84–92, 1976.
- WIEBE, M. G. et al. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 1, p. 140–154, 1 fev. 2008.
- XU, Z. et al. Polymicrobial interaction between *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae*: coexistence-relevant mechanisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 386–396, 2021.
- YE, N. et al. L-(–)-Malic Acid Production by *Saccharomyces* spp. during the Alcoholic Fermentation of Wine (1). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 912–919, 2007.
- YU, K. O.; KIM, S. W.; HAN, S. O. Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 2, p. 209–214, 15 out. 2010.

Tabelas Suplementares

Tabela 1. Proteínas que apresentaram abundância significativa de levedura em cocultivo com bactéria heterofermentativa quando comparado com o controle ao final da fermentação (24 horas). Os valores de Log₂(FC) e Log₁₀(p) obtidos da análise de volcano plot, combinado com fold change (Limite de 2) e teste t (FDR $p \leq 0,05$). Valores de Log₂(FC) positivos apresentam alta abundância e negativos apresentaram baixa abundância.

Proteína	Log ₂ (FC)	Log ₁₀ (p)
Chz1p	6.0626	2.7714
Nca3p	5.9379	2.349
Arg56p	5.9133	1.5121
Pai3p	5.6261	1.3937
Cox17p	5.5599	1.5391
Ade8p	5.5084	2.9489
Tif3p	5.4896	2.3503
Apt1p	5.359	2.53
Por1p	5.3557	2.9874
Gph1p	5.2917	3.8829
Rps21ap	5.1879	2.7139
Atp1p	5.1632	2.9553
Ras2p	5.1426	1.8567
Lap4p	4.929	2.4089
Cdc48p	4.9088	2.3503
Idp1p	4.8954	1.9397
Bat1p	4.7778	2.7757
Hnt1p	4.7599	1.5835
Scw4p	4.6606	1.7886
Met14p	4.6558	2.7714
Erg11p	4.5802	2.4401
Ess1p	4.5731	2.2823
Cwc21	4.5577	2.2052
Hsp60p	4.5571	2.5776
Shb17p	4.5355	2.9642
Inh1p	4.479	2.349
Lsb1p	4.4484	1.9064
Fmp46p	4.3914	2.3296
Shp1p	4.3201	2.2131
Crs5p	4.3121	1.3213
Rtn1p	4.2972	1.3829
Rpl17ap	4.2468	3.6267
Yhi9p	4.1803	2.7757
Yme1p	4.1687	2.4089
Cmk1p	4.1401	1.3826
Rps15	4.095	1.8591
Yrb2p	4.064	1.3826
Caf20p	4.0541	2.4074
Rtn1p	3.9512	1.639

Fms1p	3.908	2.66
Mdg1p	3.8487	2.9642
Pep4p	3.8116	1.4987
Sec53p	3.8004	1.4788
Atp14p	3.7974	2.5776
Rsr1p	3.7773	2.2329
Guk1p	3.7537	1.6645
Cue5p	3.7275	1.5309
Cct2p	3.7032	1.5124
Tmt1p	3.7005	1.8567
Trx3p	3.6304	1.4458
Cdc37p	3.5669	1.6517
Snu13p	3.563	2.1994
Rps8bp	3.5503	3.4094
Rps1ap	3.5339	1.538
Scp1p	3.5288	1.627
Zwf1p	3.4669	2.4763
Clc1p	3.44	2.4168
Tir3p	3.4202	1.6714
Shg1p	3.4082	1.6772
Vma13p	3.3894	1.606
Snx3p	3.3454	1.7296
Dfm1p	3.3202	1.4059
Stm1p	3.3129	1.325
Gsy2p	3.3123	1.5632
Ole1p	3.3059	1.627
Nmt1p	3.2871	1.6054
Grx8p	3.2809	1.4987
Rpc19p	3.2625	1.7362
Ale1p	3.2613	1.5839
Pir3p	3.2571	1.5839
Yih1p	3.2068	1.5943
Mht1p	3.2023	2.53
Arf3p	3.1921	1.8284
Cap2p	3.1858	1.6517
Coa4p	3.1858	1.6013
Sec13p	3.1737	1.8647
Ty1B	3.1696	1.5872
Bcy1p	3.1481	1.687
Vrp1p	3.1453	1.4059
Ppm1p	3.139	2.3503
Fad1p	3.1174	2.017
Crm1p	3.1083	1.627
Erg6p	3.0896	1.5839
Lhp1p	3.0533	2.7757

Atp2p	3.0532	2.8628
Rpl17bp	3.0469	1.9397
Cdc73p	3.0184	2.017
Ura2p	3.0168	1.9397
Sds22p	2.987	2.017
Hnt1p	2.9779	1.9397
Fmp52p	2.9701	2.0271
Ilv2p	2.9461	1.8107
Ddp1p	2.8833	2.7139
Pdb1p	2.8782	1.9064
Rib5p	2.8643	2.4089
Did2p	2.8339	2.017
Trx1p	2.8286	1.3552
Acc1p	2.8052	1.8284
Trx2p	2.7836	2.3608
Cpa2p	2.7722	2.3993
Pdr17p	2.7666	2.017
Uth1p	2.7549	2.2052
Hsp26	2.7509	1.9336
Irc24p	2.7291	2.66
Arc1p	2.7289	2.017
Yet3p	2.6706	2.3993
Sso1p	2.6502	3.326
Rvb1p	2.6492	2.9487
Leu4p	2.6191	2.4074
His2p	2.5946	2.5371
Sss1 p	2.5913	2.4763
Hxt3p	2.5838	2.7714
Nhp6ap	2.4371	1.325
Ent2p	2.4163	3.4094
Gor1p	2.0853	1.321
Acp1p	1.9659	2.2052
Fpr1p	1.8182	1.6054
Guk1p	1.4599	1.627
Aim7p	1.2669	1.538
Igo2p	1.1765	1.325
Aim29p	1.1409	1.4059
Hem13p R	-1.4981	1.6645
Pgm2p	-2.0411	1.7396
Coa6p	-2.4565	3.373
Pet9p	-3.1545	1.6517

Tabela 2. Proteínas que apresentaram abundância significativa de levedura em cocultivo com bactéria homofermentativa quando comparado com o controle ao final da fermentação (24 horas). Os valores de Log₂(FC) e Log₁₀(p) obtidos da análise de volcano plot, combinado com fold change (Limite de 2) e teste t (FDR p≤0,05). Valores de Log₂ (FC) positivos apresentam alta abundância e negativos apresentaram baixa abundância.

Proteína	Log ₂ (FC)	Log ₁₀ (p)
Rtn1p	6.5889	1.6675
Cox17p	6.5413	1.7129
Pai3p	6.2943	1.4045
Chz1p	6.2873	2.7946
Nca3p	6.2733	2.0752
Cwc21 p	5.9206	1.9102
Rps18p	5.7499	1.619
Trx3p	5.7426	2.5463
Crp1p	5.5596	1.7898
Hsp31p	5.504	1.7774
Vph1p	5.1916	1.7679
Tif3p	5.1693	2.9774
Inh1p	5.129	2.6819
Scw4p	5.0422	1.9935
Cue5p	5.0304	1.5005
Caf20p	5.0246	2.0647
Yme1p	4.8467	3.9222
Shb17p	4.7713	2.3031
Rtn1p	4.7605	2.3397
Dfm1p	4.6452	2.3397
Lap4p	4.5871	1.6106
Igd1p	4.5521	1.454
Yrb2p	4.5079	2.3397
Mdg1p	4.5051	2.3031
Dph5p	4.4855	2.5513
Crs5p	4.4566	2.3089
Ess1p	4.4172	2.2444
Abp1p	4.4	1.5067
Atp14p	4.3281	1.6675
Fmp46p	4.2945	3.6186
Rad23p	4.1796	2.6706
Bat1p	4.1448	2.4661
Atp1P	4.1243	2.3397
Stm1p	4.121	2.1296
Lsb1p	4.0663	1.406
Shp1p	3.991	2.2444
Por1p	3.9595	1.3283
Cdc48p	3.9588	1.3525
Pma1p	3.9	1.4089
Ty1b p	3.8604	2.2444
Snu13p	3.857	1.3759

Rho1p	3.8112	2.027
Ppm1p	3.8068	1.4983
Adh5p	3.7997	1.4757
Uth1p	3.7782	2.0687
Glo2p	3.7719	2.4395
Rpc19p	3.7706	1.8203
Tir3p	3.7242	1.5176
Bol2p	3.7099	1.348
Vrp1p	3.7018	1.5001
Ras2p	3.6954	2.3397
Fms1p	3.6756	1.7747
Yhi9p	3.6351	2.4661
Trx2p	3.5824	2.0282
Hsp60p	3.5821	1.4691
Npc2p	3.5692	1.3525
Apt1p	3.5678	1.5005
Coa4p	3.5411	1.9102
Vti1p	3.5029	2.3539
Erg11p	3.4857	1.6659
Guk1p	3.4677	1.6969
Yck2p	3.4587	1.7774
Pir3p	3.4579	3.6186
Rps8bp	3.4433	1.6844
Tmt1p	3.4002	2.7623
Arc1p	3.3864	1.7304
See1p	3.3758	1.9102
Scs2p6	3.3595	1.8203
Pin3p	3.3419	1.7219
Bug1p	3.3291	1.6298
Yet3p	3.3027	3.2762
Arf3p	3.2881	2.3031
Met14pa	3.2865	2.3031
Rps1ap	3.2569	2.5815
Ddp1	3.2489	1.7898
Hnt1p	3.2331	2.7246
Rib5p	3.2198	2.1005
Nhp6ap	3.1194	2.0589
Cdc37p	3.094	1.488
Poa1p	3.0401	1.6675
Ede1p	2.9501	2.0282
Caj1p	2.9464	2.0647
Aro2p	2.836	1.7774
Mht1p	2.8174	2.2444
Sso1p	2.8047	2.2915
Zwf1p	2.7918	1.8203

Yet3p	2.7822	2.3089
Rpl29p	2.7179	2.7946
Atp2p	2.623	2.3089
Cmc4p	2.6133	2.2444
Dak1p	2.4588	3.373
Tah1p	2.4279	2.9774
Hub1p	2.4153	1.3978
Fpr1p	2.3054	1.9935
Rpp2ap	2.2724	1.3525
Tal1p	1.9695	1.5676
Acp1p	1.9554	2.7246
Ado1p	1.4292	1.993
Gnd1p	-1.2153	1.4512
Hxk1p	-1.283	1.9102
Hem13p	-1.4153	1.7604
Sah1p	-1.4927	1.4757
Coa6p	-2.4565	3.3347
Pet9p	-3.1545	1.6675
Lys1p	-3.414	1.9513
Hem12p	-5.1443	1.993
Dug1p	-5.2208	2.1124

Tabela 3. Proteínas que apresentaram abundância significativa de levedura em cocultivo com bactéria homo- e heterofermentativa quando comparado com o controle ao final da fermentação (24 horas). Os valores de Log₂(FC) e Log₁₀(p) obtidos da análise de volcano plot, combinado com fold change (Limite de 2) e teste t (FDR p≤0,05). Valores de Log₂ (FC) positivos apresentam alta abundância e negativos apresentaram baixa abundância.

Proteína	log ₂ (FC)	Log ₁₀ (p)
Cmk1p	4.7238	2.9656
Erg12p	4.5688	1.8273
Crp1p	4.5454	1.9583
Get3p	4.0412	2.1152
Apt1p	3.7872	2.174
Ddp1	3.696	1.5999
Ppm1p	3.6184	2.1255
Arc1p	3.5934	1.4633
Inh1p	3.5563	1.3247
Scp1p	3.4788	1.5923
Dph5p	3.3608	1.4633
Poa1p	3.1589	2.1152
Gnd2p	3.0612	1.6237
Tmt1p	3.0278	1.8158
Trx3p	3.0208	2.1152
Rtn1p	2.9992	1.8158
Ade8p	2.9782	1.6646
Scw4p	2.9706	1.8273
Atp14p	2.9457	1.8273
Rad23p	2.9054	2.1035
Rps15p	2.9049	1.8462
Yhi9p	2.7996	1.7562
Caf20p	2.7994	1.9583
See1p	2.7538	2.1152
Cps1p	2.71	2.1255
Pet191p	2.7061	2.1152
Shp1p	2.6844	2.174
Glo2p	2.6762	2.588
Pin3p	2.6227	4.852
Nhp6ap	2.4878	1.5979
Bna7p	2.4467	3.4268
Coa6p	-2.4565	3.4052
Pet9p	-3.1545	1.376

Tabela 4. Processo biológico das proteínas e seu respectivo ID GO obtido de proteínas que apresentaram diferença significativa quanto a sua abundância durante a cultura pura de levedura e em cocultivo com bactéria heterofermentativa. São apresentados os genes utilizados para a busca e a porcentagem de proteínas obtidas para cada função.

ID GO	Processo Biológico	Gene	Proteína%
GO:0042221	Resposta a estímulo químico	CDC37, CDC48, CRS5, DFM1, HNT1, MDG1, OLE1, PDR17, RAS2, SEC13, SHP1, TRX3, YHI9, ZWF1	11
GO:0055086	Metabolismo de nucleobase, nucleosídeo e nucleotídeo.	ADE8, ATP1, ATP14, ATP2, DDP1, FAD1, GUK1, HNT1, NCA3, PDB1, PGM2, URA2, ZWF1	11
GO:0007005	Organização mitocondrial	ATP14, CDC48, COA4, COA6, HSP60, OLE1, POR1, UTH1, YME1	7
GO:0007010	Organização do citoesqueleto	AIM7, ARF3, CAP2, CDC37, CDC48, ENT2, LSB1, SCP1, VRP1	7
GO:0033043	Regulamento da organização de organelas	AIM7, BCY1, CAF20, CAP2, CDC48, ESS1, LSB1, RAS2, VRP1	7
GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	ARG56, CPA2, FPR1, HIS2, IDP1, ILV2, LEU4, URA2, MET14	7
GO:0051603	Proteólise envolvida no processo catabólico de proteínas	CDC48, CUE5, DFM1, ESS1, PEP4, SEC13, SHP1, YME1	7
GO:0006629	Processo metabólico lipídico	ACC1, ACP1, ALE1, ARF3, ERG11, ERG6, OLE1, PDR17	7
GO:0006366	Transcrição por RNA polimerase II	BCY1, CDC73, CKS1, ESS1, FPR1, NHP6A, RPB5, RVB1	7
GO:0006605	Direcionamento de proteína	APE1, DID2, HSP60, PEP4, RAS2, SSS1, YME1	6
GO:000278	Ciclo celular mitótico	ARF3, CDC48, CKS1, IGO2, RSR1, VRP1	5
GO:0002181	Tradução citoplasmática	RPL17A, RPL17B, RPS15, RPS1A, RPS21A, TIF3	5
GO:0031399	Regulação do processo de modificação de proteínas	CDC48, CDC73, CHZ1, ESS1, IGO2, POR1	5
GO:0032787	Processo metabólico do ácido monocarboxílico	ACC1, ACP1, FMS1, GOR1, OLE1, PDB1	5
GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	GPH1, GSY2, PGM2, SHP1, ZWF1	4
GO:0048193	Transporte da vesícula de Golgi	PDR17, SEC13, SNX3, TRX1, TRX2	4
GO:0006457	Dobramento de proteínas	CCT2, FPR1, HSP26, HSP60, YME1	4
GO:0006364	Processamento de rRNA	RPL17A, RPL17B, RPS1A, RPS21A, SNU13	4
GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	DDP1, GPH1, GSY2, PGM2, SHP1	4
GO:0055085	Transporte membrana	HSP60, HXT3, PET9, SSS1, YME1	4
GO:0006325	Organização da cromatina	CHZ1, ESS1, FPR1, NHP6A, RVB1	4
GO:0006897	Endocitose	ARF3, CLC1, ENT2, VRP1	3
GO:0016570	Modificação de histonas	CDC48, CHZ1, ESS1, SHG1	3
GO:0070925	Montagem de organelas	BCY1, CAF20, RAS2, SHP1	3
GO:0048308	Herança de organelas	OLE1, RTN1, TRX1, TRX2	3
GO:0048284	Fusão de organelas	CDC48, SSO1, TRX1, TRX2	3
GO:0015931	Transporte de composto contendo nucleobase	CRM1, PET9, POR1, RPS15	3
GO:0051726	Regulação do ciclo celular	CDC37, CKS1, IGO2, VRP1	3
GO:0051049	Regulamento de transporte	CLC1, DFM1, FMP46, POR1	3
GO:0018193	Modificação de peptidil-aminoácido	CHZ1, NMT1, SHG1	2
GO:0000910	Citocinese	ARF3, RSR1, VRP1	2
GO:0007059	Segregação cromossômica	CDC48, SDS22, SHP1	2
GO:0006811	Transporte de íons	PET9, POR1, YBT1	2
GO:0006383	Transcrição por RNA polimerase III	NHP6A, RPB5, RPC19	2
GO:0006397	Processamento de mRNA	CDC73, CWC21, SNU13	2
GO:0042274	Biogênese de pequenas subunidades ribossomais	RPS1A, RPS21A, SNU13	2
GO:0045333	Respiração celular	COX1, NCA3, PET9	2
GO:0006997	Organização do núcleo	ESS1, RTN1, SEC13	2
GO:0051321	Ciclo celular meiótico	RAS2, SHP1, SSO1	2

GO:0016197	Transporte endossomal	CDC48, DID2, SNX3	2
GO:0043934	Esporulação	RAS2, SHP1, SSO1	2
GO:0070647	Modificação de proteínas por conjugação/Remoção de proteínas pequenas	CDC48, CHZ1, PCI8	2
GO:0006468	Fosforilação de proteínas	CDC73, ESS1, POR1	2
GO:0006360	Transcrição por RNA polimerase I	CDC73, RPB5, RPC19	2
GO:0007033	Organização do vacúolo	SHP1, TRX1, TRX2	2
GO:0006873	Homeostase de íons celulares	COA6, PGM2, VMA13	2
GO:0008213	Alquilação de proteínas	CHZ1, PPM1, SHG1	2
GO:0051604	Maturação de proteínas	HSP60, PEP4, YME1	2
GO:0071554	Organização da parede celular ou biogênese	PIR3, UTH1	2
GO:0042273	Biogênese de grandes subunidades ribossômicas	RPL17A, RPL17B	2
GO:0006354	Alongamento de transcrição modelado por DNA	CDC73, NHP6A	2
GO:0006352	Iniciação de transcrição modelada por DNA	ESS1, NHP6A	2
GO:0006470	Desfosforilação de proteínas	ESS1, IGO2	2
GO:0006281	Reparo de DNA	CDC73, NHP6A	2
GO:0006979	Resposta ao estresse oxidativo	TRX3, ZWF1	2
GO:0006401	Processo catabólico de RNA	CDC48, IGO2	2
GO:0000054	Exportação de subunidade ribossomal do núcleo	CRM1, YRB2	2
GO:0051052	Regulação do processo metabólico do DNA	CDC48, CDC73	2
GO:0061025	Fusão de membrana	CDC48, SSO1	2
GO:0042594	Resposta à esgotamento	PEP4, TMT1	2
GO:0007114	Brotamento celular	RSR1, VRP1	2
GO:0006766	Processo metabólico da vitamina	FMS1, RIB5	2
GO:0016050	Organização da vesícula	SEC13, SSO1	2
GO:0008380	Emenda de RNA	CWC21, SNU13	2
GO:0006417	Regulamento de tradução	CAF20, IGO2	2
GO:0006310	Recombinação de DNA	<u>CDC73</u>	1
GO:0006353	Terminação de transcrição modelada por DNA	<u>ESS1</u>	1
GO:0009408	Resposta a choque térmico	<u>HSP26</u>	1
GO:0006869	Transporte lipídico	<u>PDR17</u>	1
GO:0006418	Aminoacilação de tRNA para tradução de proteínas	<u>ARC1</u>	1
GO:0006497	lipidação de proteínas	<u>NMT1</u>	1
GO:0007031	Organização do peroxissomo	<u>RTN1</u>	1
GO:0006260	Replicação de DNA	<u>CDC48</u>	1
GO:0006970	Resposta ao estresse osmótico	<u>CDC37</u>	1
GO:0007124	Crescimento de pseudo-hifas	<u>RAS2</u>	1
GO:0009311	Processo metabólico de oligossacarídeos	<u>PGM2</u>	1
GO:0008033	Processamento de tRNA	<u>LHP1</u>	1
GO:0008643	Transporte de carboidratos	<u>HXT3</u>	1
GO:0043543	Acilação de proteínas	<u>NMT1</u>	1
GO:0006413	Iniciação da tradução	<u>TIE3</u>	1

Tabela 5. Função biológica de proteínas e seu respectivo ID GO obtido de proteínas que apresentaram diferença significativa quanto a sua abundância durante a cultura pura de levedura e em cocultivo com bactéria heterofermentativa. São apresentados os genes utilizados para a busca e a porcentagem de proteínas obtidas para cada função.

ID GO	Função Biológica	Genes	Proteínas %
GO:0016491	Atividade oxidorreductase	ARG56, COX1, ERG11, FMS1, GOR1, GRX8, HEM13, IDP1, IRC24, OLE1, PDB1, TRX1, TRX2, TRX3, ZWF1	12
GO:0043167	Ligação de íons	APE1, ARC1, COA6, CRS5, HNT1, ILV2, LEU4, MHT1, RAS2, SSO1, YME1	9
GO:0022857	Atividade do transportador transmembranar	ATP1, ATP14, ATP2, COX1, HXT3, PET9, POR1, SSS1, VMA13, YBT1	8
GO:0030234	Atividade reguladora de enzimas	ARC1, ARF3, BCY1, CDC48, CKS1, INH1, PAI3, SDS22, SHP1	7
GO:0003735	Constituinte estrutural do ribossomo	RPL17A, RPL17B, RPS15, RPS1A, RPS21A, RPS8A	5
GO:0016874	Atividade de ligação	ACC1, ATP1, ATP14, ATP2, CPA2, URA2	5
GO:0003723	Ligação de RNA	ARC1, CRM1, LHP1, SNU13, TIF3	4
GO:0016887	Atividade de hidrólise de ATP	ATP1, ATP14, ATP2, CDC48, HSP60	4
GO:0008168	Atividade de metiltransferase	ERG6, MHT1, PPM1, SHG1, TMT1	4
GO:0016301	Atividade de quinase	ARG56, CMK1, GUK1, MET14	3
GO:0051082	Ligação proteica desdobrada	CCT2, CDC37, HSP26, HSP60	3
GO:0003729	Ligação de mRNA	ARF3, HSP26, SCW4, TIF3	3
GO:0016853	Atividade isomerase	ESS1, FPR1, PGM2, SEC53	3
GO:0005198	Atividade da molécula estrutural	CLC1, PIR3, SEC13, SSS1	3
GO:0008092	Ligação às proteínas do citoesqueleto	CAP2, SCP1, VRP1	2
GO:0016779	Atividade de nucleotidiltransferase	FAD1, RPB5, RPC19	2
GO:0008289	Ligação lipídica	ARC1, SNX3, SSO1	2
GO:0016740	Atividade de transferência	ADE8, ILV2, URA2	2
GO:0032182	Ligação a proteínas do tipo ubiquitina	CDC48, CKS1, CUE5	2
GO:0008233	Atividade peptidase	APE1, PEP4, YME1	2
GO:0030674	Atividade adaptadora proteína-macromolécula	CUE5, SCP1, SSO1	2
GO:0003924	Atividade GTPase	ARF3, RAS2, RSR1	2
GO:0016757	Atividade de glicosiltransferase	GPH1, GSY2	2
GO:0003677	Ligação de DNA	HSP60, NHP6A	2
GO:0003682	Ligação de cromatina	CDC73, NHP6A	2
GO:0016791	Atividade de fosfatase	HIS2, SHB17	2
GO:0042393	Ligação de histona	CHZ1, CKS1	2
GO:0016787	Atividade de hidrolase	DDP1, TML25	2
GO:0019899	Ligação de enzimas	CDC73, ESS1	2
GO:0004386	Atividade de helicase	RVB1	1
GO:0004518	Atividade de nuclease	DDP1	1
GO:0016798	Atividade da hidrolase, atuando nas ligações glicosil	SCW4	1
GO:0003700	Atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA	FPR1	1

Tabela 6. Processo biológico das proteínas e seu respectivo ID GO obtido de proteínas que apresentaram diferença significativa quanto a sua abundância durante a cultura pura de levedura e em cocultivo com bactérias homofermentativa. São apresentados os genes utilizados para a busca e a porcentagem de proteínas obtidas para cada função.

ID GO	Processo Biológico	Genes	Proteínas %
GO:0042221	Resposta a estímulo químico	CDC37, CDC48, CRS5, DAK1, DFM1, EDE1, GND1, HNT1, HSP31, M DG1, RAD23, RAS2, SFA1, SHP1, TRR1, TRX3, VPH1, YAR1, YCK2, Y HI9, ZWF1	19
GO:0055086	Metabolismo de nucleobase, nucleosídeo e nucleotídeo	ADO1, ATP1, ATP14, ATP2, DDP1, GND1, GUK1, HNT1, HXK1, NC A3, SAH1, TAL1, ZWF1	12
GO:0007005	Organização mitocondrial	ATP14, CDC48, COA4, COA6, COX17, HSP60, POR1, UTH1, YME1	8
GO:0051603	Proteólise envolvida no processo catabólico de proteínas	CDC48, CUE5, DFM1, ESS1, RAD23, SEM1, SHP1, YME1	7
GO:0033043	Regulamento de organização de organelas	ABP1, CAF20, CDC48, ESS1, LSB1, PIN3, RAS2, RHO1	7
GO:0007010	Organização do citoesqueleto	ABP1, ARF3, CDC37, CDC48, EDE1, LSB1, PIN3, RHO1	7
GO:0006366	Transcrição por RNA polimerase II	BOL2, CKS1, ESS1, FPR1, NHP6A, RAD23, RPB5	7
GO:0006520	Processo metabólico de aminoácidos	ARO2, FPR1, IDH2, LYS1, SAH1, SFA1	6
GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	DAK1, DDP1, HXK1, IGD1, RHO1, SHP1	6
GO:0002181	Tradução citoplasmática	DPH5, RPL29, RPP2A, RPS1A, RPS8B, TIF3	6
GO:0055085	Transporte membrana	HSP60, HXK1, LYS1, PET9, PMA1, YME1	6
GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	GND1, HXK1, IGD1, SHP1, TAL1, ZWF1	6
GO:0006457	Dobramento de proteínas	CAJ1, FPR1, HSP31, HSP60, TAH1, YME1	6
GO:0006979	Resposta ao estresse oxidativo	GND1, HSP31, TRR1, TRX3, YAR1, ZWF1	6
GO:0048284	Fusão de organelas	CDC48, RHO1, SSO1, TRX2, VTI1	5
GO:0006605	Direcionamento de proteína	APE1, HSP60, LYS1, RAS2, YME1	5
GO:0032787	Processo metabólico do ácido monocarboxílico	ACP1, FMS1, GLO2, HSP31, HXK1	5
GO:0051726	Regulação do ciclo celular	CDC37, CKS1, EDE1, RHO1, SEM1	5
GO:0006325	Organização da cromatina	CHZ1, ESS1, FPR1, NHP6A	4
GO:0031399	Regulação do processo de modificação de proteínas	CDC48, CHZ1, ESS1, POR1	4
GO:0006629	Processo metabólico lipídico	ACP1, ARF3, ERG11, SAH1	4
GO:0016570	Modificação de histonas	CDC48, CHZ1, ESS1, SEM1	4
GO:0070925	Montagem de organelas	CAF20, PMA1, RAS2, SHP1	4
GO:0042274	Biogênese de pequenas subunidades ribossomais	RPS1A, RPS8B, SNU13, YAR1	4
GO:0007033	Organização do vacúolo	RHO1, SHP1, TRX2, VTI1	4
GO:0006897	Endocitose	ARF3, EDE1, RHO1, YCK2	4
GO:0006811	Transporte de íons	PET9, PMA1, POR1, YBT1	4
GO:0000278	Ciclo celular mitótico	ARF3, CDC48, CKS1, RHO1	4
GO:0051049	Regulamento de transporte	DFM1, FMP46, POR1, RHO1	4
GO:0008380	Emenda de RNA	CWC21, HUB1, POA1, SNU13	4
GO:0015931	Transporte de compostos contendo nucleobases	PET9, POR1, SEM1	3
GO:0006383	Transcrição por RNA polimerase III	NHP6A, RPB5, RPC19	3
GO:0071554	Organização da parede celular ou biogênese	PIR3, RHO1, UTH1	3
GO:0048193	Transporte da vesícula de Golgi	BUG1, TRX2, VTI1	3
GO:0061025	Fusão de membrana	CDC48, SSO1, VTI1	3
GO:0006397	Processamento de mRNA	CWC21, HUB1, SNU13	3

GO:0045333	Respiração celular	IDH2, NCA3, PET9	3
GO:0070647	Modificação de proteínas por conjugação ou remoção de proteínas pequenas	CDC48, CHZ1, SEM1	3
GO:0006970	Resposta ao estresse osmótico	CDC37, VPH1, YAR1	3
GO:0043934	Esporulação	RAS2, SHP1, SSO1	3
GO:0051604	Maturação de proteínas	COX17, HSP60, YME1	3
GO:0051321	Ciclo celular meiótico	RAS2, SHP1, SSO1	3
GO:0000910	Citocinese	ARF3, EDE1, RHO1	3
GO:0006364	Processamento de rRNA	RPS1A, RPS8B, SNU13	3
GO:0007059	Segregação cromossômica	CDC48, SHP1	2
GO:0006360	Transcrição por RNA polimerase I	RPB5, RPC19	2
GO:0006997	Organização do núcleo	ESS1, RTN1	2
GO:0000902	Morfogênese celular	HUB1, YCK2	2
GO:0048308	Herança de organelas	RTN1, TRX2	2
GO:0006352	Iniciação de transcrição modelada por DNA	ESS1, NHP6A	2
GO:0016050	Organização da vesícula	SSO1, VTI1	2
GO:0006417	Regulamento de tradução	CAF20, DPH5	2
GO:0018193	Modificação de peptidil-aminoácido	CHZ1, DPH5	2
GO:0007031	Organização de peroxissomos	LYS1, RTN1	2
GO:0008213	Alquilação de proteínas	CHZ1, PPM1	2
GO:0006766	Processo metabólico da vitamina	FMS1, RIB5	2
GO:0000054	Exportação de subunidade ribossomal do núcleo	YAR1, YRB2	2
GO:0006468	Fosforilação de proteínas	ESS1, POR1	2
GO:0006873	Homeostase de íons celulares	COA6, VPH1	2
GO:0006260	Replicação de DNA	CDC48	1
GO:0051052	Regulação do processo metabólico do DNA	CDC48	1
GO:0008033	Processamento de tRNA	POA1	1
GO:0008643	Transporte de carboidratos	HXK1	1
GO:0006869	Transporte lipídico	NPC2	1
GO:0006413	Iniciação da tradução	TIF3	1
GO:0006354	Alongamento de transcrição modelado por DNA	NHP6A	1
GO:0016197	Transporte endossomal	CDC48	1
GO:0007124	Crescimento de pseudo-hifas	RAS2	1
GO:0006353	Terminação de transcrição modelada por DNA	ESS1	1
GO:0006418	Aminoacilação de tRNA para tradução de proteínas	ARC1	1
GO:0006414	Alongamento translacional	DPH5	1
GO:0006281	Reparo de DNA	NHP6A	1
GO:0007114	Brotamento celular	RHO1	1
GO:0006470	Desfosforilação de proteínas	ESS1	1
GO:0042594	Resposta à esgotamento	TMT1	1
GO:0006401	Processo catabólico de RNA	CDC48	1

Tabela 7. Função biológica das proteínas e seu respectivo ID GO obtido de proteínas que apresentaram diferença significativa quanto a sua abundância durante a cultura pura de levedura e em cocultivo com bactérias homofermentativa. São apresentados os genes utilizados para a busca e a porcentagem de proteínas obtidas para cada função.

GO ID	Função Biológica	Genes	Proteínas%
GO:0043167	Ligação de íons	APE1, ARC1, COA6, CRS5, DUG1, GLO2, HNT1, MHT1, NPC2, RAS2, SFA1, SSO1, TRR1, VPH1, YME1	14
GO:0016491	Atividade oxidoreductase	ARO2, ERG11, FMS1, GND1, HEM13, IDH2, LYS1, SFA1, TRR1, TRX2, TRX3, ZWF1	11
GO:0030234	Atividade reguladora de enzimas	ARC1, ARF3, CDC48, CKS1, IGD1, INH1, PAI3, RPP2A, SHP1	8
GO:0022857	Atividade do transportador transmembranar	ATP1, ATP14, ATP2, PET9, PMA1, POR1, VPH1, YBT1	7
GO:0016887	Atividade de hidrólise de ATP	ATP1, ATP14, ATP2, CDC48, HSP60	4
GO:0008168	Atividade de metiltransferase	DPH5, EFM4, MHT1, PPM1, TMT1	4
GO:0016301	Atividade de quinase	ADO1, DAK1, GUK1, HXK1, YCK2	4
GO:0032182	Ligação a proteínas do tipo ubiquitina	CDC48, CKS1, CUE5, EDE1, RAD23	4
GO:0003677	Ligação de DNA	CRP1, HSP60, NHP6A, RAD23	3
GO:0016787	Atividade de hidrolase	DDP1, GLO2, SAH1, TML25	3
GO:0003735	Constituinte estrutural do ribossomo	RPL29, RPP2A, RPS1A, RPS8B	3
GO:0030674	Atividade adaptadora proteína-macromolécula	CUE5, RAD23, SSO1, VTI1	3
GO:0003729	Ligação de mrna	ARF3, LYS1, SCW4, TIF3	3
GO:0008289	Ligação lipídica	ARC1, NPC2, SSO1, VPH1	3
GO:0003924	Atividade gtpase	ARF3, RAS2, RHO1	2
GO:0008233	Atividade peptidase	APE1, DUG1, YME1	2
GO:0003723	Ligação de RNA	ARC1, SNU13, TIF3	2
GO:0051082	Ligação proteica desdobrada	CDC37, HSP60, YAR1	2
GO:0016829	Atividade de liase	ARO2, HEM12, HSP31	2
GO:0016874	Atividade de ligação	ATP1, ATP14, ATP2	2
GO:0016791	Atividade de fosfatase	POA1, SHB17	1
GO:0042393	Ligação de histona	CHZ1, CKS1	1
GO:0016798	Atividade da hidrolase, atuando nas ligações glicosil	POA1, SCW4	1
GO:0016740	Atividade de transferência	RDL2, TAL1	1
GO:0016853	Atividade isomerase	ESS1, FPR1	1
GO:0016779	Atividade de nucleotidiltransferase	RPB5, RPC19	1
GO:0008092	Ligação às proteínas do citoesqueleto	ABP1	1
GO:0019899	Ligação de enzimas	ESS1	1
GO:0004518	Atividade de nuclease	DDP1	1
GO:0003682	Ligação de cromatina	NHP6A	1
GO:0005198	Atividade da molécula estrutural	PIR3	1
GO:0003700	Atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA	FPR1	1

Tabela 8. Processo biológico das proteínas e seu respectivo ID GO obtido de proteínas que apresentaram diferença significativa quanto a sua abundância durante a cultura pura de levedura e em cocultivo com bactérias homo e- heterofermentativa. São apresentados os genes utilizados para a busca e a porcentagem de proteínas obtidas para cada função.

ID GO	Processo Biológico	Genes	Proteínas %
GO:0055086	Metabolismo de nucleobase, nucleosídeo e nucleotídeo	ADE8, ATP14, BNA7, DDP1, ERG12, GND2	18
GO:0042221	Resposta a estímulo químico	GET3, RAD23, SHP1, TRX3, YHI9	15
GO:0007005	Organização mitocondrial	ATP14, COA6, PET191	9
GO:0051603	Proteólise envolvida no processo catabólico de proteínas	CPS1, RAD23, SHP1	9
GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	DDP1, SHP1	6
GO:0006417	Regulamento de tradução	CAF20, DPH5	6
GO:0015931	Transporte de compostos contendo nucleobases	PET9, RPS15	6
GO:0070925	Montagem de organelas	CAF20, SHP1	6
GO:0033043	Regulamento de organização de organelas	CAF20, PIN3	6
GO:0006091	Geração de metabólitos precursores e energia	GND2, SHP1	6
GO:0006366	Transcrição por RNA polimerase II	NHP6A, RAD23	6
GO:0007010	Organização do citoesqueleto	PIN3, SCP1	6
GO:0002181	Tradução citoplasmática	DPH5, RPS15	6
GO:0006997	Organização do núcleo	RTN1	3
GO:0006873	Homeostase de íons celulares	COA6	3
GO:0018193	Modificação de peptidil-aminoácido	DPH5	3
GO:0006811	Transporte de íons	PET9	3
GO:0048193	Transporte da vesícula de Golgi	GET3	3
GO:000803	Processamento de tRNA	POA1	3
GO:0006383	Transcrição por RNA polimerase III	NHP6A	3
GO:0006418	Aminoacilação de tRNA para tradução de proteínas	ARC1	3
GO:0007033	Organização do vacúolo	SHP1	3
GO:0051321	Ciclo celular meiótico	SHP1	3
GO:0045333	Respiração celular	PET9	3
GO:004393	Esporulação	SHP1	3
GO:0007059	Segregação cromossômica	SHP1	3
GO:0006414	Alongamento translacional	DPH5	3
GO:0006281	Reparo de DNA	NHP6A	3
GO:0042594	Resposta à esgotamento	TMT1	3
GO:0006352	Iniciação de transcrição modelada por DNA	NHP6A	3
GO:0032787	Processo metabólico do ácido monocarboxílico	GLO2	3
GO:0055085	Transporte transmembranar	PET9	3
GO:0006605	Direcionamento de proteína	GET3	3
GO:0008213	Alquilação de proteínas	PPM1	3
GO:0006325	Organização da cromatina	NHP6A	3
GO:0006979	Resposta ao estresse oxidativo	TRX3	3
GO:0006354	Alongamento de transcrição modelado por DNA	NHP6A	3
GO:0048308	Herança de organelas	RTN1	3
GO:0006629	Processo metabólico lipídico	ERG12	3
GO:0007031	Organização de peroxissomos	<u>RTN1</u>	3
GO:0009408	Resposta ao choque térmico	<u>GET3</u>	3

GO:0008380	Emenda de RNA	<u>POA1</u>	3
------------	---------------	-------------	---

Tabela 9. Função biológica das proteínas e seu respectivo ID GO obtido de proteínas que apresentaram diferença significativa quanto a sua abundância durante a cultura pura de levedura e em cocultivo com bactérias homo e- heterofermentativa. São apresentados os genes utilizados para a busca e a porcentagem de proteínas obtidas para cada função.

ID GO	Função Biológica	Gene	Proteínas %
GO:0043167	Ligação de íons	ARC1, COA6, CPS1, GET3, GLO2	15
GO:0008168	Atividade de metiltransferase	DPH5, EFM4, PPM1, TMT1	12
GO:0003677	Ligação de DNA	CRP1, NHP6A, RAD23	9
GO:0016787	Atividade de hidrolase	DDP1, GLO2, TML25	9
GO:0030234	Atividade reguladora de enzimas	ARC1, INH1, SHP1	9
GO:0022857	Atividade do transportador transmembranar	ATP14, PET9	9
GO:0016798	Atividade da hidrolase, atuando nas ligações glicosil	POA1, SCW4	9
GO:0030674	Atividade adaptadora proteína-macromolécula	RAD23, SCP1	9
GO:0016491	Atividade oxidoredutase	GND2, TRX3	9
GO:0016887	Atividade de hidrólise de ATP	ATP14, GET3	9
GO:0016301	Atividade de quinase	CMK1, ERG12	9
GO:0051082	Ligação proteica desdobrada	GET3	3
GO:0016791	Atividade de fosfatase	POA1	3
GO:0003735	Constituinte estrutural do ribossomo	RPS15	3
GO:0005085	Atividade do fator de troca de guanil-nucleotídeo	GET3	3
GO:0032182	Ligação a proteínas do tipo ubiquitina	RAD23	3
GO:0008233	Atividade peptidase	CPS1	3
GO:0003729	Ligação de mrna	SCW4	3
GO:0008092	Ligação às proteínas do citoesqueleto	SCP1	3
GO:0003682	Ligação de cromatina	NHP6A	3
GO:0003723	Ligação de RNA	ARC1	3
GO:0016740	Atividade de transferência	ADE8	3
GO:0008289	Ligação lipídica	ARC1	3
GO:0004518	Atividade de nuclease	DDP1	3
GO:0016874	Atividade de ligação	ATP14	3

Tabela 10. Metabólitos que apresentaram abundância significativa em cocultivo com bactéria heterofermentativa quando comparado com o controle para os tempos 0, 6 e 24 horas de fermentação. NIST ID e nome usual de cada metabólito são reportados. Os valores de Log₂(FC) e Log₁₀(p) obtidos da análise de volcano plot, e análise de *fold change thresbol* (Limite de 2) e teste t FDR p≤0,05. Valores de log₂ (FC) positivos apresentam alta abundância e metabólitos negativos apresentaram baixa abundância. As classe e subclasses de cada metabólito obtidos no banco de dados Yeast Metabolome Database (YMD) e Human Metabolome Database (HMDB).

Tempo	NIST ID	Metabólito	Log ₂ (FC)	Log ₁₀ (p)	Classe	Subclasse
0h	119455-mainlib	1,4-Butanediol	2.6856	5.8259	Compostos organo-oxigenados	Álcool e polióis
	197243-mainlib	Metil 2,6-dihidroxibenzoato	5.3628	2.5694	Benzeno e derivados substituídos	Ácidos benzóicos e derivados
	190292-mainlib	Ácido Mandélico	5.7927	4.9673	Benzeno e derivados substituídos	Benzeno e derivados substituídos
	38261-mainlib	Xilitol	7.261	1.7954	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	37692-mainlib/86849-mainlib	Propileno glicol	-47.874	4.9673	Compostos organo-oxigenados	Álcoois e polióis
	38852-mainlib	1,5-Anidro-D-sorbitol	-51.628	5.8427	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
6h	38643-mainlib	Acido Pentanoico	3.882	2.1931	Acils Graxos	Ácidos graxos e conjugados
	168481-mainlib	Monoetil Fosfato/Etilfosfato	4.4287	2.1931	Ácidos graxos e conjugados	Ácidos fosfóricos orgânicos e derivados
	9296-replib/36240-mainlib	Valina	4.5561	1.694	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	86253-mainlib	Fenilpropanolamino	5.5144	2.1931	Benzeno e derivados substituídos	Fenilpropanos
	115347-mainlib	Pirrolididona	6.654	2.1931	Pirrolidinas	Pirrolidonas
	191513-mainlib	Ácido Cítrico	6.833	2.2679	Ácidos carboxílicos e derivados	Ácidos tricarboxílicos e derivados
	27420-replib	Tirosina	7.5917	4.0799	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	86488-mainlib/164581-mainlib	Serina	49.128	4.0799	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	38909-mainlib	Ácido Eritronico	49.914	4.0457	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	182910-mainlib	Ácido Glutâmico	51.009	4.0799	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	37588-mainlib	Glicina	52.443	4.9412	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	86440-mainlib	Alanina	53.224	4.7979	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
24h	11990-replib	Ácido Decanoico, etil ester	-4.8553	1.3258	Acils Graxos	Ésteres de ácidos graxos
	9636-replib	Cinamato	2.5533	2.0817	Ácidos cinâmicos e derivados	Ácidos cinâmicos e derivados
	164513-mainlib	1-Cicloexano-1-Ácido carboxílico	3.1734	1.6917	Compostos organo-oxigenados	Compostos organo-oxigenados
	38869-mainlib	Ácido Mercaptoacético	3.7877	2.0817	Ácidos carboxílicos e derivados	Ácidos carboxílicos

	9961-replib	Ácido Linoleico	4.814	2.0817	Acils Graxos	Ácidos Linéólicos e Derivados
	39036-mainlib/131231-mainlib	Ácido Pentanoico, 3-metil	4.9439	2.2083	Acils Graxos	Ácidos graxos e conjugados
	38673-mainlib	Ácido Isovalerico	-2.7892	1.9133	Acils Graxos	Ácidos graxos e conjugados

Tabela 11. Metabólitos que apresentaram abundância significativa em cocultivo com bactéria homofermentativa quando comparado com o controle para os tempos 0, 6 e 24 horas de fermentação. O ID e nome usual de cada metabólito são reportados. Os valores de Log₂(FC) e Log₁₀(p) obtidos da análise de volcano plot, e análise de *fold change thresbol* (Limite de 2) e teste t FDR $p \leq 0,05$. Valores de log₂ (FC) positivos apresentam alta abundância e metabólitos negativos apresentaram baixa abundância As classe e subclasses de cada metabólito obtidos no banco de dados Yeast Metabolome Database (YMD) e Humam Metabolome Database (HMDB).

Tempo	ID	Metabólito	Log ₂ (FC)	Log ₁₀ (p)	Classe	subclasse
0h	86852-mainlib	2,3-Butandiol	1.7346	1.4261	Compostos organo-oxigenados	Álcoois e polióis
	125141-mainlib	Acetona/Propanona	3.1149	1.4821	Compostos organo-oxigenados	Compostos carbonílicos
	147073-mainlib	Tirosol	-5.5163	5.4854	Fenol	Tirossóis e derivados
	37692-mainlib/86849-mainlib	Propileno glicol	-48.274	3.1639	Compostos organo-oxigenados	Álcoois e polióis
6h	190293-mainlib	Ácido Mandélico	2.5402	3.0715	Benzeno e derivados substituídos	Benzeno e derivados substituídos
	11990-replib	Ácido Decanoico; Decanoic acid	-51.17	3.7732	Acils Graxos	Ácidos graxos e conjugados
24h	38869-mainlib	Ácido Mercaptoacético	2.9388	2.0718	Ácidos carboxílicos e derivados	Ácidos carboxílicos
	197073-mainlib	3-Hidroxi-4-methoxyphenil ethilene glicol	2.9886	4.7352	Fenól	Metoxifenóis
	47725-mainlib	Stigmasterol	3.3229	3.1331	Esteróides e derivados de esteróides	Estigmas e derivados
	9961-replib	Ácido Linoleico	4.824	3.5175	Acils Graxos	Ácidos Lineólicos e Derivados
	167184-mainlib	Ácido Benzenopropanoic /Tirosina	4.3364	4.7352	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	115348-mainlib/143906-mainlib/115343-mainlib	Ornitina	53.473	3.2359	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	39414-mainlib	Glicerol	-2.4809	1.4145	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	38673-mainlib	Ácido Isovalérico	-2.7892	2.0718	Acils Graxos	Ácidos graxos e conjugados
	38880-mainlib/9088-replib	Ácido Málico	-46.962	4.24	Hidroxiácidos e derivados	Beta hidroxiácidos e derivados

Tabela 12. Metabólitos que apresentaram abundância significativa em cocultivo com bactéria homo- e heterofermentativa quando comparado com o controle para os tempos 0, 6 e 24 horas de fermentação. O ID e nome usual de cada metabólito são reportados. Os valores de Log₂(FC) e Log₁₀(p) obtidos da análise de volcano plot, e análise de *fold change threshol* (Limite de 2) e teste t FDR $p \leq 0,05$. Valores de log₂ (FC positivos apresentam alta abundância e metabólitos negativos apresentaram baixa abundância) As classe e subclasses de cada metabólito obtidos no banco de dados Yeast Metabolome Database (YMD) e Human Metabolome Database (HMDB).

Tempo	ID	Metabólito	Log ₂ (FC)	Log ₁₀ (p)	Classe	subclasse
	40043-mainlib	Frutofuranose	2.1919	2.9684	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	40051-mainlib	Ribose-5- fosfato	3.0057	4.8583	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	38518-mainlib	Ácido Pentanedioico	3.8552	3.7632	Ácidos carboxílicos e derivados	Ácidos dicarboxílicos e derivados
	38809-mainlib	Ácido Glicérico	3.8853	5.3606	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	9598-replib	Ácido Benzóico	4.6333	3.8534	Benzeno e derivados substituídos	Ácidos benzóicos e derivados
	86253-mainlib	Fenilpropanolamina	5.7402	4.0807	Benzeno e derivados substituídos	Fenilpropanos
	27420-replib	Tirosina	11.418	3.4541	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	38742-mainlib	Ácido Malônico	50.784	5.0274	Ácidos carboxílicos e derivados	Ácidos dicarboxílicos e derivados
	38909-mainlib	Ácido Eritrônico	51.551	4.2217	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	171358-mainlib/118825-mainlib	Homoserina	51.928	8.7258	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	86488-mainlib/164581-mainlib	Serina	52.133	8.7068	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	119424-mainlib	Ácido Acético	52.376	5.2777	Compostos organo-oxigenados	Ácidos carboxílicos e derivados
	38880-mainlib/9088-replib	Ácido Málico	53.108	8.7258	Hidroxiácidos e derivados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	9296-replib/36240-mainlib	Valina	54.025	7.444	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	182607-mainlib/119480-mainlib	Ácido Fumarico/Ácido Maleico	54.72	8.7258	Compostos organo-oxigenados	Ácidos carboxílicos e derivados
	40201-mainlib	Glicerol-3-Fosfato	64.125	5.2079	Glicerofosfolípidios	Glicerofosfatos
	38412-mainlib/38447-mainlib	Treonina	53.587	4.4282	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos

	38852-mainlib	1,5-Anidro-D-sorbitol	-51.629	6.4553	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
6h	38777-mainlib	D-Ribono-1,4-lactona	3.0518	1.6652	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	38768-mainlib	L-(-)-Arahitol	3.1238	1.6652	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	146504-mainlib	2-Alil-1,4-dimetoxibenzeno	3.7823	2.5079	Benzeno e derivados substituídos	Ácidos benzóicos e derivados
	40218-mainlib	Beta-D-glucopiranosida	-4.5794	1.5424	Compostos organo-oxigenados	Carboidratos e conjugados de carboidratos
	38261-mainlib	Xilitol	-6.7791	1.6652	Compostos orgânicos de oxigênio	Compostos organo-oxigenados
	176199-mainlib	Ácido Decanoico	-51.169	3.7603	Acils Graxos	Ácidos graxos e conjugados
24h	38869-mainlib	Ácido Mercaptoacético	3.3284	1.8385	Ácidos carboxílicos e derivados	Ácidos carboxílicos
	38643-mainlib	Ácido Pentanoico;	3.9739	3.1807	Acils Graxos	Ácidos graxos e conjugados
	39055-mainlib/39626-mainlib	Ácido Aspártico	49.763	5.2978	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	38742-mainlib	Ácido Malônico	49.823	4.6573	Ácidos carboxílicos e derivados	Ácidos dicarboxílicos e derivados
	39149-mainlib	Lisina	51.39	7.0095	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	86440-mainlib	Alanina	51.953	5.5744	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos
	171358-mainlib/118825-mainlib	Homoserina	-51.168	4.6186	Ácidos carboxílicos e derivados	Aminoácidos, peptídeos e análogos

ANEXO

Anexo A - 228 metabólitos intracelulares identificados em todos os tratamentos e controle. São reportados os nomes usuais e NIST ID

Metabólito	NIST ID
(+)-4-Hydroxy-alpha-(1-(methylamino)ethyl)benzyl alcohol/4-[1-Hydroxy-2-(methylamino)propyl]phenol	25890-mainlib
Acetone/Propanone	125141-mainlib
(5-methoxyindol-3-yl)-N,N-diisopropyl-glyoxylamide	143966-mainlib
(5S,8R,8aS)-8-Ethyl-5-((Z)-pent-2-en-4-yn-1-yl)octahydroindolizine/5,8-Indolizidine (5,9Z)	125894-mainlib
2-Pyrrolidinylmethanol/D-Prolinol	33752-mainlib
[1,1'-Biphenyl-3-ol], 6-chloro-/6-Chloro[1,1'-biphenyl]-3-ol	164878-mainlib
Benzidine	30375-replib
Benzene	137942-mainlib
1-(2-Methoxyethoxy)-2-methyl-2-propanol, methyl ether	37383-mainlib
p-Hydroxybenzalacetone	119775-mainlib
1-propan-2-ol/ Álcool isopropílico/Isopropano	41266-mainlib
1-Cyclohexyl-2-phenylethane/Benzene, (2-cyclohexylethyl)-	147408-mainlib
1-Cyclohexyloctadecane	202518-mainlib
Propanol	41535-mainlib
methylbenzene/Toluol	146084-mainlib
Pentane	119545-mainlib
1-Propene-1,2,3-tricarboxylic acid	38748-mainlib
1,2-Benzenedicarboxylic acid, dinonyl ester/Phthalic acid, dinonyl ester	21681-replib
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diphenyl ester/Phthalic acid, diphenyl ester	174780-mainlib
1,2-Bis(diethylamino)-1,2-bis(4-cyanophenyl)ethane	154273-mainlib
Ethane	9311-replib
1,2-Propanediol	3769-replib
Butane/n-Butane	119461-mainlib
1,3-Dioxolane-2-methanol/Acetaldehyde, hydroxy-, cyclic 1,2-ethanediyil acetal	37117-mainlib
1,3,5-Trioxepane/1,3,5-Trioxacycloheptane	14805-mainlib
10,12-Tricosadiynoic acid	37660-mainlib
14-Aza-10,12-dioxatetracyclo[6.5.1.0(2,7).0(9,13)]tetradeca-2,4,6-triene, 14-methyl-11-oxo-	103257-mainlib
1,2,4-Triazole	8088-replib
1H-Indole-3-carbonitrile, 2-(4-chlorobenzenesulfonylmethyl)-1-methyl-	139917-mainlib
2-propionaldehyde/Propanal	136476-mainlib
2-propane	186087-mainlib
2-[[2-[Dimethylamino]propyl]amino-4-[trichloromethyl]-6-[a,a,a-trichloro-m-tolyl]-S-triazine	36183-mainlib
2-ethoxyethanol	41231-mainlib
2-Butanol	15673-mainlib
2-Butanol, 3-methyl	3791-replib
Crotonic acid/2-Butenoic acid	21396-replib
2-Ethylpropane-1,3-diol	119464-mainlib
2-Fluoroimidazole/2-Fluoro-1H-imidazole	51064-mainlib
Furfural, 5-methyl/2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	78695-mainlib

D-Leucic acid/2-Hydroxyisocaproic acid	37696-mainlib
2-oxohexanoic acid/2-Ketohexanoic acid	37742-mainlib
dioxolane/Ethylene glycol formal	37075-mainlib
2-Methylaminomethyl-1,3-dioxolane/1,3-Dioxolan-2-yl-N-methylmethanamine	3492-replib
2-Mono-isobutyrim	36999-mainlib
2-Oxo-octanoic acid	37719-mainlib
2-Propanol	119575-mainlib
2-Phenyl lactic	39288-mainlib
2-Propanol	3829-replib
2-Propenoic acid/Acrylic acid/ Propenoic acid	119496-mainlib
Ethyl 5-oxo-2-pyrrolidinecarboxylate	48630-mainlib
Dimethyl 2-tert-butyl-1,3-thiazolidine-3,4-dicarboxylate	164848-mainlib
2,2-Dimethyl-5-[2-(2-trimethylsilyloxyethoxy)-propyl]-[1,3]dioxolane-4-carboxaldehyde	37019-mainlib
2,2,4,4,6,6-Hexamethylcyclotrisilazane/Hexamethylcyclotrisilazane	164852-mainlib
2,2,4,7-Tetramethyl-3,6,9-trioxa-2-siladecane	86772-mainlib
2,5-Furandione, dihydro-3-methylene-/Succinic anhydride, methylene-	1835-mainlib
Methyl 4-oxo-1-(trifluoroacetyl)-2-pyrrolidinecarboxylate	39913-mainlib
3-Amino-2,4-dimethylpentane/3-Pentanamine, 2,4-dimethyl-	36236-mainlib
3-Ethylphenol	147484-mainlib
3-Hydroxy-2-butanone/Acetoin	38385-mainlib
4-Hydroxyisovaleric acid	119431-mainlib
3,4-Dimethoxyphenol/3,4-Dimethoxyphenol	39454-mainlib
3,4,5-Trihydroxypentanoic acid	38720-mainlib
3,4,5-Trimethoxymandelic acid	190293-mainlib
3,5-Dimethoxymandelic acid	180082-mainlib
3,6,9,13-Tetraoxa-2,14-disilapentadecane, 2,2,14,14-tetramethyl-	38401-mainlib
3,9-Dioxa-2,10-disilaundecane, 2,2,10,10-tetramethyl-	32391-mainlib
(4-aminobutyl)phosphonic acid	210793-mainlib
4H-1,2,4-Triazol-3-amine, 4-ethyl-	80316-mainlib
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	1920-replib
5,5'-Bis[2-(4-aminophenyl)-1H-1,3-benzimidazol]	210115-mainlib
6-[2-Hexahydroazepino-1-hydroxyethyl]-8-methyl-2-p-methylphenylquinoline	80715-mainlib
3-methylbenzofuran	120010-mainlib
̢-D-(-)-Tagatopyranose	39371-mainlib
Glucose	164554-mainlib
̡-Methyl-D-Mannopyranoside	164503-mainlib
̡-DL-Arabinofuranoside, methyl 2,3,5-tris-O	170812-mainlib
̢-DL-Arabinopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O	170833-mainlib
̢-Sitosterol	1982-replib
Acetic acid, 2,2'-oxybis-	40007-mainlib
Acrylic /Acroleic acid	38916-mainlib
Adenosine	39093-mainlib
Adonitol	38859-mainlib
Alanine	86440-mainlib

Amphetamine-3-methyl	14293-mainlib
Arabino-Hexonic acid	39694-mainlib
Benzene, 2-[(ethenoxy)	125146-mainlib
Benzeneacetic acid, ethyl ester/Acetic acid, phenyl-, ethyl ester	197082-mainlib
Benzenepropanoic acid	167184-mainlib
Benzoic acid	9598-replib
Benzyl alcohol, a-(1-(dimethylamino)ethyl)-	8734-replib
Bis(2-ethylhexyl) phthalate	21797-replib
bromosuccinate	38716-mainlib
Butanedioic acid, 2,2-dimethyl	38734-mainlib
Butanedioic acid, methylene	38744-mainlib
Butanoic acid	53165-mainlib
Butanoic acid, 3-methyl-2-oxo-	37600-mainlib
Butyl citrate	152071-mainlib
Cinnamic acid	9408-replib
Cyclohexene, 3-butyl-3-methyl	149872-mainlib
D-(+)-Arabitol	38854-mainlib
D-(+)-Glucosamine	102960-mainlib
D-(+)-Xylose	38224-mainlib
D-Altro-2-Heptulose, 1,3,4,5,6-pentakis-O	39945-mainlib
D-Arabino-Hexonic acid, 3-deoxy-2,5,6-tris, 3-lactone	38517-mainlib
D-Arabinonic acid, 2,3,5-tris-O,3-lactone	9526-replib
D-Arabinose	39528-mainlib
D-Erythro-Pentofuranose, 2-deoxy-1,3,5-tris-O	37613-mainlib
D-Galactofuranose	39967-mainlib
2-Deoxy-D-galactose	164010-mainlib
D-(+)-Galactose	38844-mainlib
D-Gluconic acid	9633-replib
D-Glucuronic acid	39391-mainlib
D-Glycero-L-manno-Heptonic acid, 2,3,5,6,7-pentakis-O-, 3-lactone	170823-mainlib
d-Proline, N-ethoxycarbonyl-, nonyl ester	115326-mainlib
d-Proline, N-methoxycarbonyl-, dodecyl ester	100169-mainlib
d-Proline, N-methoxycarbonyl-, heptadecyl ester	100180-mainlib
D-Psicofuranose	39491-mainlib
D-Psicopyranose	39369-mainlib
D-Psicose	38759-mainlib
D-Ribo-Hexonic acid, 3-deoxy-2,5,6-tris-O-, lactone	38502-mainlib
D-Ribose, 2,3,4,5-tetrakis-O	39523-mainlib
Decanoic acid, ethyl ester	11990-replib
Decanoic acid	176199-mainlib
Deoxyribopyranose	38374-mainlib
Dihydroxyacetone dimer	38258-mainlib
Dimethylamine	3429-replib
Diphenyl isophthalate	27779-replib
DL-2,3-Butanediol	15782-mainlib

dl-7-Azatryptophan	103287-mainlib
dl-Laudanosoline hydrobromide	146751-mainlib
Dodecanoic acid, ethyl ester	11994-replib
Dodecanoic acid	9124-replib
Δ Amino levulinic acid	143914-mainlib
Ethanamine, N,N-dimethyl-2	25619-mainlib
Ethanesulfonic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]	39742-mainlib
Ethanol	15649-mainlib
Ethyl aminomethylformimidate	14824-mainlib
Ethylamine, 2-((p-bromo-a-methyl-a-phenylbenzyl)oxy)-N,N-dimethyl-	25951-mainlib
Etilefrine	25461-mainlib
Etoperidine	183099-mainlib
Fructofuranose	40043-mainlib
Fructofuranoside	171213-mainlib
Furan	30531-mainlib
Furan-2-carboxylic acid, 3-methyl	111918-mainlib
Galactopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O	26716-replib
Gluconic acid, 2,3,5,6	39508-mainlib
Glucopyranose, 1,2,3,4	39407-mainlib
Glycine, N-formyl	37793-mainlib
Glycine	37588-mainlib
Hexadecanoic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	8935-replib
Hexanoic acid	9983-replib
Hydrazine, 1-ethyl-1-(2-methylpropyl)-	37202-mainlib
Hydroquinone-6-d-glucopyranoside	39737-mainlib
Inosine	39534-mainlib
Isothiourea, 2-methyl-1-(2,4-dimethylphenyl)-3-(1,1-dimethyl-2-propynyl)-	182799-mainlib
L-(+)-Rhamnopyranose	164512-mainlib
L-(+)-Threose	119491-mainlib
L-Glutamine	39000-mainlib
L-Isoleucine	22747-replib
L-Leucine	22744-replib
L-Proline, N-methoxycarbonyl-, dodecyl ester	100160-mainlib
L-Threitol	38853-mainlib
L-Threonic acid	38908-mainlib
Mannose, 2,3,4,5,6	164553-mainlib
Mepivacaine	64610-mainlib
Mercaptoacetic acid	38869-mainlib
Methyl 2-hydroxy-4-methoxybenzoate	180171-mainlib
Methyl 2,2-dimethyl-3,6,9-trioxa-2-silaundecan-11-oate	86771-mainlib
N-Dimethylaminomethyl-tert.-butyl-isopropylphosphine	25711-mainlib
N-Methyl-4-ethoxyamphetamine	26555-mainlib
N-Trifluoroacetyl-O	197074-mainlib
N-trimethylsilylaziridine	38122-mainlib
N,N,O-4-aminomethylcyclohexane carboxylic acid	144250-mainlib

N,O-L-phenylalanine	9536-replib
Niacinamide	147082-mainlib
Nitrous oxide	3342-replib
Norpseudoephedrine	14841-mainlib
Octadecanoic acid	1782-replib
Octanoic acid	163060-mainlib
Pentanedioic acid, 3-methyl-3-[(trimethylsilyl)oxy]	38886-mainlib
Pentenoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]	38643-mainlib
Phenylethanolamine	24434-replib
Phthalic acid, 5-methylhex-2-yl nonyl ester	121174-mainlib
Phthalic acid, 6-methylhept-2-yl nonyl ester	122640-mainlib
Phthalic acid, bis(7-methyloctyl) ester	21707-replib
Phthalic acid, dodecyl nonyl ester	122485-mainlib
Phthalic acid, nonyl pentadecyl ester	121069-mainlib
Propanamide, 2,2-dimethyl-N-(2'-t-butylcarbonylphenyl)-	164490-mainlib
Propane, 2-methyl-1,2-bis(trimethylsiloxy)-	38572-mainlib
Propanedioic acid	38918-mainlib
Propanedioic acid, methyl	119438-mainlib
Propanoic acid, 2-oxo	37598-mainlib
Pyrimidine, 2,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-	180949-mainlib
Sebacic acid, 2,6-dimethoxyphenyl ethyl ester	127520-mainlib
Stigmastan-6,22-dien, 3,5-dedihydro-	18451-mainlib
Succinic acid, di(5-fluoro-2-nitrophenyl) ester	113452-mainlib
Succinic acid, diamide, N,N'-diethyl-N,N'-diphenyl-	164846-mainlib
Thiazole, 2-hydroxy-4-methyl-5-(6-chloroethyl)-	99987-mainlib
Threitol, 1,2,3,4-tetrakis-O	38248-mainlib
2-acetoxyacetate	37027-mainlib
3-methoxy-4-(trimethylsilyloxy)cinnamate	9636-replib
glucitol	40094-mainlib
Undecan, 1,11-bis(9,10-dihydroanthracen-9-yl)-	147361-mainlib
(2-Ethoxyethoxy)acetic acid	37193-mainlib
(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)ethylene glycol	197073-mainlib
4 Aminobutanoic acid/4-Aminobutyric acid	143908-mainlib
1-(2-Hydroxybenzyl)-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-7-isoquinolinol	146641-mainlib
1-Aminocyclopentanecarboxylic acid, N-methoxycarbonyl-, octyl ester	115608-mainlib
1-Buten-3-yne	17095-mainlib
1-Deoxypentitol	38399-mainlib
1-Ethylsulfanylmethyl-2,8,9-trioxa-5-aza-1-sila-bicyclo[3.3.3]undecane	144277-mainlib
1-Glucopyranosylpiperidine	164767-mainlib
1,2-Ethenediol	37234-mainlib
1,2-Octadecanediol	202416-mainlib
1,2,3-Butanetriol	38436-mainlib
1,2,3-Trihydroxybenzene	39664-mainlib
1,2,4-Butano	14465-replib
1,3-Diethynylbenzene	186051-mainlib

3,8-Dioxa-2,9-disiladecane	119455-mainlib
1,5-Anhydro-D-sorbitol	38852-mainlib
16-Methyl-heptadecane-1,2-diol	202417-mainlib
2',5'-Dimethoxypropiophenone	136701-mainlib
2-(3-Bromo-5,5,5-trichloro-1,1-dimethylpentyl)-1,3-dioxolane	37089-mainlib
2-(6-Fluoro-1H-indol-3-yl)propylamine	86261-mainlib
2-Allyl-1,4-dimethoxybenzene	146504-mainlib
2-Deoxy-galactopyranose	39363-mainlib
2-Deoxytetrionic acid	39637-mainlib
2-ethyl-3-hydroxy-butanoate	38423-mainlib
2-Furoic acid	97859-mainlib
2-Hydroxy-2-methylbutyric acid	38671-mainlib
Pentanoic acid, 3-methyl	39036-mainlib/131231-mainlib
Pentanedioic acid	38518-mainlib
2-Hydroxymethylfuran-5-carboxylic acid	38895-mainlib
2-Hydroxyvaleric acid	38672-mainlib
2-Isopropyl-3-ketobutyrate	39215-mainlib
2-Isopropylmalic acid	39838-mainlib
2-Keto-d-gluconic acid	38850-mainlib/39903-mainlib
2-Methyl-1,3-butanediol	86839-mainlib
2-Methylacetoacetic acid	119508-mainlib
2-O-Glycerol-a-d-galactopyranoside	164496-mainlib
2-Phosphoglyceric acid	182213-mainlib
2,2-Dimethyl-3-hydroxybutanoic acid	38432-mainlib
2,3-Butandiol	86852-mainlib
2,3-Dimethylsuccinic acid	119444-mainlib
2,3,4-Trimethoxymandelic acid	190292-mainlib
2,4-Dihydroxypentan-1,5-dioic acid	39693-mainlib
2,5-Dimethoxybenzaldehyde	23691-replib
2,5-Dimethoxymandelic acid	180081-mainlib
3-Amino-2-cyclohexenone	48262-mainlib
3-Deoxypentitol	39622-mainlib
3-Deoxytetrionic acid	68941-mainlib
3-Methyl-1,2-butane	38666-mainlib
3,4-Dihydroxybutanoic acid	38879-mainlib
3,4-Dimethoxymandelic acid	180080-mainlib
3,8-Dioxa-2,9-disiladecane, 2,2,4,9,9-pentamethyl-5-[(trimethylsilyloxy)-	68923-mainlib
4-Hydroxy-3-methoxyphenethylene glycol	197083-mainlib
4-Hydroxybenzoic acid	189627-mainlib
4-Hydroxybutyric acid	119436-mainlib
4-Hydroxyphenylethanol	147073-mainlib
5-Aminovaleric acid	143939-mainlib
5-Methyluridine	39480-mainlib
5-Nitro-3-phenyl-1H-indazole	180298-mainlib
a-Methyl 4-methylmannoside	39361-mainlib

Acetyl-Lysine	143916-mainlib
Adenine	188798-mainlib
Adenosine	39649-mainlib
Ala-Gly	86256-mainlib
̢-Alanine	68518-mainlib/143942-mainlib/41530-mainlib/86273-mainlib/14828-mainlib
Alanine, N-methyl-N-methoxycarbonyl-, undecyl ester	86442-mainlib
Allonic acid, 1,4-lactone	38863-mainlib
Aminoisobutyric acid	39144-mainlib
Aminomalonic acid	38864-mainlib
L-(-)-Arabitol	38768-mainlib
2,3,4,5-Tetrahydroxypentanoic acid-1,4-lactone	38424-mainlib
Asparagine	9234-replib/14815-mainlib
Aspartic acid	39055-mainlib/39626-mainlib
Aucubin	37875-mainlib
Benzoic acid	73508-mainlib
Bis(2-chloroethyl) ether	59953-mainlib
Cadaverine	143920-mainlib
Carbitol	37192-mainlib
Catechol	39732-mainlib
Citramalic acid	39704-mainlib
Citric acid	191513-mainlib
Cysteine	39566-mainlib
d-Erythrotetrofuranose	38865-mainlib
Arabino-hexaric acid, 3-deoxy-2,4,5	39695-mainlib
Erythro-Pentonic acid, 2-deoxy-3,4,5-tris-O	38732-mainlib
Malonic acid	38742-mainlib
Diethylene glycol	38410-mainlib
Erythritol	38855-mainlib
D-(-)- Erythrofuranose	38812-mainlib
Erythronic acid	38909-mainlib
Erythronic acid lactone	37670-mainlib
Ethanedioic acid	38695-mainlib
Ethyl-alpha-D-glucopyranoside	164509-mainlib
Ethyl 5-ethoxy-3,4-dihydro-2H-pyrrole-2-carboxylate	49298-mainlib
Ethyl pipercolinate	48924-mainlib
Formylpiperidine	81086-mainlib
a-D-(-)-Tagatopyranose	39370-mainlib/39373-mainlib/38826-mainlib/164515-mainlib
D-(-)-Tagatose	38207-mainlib
Fumaric acid/Maleic acid	182607-mainlib/119480-mainlib
D-Galactose, 2,3,4,5,6	9498-replib/9365-replib/164550-mainlib/164551-mainlib
D-(+)-Galacturonic acid	39387-mainlib
Glucaric acid	40135-mainlib
Gluconolactone	38783-mainlib

Glucosamine	164009-mainlib
Glutamic acid	182910-mainlib
Glyceric acid	38809-mainlib
Glycerol	39414-mainlib
Glycerol-3-phosphate	40201-mainlib
Glyceryl-glycoside	164510-mainlib
Glycine	68519-mainlib/143909-mainlib
Acetic acid	119424-mainlib
Gulose	164567-mainlib
Hexadecanoic acid	9118-replib
Homoserine	171358-mainlib/118825-mainlib
Hydroquinone	180345-mainlib
Hydroxypyruvic acid	38693-mainlib
Hypoxanthine	189064-mainlib
Inositol	9527-replib/38857-mainlib
Inositol 6-phosphate	9617-replib
Isoleucine	51164-mainlib
Isovaleric acid	38673-mainlib
Ketovaleric acid	37599-mainlib
L-Leucine, N-methyl-N-(2-methoxyethoxycarbonyl)-, tetradecyl ester	163783-mainlib
Lactic acid	38429-mainlib/119500-mainlib
Lactic acid dimer	38434-mainlib
Leucine	50781-mainlib
Levoglucosan	39390-mainlib
Linoleic acid	9961-replib
Lysine	39149-mainlib
Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-	170841-mainlib/170821-mainlib/170816-mainlib/170817-mainlib
Lyxose	39380-mainlib
Malic acid	38880-mainlib/9088-replib
Malonic acid	38917-mainlib/119448-mainlib
Mannitol	38861-mainlib
Mannonic acid, 1,4-lactone	39502-mainlib
Mannopyranose 6-phosphate	39404-mainlib
6-D-(+)-Mannopyranose	164533-mainlib/39379-mainlib/164538-mainlib/164536-mainlib/164542-mainlib/164556-mainlib/164552-mainlib/164557-mainlib/164534-mainlib/164535-mainlib/164563-mainlib/39377-mainlib/164549-mainlib
d-Mannose	9364-replib
Methyl (3,4-dimethoxyphenyl)(hydroxy)acetate	180294-mainlib
Methyl 1,2-dimethyl-5-oxo-2-pyrrolidinecarboxylate	80457-mainlib
Methyl 2,6-dihydroxybenzoate	197243-mainlib
Methyl α -L-fucopyranoside	164506-mainlib
Methyl galactoside	39358-mainlib

Methyl mannofuranoside	170808-mainlib
Methyl Я-d-galactopyranoside	164500-mainlib
Methylmaleic acid	38806-mainlib
Methylsuccinic acid	119442-mainlib
Monoethyl phosphate	168481-mainlib
N-Isobutyl-N'-oxooctadecanohydrazide	164011-mainlib
o-(2-Hydroxyethyl)phenol	9206-replib
Octadecanoic acid	9244-replib
Ornithine	115348-mainlib/143906-mainlib/115343-mainlib
Phenyl-3-buten-1-ol	39173-mainlib
Phenylglycine	146360-mainlib
Phenylpropanolamine	86253-mainlib
Phosphoric acid, monomethyl ester	180906-mainlib
Pipelic acid	129208-mainlib/48951-mainlib
Proline	9291-replib/34273-mainlib
Propylene glycol	37692-mainlib/86849-mainlib
Protocatechuic acid	25909-replib
Putrescine	143937-mainlib
2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid	49101-mainlib/129206-mainlib
Pyrrolidinone	115347-mainlib
Pyruvic acid	119415-mainlib
Rhamnose	39381-mainlib
Ribitol	9203-replib
Ribonic acid	38766-mainlib
D-Ribono-1,4-lactone	38777-mainlib
Ribose-5- phosphate	40051-mainlib
S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]N,N-dimethylcarbamoyl thiocarbohydroximate	26097-mainlib
Serine	86488-mainlib/164581-mainlib
1-Cyclohexene-1-carboxylic acid	164513-mainlib
Sitosterol	101993-mainlib
Sorbose	38761-mainlib
Stigmasterol	47725-mainlib
Butanedioic acid	119441-mainlib
3,5-dimethoxy-4-benzoate	202500-mainlib
Fructofuranose	39494-mainlib/39495-mainlib/39490-mainlib/170818-mainlib/170822-mainlib/39492-mainlib/39493-mainlib
Talofuranose	170820-mainlib/170819-mainlib
Tartaric acid	38907-mainlib
Threonine	38412-mainlib/38447-mainlib
Pyrimidine	185875-mainlib
Thymol-beta-d-glucopyranoside	40218-mainlib
Tryptophan	26576-replib/163565-mainlib
Tyrosine	27420-replib
Uracil	38117-mainlib

Urea	120080-mainlib
Uridine	39499-mainlib
Valine	9296-replib/36240-mainlib
Benzeneacetic acid, 3-methoxy-a,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]	9599-replib
Xylitol	38261-mainlib
Xylopyranose	39394-mainlib
Xylulose	38204-mainlib