

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

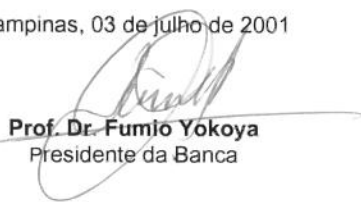
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS QUE AFETAM A
FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS ISOLADAS DE
PROCESSOS INDUSTRIAIS DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Valmir Eduardo Alcarde** aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de julho de 2001.

Campinas, 03 de julho de 2001


Prof. Dr. Fumio Yokoya
Presidente da Banca

Valmir Eduardo Alcarde
Engenheiro Agrônomo

Prof. Dr. Fumio Yokoya
Orientador

Tese apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS

Estado de São Paulo – Brasil

2001



200116939

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP
	AL16a
V.	Ex.
TOMBO BC/	45909
PROC.	16-392/01
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10-08-01
N.º CPD	

CM00158799-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

AL16a Alcarde, Valmir Eduardo
Avaliação de parâmetros que afetam a floculação de leveduras e bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica / Valmir Eduardo Alcarde. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

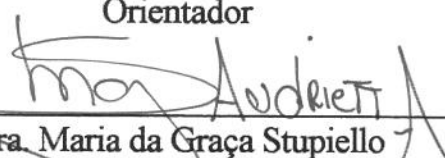
Orientador: Fumio Yokoya
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Floculação. 2.Bactérias. 3.Fermentação. I.Yokoya, Fumio. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

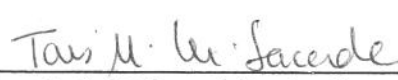
BANCA EXAMINADORA



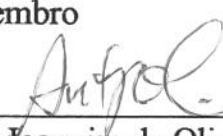
Prof. Dr. Fumio Yokoya
DCA/FEA-UNICAMP
Orientador



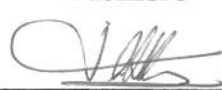
Dra. Maria da Graça Stupiello
CPQBA-UNICAMP
Membro



Profa. Dra. Taís Helena Martins Lacerda
FECQ/UNIMEP
Membro



Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira
LAN/ESALQ-USP
Membro



Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo
LAN/ESALQ-USP
Membro

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
DTA/FEA-UNICAMP
Membro

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
DCA/FEA-UNICAMP
Membro

À ANABEL, pela dedicação, compreensão e amor

Dedico

Aos meus pais JOSÉ CARLOS e NIUZA e ao meu irmão ANDRÉ

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser o meu guia em todas as etapas da vida.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya, pela sabedoria na orientação, profissionalismo e confiança constante ao longo deste trabalho.

Aos Professores Dr. Antônio Joaquim de Oliveira e Dr. Henrique Vianna de Amorim pela atenção e valiosas sugestões.

À Universidade Estadual de Campinas, através da Faculdade de Engenharia de Alimentos e do Departamento de Ciência de Alimentos, pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

À Fundação Tropical de Pesquisas “André Tosello”, pelo fornecimento de culturas microbianas para a realização deste trabalho.

À Fermentec S/C Ltda- Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica, por ceder microrganismos para a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de estudo e recursos financeiros para a realização deste trabalho.

Ao amigo Carlos Eduardo Garcia, pela convivência, amizade e auxílios prestados.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Agregação celular	3
2.2. Aspectos genéticos e fisiológicos	5
2.3. Aspectos físico-químicos	6
2.4. Ação de bactérias	8
2.5. Mecanismos de floculação.....	10
2.5.1. Hidrofobicidade celular	10
2.5.2. Ligação tipo-lectina	10
2.6. Métodos de quantificação da floculação.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Culturas de leveduras.....	15
3.1.1. Meio de cultivo para leveduras	15
3.1.2. Reativação das culturas de leveduras.....	15
3.2. Culturas de bactérias.....	15
3.2.1. Meio de cultivo para bactérias	17
3.2.2. Reativação das culturas de bactérias.....	17

3.3. Condições de cultivo de células para o teste de floculação	17
3.4. Relação entre as concentrações celulares na floculação	18
3.5. Teste de floculação	18
3.6. Efeito da temperatura na floculação	19
3.7. Efeito do teor alcoólico na floculação	20
3.8. Efeito do tratamento enzimático sobre a capacidade floculante de bactérias em leveduras	20
3.8.1. Tratamento com protease de <i>Streptomyces griseus</i>	20
3.8.2. Tratamento com papaina	20
3.9. Efeito do tratamento com modificadores químicos dos componentes da parede celular sobre a capacidade floculante de leveduras e bactérias	20
3.9.1. Modificadores químicos de proteínas	20
3.9.2. Modificadores químicos de carboidratos	21
 4. RESULTADO E DISCUSSÃO	 22
4.1. Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 134L/PE-2	22
4.2. Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 136L/VR-1	38
4.3. Influência do teor alcoólico no processo de floculação	56
4.4. Influência da temperatura no processo de floculação	61
4.5. Efeito do tratamento enzimático sobre a capacidade floculante de leveduras e bactérias	69
4.6. Efeito do tratamento com modificadores químicos dos componentes da parede celular sobre a capacidade floculante de leveduras e bactérias	71
4.6.1. Modificadores químicos de proteínas	71
4.6.2. Modificadores químicos de carboidratos	74
4.7. Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à outras leveduras	76

5. CONCLUSÕES.....	78
--------------------	----

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
-------------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1: Condições de cultivo e separação de células para o teste de floculação.....	18
Figura 2: Procedimento para o teste de floculação	19
Figura 3: Capacidade floculante de <i>L. fermentum</i> (FT 038B) frente à levedura PE-2.....	28
Figura 4: Capacidade floculante de <i>L. fermentum</i> (FT 108B) frente à levedura PE-2.....	29
Figura 5: Capacidade floculante de <i>L. fermentum</i> (FT 256B) frente à levedura PE-2.....	29
Figura 6: Capacidade floculante de <i>L. plantarum</i> (FT 032B) frente à levedura PE-2.....	30
Figura 7: Capacidade floculante de <i>L. plantarum</i> (FT 158B) frente à levedura PE-2.....	30
Figura 8: Capacidade floculante de <i>L. plantarum</i> (FT 286B) frente à levedura PE-2.....	31
Figura 9: Capacidade floculante de <i>L. fructivorans</i> (FT 091B) frente à levedura PE-2.	31
Figura 10: Capacidade floculante de <i>L. fructivorans</i> (FT 146B) frente à levedura PE-2.	32
Figura 11: Capacidade floculante de <i>L. fructivorans</i> (FT 189B) frente à levedura PE-2.	32
Figura 12: Capacidade floculante de <i>L. fructivorans</i> (FT 289B) frente à levedura PE-2.	33
Figura 13: Capacidade floculante de <i>L. fructosus</i> (FT 138B) frente à levedura PE-2.....	33
Figura 14: Capacidade floculante de <i>L. fructosus</i> (FT 243B) frente à levedura PE-2.....	34
Figura 15: Capacidade floculante de <i>L. buchneri</i> (FT 048B) frente à levedura PE-2.	34
Figura 16: Capacidade floculante de <i>B. subtilis</i> (FT 014B) frente à levedura PE-2.....	35
Figura 17: Capacidade floculante de <i>B. coagulans</i> (FT 003B) frente à levedura PE-2.....	35
Figura 18: Capacidade floculante de <i>L. fermentum</i> (CCT 2571) frente à levedura PE-2.....	36
Figura 19: Capacidade floculante de <i>L. plantarum</i> (CCT 2687) frente à levedura PE-2.....	36

Figura 20: Capacidade flocculante de <i>L. buchneri</i> (CCT 3746) frente à levedura PE-2.	37
Figura 21: Capacidade flocculante de <i>L. fermentum</i> (FT 038B) frente à levedura VR-1.	44
Figura 22: Capacidade flocculante de <i>L. fermentum</i> (FT 108B) frente à levedura VR-1.	45
Figura 23: Capacidade flocculante de <i>L. fermentum</i> (FT 256B) frente à levedura VR-1.	45
Figura 24: Capacidade flocculante de <i>L. plantarum</i> (FT 032B) frente à levedura VR-1.	46
Figura 25: Capacidade flocculante de <i>L. plantarum</i> (FT 158B) frente à levedura VR-1.	46
Figura 26: Capacidade flocculante de <i>L. plantarum</i> (FT 286B) frente à levedura VR-1.	47
Figura 27: Capacidade flocculante de <i>L. fructivorans</i> (FT 091B) frente à levedura VR-1.	47
Figura 28: Capacidade flocculante de <i>L. fructivorans</i> (FT 146B) frente à levedura VR-1.	48
Figura 29: Capacidade flocculante de <i>L. fructivorans</i> (FT 189B) frente à levedura VR-1.	48
Figura 30: Capacidade flocculante de <i>L. fructivorans</i> (FT 289B) frente à levedura VR-1.	49
Figura 31: Capacidade flocculante de <i>L. fructosus</i> (FT 138B) frente à levedura VR-1.	49
Figura 32: Capacidade flocculante de <i>L. fructosus</i> (FT 243B) frente à levedura VR-1.	50
Figura 33: Capacidade flocculante de <i>L. buchneri</i> (FT 048B) frente à levedura VR-1.	50
Figura 34: Capacidade flocculante de <i>B. subtilis</i> (FT 014B) frente à levedura VR-1.	51
Figura 35: Capacidade flocculante de <i>B. coagulans</i> (FT 003B) frente à levedura VR-1.	51
Figura 36: Capacidade flocculante de <i>L. fermentum</i> (CCT 2571) frente à levedura VR-1.	52
Figura 37: Capacidade flocculante de <i>L. plantarum</i> (CCT 2687) frente à levedura VR-1.	52
Figura 38: Capacidade flocculante de <i>L. buchneri</i> (CCT 3746) frente à levedura VR-1.	53

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Capacidade flocculante de bactérias frente à levedura FT 134L/PE-2.	24
Tabela 2: Capacidade flocculante de bactérias frente à levedura FT 136L/VR-1.	40

Tabela 3: Relação entre as populações de bactérias e leveduras no teste de floculação.....	54
Tabela 4: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 134L/PE-2, na ausência e na presença de 7,0% e 9,0% de teor alcoólico.	57
Tabela 5: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 136L/VR-1, na ausência e na presença de 7,0% e 9,0% de teor alcoólico.	59
Tabela 6: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 134L/PE-2, nas temperaturas de 33 °C e 39°C	63
Tabela 7: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 136L/VR-1, nas temperaturas de 33 °C e 39 °C	65
Tabela 8: Efeito da temperatura na floculação de leveduras.....	68
Tabela 9: Efeito na floculação do tratamento enzimático de células bacterianas com protease de <i>Streptomyces griseus</i> frente às leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1.....	69
Tabela 10: Teste de desfloculação com papaina.....	71
Tabela 11: Efeito na floculação do tratamento com modificadores químicos de proteínas em células bacterianas frente à levedura FT 134L/PE-2.	72
Tabela 12: Efeito na floculação do tratamento com modificadores químicos de proteínas em células bacterianas frente à levedura FT 136L/VR-1.....	73
Tabela 13: Efeito na floculação do tratamento com modificadores químicos de carboidratos nas leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1.	75
Tabela 14: Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à outras leveduras	77

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS QUE AFETAM A FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS ISOLADAS DE PROCESSOS INDUSTRIAIS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.

Autor: Valmir Eduardo Alcarde
Orientador: Prof. Dr. Fumio Yokoya

RESUMO

A contaminação bacteriana na fermentação alcoólica é um dos problemas que afeta o rendimento do processo de produção de álcool. A floculação de leveduras é uma das consequências desta contaminação, sendo linhagens de *Lactobacillus fermentum* a primeira bactéria citada como responsável por este fenômeno. Muitos fatores exercem influência na floculação de leveduras como os componentes genéticos, proteínas, temperatura, pH, produtos da fermentação como o etanol e necessidade de íons metálicos, especialmente o cálcio. Este trabalho teve por objetivo verificar as condições de ocorrência da floculação de leveduras causada por algumas espécies bacterianas contaminantes do processo de produção de álcool, avaliando o nível de contaminação bacteriana necessário para desencadear o processo de floculação, o efeito do teor alcoólico e da temperatura sobre a capacidade floculante destas bactérias. Além disto procurou contribuir para o esclarecimento do mecanismo de floculação de leveduras industriais provocada por espécies e cepas de bactérias contaminantes do processo, através da avaliação do efeito da modificação química de proteínas e carboidratos nas paredes celulares de bactérias e leveduras e do tratamento enzimático sobre a capacidade floculante destes microrganismos.

Os resultados obtidos indicaram que as espécies de *Lactobacillus*: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus* e *L. buchneri* podem ser responsabilizados pela floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, porém há necessidade de uma

certa relação levedura: bactéria para que ocorra floculação, e esta relação é diferente para as espécies de *Lactobacillus*.

O teor alcoólico (0 a 10%) e as temperaturas (25°C a 65°C) afetaram significativamente a capacidade floculante das bactérias frente às leveduras estudadas.

Componentes protéicos da parede celular de *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. buchneri* devem participar do processo de floculação, uma vez que modificadores químicos que reagem com os grupos funcionais fenol e indol da cadeia lateral de aminoácidos (anidrido maleico e anidrido acético) inibiram a capacidade floculante dessas bactérias, sugerindo o envolvimento destes grupamentos no processo de floculação. Já para as espécies *L. fructivorans* e *L. fructosus* o tratamento com estes modificadores químicos não afetaram o processo de floculação.

Células de *S. cerevisiae* submetidas a tratamento com modificadores químicos de carboidratos da parede celular (NaIO_4 0,01M) apresentaram inibição em sua capacidade de serem floculadas por bactérias, indicando que carboidratos são essenciais no processo de floculação.

De acordo com estes resultados sugere-se que a floculação de *Saccharomyces cerevisiae* causada por bactérias do gênero *Lactobacillus* deve apresentar um mecanismo intercelular a nível da parede celular destes microrganismos. Este processo envolve componentes protéicos da superfície celular das bactérias *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. buchneri* e carboidratos da parede celular das leveduras. Já para as espécies *L. fructivorans* e *L. fructosus* a presença de outros componentes celulares devem também estar envolvida no processo de floculação.

EVALUATION OF PARAMETERS WHICH AFFECT THE YEASTS AND BACTERIA FLOCCULATION ISOLATED FROM INDUSTRIAL ALCOHOL FERMENTATION PROCESS

Author: Valmir Eduardo Alcarde

Advisor: Prof. Dr. Fumio Yokoya

SUMMARY

The bacterial contamination in the alcoholic fermentation is one of the problems in the process of alcohol production. Yeast flocculation is one of the consequences of this contamination, that strains of *Lactobacillus fermentum* are the first one microorganism quoted as responsible by this phenomenon. Many factors may influence the yeast flocculation, such as, genetic compounds, proteins, temperature, pH, fermentation products like ethanol and necessity of metallic ions, especially calcium.

This research was carried out to examine the conditions of yeast flocculation occurrence caused by some bacterial species which contaminate the process of alcohol production, evaluating the effect of the population of contaminant bacteria needed to occur the flocculation process, effect of alcohol amount and temperature in the flocculency capacity of these bacteria. Moreover, this research tried to contribute to the flocculation mechanisms elucidation of industrial yeasts provoked by strains and cepa of contaminant bacteria of alcohol fermentation process, through the chemistry modification effect evaluation of proteins and carbohydrates from the wall of cell and the enzymic treatment on the flocculant capacity of these microorganisms.

The results obtained indicated that *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus* and *L. buchneri* can be responsible by the *S. cerevisiae* flocculation, but it

is necessary a ratio of yeast:bacteria for flocculation to occur flocculation, and this ratio is different for some species of *Lactobacillus*.

The ethanol amount (0 to 10%) and the temperature (25°C to 65°C) affected significantly the bacterial flocculence capacity on the studied yeasts.

Proteic compounds in the cell wall of *L. plantarum*, *L. fermentum* and *L. buchneri* may participate in the flocculation process, because chemical changers which react with fenol and indol funcional groups in the lateral chain of aminoacids (maleic anidride and acetic anidride) inhibited the bacterial flocculency capacity, suggesting that these groups are responsible for the flocculation process. For *L. fructivorans* and *L. fructosus* species the treatment with these chemical changers did not affect the flocculation process.

Cells of *S. cerevisiae* submitted to carbohidrate chemical changers treatment (NaIO₄ 0,01M) showed some inhibitions in their flocculant capacity promoted by bacteria, that indicates that carbohidrates are essential for flocculation process.

According of these results, it suggest that *S. cerevisiae* flocculation caused by *Lactobacillus* bacteria genus may show up a intercelular mechanisms at cell wall of these microorganisms. This process involves proteic compounds of the celular surface of *L. plantarum*, *L. fermentum* and *L. buchneri* and carbohidrates of the cell wall of the yeasts. On the other hand for *L. fructivorans* and *L. fructosus* strains, others compounds of the cell wall may also be envolved in the flocculation process.

1. INTRODUÇÃO

A floculação é um fenômeno apresentado por leveduras, as quais se unem em agregados denominados flocos constituídos por várias células. A ocorrência da floculação na fermentação alcoólica pode ser causada pela presença de cepas floculentas do gênero *Saccharomyces* e por bactérias contaminantes. Nas usinas produtoras de álcool a contaminação bacteriana é considerada a principal responsável pela floculação do fermento.

A contaminação bacteriana é um dos fatores preponderantes dentre aqueles que afetam a fermentação alcoólica, posto que é o mais frequente agente presente. Segundo Amorim et al. (1996), o maior efeito das bactérias na levedura e no rendimento da fermentação alcoólica é físico. As bactérias se unem às leveduras provocando floculação, levando-as ao fundo da dorna ocasionando na centrifugação entupimento de bicos, canalizações, ocorrendo muita perda de levedura, resultando em queda no rendimento. Este fenômeno, bastante comum nas destilarias tem motivado a indústria de álcool e pesquisadores na busca de soluções para esta questão.

Os mecanismos através do qual as bactérias exercem efeito direto na floculação de leveduras não estão totalmente esclarecido. Na floculação de leveduras floculentas o modelo mais aceito é o "modelo das lectinas", proposto por Miki et al. (1982a). Este modelo propõe a ocorrência de uma ligação específica entre as proteínas (lectinas) de células floculentas e os receptores de manana da parede celular de células adjacentes, requerendo ainda a presença de íons cálcio, cuja função é a de manter as lectinas em sua conformação ativa.

No entanto, a diversidade dos microrganismos e dos agentes envolvidos na floculação do fermento nas dornas de fermentação, bem como o grande volume de mosto manuseado durante a fermentação alcoólica industrial, tornam o controle do processo um desafio de grande importância e dificuldade. A elucidação das diferentes

causas envolvidas neste processo permitirá um controle eficiente e econômico do fenômeno da floculação.

Este estudo teve por objetivo verificar as condições de ocorrência da floculação de leveduras causada por algumas espécies bacterianas contaminantes do processo de produção de álcool, avaliando o nível de contaminação bacteriana necessária para desencadear o processo de floculação, o efeito da temperatura e do teor alcoólico sobre a capacidade floculante destas bactérias. Foram também investigados os possíveis mecanismos da floculação de leveduras industriais provocada por cepas de bactérias contaminantes do processo, através da avaliação do efeito da modificação química de proteínas e de carboidratos da parede celular, do tratamento enzimático e do aumento da temperatura sobre a capacidade floculante destes microrganismos, contribuindo assim para uma maior compreensão dos fatores envolvidos na floculação de leveduras por bactérias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A floculação é classicamente descrita como um fenômeno reversível em que células de levedura aderem-se umas as outras formando flocos que sedimentam-se rapidamente no meio em que estão suspensas (Stewart, 1975).

Quando se estuda a floculação é importante fazer a distinção entre formação de cadeias, onde células mães e filhas não se soltam umas das outras (fenômeno não reversível) e a floculação induzida (fenômeno reversível). A formação de cadeias celulares está relacionada com o crescimento e começa no início da fermentação. A floculação real pode ser considerada como uma reação de estresse, como uma resposta a um baixo nível de nutrientes ou um mecanismo de defesa contra altas concentrações de etanol. Desta forma a floculação pode ser considerada como uma estratégia de sobrevivência sendo que as células localizadas na periferia do floco protegeriam as células que estão no centro contra as condições desfavoráveis do meio (Iserentant, 1996).

A floculação das leveduras utilizadas na indústria de bebidas fermentadas (cerveja e vinho) é um fenômeno benéfico ao processamento onde é necessário a retirada do fermento da bebida. Por outro lado, a floculação das leveduras produtoras de álcool é prejudicial ao processo de fermentação alcoólica uma vez que com isto ocorre uma maior perda de células de levedura no fundo de dorna ou nas centrífugas (Yokoya & Oliva-Neto, 1991).

2.1. Agregação celular

Na literatura o termo agregação é designado por muitos pesquisadores como adesão, aglomeração, coesão, associação e floculação (Atkinson & Daoud, 1976). Porém, em biotecnologia e microbiologia, estudam-se vários processos referentes a associação de células com elas próprias (floculação)(Miki et al., 1982b); com células

estranhas (contaminações)(Serra et al., 1976) ou com um material inerte (adesão)(Reid et al., 1988).

A agregação de células de levedura pode ser provocada por mecanismos aparentemente similares, entre eles a formação de cadeias (Eddy, 1955), agregação sexual (Calleja, 1987) e a floculação (Stewart & Russel, 1986). Além disso, a adição de lectinas (Stratford & Bond, 1992) e a presença de substâncias floculantes de diversas composições também podem acarretar a agregação de células de levedura (Nakamura et al., 1976).

O fenômeno da floculação em leveduras pode ser considerado como um mecanismo de sobrevivência (Stratford, 1992). Possivelmente, este ocorre através da interação proteína-carboidrato da parede celular dos microrganismos (Miki et al., 1982a), requerendo a presença de cátions metálicos (Mill, 1964b). Isto pode ser sugerido uma vez que se verificou a ocorrência de inibição da floculação causada por agentes quelantes, como o EDTA (Stewart, 1975), por solução de açúcares específicos (Taylor & Orton, 1975) ou por enzimas e agentes modificadores de proteínas (Nishihara et al., 1976).

Muitos fatores exercem influência na floculação de leveduras como os componentes genéticos (Zarattini et al., 1993); proteínas, agitação e stress (Momose et al., 1969; Stratford e Keenan, 1988); produtos da fermentação como o etanol (Patel e Ingledew, 1975); pH (Masy et al., 1991) e íons metálicos (Kuriyama et al., 1991).

Yokoya (1989) observou que íons cálcio intensificam a agregação e que a agitação da mistura é fundamental para o início da floculação. Segundo Yokoya e Oliveira Neto (1991), a concentração de cálcio necessária para estimular completamente a floculação é de 10^{-3} M a qual é dependente do pH ou seja, enquanto que a pH 6,2 e pH 3,0 a floculação é nula sem a presença deste íon, a pH 4,5 observa-se uma floculação parcial nas mesmas condições. Ainda, segundo os mesmos autores, o magnésio e o manganês podem substituir o cálcio para provocar a floculação total a pH 6,2, desde que adicionados em concentrações maiores, ou seja 10^{-1} M e 10^{-2} M, respectivamente.

No trabalho de Yokoya & Oliva-Neto (1991) foi constatado que o tratamento térmico e enzimático com protease resultava na perda da capacidade floculante das células bacterianas, sugerindo que um fator de natureza protéica seria responsável pela capacidade floculante de *L. fermentum*.

Com relação aos carboidratos, Santos & Yokoya (1993) verificaram que concentração de 10^{-1} M de manose causa completa desfloculação. Já a glucose, a maltose e a sacarose não produzem nenhum efeito. Ainda os mesmos autores citam que o tratamento térmico aplicado sobre as células bacterianas provoca a perda da sua capacidade floculadora. A temperatura necessária para inativação efetiva é de 55°C se a suspensão estiver a pH 4,5 e de 70°C a pH 6,2, indicando que o fator é mais estável a pH mais próximo da neutralidade.

Segundo Miki et al. (1982a) o gene FLO-1 determina a expressão do comportamento protéico da parede celular similar à lectina, dependente de cálcio nas células floculentas que ligam a manana de células adjacentes. Se a célula adjacente for também floculenta há uma interação bilateral, e se for não floculenta essa interação é unilateral. Trabalhos realizados com linhagens FLO-1, usando coloração seletiva com concavalina A-ferretina e microscopia eletrônica, mostraram que a manana da parede celular participava da floculação. A interação se estendia por toda área causando a distorção da parede no local do contato.

2.2. Aspectos genéticos e fisiológicos

A floculação é um processo controlado geneticamente, originado por um complexo mecanismo, o qual é constituído por características genéticas cromossômicas (Miki et al., 1982b) e extracromossômicas (Jin & Speers, 1999a; Wilkie & Evans, 1982)

A ocorrência da floculação relaciona-se com a presença de genes FLO (Lewis et al., 1976), os quais compreendem, principalmente, os genes dominantes FLO 1 (Watari et al., 1991); FLO 2 (Lewis et al., 1976); FLO 4 (Stewart & Russel, 1986); FLO 5

(Vezinhet et al., 1991) e FLO 8 (Yamashita & Fukui, 1983). De acordo com análises realizadas verificou-se que os genes FLO 1, FLO 2 e FLO 4 são alelos, sendo então considerados como pertencentes ao locus Flo 1 (Russel et al., 1980).

O metabolismo celular é necessário para a ocorrência da floculação, porém, após seu estabelecimento este fenômeno torna-se propriedade da parede celular, uma vez que estas estruturas mantêm a capacidade floculante dos microrganismos (Miki et al., 1982a).

Observou-se que a floculação aumenta rapidamente na metade final da fase exponencial de crescimento (Mill, 1964b). Bielecki & Brzeski (1989), por sua vez, relataram a ocorrência de floculação em células de *Saccharomyces cerevisiae* durante todos os estágios de crescimento celular, sugerindo que este fenômeno seja dependente da disponibilidade de um número suficiente de sítios receptores, necessitando além disso, que os mesmos se encontrem em correta conformação para que as células formem agregados estáveis. Estes mesmos pesquisadores verificaram que células filhas novas apresentam um grau de floculência menor que a célula mãe, porém, à medida que as células filhas passam por divisões celulares, estas adquirem a característica de flocular.

2.3. Aspectos físico-químicos

Muitos estudos tem sido realizados sobre os aspectos físico-químicos do fenômeno de floculação (Jin & Speers, 1999a).

A agitação mecânica é requerida para superar a repulsão eletrostática entre as células (Stratford, 1989). Verificou-se a existência de um limite mínimo de agitação, abaixo do qual a floculação não ocorre, sendo este dependente da cepa do microrganismo. À medida que a agitação se intensifica, as colisões tornam-se mais frequentes e fortes e uma grande proporção de células podem ser encontradas livres no meio, ocorrendo então, a desfloculação. Sob agitação constante, um equilíbrio dinâmico

é alcançado entre as células dispersas e os flocos, o qual é diretamente proporcional ao quadrado da concentração celular presente (Stratford & Keenan, 1988).

Kamada & Murata (1984) verificaram a intensificação da taxa de floculação de cepas de *Saccharomyces* com o aumento da temperatura de 0°C para 30°C. Mill (1964b) observou que, quando uma suspensão de leveduras floculentas utilizadas na produção de cerveja era aquecida de 23°C para 62°C, acontecia inicialmente uma progressiva diminuição da floculação. Entre 50°C a 62°C ocorria uma drástica inibição do processo mas, após o retorno a uma temperatura menor, a floculação era restabelecida. Similarmente, verificou-se que flocos da levedura *Schizosaccharomyces pombe* mostraram-se estáveis na faixa de 20-50°C, enquanto que temperaturas mais altas causavam uma desfloculação reversível, a qual atingiu o máximo em valores maiores que 80°C (Calleja, 1970).

A mudança do pH acarreta um efeito profundo na floculação, sendo que o pH ótimo é dependente da cepa do microrganismo (Calleja, 1987).

O efeito dos sais na floculação é complexo e dependente de algumas variáveis como o tipo de cátion, cepa da levedura, pH e força tampão (Stratford & Brundish, 1990).

A maioria dos autores concorda com a especificidade do cálcio como agente promotor da floculação de leveduras (Stratford, 1989; Taylor & Orton, 1975). No entanto, esta opinião não é compartilhada por outros autores (Nishihara et al., 1976; Souza et al., 1992; Stewart, 1975), que consideram o magnésio e o manganês, além de outros íons, tão eficazes quanto o cálcio.

O efeito promotor da floculação de leveduras pelo íon cálcio pode ser suspenso ou reduzido através da lavagem com água destilada ou com agentes quelantes, como o EDTA (Stewart, 1975). Esta inibição pode ser revertida com nova adição de íons cálcio (Stratford, 1989).

2.4. Ação de bactérias

A contaminação bacteriana na fermentação alcoólica é um dos problemas que afeta diretamente o desempenho do processo de produção de álcool (Amorim et al., 1989). A floculação de leveduras é uma das consequências desta contaminação, onde as células de levedura aglomeram-se formando flocos que dificultam o contato com o substrato, reduzindo o rendimento e aumentando o tempo de fermentação (Serra et al., 1976). Além disto ocorrem dificuldades operacionais relacionadas principalmente com o entupimento de canalizações e problemas na separação do fermento nas centrífugas (Altherthum et al., 1984; Tilbury, 1975).

Yokoya (1989) relata que o problema da floculação de leveduras por contaminantes bacterianos tem sido intensificado pelo reciclo de células, que consiste na reutilização do chamado "leite de leveduras". Esta prática provocaria o acúmulo dos agentes de floculação, diminuindo a eficiência da fermentação.

Trabalhos de caracterização dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica mostraram que as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são as de maior ocorrência (Gallo, 1989; Oliva-Neto, 1990; Rodini, 1985; Rosales, 1989). Yokoya & Oliva-Neto (1991) indicam cepas de *Lactobacillus fermentum* como o principal microrganismo responsável pelo processo de floculação; no entanto para que houvesse floculação o número de células de bactéria deveria atingir um valor crítico em relação ao número de células de levedura. Estes mesmos autores citam que a floculação ocorre numa faixa de pH que varia de 2,0 a 12,0.

Serra et al (1976) relacionaram a contaminação bacteriana nas dornas de fermentação com o problema de floculação, identificando uma espécie de *Sporolactobacillus* como responsável pela floculação do fermento. O principal efeito desta contaminação, de acordo com estes autores, consistiria no aumento progressivo do tempo de fermentação como consequência da diminuição da superfície útil das células de levedura, e redução de aproximadamente 15% no rendimento fermentativo.

Momose et al., (1969) constataram que cepas de levedura eram floculadas por *Lactobacillus plantarum*. O fenômeno ocorre a um pH entre 2,0 a 4,0 e é inibido por sais neutros. O estudo da mobilidade eletrostática das células de bactéria e leveduras mostrou que a floculação possivelmente era causada pela atração eletrostática entre as superfícies celulares de bactérias e leveduras com cargas opostas.

Estudos de contaminação bacteriana na indústria do álcool no Estado de São Paulo indicaram que as espécies de *Leuconostoc*, bactérias produtoras de goma, não estariam envolvidas na floculação, uma vez que não são capazes de sobreviver por longos períodos nas condições de fermentação alcoólica (Kaji, 1989).

Para que se possa reduzir a contaminação no leite de leveduras utiliza-se o tratamento com ácido sulfúrico. Este tratamento ácido promoveu uma redução de 45% em média na flora contaminante de acordo com Gallo (1989).

Serra et al., (1976) observaram que a adição de ácido provocou a separação das células, desfazendo os flocos. Yokoya (1989) cita que a desfloculação com a acidificação da suspensão das leveduras tem sido comumente observada nas destilarias de álcool. Este efeito mostrou-se reversível, uma vez que a floculação era restabelecida quando o pH era ajustado a valores superiores a 2,5.

No trabalho de Yokoya & Oliva-Neto (1991) foi constatado que o tratamento térmico e enzimático com proteases resultava na perda da capacidade floculante das células bacterianas, sugerindo que um fator de natureza protéica seria responsável pela capacidade floculante de *L. fermentum*. Este fator estaria intimamente ligado à superfície celular, uma vez que o sobrenadante da cultura não apresentou capacidade floculadora.

De acordo com Garcia (1999) cepas de *L. fermentum* e de *L. fructivorans* podem ser responsabilizadas pela floculação do fermento industrial, porém o nível bacteriano para que a floculação ocorra é variável para estas espécies de *Lactobacillus*.

2.5. Mecanismos da floculação

Vários mecanismos são propostos para explicar o fenômeno da floculação e os modelos mais aceitos são aqueles que estão baseados em um aumento da hidrofobicidade celular durante a fermentação ou em uma ligação tipo-lectina (Stratford, 1996).

2.5.1. Hidrofobicidade celular

Vários autores enfatizaram a importância da hidrofobicidade celular na agregação celular (Amory et al., 1988; Straver et al., 1993). Os trabalhos de Straver e co-autores mostram que a limitação de nutrientes induz a mudanças nas características físico-químicas da parede celular da levedura e que estas mudanças levam a um aumento na hidrofobicidade da levedura. O aumento da hidrofobicidade coincide com a floculação e é causado pela síntese de uma glicoproteína que pode ser a maior causa da floculação de leveduras (Straver et al., 1993).

2.5.2. Ligação tipo-lectina

Lectinas são proteínas hábeis em ligar resíduos de açúcar. Por um mecanismo similar, algumas proteínas da parede celular das leveduras podem ligar-se a resíduos de açúcares das glicoproteínas da parede celular de outras células de leveduras. Esta ligação induziria a floculação. Esta hipótese é fortemente coerente segundo os resultados de Stratford & Assinder (1991) e Stratford (1992). A proteína tipo-lectina seria sintetizada durante a fermentação e o cálcio seria necessário para a ativação da proteína. O cálcio que ativou a proteína é hábil em unir as cadeias de manose das glicoproteínas das leveduras. Esta ligação resultaria na formação de flocos e por consequência a floculação das leveduras.

Stratford e co-autores (Stratford, 1989; Stratford & Assinder, 1991) sustentam que há pelo menos duas famílias de lectinas de leveduras: grupo Flo1 (cepas que carregam o gene FLO1, mas também aquelas com os genes FLO5 e FLO8 e aquelas

com o gene floculante) e o grupo NewFlo. No grupo Flo1 a ligação de lectina é primariamente inibida por manose e independente do pH do meio. Cepas microbianas isoladas de cervejarias, entretanto, frequentemente pertencem ao grupo NewFlo em que a floculação não é apenas inibida pela manose, mas também por sacarose, maltose e glucose.

Frequentemente a teoria da hidrofobicidade e a teoria da ligação tipo-lectina são tratadas como dois mecanismos independentes. Isto não é necessariamente o caso. As proteínas da parede celular do grupo Flo1 são fortemente hidrofóbicas; este é também o caso para outras proteínas glicosiladas da parede celular que podem agir como açúcar ligante na ligação tipo-lectina. A síntese destas proteínas resultaria em um grande aumento na hidrofobicidade da célula de levedura. Portanto, hidrofobicidade e ligação tipo-lectina deveriam ser consideradas como dois aspectos do mesmo mecanismo (Iserentant, 1996).

2.6. Métodos de quantificação da floculação

Um dos maiores problemas nos estudos de floculação está na escolha de um método rigoroso para determinar este fenômeno. Vários métodos para quantificar a floculação de leveduras são relatados na literatura. Entretanto, não se tem uma opinião consensual sobre o método de quantificação da floculação a ser utilizado.

A despeito do primeiro método de quantificação da floculação de leveduras ter sido descrito por Schönfeld em 1909 (citado por Greenshields et al., 1972), o método de sedimentação descrito por Burns em 1937 é a base para a maioria das análises atuais de floculação. Este método tem sido melhorado e modificado por vários autores como Helm et al., 1953; Mill (1964a e 1964b); Greenshields et al., (1972); Patel & Ingledew (1975); Stewart (1975); Miki et al., (1982a e 1982b).

O teste de Burns (1937) e suas múltiplas versões, tanto quanto o método descrito por Nielsen em 1937 (citado por Soares & Mota, 1997), subsequentemente melhorado por Nishihara et al., (1976) têm em comum o fato de que as células

tenham sido removidas do meio de crescimento, lavadas e então deixadas para sedimentar em um meio padronizado com Ca^{++} em sua composição e pH definidos. Este procedimento foi criticado por Woof em 1962 como sendo artificial, porque estes testes foram geralmente feitos em solução tampão na ausência de etanol, com um número de células 100-200 vezes maior que os valores geralmente obtidos no final da fermentação da cerveja (Soares & Mota, 1997). Gilliland (1951) propôs um novo método em que as medidas fossem feitas no meio de crescimento; este método foi considerado como um teste *in vivo* em oposição aos testes descritos acima, considerados testes *in vitro*. As técnicas de Helm e Gilliland são as bases para a maioria das análises de floculação e são os métodos de quantificação da floculação adotados pelo European Brewing Convention em 1981 (citado por Soares & Mota, 1997).

Além dos testes de sedimentação reportados acima, outros métodos foram desenvolvidos para determinar a floculação de leveduras baseados na dispersão das leveduras floculadas em suspensão pela ação de açúcares (Eddy, 1955), EDTA (Stahl et al., 1983) ou calor (Taylor & Orton, 1975).

Nos anos 80 uma análise mais detalhada foi feita com a influência da concentração inicial de células (Kihn et al., 1988b; Miki et al., 1982a e 1982b) e agitação (Amory et al., 1988; Kihn et al., 1988b; Stratford et al., 1988; Stratford & Keenan, 1988; Stratford & Wilson, 1990) na quantificação de floculação de leveduras. Desta forma, técnicas adicionais ou variantes de outras mais antigas também foram descritas. Na década de 80, Miki et al. (1982a e 1982b), aperfeiçoaram um método descrito por Woof em 1962. Kihn et al. (1988a e 1988b) e Smit et al. (1992) desenvolveram seus próprios métodos que são uma modificação do método descrito por Miki et al. (1982a e 1982b). Stratford & Keenan (1988) descreveram um novo método completamente padronizado; neste método uma suspensão celular constituída inteiramente de células soltas foi agitada durante várias horas (4 - 6 horas) até que o equilíbrio entre a fração de células floculadas e soltas

fosse atingido. Uma revisão detalhada dos métodos de quantificação da floculação de leveduras foi feita por Calleja (1984); Calleja & Johnson (1977) e Speers et al. (1992).

Algumas técnicas medem diretamente a floculação através do exame microscópico ou redução da turbidez da suspensão celular, mas a maioria das técnicas encontradas nos ensaios medem indiretamente, usando como parâmetro a velocidade ou grau de sedimentação dos flocos formados. Para medir a sedimentação usa-se no geral a técnica da absorbância, tanto da parte não floculada (sobrenadante) como do sedimento formado após a ressuspensão. Nas diversas técnicas disponíveis é essencial a padronização das etapas para a sua medida porque a floculação é afetada por íons e outros componentes do meio, por pH, temperatura, grau e forma de agitação (Stratford et al., 1988; Taylor & Orton, 1975).

O exame direto do material ao microscópio, embora forneça informações detalhadas como o número de células que integram cada floco e o número e diversidade de flocos em relação ao total de células de levedura, é uma técnica trabalhosa e demorada, além de estar sujeita a erros individuais do observador (Calleja & Johnson, 1977).

Embora os flocos grandes que se formam sejam visíveis a olho nú, essa observação fornece resultados apenas qualitativos. Já os testes de sedimentação fornecem resultados mais consistentes (Suzzi et al., 1984). Assim as técnicas mais comumente utilizadas para quantificar a floculação consistem na medida da sedimentação, que é uma forma indireta de avaliar o grau de floculação. No geral, a estimativa das células do sedimento formado ou remanescente na suspensão após a sedimentação é feita por turbidimetria (Calleja & Johnson, 1977).

Taylor e Orton (1975) citam que a redução da absorbância pela formação de agregado celular pode ser medida em espectrofotômetro. Esta técnica também mede diretamente o grau de floculação e é influenciada pelas condições experimentais como pH, temperatura, aparelho utilizado na leitura, velocidade e forma de agitação. Os

resultados permitem comparar diferentes culturas ou condições de floculação, segundo os autores.

Nas condições do experimento, o incremento na agitação aumenta a floculação pelo aumento da probabilidade de colisão entre as partículas. Entretanto, com o transcorrer do tempo, há também a quebra dos flocos formados resultando em um estado de equilíbrio, o qual é dependente da cepa e da velocidade de agitação (Stratford e Keenan, 1988). Se a intensidade de agitação for mantida constante em determinado método de ensaio, a quantidade de células livres reflete a floculência da levedura. Assim, a medida da absorbância do sobrenadante após a sedimentação dos flocos representa um parâmetro adequado para caracterizar a floculência da levedura (Kihn et al., 1988b).

Na ausência de um método consensual, alguns autores (Speers et al., 1992) enfatizam a necessidade urgente de padronização de um teste de floculação. Com o propósito de uma padronização de um método para quantificar a floculação de leveduras, nos últimos anos a American Society of Brewing Chemists (ASBC) formou um subcomitê encarregado da avaliação e melhoria do método de Helm. Speers et al. (1992) propuseram um protótipo de método ideal de floculação.

Um método de quantificação de leveduras baseado no teste de floculação de Helm foi melhorado por Soares & Mota (1997). Neste método, todos os passos foram padronizados: concentração de células, amostragem e determinação de células sedimentadas. Os resultados obtidos com o teste de sedimentação não diferiram significativamente daqueles obtidos com o teste de Stratford (1989). Os resultados demonstraram claramente que o método melhorado no trabalho de Soares & Mota (1997) é rigoroso para a quantificação da floculação de leveduras e permite a diferenciação da capacidade de floculação das cepas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Culturas de leveduras

Para este estudo foram utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1), isoladas da Usina da Pedra e da Usina Vale do Rosário, respectivamente. Estas leveduras foram as que mais persistiram no processo fermentativo durante as safras 94/95 e 95/96, de acordo com Basso et al. (1996).

Além destas foram avaliadas também as seguintes espécies: *Saccharomyces chevalieri* (FT 119L); *Saccharomyces kluyveri* (FT 151L); *Schizosaccharomyces pombe* (FT 155L); *Pichia ohmeri* (FT 061L) e *Candida krusei* (FT 056L).

Estas culturas encontram-se conservadas em estado liofilizado e fazem parte da coleção de microrganismos da empresa Fermentec S/C Ltda.-Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica.

3.1.1. Meio de cultivo para leveduras

Para a reativação das células de levedura foi utilizado o meio de cultivo líquido YEPD (extrato de levedura-1,0%; peptona-1,0%; dextrose-2,0%).

3.1.2. Reativação das culturas de leveduras

As culturas de leveduras foram reativadas em tubo de ensaio contendo 5,0 mL de meio de cultivo líquido YEPD. Depois de incubadas a 30°C por 24 horas, a cultura foi repicada novamente nas mesmas condições, por mais 24 horas.

3.2. Culturas de bactérias

As culturas de bactérias utilizadas nos experimentos foram: *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus*, *L. buchneri*, *Bacillus subtilis* e *B. coagulans*. Estas bactérias foram isoladas de processos fermentativos para a produção de álcool de cana-de-açúcar e identificadas segundo metodologia descrita por Gallo (1989)

e fazem parte da coleção de microrganismos da empresa Fermentec S/C Ltda.- Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica, identificadas com a sigla “FT”.

Além destas foram testadas também linhagens “Tipo” das seguintes espécies: *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. buchneri* que fazem parte da coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, identificadas com a sigla “CCT”. Estas culturas encontram-se conservadas em estado liofilizado. (Quadro 1).

QUADRO 1: Bactérias utilizadas e suas respectivas origens

BACTÉRIA	CÓDIGO	ORIGEM
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT 038B	Destilaria Jardest-SP
	FT108B	Usina Vale do Rosário-SP
	FT 256B	Usina MB-SP
	CCT 2571	“Linhagem Tipo”
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FT 032B	Usina Batatais-SP
	FT 158B	Usina Alta Mogiana-SP
	FT 286B	Usina MB-SP
	CCT 2687	“Linhagem Tipo”
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	FT 091B	Debrasa-MS
	FT 146B	Usina Ester-SP
	FT 189B	Usina Alto Alegre-PR
	FT 289B	Usina MB-SP
<i>Lactobacillus fructosus</i>	FT 138B	Usina da Pedra-SP
	FT 243B	Usina Batatais-SP
<i>Lactobacillus buchneri</i>	FT 048B	Destilaria Pioneiros-SP
	CCT 3746	“Linhagem Tipo”
<i>Bacillus subtilis</i>	FT 014B	Usina Costa Pinto-SP
<i>Bacillus coagulans</i>	FT 003B	Usina da Pedra-SP

3.2.1. Meio de cultivo para bactérias

Para a reativação e crescimento das culturas de *Lactobacillus* foi utilizado o meio de cultivo "De Man, Rogosa, Sharp" - MRS Difco 0881-01-3.

Para a reativação e crescimento das culturas de *Bacillus* foi utilizado o meio de cultivo "Plate Count Agar"(Oxoid CM 325).

3.2.2. Reativação das culturas de bactérias

As culturas liofilizadas do gênero *Lactobacillus* foram reativadas em tubo de ensaio contendo 5,0 mL de meio de cultivo líquido MRS. Depois de incubadas a 32 °C por 24 horas, as culturas foram repicadas e incubadas novamente nas mesmas condições por mais 48 horas.

Para as culturas do gênero *Bacillus* os procedimentos foram semelhantes porém utilizando o meio de cultivo líquido GLT(extrato de levedura-0,25%; triptona-0,5%; dextrose-0,1%).

3.3. Condições de cultivo de células para o teste de floculação

As leveduras foram cultivadas em caldo YEPD por 24-48 horas a 30°C, utilizando como inóculo 1% de um cultivo de 24 horas em caldo.

As bactérias foram cultivadas em caldo MRS ou GLT por 24-48 horas a 30°C, utilizando como inóculo 1% de um cultivo de 24 horas em caldo MRS ou GLT.

Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 3600 G por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com solução de ácido etilenodiaminotetracético dissódico dihidratado (Na_2EDTA) 0,025M, sendo posteriormente ressuspendidas em água deionizada, em tampão Tris-HCl 10^{-1}M , pH 7,0-7,5 .

A Figura 1 ilustra os procedimentos para o cultivo das células microbianas utilizadas no teste de floculação.

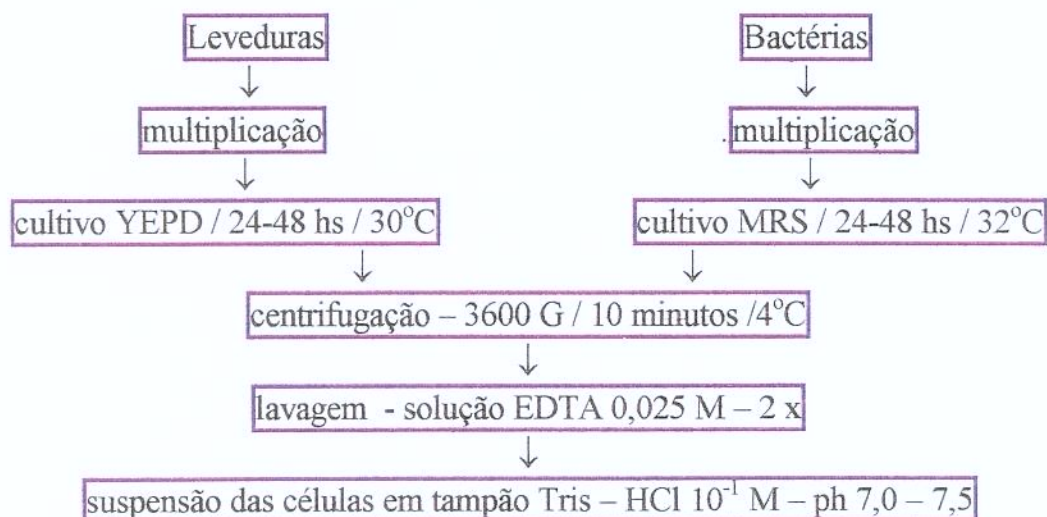


Figura 1: Condições de cultivo e separação de células para o teste de floculação

3.4. Relação entre as concentrações celulares na floculação

Para os testes de floculação foram utilizadas culturas de leveduras com concentração de 10% v/v, com uma população entre 1 a $5,0 \times 10^8$ UFC de levedura/mL, concentração esta comumente encontrada em uma dorna de fermentação alcoólica.

As populações iniciais de leveduras e bactérias, na suspensão em água deionizada em tampão Tris-HCl 10^{-1} M, pH 7,0-7,5 foi determinada por plaqueamento “pour plate” e, no caso das bactérias, diluída a fim de se obter a população mínima limite causadora da floculação.

3.5. Teste de floculação

Os testes de floculação foram realizados de acordo com o método de Stratford & Keenan (1988), adaptado para a utilização de suspensões mistas de leveduras e bactérias. Este método baseia-se na velocidade de sedimentação e clarificação do sobrenadante da suspensão de microrganismos. Desta forma adicionou-se em tubos de ensaio (16 x 150 mm) 3 mL da suspensão de leveduras, 3 mL da suspensão de bactérias e solução de CaCl_2 5×10^{-2} M em quantidade suficiente para se obter uma concentração final de 1×10^{-2} M. A seguir os tubos foram agitados manualmente por 2 minutos, mantidos em

repouso por 5 minutos e depois, com auxílio de um pipetador automático, coletou-se 3 mL da amostra do sobrenadante, medindo-se a absorvância em espectrofotômetro a 600nm.

A Figura 2 ilustra os procedimentos realizados no teste de floculação.

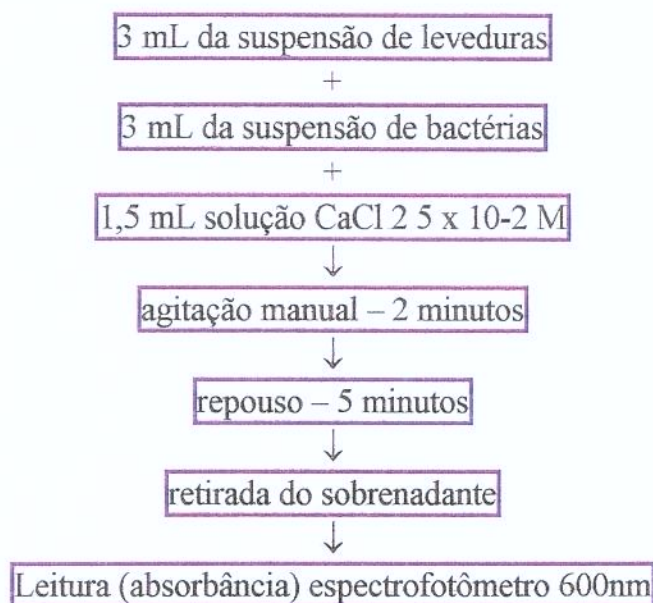


Figura 2: Procedimento para o teste de floculação

3.6. Efeito da temperatura na floculação

Para se verificar o efeito da temperatura, os testes de floculação foram realizados em temperaturas de 33°C e 39°C, uma vez que estes níveis de temperatura são frequentemente observados durante a safra. Também foram conduzidos testes de floculação após o tratamento térmico das cepas microbianas (45 °C, 55 °C e 65 °C/ 30 minutos), com a finalidade de se elucidar os mecanismos envolvidos neste processo.

3.7. Efeito do teor alcoólico na floculação

Para se verificar o efeito do teor alcoólico foram realizados testes de floculação na presença de 7,0 % e 9,0% de álcool, uma vez que estes níveis de teores alcoólicos são observados na prática industrial.

3.8. Efeito do tratamento enzimático sobre a capacidade flocculante de bactérias em leveduras

3.8.1. Tratamento com protease de *Streptomyces griseus*

De acordo com a metodologia descrita por Santos (1991), acrescentou-se a enzima protease de *Streptomyces griseus* (Sigma, P 5147) na concentração de 0,1 g/l a frascos erlenmeyer contendo 50mL da suspensão das culturas bacterianas flocculentas preparadas conforme descrito no item 3.3. Os frascos foram incubados sob agitação de 100 rpm a 30 °C sendo que após 40 minutos foram retiradas amostras para se medir a capacidade flocculante.

3.8.2. Tratamento com papaina

Utilizou-se a enzima papaina (Biochemical, 3.4.22.2) para se verificar a ocorrência de desfloculação em células flocculadas de leveduras e bactérias adicionando-se a mesma no material flocculado, e a seguir observando a ocorrência de desfloculação através da leitura em espectrofotômetro a 600 nm deste material .

3.9. Efeito do tratamento com modificadores químicos dos componentes da parede celular sobre a capacidade flocculante de leveduras e bactérias

As culturas de leveduras e bactérias submetidas a tratamento com modificadores químicos dos componentes da parede celular foram preparadas conforme descrito no item 3.3.

3.9.1. Modificadores químicos de proteínas

De acordo com a metodologia descrita por Bromberg (1994), células bacterianas de culturas flocculentas foram tratadas com os seguintes modificadores químicos de proteínas:

- a) Anidrido Acético: as suspensões de células foram tratadas com solução de anidrido acético 4×10^{-1} M preparada em dioxano 2 M, e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos, ajustando o pH para 6,0 com NaOH 1 N.
- b) Anidrido Maleico: as suspensões de células foram tratadas com solução de anidrido maleico 2×10^{-1} M preparada em dioxano 2 M, e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos, ajustando o pH para 7,5 com NaOH 1 N.

A seguir as células tratadas foram lavadas duas vezes com água destilada e submetidas ao teste de floculação.

3.9.2. Modificadores químicos de carboidratos

De acordo com a metodologia descrita por Bromberg (1994), células de culturas de leveduras foram tratadas com o seguinte modificador químico de carboidrato:

- a) Periodato de Sódio: as suspensões de células foram tratadas com solução de NaIO_4 2×10^{-2} M, a 20 °C por 30 minutos, no escuro.

A seguir as células tratadas foram lavadas três vezes com água deionizada e submetidas ao teste de floculação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A floculação de leveduras por bactérias pôde ser quantificada pela rápida diminuição da turbidez da suspensão das células de levedura, com o decorrer do tempo. Na ausência de floculação, a turbidez da suspensão diminuiu vagarosamente, mas na presença de bactérias floculentas a queda da turbidez foi bastante acelerada.

Os resultados dos testes de floculação realizados com as leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1 frente às espécies/cepas bacterianas encontram-se nas Tabelas 1 a 13.

De uma forma geral, os resultados obtidos mostraram uma grande variação na capacidade floculante das bactérias estudadas e nos seus respectivos níveis de contaminação. Foi constatada que muitas cepas das espécies de *Lactobacillus* apresentaram capacidade de flocular células de levedura enquanto que outras cepas das mesmas espécies não foram hábeis em desencadear o processo de floculação. Todas as espécies de *Bacillus* não apresentaram capacidade floculadora.

Para efeito de padronização dos resultados e, de acordo com Santos (1991), foram consideradas como fortemente floculante (+++) as espécies bacterianas que proporcionaram uma leitura em absorbância inferior a 0,25. Foi denominado como mediantemente floculante (++) as leituras entre 0,25 a 0,40, fracamente floculante (+) as bactérias que proporcionaram leitura entre 0,40 a 0,65 e como não floculante (-) as culturas bacterianas que proporcionaram leitura (absorbância) superior a 0,65.

4.1. Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à levedura

FT 134L/PE-2.

Os resultados dos testes de floculação realizados com a levedura FT 134L/PE-2 encontram-se na Tabela 1.

Esta Tabela mostra que as cepas de *L. fermentum* (FT 038B), *L. plantarum* (FT 032B), *L. fructivorans* (FT 091B, FT 189B e FT 289B), *L. fructosus* (FT 138B e FT

243B) e *L. buchneri* (FT 048B) apresentaram capacidade de flocular a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT 134L/PE-2). Já *L. fermentum* (FT 108B, FT256B e CCT 2571), *L. plantarum* (FT 158B, FT 286B e CCT 2687), *L. buchneri* (CCT 3746), *B. subtilis* (FT 014B) e *B. coagulans* (FT 003B) não foram capazes de provocar a floculação, nas condições estudadas. A espécie *L. fructivorans* (FT 146B) mostrou-se fracamente floculante. Estes resultados concordam com a afirmação de Santos (1991) de que somente algumas espécies de *L. fermentum* provocam a floculação de células de levedura.

Com os resultados obtidos nesta pesquisa pode-se dizer que outras espécies de *Lactobacillus* também são hábeis em provocar a floculação de células de levedura além do já conhecido *L. fermentum*. Estes resultados estão de acordo com Garcia (1999), o qual constatou que 2 cepas de *L. fermentum* e 2 cepas de *L. fructivorans* flocularam a levedura *S. cerevisiae*. A ocorrência da floculação foi constatada pela redução drástica da absorbância do sobrenadante, após a adição de uma solução de CaCl_2 10^{-3} M, com agitação vigorosa, seguida de um período de repouso da mistura de células bacterianas e de levedura.

Com relação às cepas bacterianas que apresentaram capacidade floculante, procurou-se verificar a partir de qual nível bacteriano se iniciaria o processo de floculação. De acordo com os ensaios realizados constatou-se que *L. fermentum* (FT 038B) e *L. plantarum* (FT 032B) apresentaram capacidade de flocular a levedura quando em nível superior a $5,0 \times 10^7$ UFC/mL; *L. fructivorans* (FT 091B e FT 189B) requerem níveis mais baixos, entre $1,0$ a $2,0 \times 10^7$ UFC/mL para desencadear o processo de floculação, enquanto que a cepa de *L. fructivorans* (FT 289B) necessita de concentrações superiores a $8,0 \times 10^7$ UFC/mL. Estes resultados também concordam com as observações de Garcia (1999).

Já *L. fructosus* (FT 138B) em concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL foi capaz de flocular a levedura e, a cepa FT 243B desta mesma bactéria desencadeou o processo de floculação quando em nível próximo a $3,0 \times 10^7$ UFC/mL.

Por outro lado, *L. buchneri* (FT 048B) apresentou capacidade de flocular a levedura quando a população bacteriana atingiu níveis superiores a 10^8 UFC/mL.

As concentrações de células bacterianas utilizadas nesta pesquisa coincidem com o número de células bacterianas contaminantes encontrado nas dornas de fermentação alcoólica (Gallo, 1989; Rodini, 1985), visto que uma dorna com problemas de contaminação bacteriana apresenta entre 10^6 a 10^8 UFC/mL.

Tabela 1: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 134L/PE-2.

Microrganismo	População levedura:bactéria	Leitura (A) 600 nm	Grau de Floculação
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,2 \times 10^8 : 3,4 \times 10^8$	0,169	+++
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,2 \times 10^8 : 1,7 \times 10^8$	0,081	+++
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,2 \times 10^8 : 6,8 \times 10^7$	0,151	+++
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,2 \times 10^8 : 3,4 \times 10^7$	1,093	–
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,2 \times 10^8 : 1,7 \times 10^7$	1,242	–
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,2 \times 10^8 : 2,0 \times 10^8$	1,222	–
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,2 \times 10^8 : 1,0 \times 10^8$	1,070	–
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,2 \times 10^8 : 5,0 \times 10^7$	1,201	–
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,2 \times 10^8 : 8,0 \times 10^8$	1,271	–
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,2 \times 10^8 : 8,0 \times 10^7$	1,026	–
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,2 \times 10^8 : 4,0 \times 10^7$	1,032	–
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,2 \times 10^8 : 2,0 \times 10^7$	1,036	–

Microrganismo	População levedura:bactéria	Leitura (A) 600 nm	Grau de Floculação
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,2 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	0,079	+++
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,2 \times 10^8 : 4,5 \times 10^7$	0,826	–
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,2 \times 10^8 : 2,2 \times 10^7$	1,179	–

<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,2 \times 10^8 : 2,2 \times 10^9$	1,437	–
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,2 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	0,563	+
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,2 \times 10^8 : 1,1 \times 10^8$	1,088	–

<i>L. plantarum</i> (FT 286B)	$1,2 \times 10^8 : 1,8 \times 10^9$	1,563	–
<i>L. plantarum</i> (FT 286B)	$1,2 \times 10^8 : 1,8 \times 10^8$	1,218	–
<i>L. plantarum</i> (FT 286B)	$1,2 \times 10^8 : 9,2 \times 10^7$	1,156	–

<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,2 \times 10^8 : 4,0 \times 10^8$	0,529	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,2 \times 10^8 : 1,6 \times 10^8$	0,372	++
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,2 \times 10^8 : 4,0 \times 10^7$	0,060	+++
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,2 \times 10^8 : 1,6 \times 10^7$	0,054	+++
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,2 \times 10^8 : 8,0 \times 10^6$	1,091	–

<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,2 \times 10^8 : 2,0 \times 10^8$	0,700	–
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,2 \times 10^8 : 1,0 \times 10^8$	0,640	+
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,2 \times 10^8 : 5,0 \times 10^7$	0,604	+
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,2 \times 10^8 : 1,0 \times 10^7$	0,690	–
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,2 \times 10^8 : 8,0 \times 10^6$	0,922	–

Microrganismo	População levedura:bactéria	Leitura (A) 600 nm	Grau de Floculação
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	1,2x10 ⁸ : 2,9x10 ⁸	0,688	–
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	1,2x10 ⁸ : 5,8x10 ⁷	0,402	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	1,2x10 ⁸ : 2,9x10 ⁷	0,156	+++
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	1,2x10 ⁸ : 1,5x10 ⁷	0,805	–

<i>L. fructivorans</i> (FT 289B)	1,2x10 ⁸ : 1,3x10 ⁸	0,150	+++
<i>L. fructivorans</i> (FT 289B)	1,2x10 ⁸ : 8,8x10 ⁷	0,535	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 289B)	1,2x10 ⁸ : 6,5x10 ⁷	0,942	–

<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,2x10 ⁸ : 4,0x10 ⁸	0,609	+
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,2x10 ⁸ : 1,6x10 ⁸	0,320	++
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,2x10 ⁸ : 4,0x10 ⁷	0,107	+++
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,2x10 ⁸ : 2,0x10 ⁷	0,226	+++
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,2x10 ⁸ : 1,0x10 ⁷	0,496	+

<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,2x10 ⁸ : 9,2x10 ⁸	0,098	+++
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,2x10 ⁸ : 9,2x10 ⁷	0,076	+++
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,2x10 ⁸ : 4,6x10 ⁷	0,254	+++
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,2x10 ⁸ : 3,1x10 ⁷	0,750	–
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,2x10 ⁸ : 1,2x10 ⁷	0,790	–

<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,2x10 ⁸ : 1,4x10 ⁹	1,060	–
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,2x10 ⁸ : 1,4x10 ⁸	0,108	+++
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,2x10 ⁸ : 7,0x10 ⁷	0,750	–
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,2x10 ⁸ : 1,4x10 ⁷	1,008	–

Microrganismo	População levedura:bactéria	Leitura (A) 600 nm	Grau de Floculação
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$1,2 \times 10^8$: $3,0 \times 10^8$	1,119	—
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$1,2 \times 10^8$: $1,5 \times 10^8$	1,085	—
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$1,2 \times 10^8$: $6,0 \times 10^7$	1,044	—
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$1,2 \times 10^8$: $3,0 \times 10^7$	1,008	—

<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$1,2 \times 10^8$: $3,5 \times 10^8$	1,151	—
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$1,2 \times 10^8$: $1,5 \times 10^8$	1,065	—
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$1,2 \times 10^8$: $7,0 \times 10^7$	1,021	—
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$1,2 \times 10^8$: $3,5 \times 10^7$	1,018	—

<i>L. fermentum</i> (CCT 2571)	$1,5 \times 10^8$: $2,2 \times 10^8$	1,242	—
<i>L. fermentum</i> (CCT 2571)	$1,5 \times 10^8$: $1,1 \times 10^8$	1,103	—
<i>L. fermentum</i> (CCT 2571)	$1,5 \times 10^8$: $4,4 \times 10^7$	0,987	—

<i>L. plantarum</i> (CCT 2687)	$1,5 \times 10^8$: $1,1 \times 10^8$	1,062	—
<i>L. plantarum</i> (CCT 2687)	$1,5 \times 10^8$: $5,5 \times 10^7$	1,001	—
<i>L. plantarum</i> (CCT 2687)	$1,5 \times 10^8$: $2,2 \times 10^7$	0,988	—

<i>L. buchneri</i> (CCT 3746)	$1,5 \times 10^8$: $1,1 \times 10^8$	1,114	—
<i>L. buchneri</i> (CCT 3746)	$1,5 \times 10^8$: $5,5 \times 10^7$	1,087	—
<i>L. buchneri</i> (CCT 3746)	$1,5 \times 10^8$: $2,2 \times 10^7$	1,012	—

Os gráficos a seguir ilustram os resultados dos testes de floculação realizados com a levedura FT 134L/PE-2 frente às espécies/cepas bacterianas. A população bacteriana está expressa em 10^7 UFC/mL.

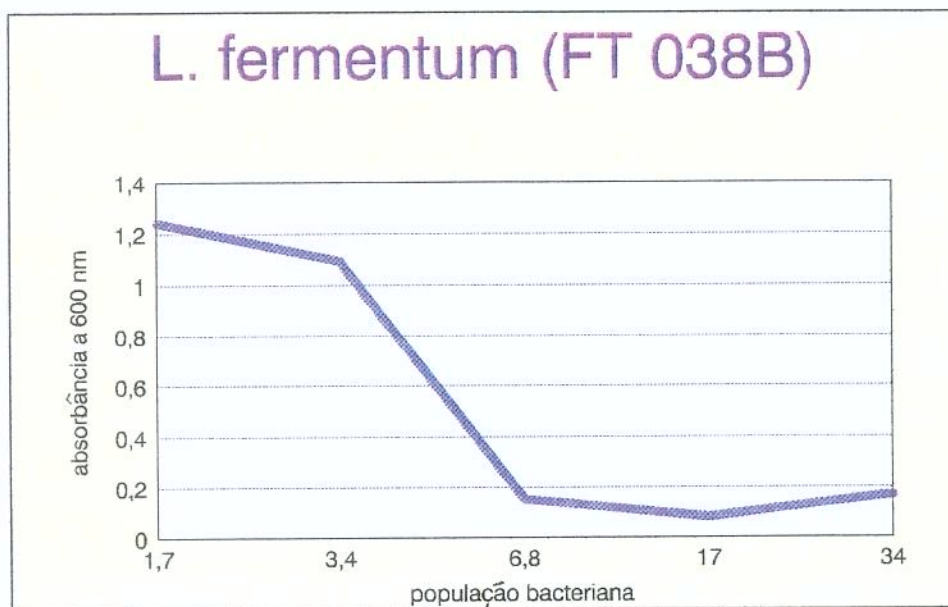


Figura 3: Capacidade floculante de *L. fermentum* (FT 038B) frente à levedura PE-2.

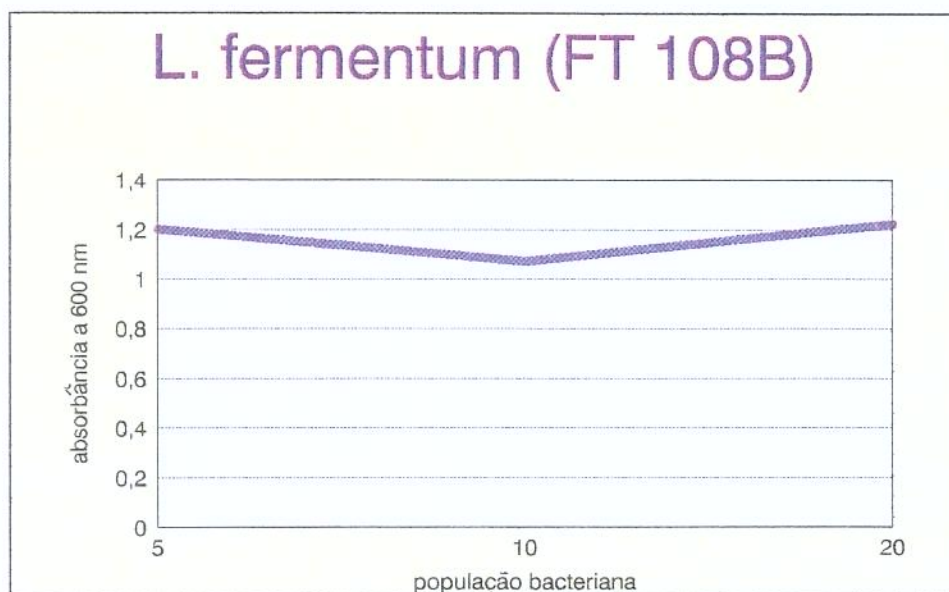


Figura 4: Capacidade flocculante de *L. fermentum* (FT 108B) frente à levedura PE-2.

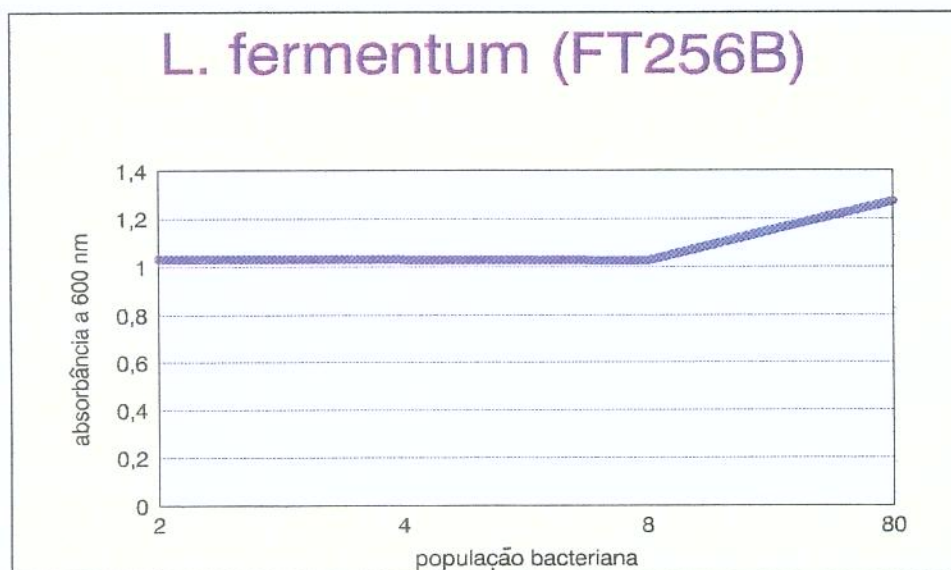


Figura 5: Capacidade flocculante de *L. fermentum* (FT 256B) frente à levedura PE-2.

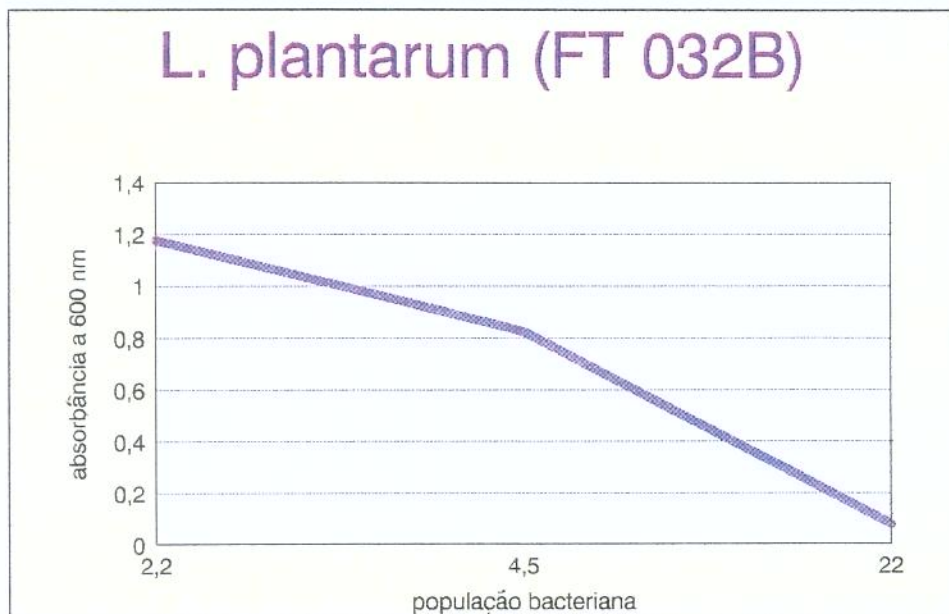


Figura 6: Capacidade flocculante de *L. plantarum* (FT 032B) frente à levedura PE-2.

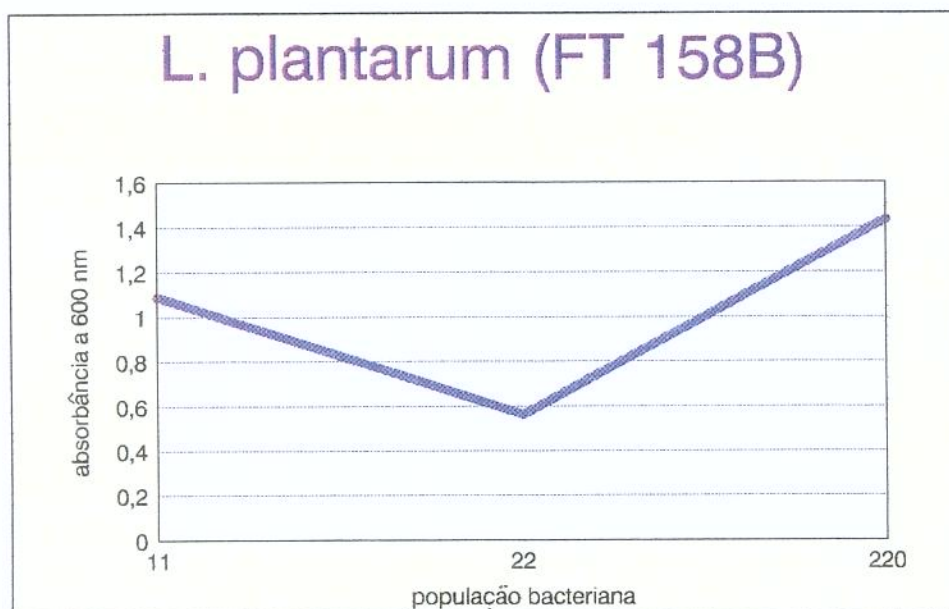


Figura 7: Capacidade flocculante de *L. plantarum* (FT 158B) frente à levedura PE-2.

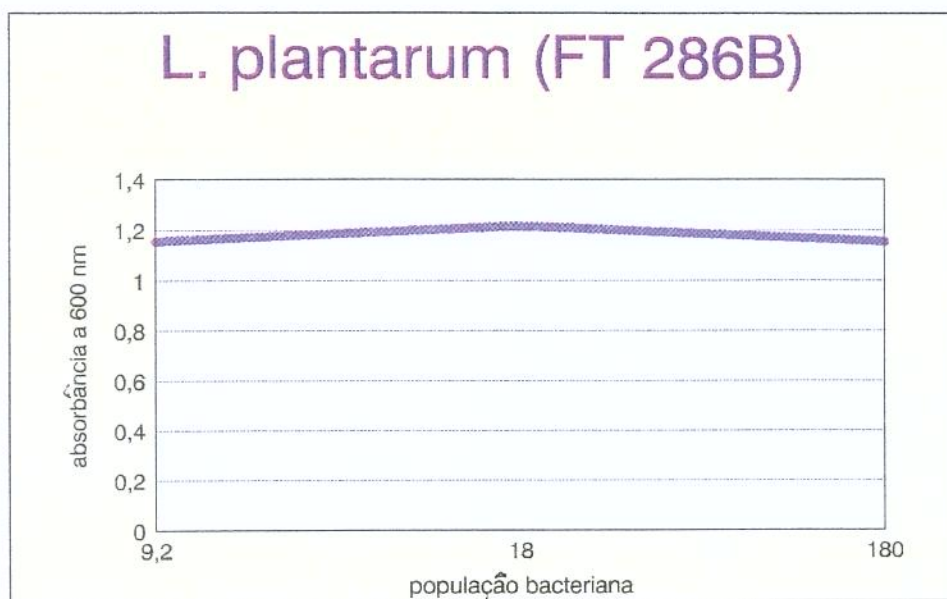


Figura 8: Capacidade floculante de *L. plantarum* (FT 286B) frente à levedura PE-2.

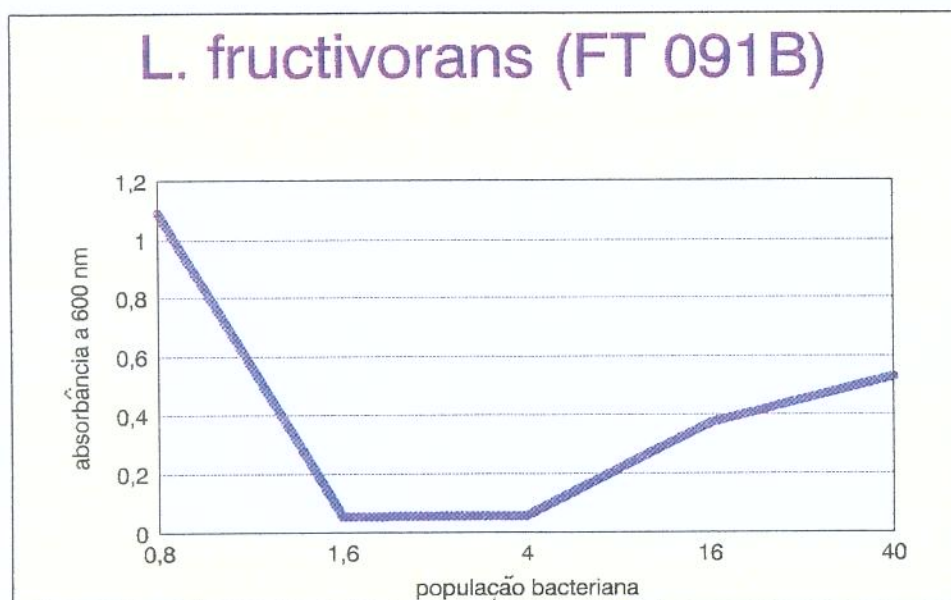


Figura 9: Capacidade floculante de *L. fructivorans* (FT 091B) frente à levedura PE-2.

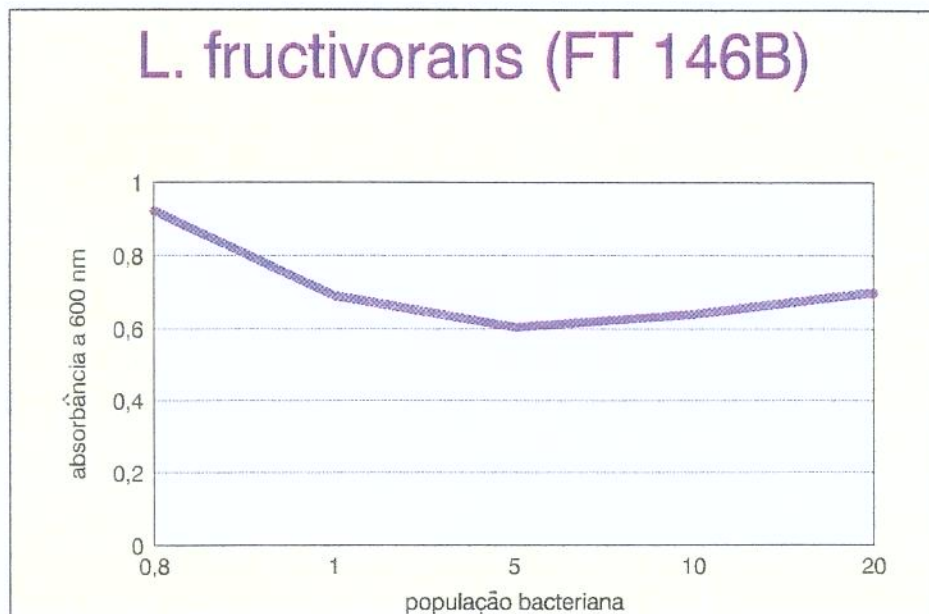


Figura 10: Capacidade floculante de *L. fructivorans* (FT 146B) frente à levedura PE-2.

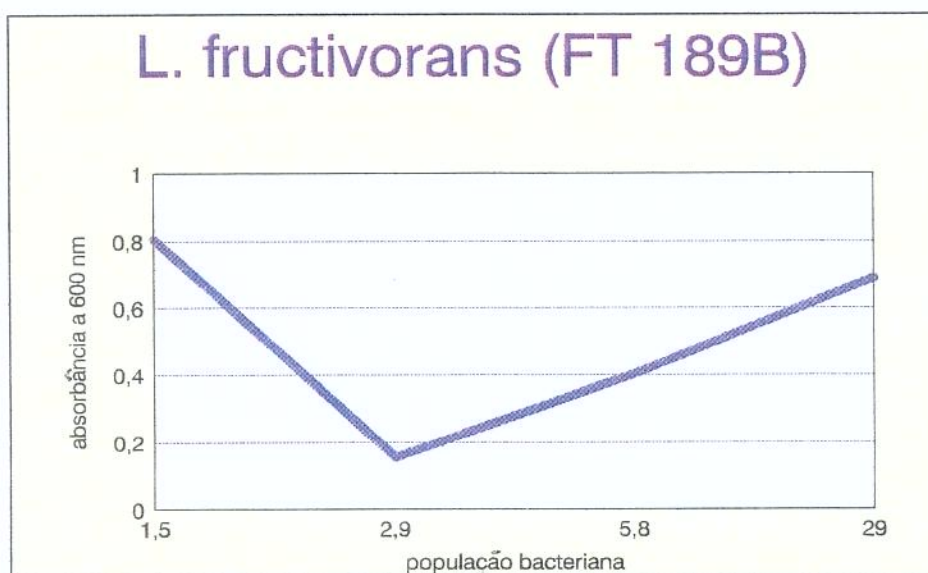


Figura 11: Capacidade floculante de *L. fructivorans* (FT 189B) frente à levedura PE-2.

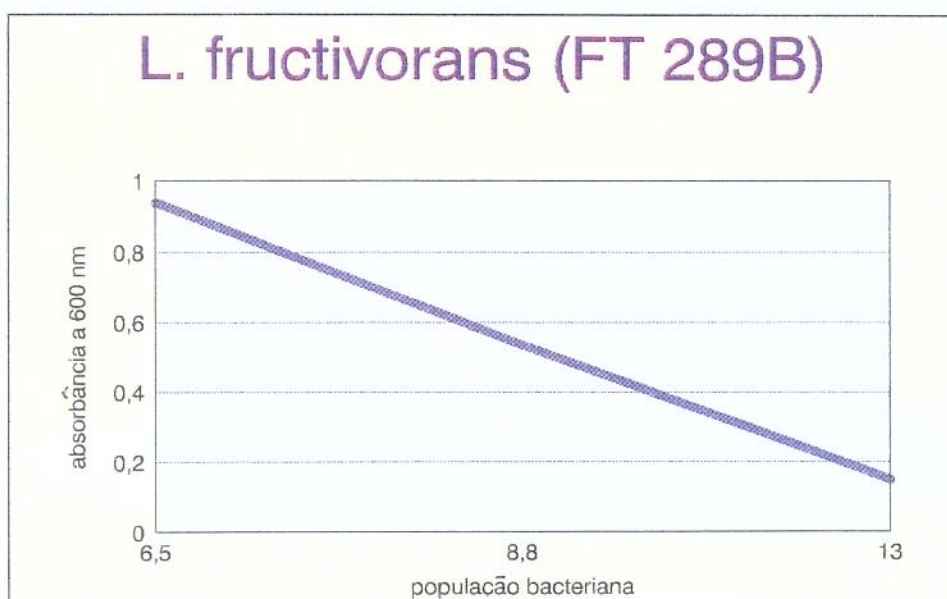


Figura 12: Capacidade floculante de *L. fructivorans* (FT 289B) frente à levedura PE-2.

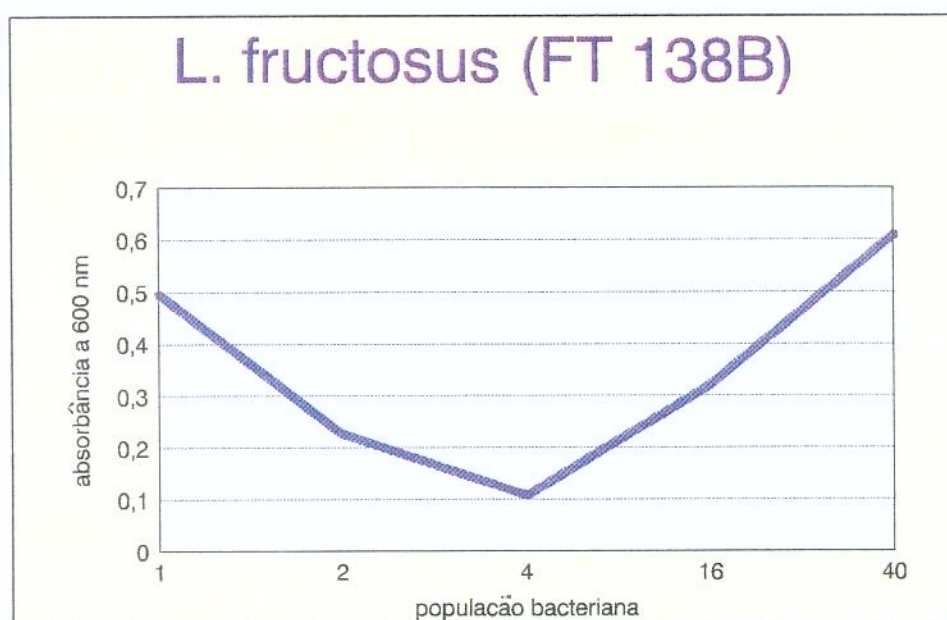


Figura 13: Capacidade floculante de *L. fructosus* (FT 138B) frente à levedura PE-2.

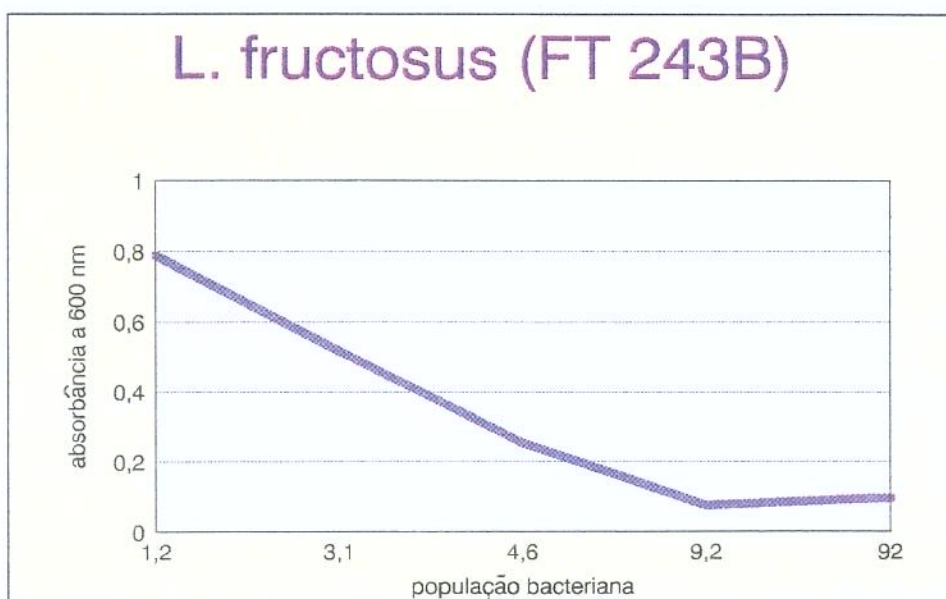


Figura 14: Capacidade floculante de *L. fructosus* (FT 243B) frente à levedura PE-2.

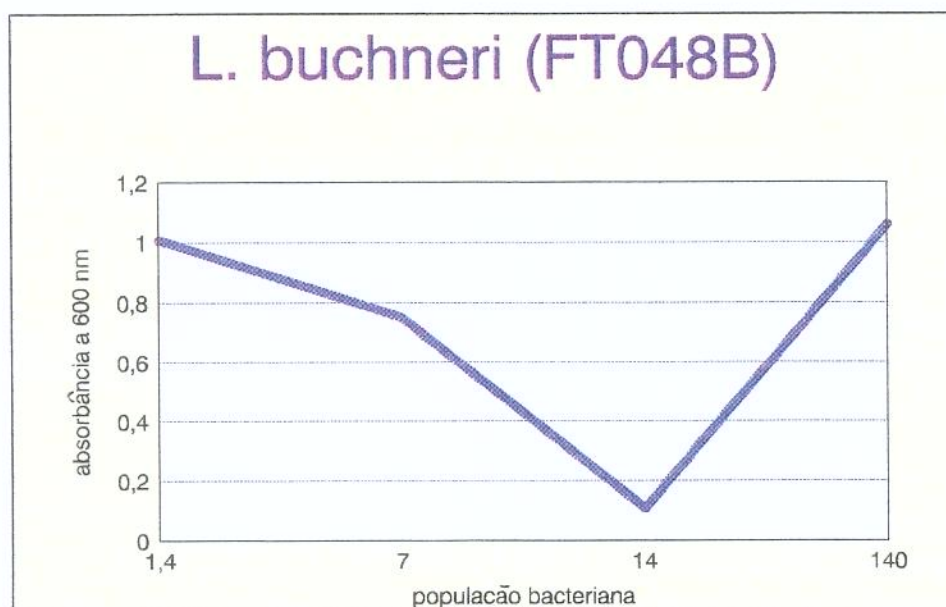


Figura 15: Capacidade floculante de *L. buchneri* (FT 048B) frente à levedura PE-2.

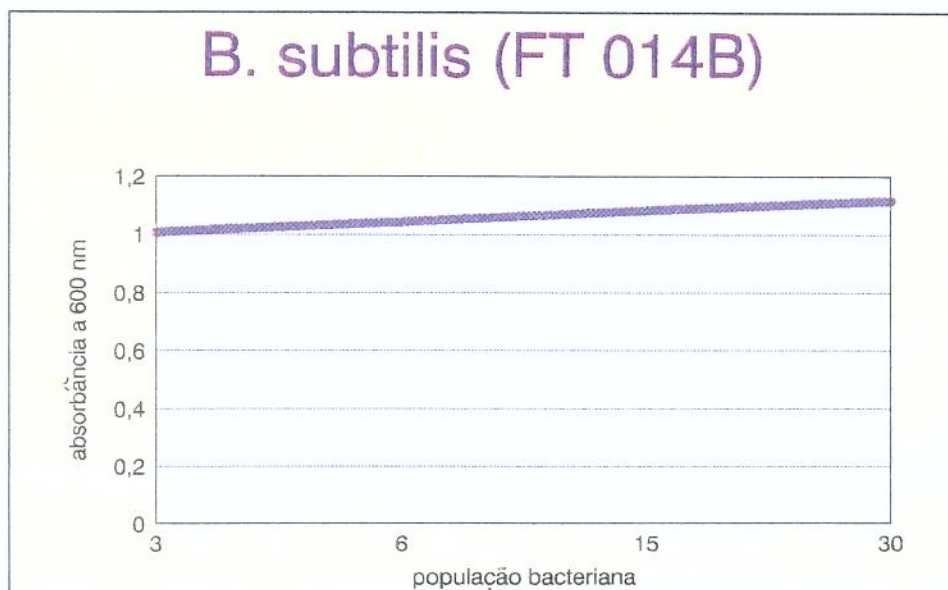


Figura 16: Capacidade flocculante de *B. subtilis* (FT 014B) frente à levedura PE-2.

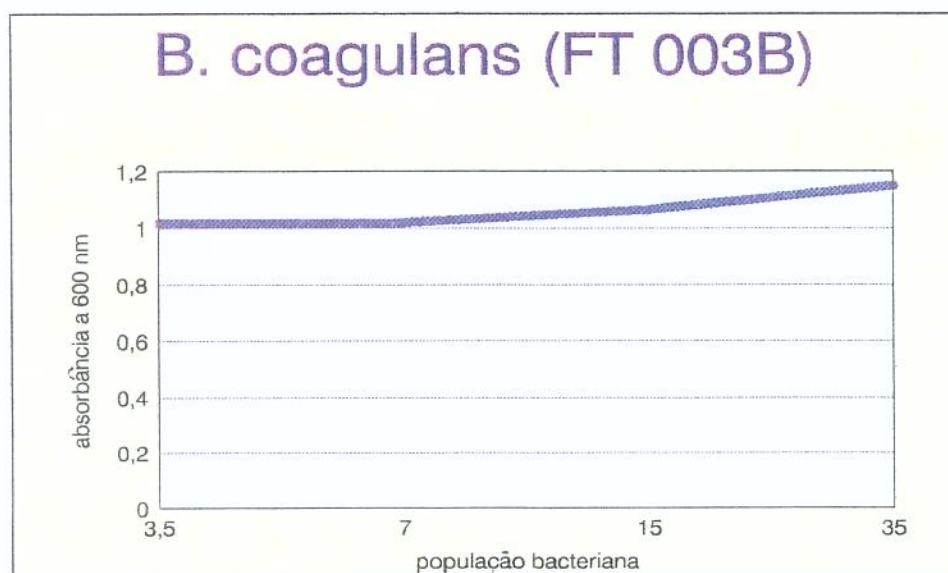


Figura 17: Capacidade flocculante de *B. coagulans* (FT 003B) frente à levedura PE-2.

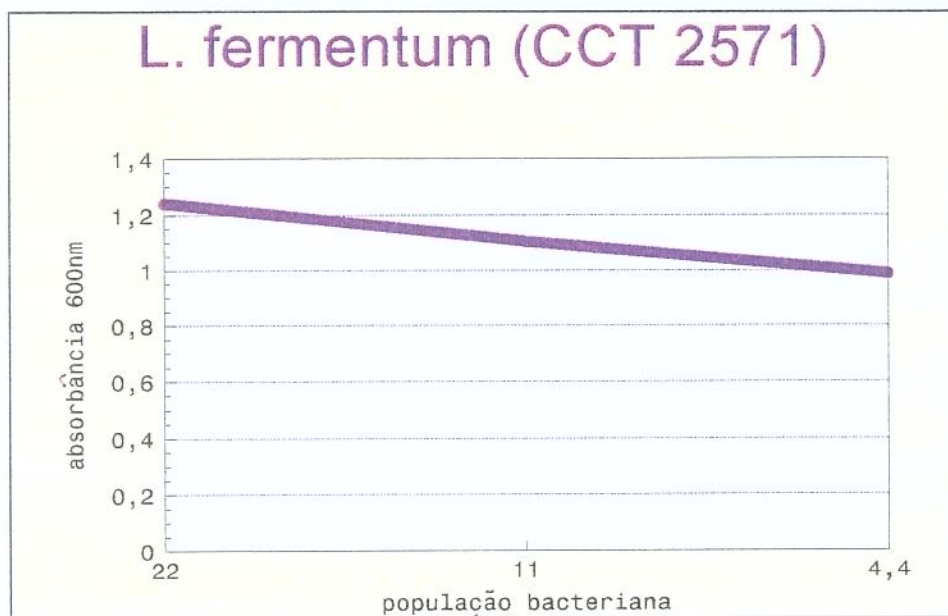


Figura 18: Capacidade floculante de *L. fermentum* (CCT 2571) frente à levedura PE-2.

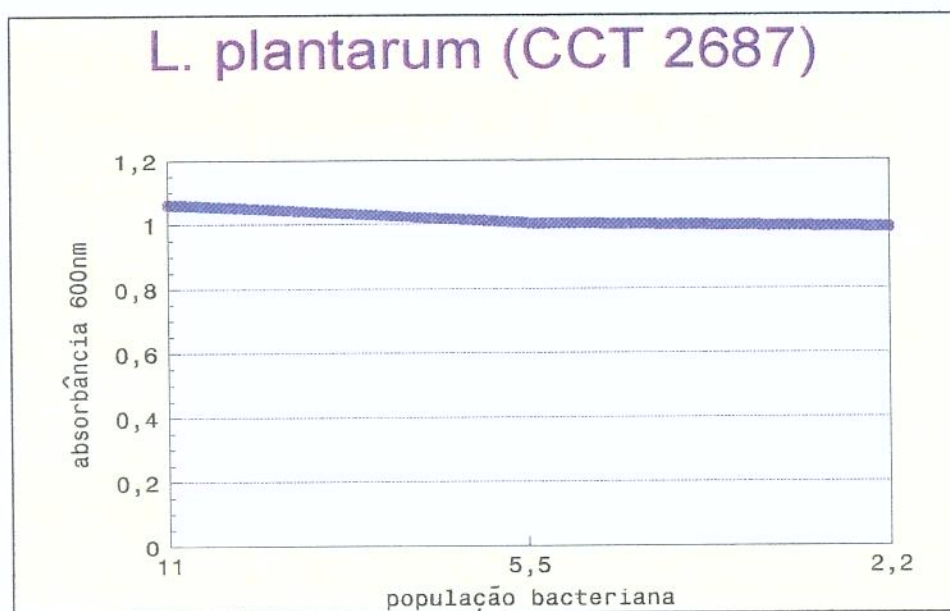


Figura 19: Capacidade floculante de *L. plantarum* (CCT 2687) frente à levedura PE-2.

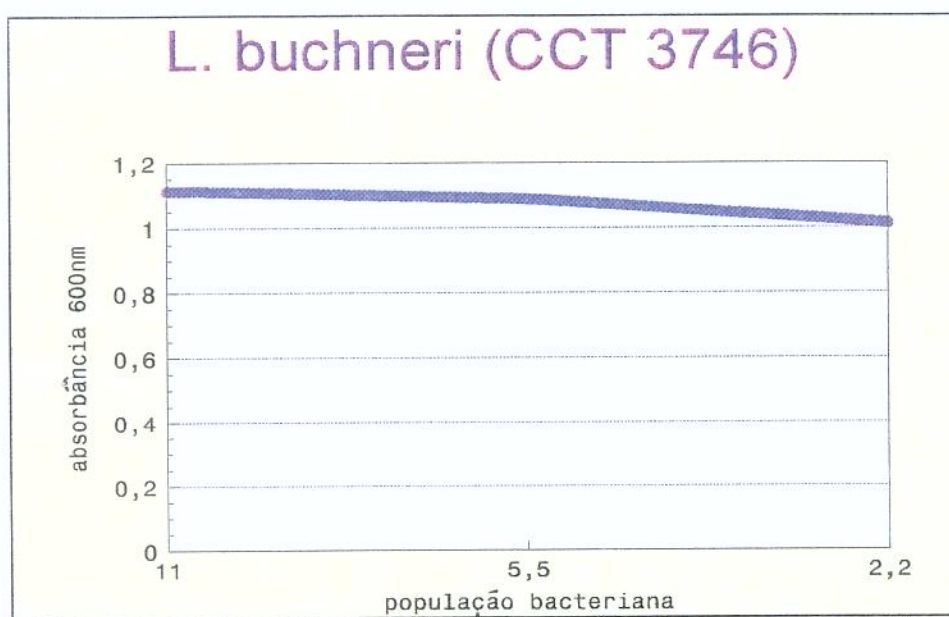


Figura 20: Capacidade floculante de *L. buchneri* (CCT 3746) frente à levedura PE-2.

4.2. Avaliação da capacidade flocculante de bactérias frente à levedura

FT 136L/VR-1.

Os resultados dos testes de floculação realizados com a levedura FT 136L/VR-1 encontram-se na Tabela 2.

Os testes de floculação realizados com a levedura FT 136L/VR-1 mostraram que as espécies bacterianas que apresentaram capacidade flocculante foram *L. fermentum* (FT 038B), *L. plantarum* (FT 032B), *L. fructivorans* (FT 091B e FT 189B), *L. fructosus* (FT 243B) e *L. buchneri* (FT 048B). Já para *L. fermentum* (FT 108B, FT256B e CCT 2571), *L. plantarum* (FT 158B, FT 286B e CCT 2687), *L. fructivorans* (FT 289B), *L. fructosus* (FT 138B), *L. buchneri* (CCT 3746), *B. subtilis* (FT 014B) e *B. coagulans* (FT 003B) não foi observado processo de floculação, enquanto que *L. fructivorans* (FT 146B) mostrou-se novamente fracamente flocculante.

De acordo com Garcia (1999), algumas cepas de *Lactobacillus* como *L. plantarum*., *L. confusus*, *L. fructosus*, *L. fructivorans*, *L. coryniformis*, *L. maltaromicus*, *L. vaccinoferus* e *L. fermentum* podem ser consideradas como não flocculentas uma vez que não floccularam a levedura *S. cerevisiae*. O fato de ocorrer uma diminuição na leitura da absorbância das cepas de *Lactobacillus* não flocculentos pode ser devido ao menor número de células de bactérias em suspensão no meio (devido a diluição), no momento da leitura da absorbância.

Para as espécies bacterianas que apresentaram habilidade em floccular a levedura *S. cerevisiae* (FT 136L/VR-1), observou-se que as concentrações celulares requeridas para o desencadeamento deste processo foram superiores as encontradas para a levedura *S. cerevisiae* (FT 134L/PE-2) ou seja, *L. fermentum* (FT 038B), *L. plantarum* (FT 032B) e *L. buchneri* (FT 048B) necessitaram de população superior a 10^8 UFC/mL; *L. fructivorans* (FT 091B) de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL enquanto a cepa FT 189B requer $5,0 \times 10^7$ UFC/mL. Para *L. fructosus* (FT 243B) são necessários níveis próximos a $5,0 \times 10^7$ UFC/mL para o início do processo de floculação.

As bactérias consideradas flocculentas apresentaram diferenças quanto a intensidade de floculação. Isto pode ser devido a existência de um maior número de sítios de interação com as células de levedura nas cepas fortemente flocculentas do que naquelas com menor poder flocculante (Stratford, 1996).

A parede celular de *S. cerevisiae* constitui-se de glicana e manana, e de quantidades menores de quitina, fosfato, lipídeo e proteínas (Parodi, 1981). Esta é composta internamente por uma camada de glicana e, externamente por camada de fosfomanana, a qual forma complexos com proteínas (Forster et al., 1985). *Lactobacillus* são bactérias Gram-positivas tendo como principal constituinte da parede celular uma camada externa de peptideoglicano, além de ácido teicóico e de polissacarídeos.

As mananas da parede celular parecem estar envolvidas na floculação, devido a sua localização e também pela ocorrência de desfloculação pela manose (Calleja, 1987; Eddy & Phill, 1955). De acordo com Mill (1964b), o teor de manana e de glicana de leveduras flocculentas e não flocculentas é praticamente igual. Por outro lado, Amory et al. (1988) mostraram que o nível de manana presente em leveduras flocculentas é maior do que o encontrado em células não flocculentas.

Ainda de acordo com Miki et al. (1982a) a floculação resulta da ocorrência de uma ligação específica entre a proteína (lectinas) de células flocculentas, e os receptores de manana da parede celular de células adjacentes, requerendo íons cálcio cuja função é conformation ativa.

As diferenças nos níveis da contaminação bacteriana requeridas para a floculação das leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1, supõe-se que a composição da parede celular destas leveduras pode ser diferente e com isto menor quantidade de sítios receptores para que ocorresse a

(1989), relataram a ocorrência de floculação em células em todos os estágios de crescimento celular, sugerindo que este processo depende da disponibilidade de um número suficiente de sítios

XII, XIII, XIV, XV
p. 114
78-80

receptores, necessitando além disso, que os mesmos se encontrem em correta conformação para que as células formem agregados estáveis. Estes mesmos pesquisadores verificaram que células filhas novas apresentam um grau de floculência menor que a célula mãe, porém à medida que as células filhas passam por divisões celulares, estas adquirem a característica de flocular.

Com relação as cepas de *S. cerevisiae* FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1 foi verificado se havia presença de agrupamentos celulares nas varias fases de crescimento destas leveduras, porém em todas elas foram observadas apenas células ovaladas, com brotamento multilateral sendo que as células filhas se desprendiam completamente da célula mãe, o que indica que estas não apresentam características floculantes.

Tabela 2: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 136L/VR-1

Microrganismo	População levedura:bactéria	Leitura (A) 600 nm	Grau de Floculação
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,0 \times 10^8 : 3,4 \times 10^8$	0,901	—
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,0 \times 10^8 : 1,7 \times 10^8$	0,639	+
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,0 \times 10^8 : 6,8 \times 10^7$	0,819	—
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,0 \times 10^8 : 3,4 \times 10^7$	1,001	—
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,0 \times 10^8 : 1,7 \times 10^7$	1,095	—
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,0 \times 10^8 : 2,0 \times 10^8$	1,412	—
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,0 \times 10^8 : 1,0 \times 10^8$	1,214	—
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,0 \times 10^8 : 5,0 \times 10^7$	1,138	—
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,0 \times 10^8 : 8,0 \times 10^8$	1,270	—
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,0 \times 10^8 : 8,0 \times 10^7$	1,060	—
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,0 \times 10^8 : 4,0 \times 10^7$	1,048	—
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,0 \times 10^8 : 2,0 \times 10^7$	1,040	—

Microrganismo	População levedura:bactéria	Leitura (A) 600 nm	Grau de Floculação
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,0 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	0,568	+
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,0 \times 10^8 : 4,5 \times 10^7$	0,865	—
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,0 \times 10^8 : 2,2 \times 10^7$	0,972	—

<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,0 \times 10^8 : 2,2 \times 10^9$	1,589	—
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,0 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	1,251	—
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,0 \times 10^8 : 1,1 \times 10^8$	1,188	—

<i>L. plantarum</i> (FT 286B)	$1,0 \times 10^8 : 1,8 \times 10^9$	1,518	—
<i>L. plantarum</i> (FT 286B)	$1,0 \times 10^8 : 1,8 \times 10^8$	1,161	—
<i>L. plantarum</i> (FT 286B)	$1,0 \times 10^8 : 9,2 \times 10^7$	1,092	—

<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,0 \times 10^8 : 4,0 \times 10^8$	0,810	—
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,0 \times 10^8 : 1,6 \times 10^8$	0,553	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,0 \times 10^8 : 4,0 \times 10^7$	0,499	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,0 \times 10^8 : 1,6 \times 10^7$	0,449	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,0 \times 10^8 : 8,0 \times 10^6$	1,119	—

<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,0 \times 10^8 : 2,0 \times 10^8$	0,809	—
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,0 \times 10^8 : 1,0 \times 10^8$	0,712	—
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,0 \times 10^8 : 5,0 \times 10^7$	0,613	+
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,0 \times 10^8 : 1,0 \times 10^7$	1,012	—
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,0 \times 10^8 : 8,0 \times 10^6$	1,056	—

Microrganismo	População levedura:bactéria	Leitura (A) 600 nm	Grau de Floculação
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	1,0x10 ⁸ : 2,9x10 ⁸	0,610	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	1,0x10 ⁸ : 5,8x10 ⁷	0,483	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	1,0x10 ⁸ : 2,9x10 ⁷	0,898	–
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	1,0x10 ⁸ : 1,5x10 ⁷	1,012	–

<i>L. fructivorans</i> (FT 289B)	1,0x10 ⁸ : 1,3x10 ⁸	0,793	–
<i>L. fructivorans</i> (FT 289B)	1,0x10 ⁸ : 8,8x10 ⁷	0,947	–
<i>L. fructivorans</i> (FT 289B)	1,0x10 ⁸ : 6,5x10 ⁷	1,062	–

<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,0x10 ⁸ : 4,0x10 ⁸	0,721	–
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,0x10 ⁸ : 1,6x10 ⁸	0,701	–
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,0x10 ⁸ : 4,0x10 ⁷	0,690	–
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,0x10 ⁸ : 2,0x10 ⁷	0,883	–
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,0x10 ⁸ : 1,0x10 ⁷	0,989	–

<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,0x10 ⁸ : 9,2x10 ⁸	0,055	+++
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,0x10 ⁸ : 9,2x10 ⁷	0,235	+++
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,0x10 ⁸ : 4,6x10 ⁷	0,434	+
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,0x10 ⁸ : 3,1x10 ⁷	0,638	+
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,0x10 ⁸ : 1,2x10 ⁷	0,994	–

<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,0x10 ⁸ : 1,4x10 ⁹	1,073	–
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,0x10 ⁸ : 1,4x10 ⁸	0,180	+++
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,0x10 ⁸ : 7,0x10 ⁷	0,678	–
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,0x10 ⁸ : 1,4x10 ⁷	0,932	–

Microrganismo	População levedura:bactéria	Leitura (A) 600 nm	Grau de Floculação
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$1,0 \times 10^8$: $3,0 \times 10^8$	0,935	—
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$1,0 \times 10^8$: $1,5 \times 10^8$	1,132	—
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$1,0 \times 10^8$: $6,0 \times 10^7$	1,098	—
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$1,0 \times 10^8$: $3,0 \times 10^7$	1,090	—

<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$1,0 \times 10^8$: $3,5 \times 10^8$	0,852	—
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$1,0 \times 10^8$: $1,5 \times 10^8$	0,997	—
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$1,0 \times 10^8$: $7,0 \times 10^7$	1,010	—
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$1,0 \times 10^8$: $3,5 \times 10^7$	1,031	—

<i>L. fermentum</i> (CCT 2571)	$3,8 \times 10^8$: $2,2 \times 10^8$	1,225	—
<i>L. fermentum</i> (CCT 2571)	$3,8 \times 10^8$: $1,1 \times 10^8$	1,141	—
<i>L. fermentum</i> (CCT 2571)	$3,8 \times 10^8$: $4,4 \times 10^7$	1,005	—

<i>L. plantarum</i> (CCT 2687)	$3,8 \times 10^8$: $1,1 \times 10^8$	1,080	—
<i>L. plantarum</i> (CCT 2687)	$3,8 \times 10^8$: $5,5 \times 10^7$	0,936	—
<i>L. plantarum</i> (CCT 2687)	$3,8 \times 10^8$: $2,2 \times 10^7$	0,902	—

<i>L. buchneri</i> (CCT 3746)	$3,8 \times 10^8$: $1,1 \times 10^8$	1,143	—
<i>L. buchneri</i> (CCT 3746)	$3,8 \times 10^8$: $5,5 \times 10^7$	0,888	—
<i>L. buchneri</i> (CCT 3746)	$3,8 \times 10^8$: $2,2 \times 10^7$	0,903	—

Os gráficos a seguir ilustram os resultados dos testes de floculação realizados com a levedura FT 136L/VR-1 frente às espécies/cepas bacterianas. A população bacteriana está expressa em 10^7 UFC/mL.

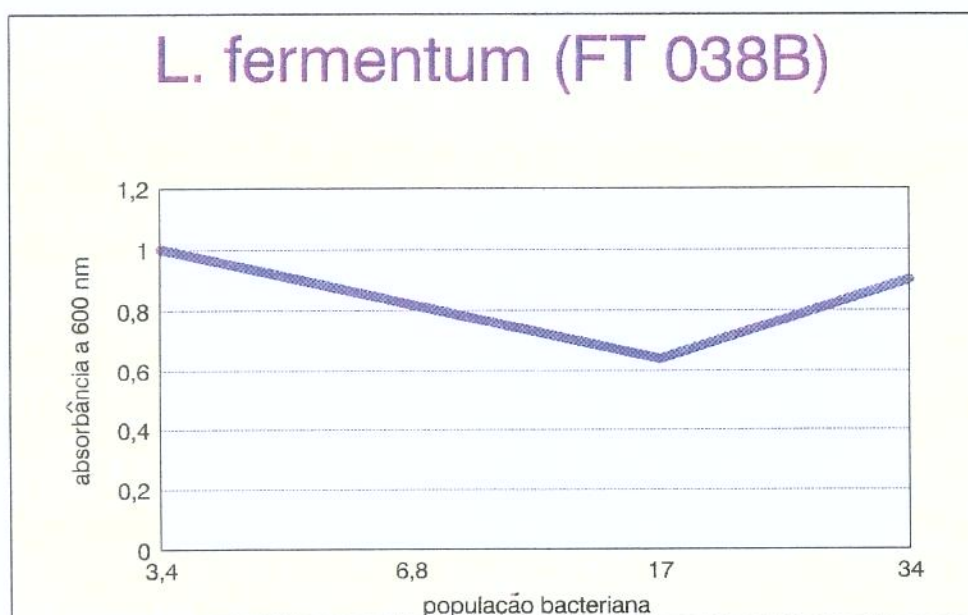


Figura 21: Capacidade floculante de *L. fermentum* (FT 038B) frente à levedura VR-1.

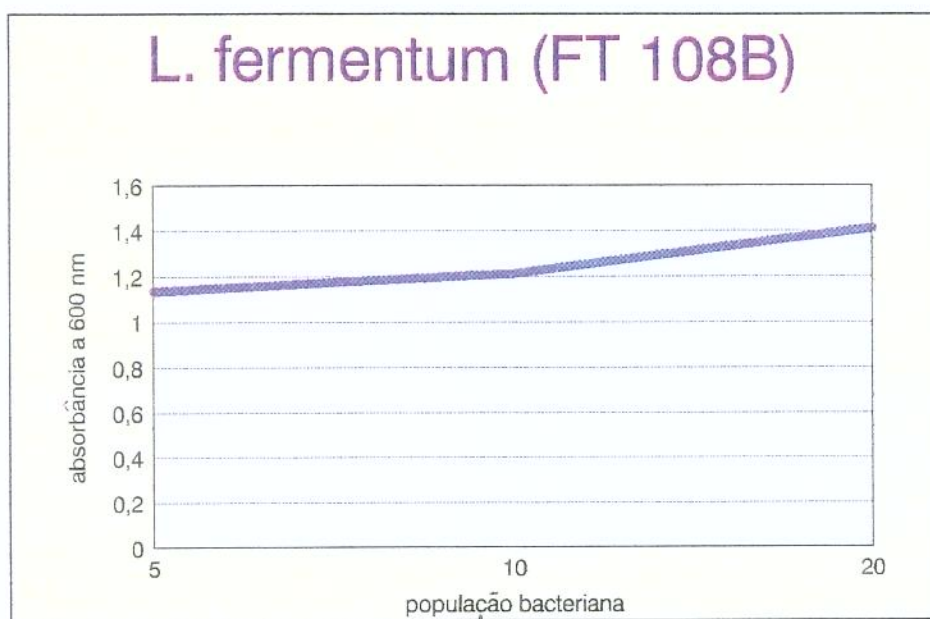


Figura 22: Capacidade flocculante de *L. fermentum* (FT 108B) frente à levedura VR-1.

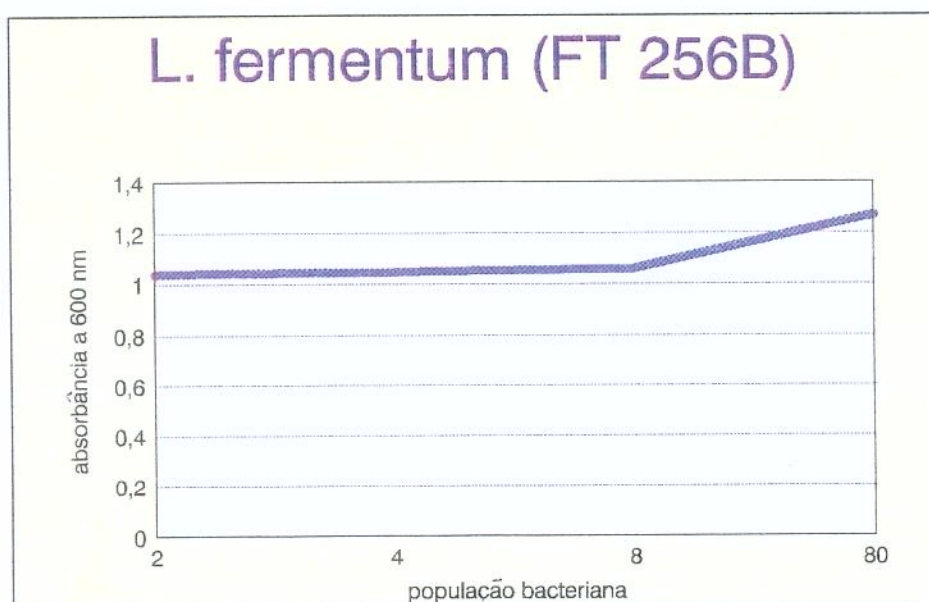


Figura 23: Capacidade flocculante de *L. fermentum* (FT 256B) frente à levedura VR-1.

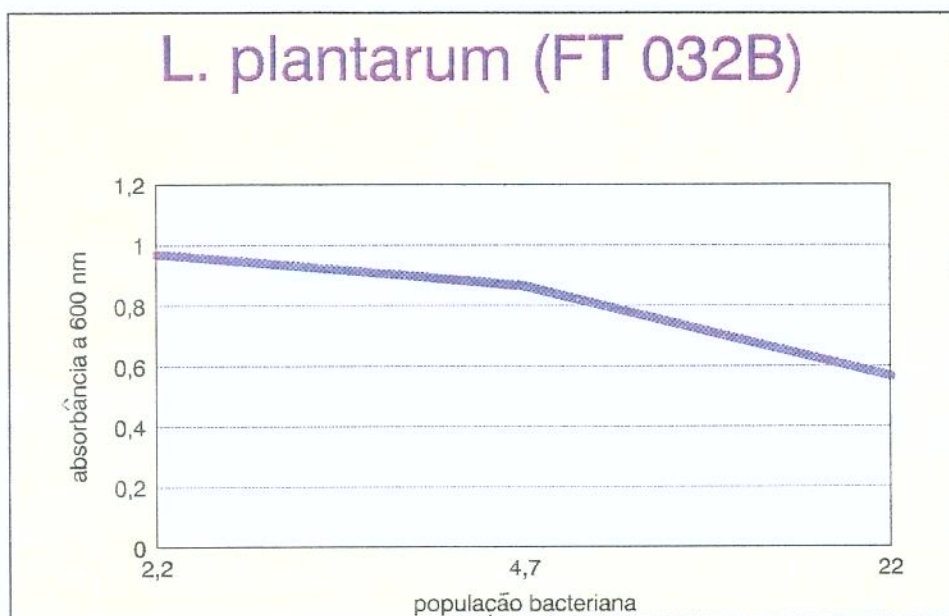


Figura 24: Capacidade floculante de *L. plantarum* (FT 032B) frente à levedura VR-1.

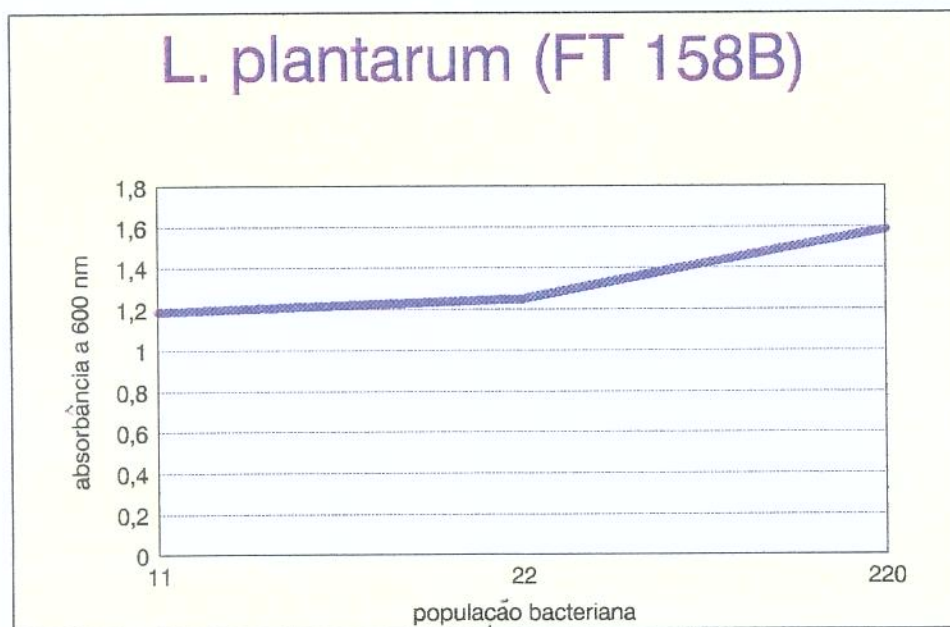


Figura 25: Capacidade floculante de *L. plantarum* (FT 158B) frente à levedura VR-1.

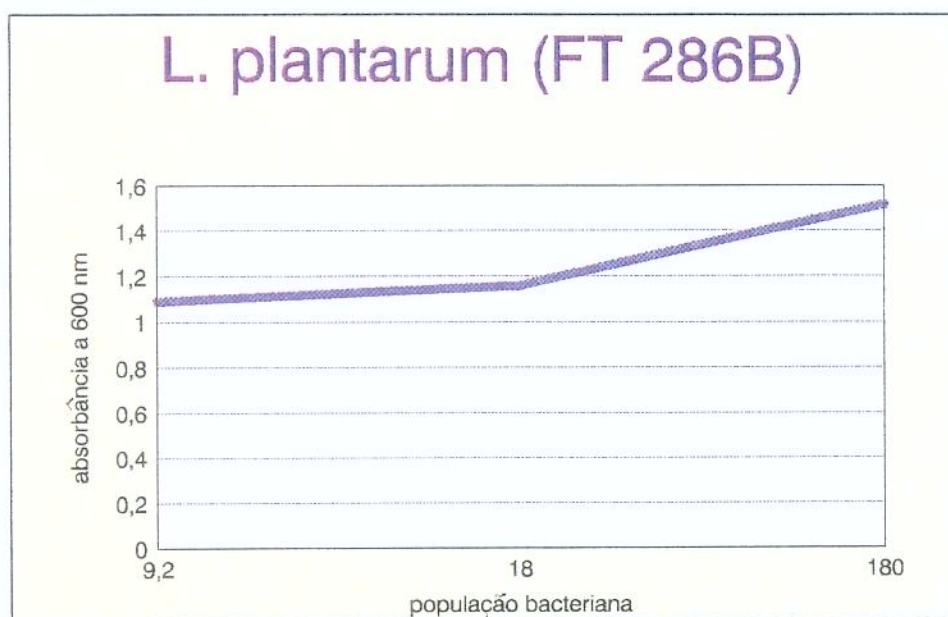


Figura 26: Capacidade floculante de *L. plantarum* (FT 286B) frente à levedura VR-1.

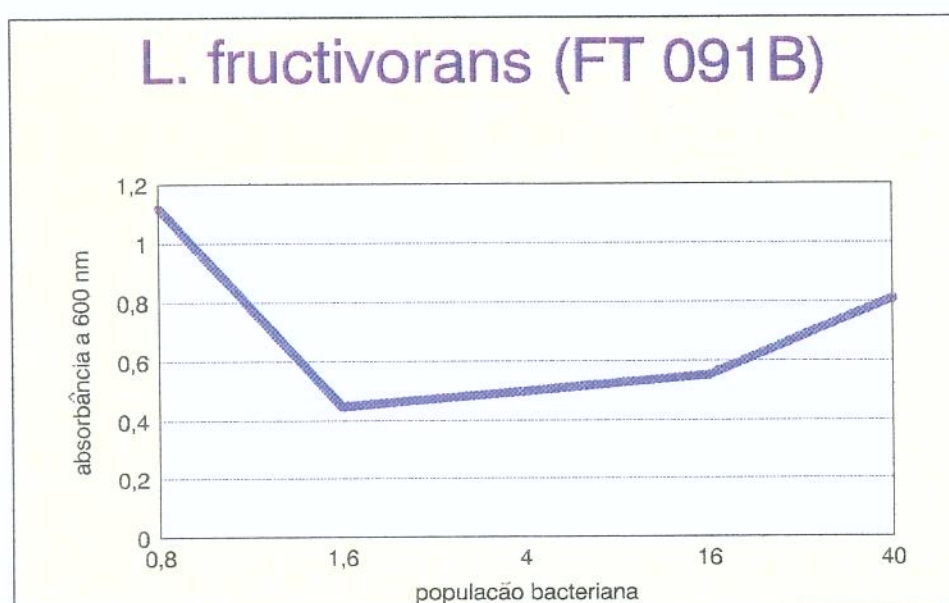


Figura 27: Capacidade floculante de *L. fructivorans* (FT 091B) frente à levedura VR-1.

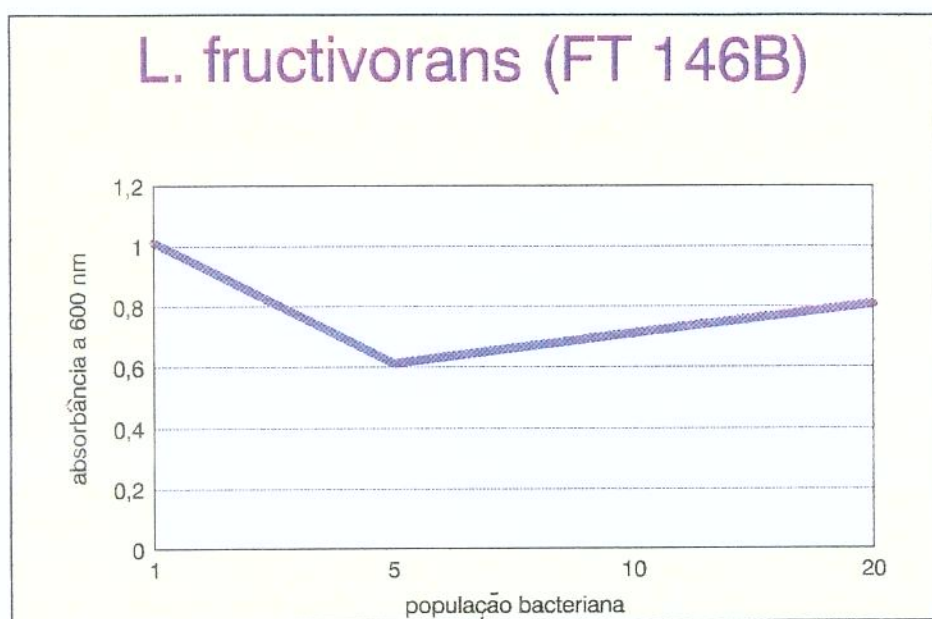


Figura 28: Capacidade floculante de *L. fructivorans* (FT 146B) frente à levedura VR-1.

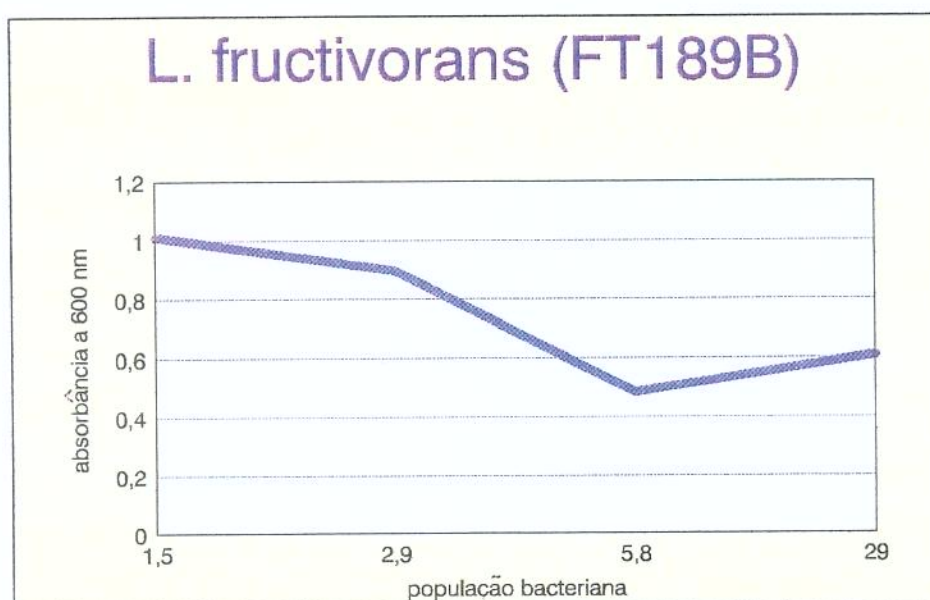


Figura 29: Capacidade floculante de *L. fructivorans* (FT 189B) frente à levedura VR-1.

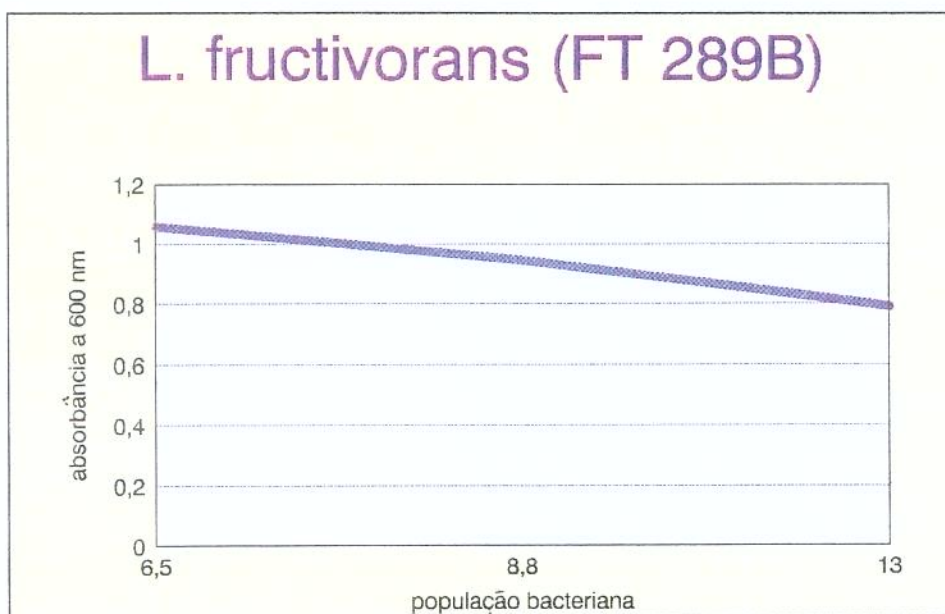


Figura 30: Capacidade floculante de *L. fructivorans* (FT 289B) frente à levedura VR-1.

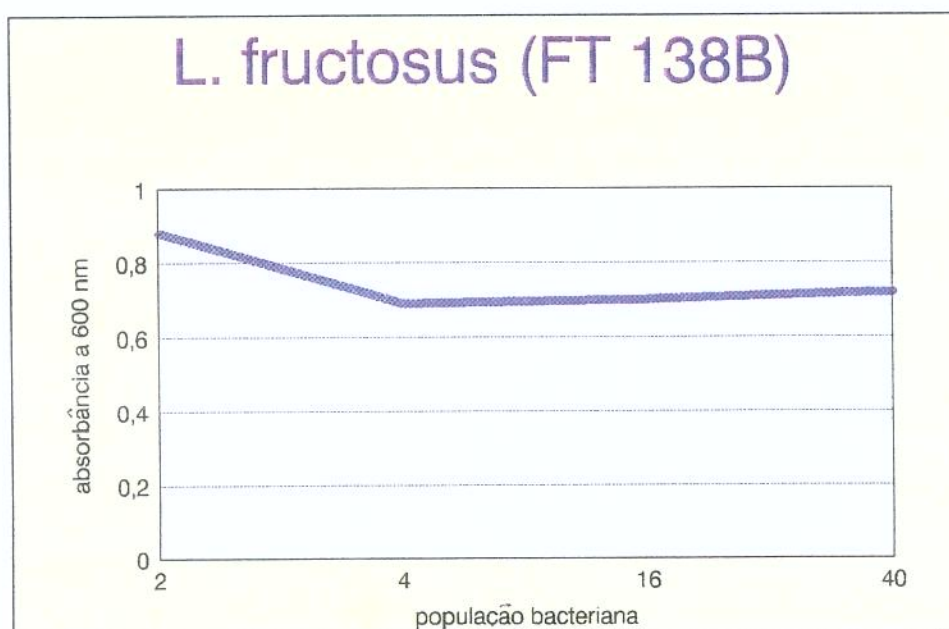


Figura 31: Capacidade floculante de *L. fructosus* (FT 138B) frente à levedura VR-1.

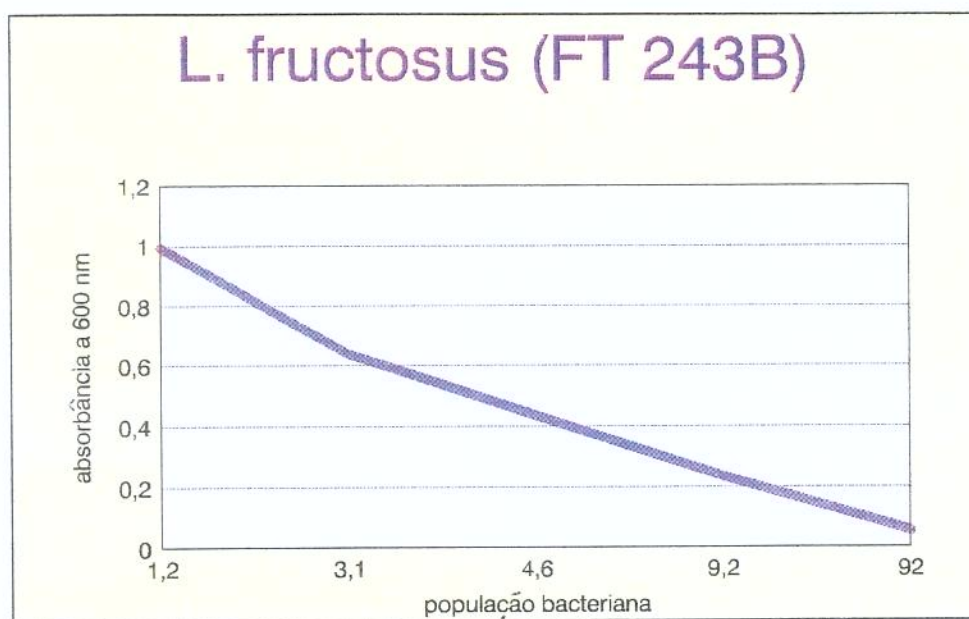


Figura 32: Capacidade floculante de *L. fructosus* (FT 243B) frente à levedura VR-1.

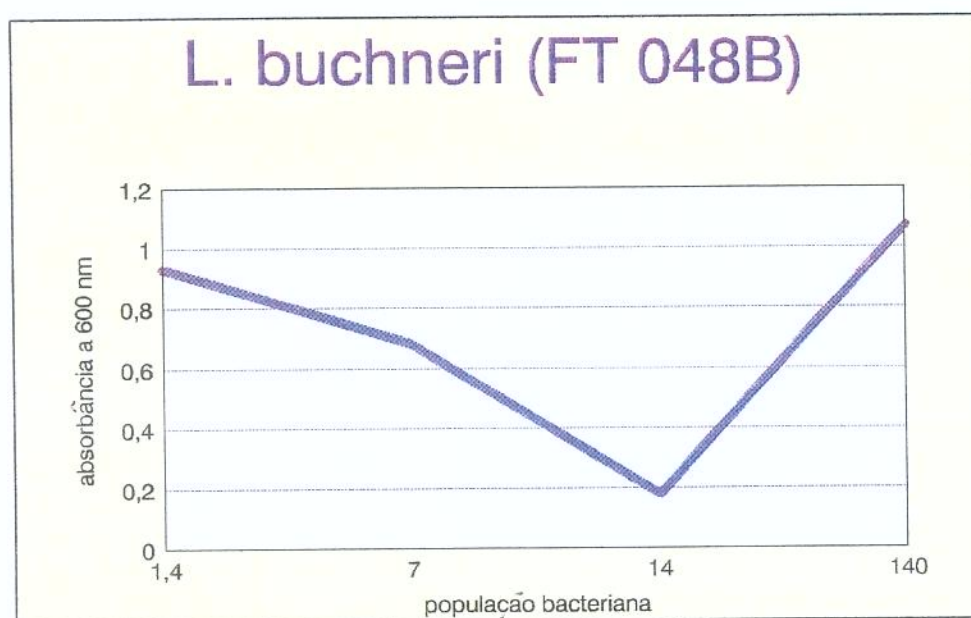


Figura 33: Capacidade floculante de *L. buchneri* (FT 048B) frente à levedura VR-1.

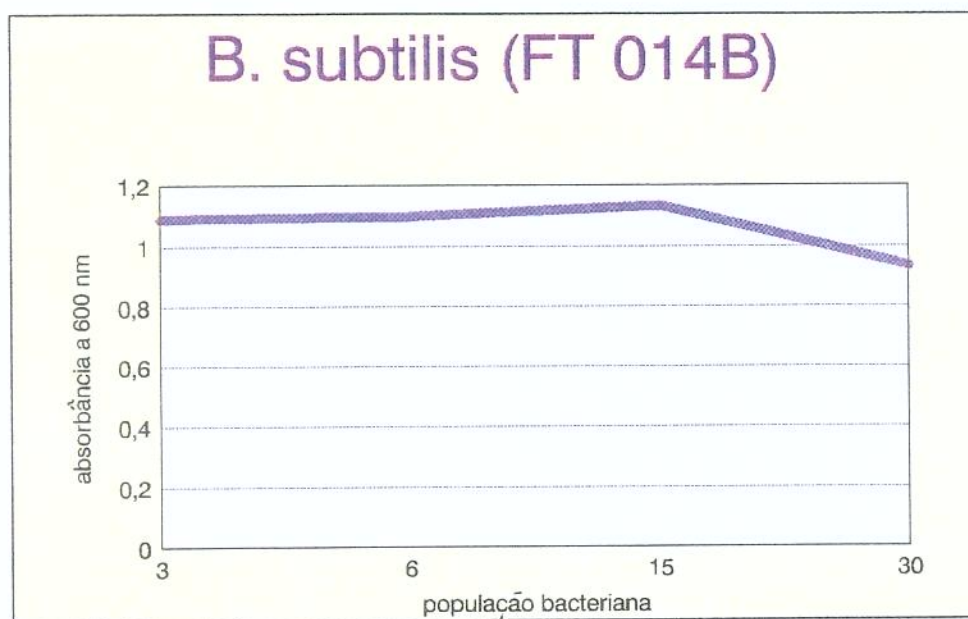


Figura 34: Capacidade floculante de *B. subtilis* (FT 014B) frente à levedura VR-1.

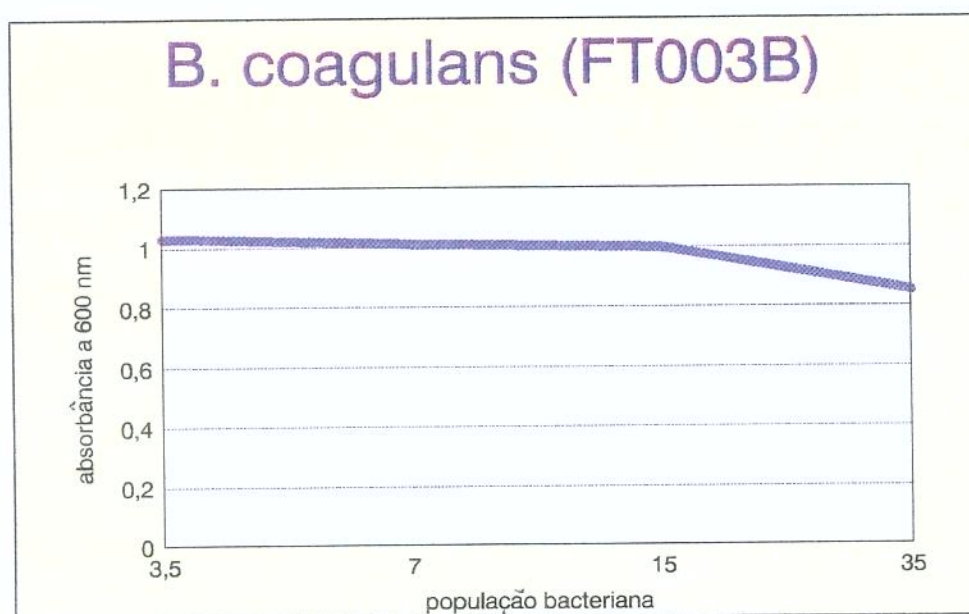


Figura 35: Capacidade floculante de *B. coagulans* (FT 003B) frente à levedura VR-1.

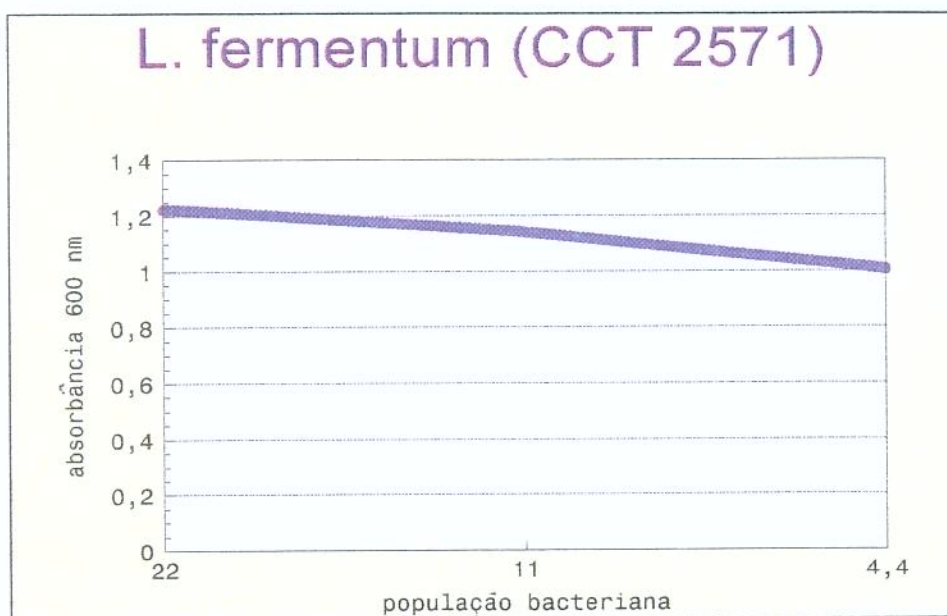


Figura 36: Capacidade flocculante de *L. fermentum* (CCT 2571) frente à levedura VR-1.

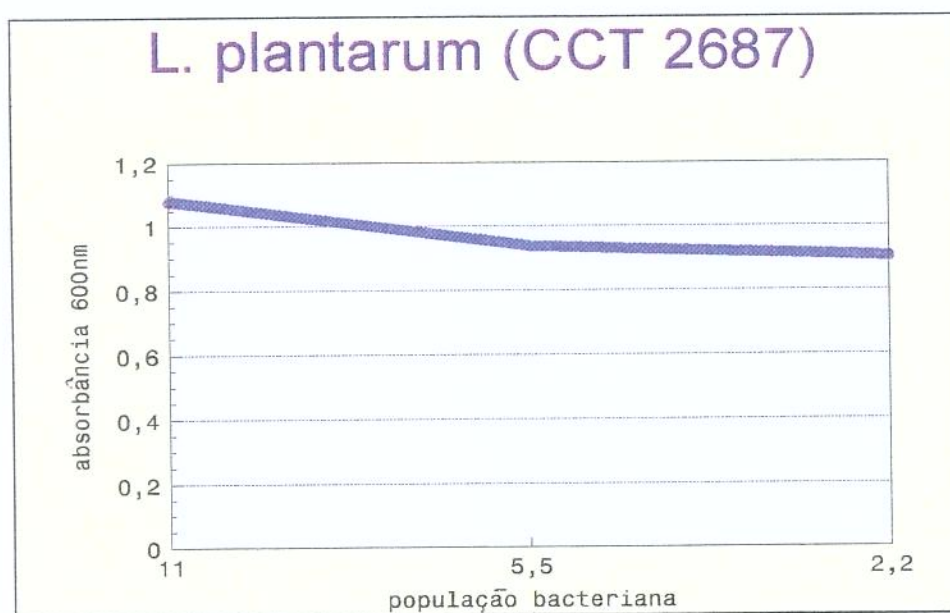


Figura 37: Capacidade flocculante de *L. plantarum* (CCT 2687) frente à levedura VR-1.

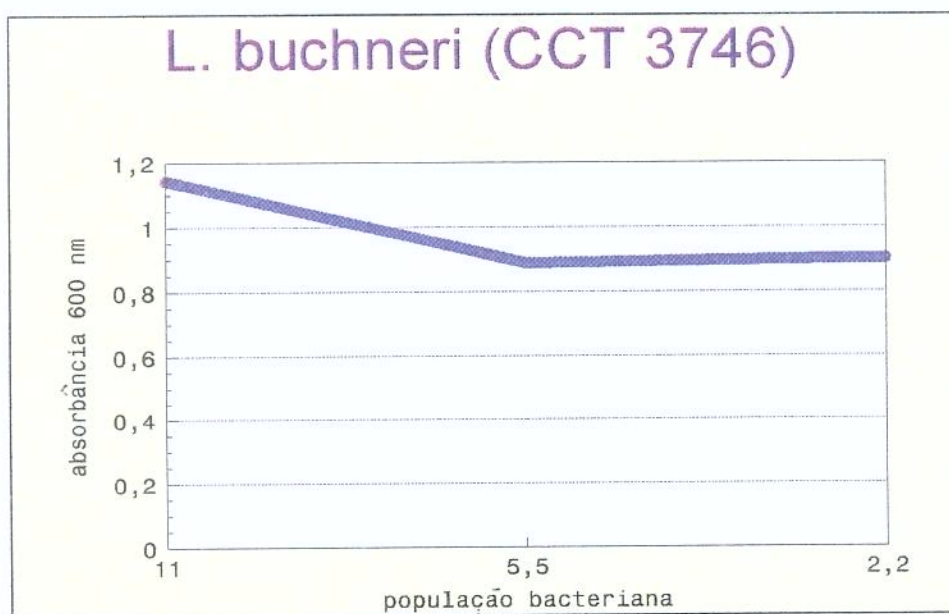


Figura 38: Capacidade floculante de *L. buchneri* (CCT 3746) frente à levedura VR-1.

Tabela 3: Relação entre as populações de bactérias e leveduras no teste de floculação.

Microrganismo	FT 134L/PE-2	Grau de Floculação	FT 136L/VR-1	Grau de Floculação
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	2,80	+++	1,70	+
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,40	+++	-	-
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	0,57	+++	-	-
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	1,80	+++	2,20	+
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	1,80	+	-	-
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	3,30	+	1,60	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	1,30	++	0,40	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	0,33	+++	0,16	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	0,13	+++	-	-
<i>L. fructivorans</i> (FT 146B)	0,83	+	0,50	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 146B)	0,42	+	-	-
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	0,48	+	2,90	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	0,24	+++	0,58	+
<i>L. fructivorans</i> (FT 289B)	1,10	+++	-	-
<i>L. fructivorans</i> (FT 289B)	0,73	+	-	-

Microrganismo	FT 134L/PE-2	Grau de Floculação	FT 136L/VR-1	Grau de Floculação
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	3,30	+	-	-
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,30	++	-	-
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	0,33	+++	-	-
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	0,17	+++	-	-
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	0,083	+	-	-

<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	7,70	+++	9,20	+++
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	0,77	+++	0,92	+++
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	0,38	+++	0,46	+
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)			0,31	+

<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,20	+++	1,40	+++
------------------------------	------	-----	------	-----

No geral, a relação de células de bactérias/leveduras para se conseguir a máxima floculação está entre 0,20 a 3,0, porém há casos como o *L. fructosus* (FT 243B) que apresentou um alto grau de floculação mesmo com uma relação de 7,70. No caso de *L. plantarum* (FT 032B) e *L. buchneri* (FT 048B) as variações são muito restritas, onde as relações bactérias/leveduras para máxima floculação são de 1,80 e 1,20, respectivamente utilizando a levedura *S. cerevisiae* (FT 134L/PE-2). A razão destas diferenças de comportamento entre espécies bacterianas é ainda desconhecida.

Estes valores são inferiores aqueles apresentados por Yokoya & Oliva-Neto (1991) sendo que, estas diferenças podem ser devidas a densidade das populações microbianas utilizadas nos ensaios de floculação.

A Tabela 3 também mostra que a levedura FT 136L/VR-1 foi menos susceptível à floculação do que a levedura FT 134L/PE-2, sendo que a relação bactéria/levedura de máxima floculação para ambas as leveduras são muito semelhantes.

4.3. Influência do teor alcoólico no processo de floculação

A Tabela 4 apresenta os resultados dos testes de floculação realizados com a levedura FT 134L/PE-2 na presença de 7,0% e 9,0% de teor alcoólico.

Foi observado que a presença de álcool no meio parece apresentar efeito inibitório no processo de floculação da levedura *S. cerevisiae* (FT 134L/PE-2) uma vez que, as leituras de absorbância encontradas para cepas bacterianas que haviam apresentado habilidade em flocular esta levedura foram superiores às leituras de absorbância quando não havia a presença de álcool no meio de floculação.

Desta forma, para os mesmos níveis bacterianos estudados, as leituras de absorbância encontradas nos testes de floculação foram crescentes na ausência de álcool no meio, com 7,0% de teor alcoólico e 9,0% de teor alcoólico, respectivamente.

A Tabela 5 apresenta os resultados dos testes de floculação realizados com a levedura FT 136L/VR-1 na presença de 7,0% e 9,0% de teor alcoólico.

Neste caso a presença de álcool no meio de floculação parece apresentar efeito estimulante no processo de floculação da levedura *S. cerevisiae* (FT 136L/VR-1), ao contrário do observado para a levedura *S. cerevisiae* (FT 134L/PE-2).

Desta forma para os mesmos níveis bacterianos estudados, as leituras de absorbância encontradas nos testes de floculação foram decrescentes quando comparadas na ausência de álcool no meio, com 7,0% de teor alcoólico e 9,0% de teor alcoólico.

Jin & Speers (1999b) estudaram duas cepas de *S. cerevisiae* as quais apresentavam os genes Flo1 e New flo respectivamente. Foi verificado o comportamento destas duas cepas com relação ao teor de etanol (0 a 10%), concluindo que a cepa com o gene Flo1 não foi afetada pelo nível de etanol enquanto que a floculação das células com

o gene *New flo* aumentou com os aumentos crescentes nas concentrações de etanol no meio.

A existência de cepas floculentas e não floculentas de *Lactobacillus* pode justificar o fato de algumas usinas apresentarem problemas de floculação enquanto outras não, mesmo apresentando níveis consideráveis e equivalentes de contaminação (Yokoya, 1989). Uma possível seleção de cepas floculentas pode explicar o fato destas últimas passarem a apresentar, repentinamente, problemas de floculação. Isto seria plausível, uma vez que segundo Gallo (1989) a predominância de espécies contaminantes varia durante a safra.

A característica floculante provavelmente é determinada geneticamente (Russel et al., 1980; Wilkie & Evans, 1982) e pode estar relacionada com herança plasmidial, em função de sua instabilidade. Esta instabilidade pode ser devido a facilidade de perda destes fatores extracromossômicos. Os plasmídeos são encontrados frequentemente em bactérias lácticas e, particularmente, nas espécies de *Lactobacillus* contendo genes responsáveis pela fermentação da lactose, resistência a bacteriófagos, velocidade de coagulação da caseína, etc. Não se pode porém descartar a possibilidade de herança cromossômica, sendo necessários estudos genéticos para esclarecer o mecanismo de transmissão destas características.

Tabela 4: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 134L/PE-2, na ausência e na presença de 7,0% e 9,0% de teor alcoólico.

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação 0,0% álcool	Teste de Floculação 7,0% álcool	Teste de Floculação 9,0% álcool
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,2 \times 10^8 : 3,4 \times 10^8$	0,169	0,177	0,349
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,2 \times 10^8 : 1,7 \times 10^8$	0,081	0,223	0,361
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,2 \times 10^8 : 6,8 \times 10^7$	0,151	0,517	0,528
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,2 \times 10^8 : 3,4 \times 10^7$	1,093	1,112	1,081

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação 0,0% álcool	Teste de Floculação 7,0% álcool	Teste de Floculação 9,0% álcool
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,2 \times 10^8 : 2,0 \times 10^8$	1,222	1,147	1,098
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,2 \times 10^8 : 1,0 \times 10^8$	1,070	1,007	1,069
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,2 \times 10^8 : 5,0 \times 10^7$	1,201	1,088	1,054

<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,2 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	0,079	0,861	0,944
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,2 \times 10^8 : 4,5 \times 10^7$	0,826	0,957	1,059
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,2 \times 10^8 : 2,2 \times 10^7$	1,179	1,118	1,148

<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,2 \times 10^8 : 2,2 \times 10^9$	1,437	1,218	1,240
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,2 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	0,563	1,057	1,137
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,2 \times 10^8 : 1,1 \times 10^8$	1,088	1,244	1,260

<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,2 \times 10^8 : 1,6 \times 10^8$	0,372	0,292	0,331
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,2 \times 10^8 : 4,0 \times 10^7$	0,060	0,112	0,129
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,2 \times 10^8 : 1,6 \times 10^7$	0,054	0,168	0,253
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,2 \times 10^8 : 8,0 \times 10^6$	1,091	1,016	1,098

<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,2 \times 10^8 : 1,0 \times 10^8$	0,640	1,030	1,084
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,2 \times 10^8 : 5,0 \times 10^7$	0,604	1,071	1,144
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,2 \times 10^8 : 1,0 \times 10^7$	0,690	1,124	1,156
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,2 \times 10^8 : 8,0 \times 10^6$	0,922	1,188	1,182

<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,2 \times 10^8 : 2,9 \times 10^8$	0,688	0,657	0,433
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,2 \times 10^8 : 5,8 \times 10^7$	0,402	0,289	0,115
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,2 \times 10^8 : 2,9 \times 10^7$	0,156	0,148	0,106

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação 0,0% álcool	Teste de Floculação 7,0% álcool	Teste de Floculação 9,0% álcool
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,2x10 ⁸ : 4,0x10 ⁸	0,609	0,591	0,724
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,2x10 ⁸ : 1,6x10 ⁸	0,320	0,368	0,663
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,2x10 ⁸ : 4,0x10 ⁷	0,107	0,291	0,453
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,2x10 ⁸ : 2,0x10 ⁷	0,226	0,424	0,601

<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,2x10 ⁸ : 9,2x10 ⁷	0,076	0,080	0,112
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,2x10 ⁸ : 4,6x10 ⁷	0,254	0,437	0,488
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,2x10 ⁸ : 3,1x10 ⁷	0,750	0,531	0,612
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,2x10 ⁸ : 1,2x10 ⁷	0,790	0,822	0,937

<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,2x10 ⁸ : 1,4x10 ⁸	0,108	0,093	0,085
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,2x10 ⁸ : 7,0x10 ⁷	0,750	0,203	0,112
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,2x10 ⁸ : 1,4x10 ⁷	1,008	0,988	1,001

Tabela 5: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 136L/VR-1, na ausência e na presença de 7,0% e 9,0% de teor alcoólico.

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação 0,0% álcool	Teste de Floculação 7,0% álcool	Teste de Floculação 9,0% álcool
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,0x10 ⁸ : 3,4x10 ⁸	0,901	1,090	0,787
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,0x10 ⁸ : 1,7x10 ⁸	0,639	0,530	0,501
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,0x10 ⁸ : 6,8x10 ⁷	0,819	0,601	0,498
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,0x10 ⁸ : 3,4x10 ⁷	1,001	0,908	0,872

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação 0,0% álcool	Teste de Floculação 7,0% álcool	Teste de Floculação 9,0% álcool
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,0 \times 10^8 : 2,0 \times 10^8$	1,412	1,129	1,203
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,0 \times 10^8 : 1,0 \times 10^8$	1,214	1,047	1,092
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,0 \times 10^8 : 5,0 \times 10^7$	1,138	1,108	1,030

<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,0 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	0,568	0,652	0,686
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,0 \times 10^8 : 4,5 \times 10^7$	0,865	0,990	0,818
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,0 \times 10^8 : 2,2 \times 10^7$	0,972	1,002	1,115

<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,0 \times 10^8 : 2,2 \times 10^9$	1,589	1,518	1,444
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,0 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	1,251	1,304	1,209
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,0 \times 10^8 : 1,1 \times 10^8$	1,188	1,107	0,995

<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,0 \times 10^8 : 1,6 \times 10^8$	0,553	0,509	0,422
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,0 \times 10^8 : 4,0 \times 10^7$	0,499	0,273	0,216
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,0 \times 10^8 : 1,6 \times 10^7$	0,449	0,404	0,393
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,0 \times 10^8 : 8,0 \times 10^6$	1,119	1,018	0,908

<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,0 \times 10^8 : 1,0 \times 10^8$	0,712	0,776	0,660
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,0 \times 10^8 : 5,0 \times 10^7$	0,613	0,701	0,512
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,0 \times 10^8 : 1,0 \times 10^7$	1,012	0,532	0,505
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,0 \times 10^8 : 8,0 \times 10^6$	1,056	0,988	0,910

<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,0 \times 10^8 : 2,9 \times 10^8$	0,610	0,884	0,680
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,0 \times 10^8 : 5,8 \times 10^7$	0,483	0,500	0,480
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,0 \times 10^8 : 2,9 \times 10^7$	0,898	0,690	0,608

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação 0,0% álcool	Teste de Floculação 7,0% álcool	Teste de Floculação 9,0% álcool
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,0x10 ⁸ : 4,0x10 ⁸	0,721	0,558	0,545
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,0x10 ⁸ : 1,6x10 ⁸	0,701	0,502	0,499
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,0x10 ⁸ : 4,0x10 ⁷	0,690	0,428	0,401
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	1,0x10 ⁸ : 2,0x10 ⁷	0,883	0,816	0,799

<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,0x10 ⁸ : 9,2x10 ⁷	0,235	0,192	0,180
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,0x10 ⁸ : 4,6x10 ⁷	0,434	0,410	0,390
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,0x10 ⁸ : 3,1x10 ⁷	0,638	0,558	0,545
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,0x10 ⁸ : 1,2x10 ⁷	0,994	0,886	0,810

<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,0x10 ⁸ : 1,4x10 ⁸	0,180	0,179	0,179
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,0x10 ⁸ : 7,0x10 ⁷	0,678	0,660	0,599
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,0x10 ⁸ : 1,4x10 ⁷	0,932	0,900	1,010

4.4. Influência da temperatura no processo de floculação

A Tabela 6 apresenta os resultados dos testes de floculação realizados com a levedura FT 134L/PE-2 nas temperaturas de 33°C e 39°C.

Os resultados observados nestes ensaios não apresentaram variações com relação a habilidade floculante das cepas bacterianas e também não houve diferenças com relação aos níveis bacterianos requeridos para desencadear o início do processo de floculação; apenas notou-se uma ligeira diminuição da floculação com o aumento da temperatura.

A Tabela 7 apresenta os resultados dos testes de floculação realizados com a levedura FT 136L/VR-1 nas temperaturas de 33°C e 39°C.

Neste caso também não foram observadas variações significativas com relação à capacidade floculante das cepas bacterianas ou nos níveis das populações destes microrganismos para desencadear o início do processo de floculação.

De acordo com Santos (1991), o tratamento com temperaturas elevadas (50°C) em células floculentas de *L. fermentum* resulta na destruição de sua capacidade floculadora. Este efeito foi maior em valores de pH 4,5, se comparado a pH 6,2. Já o tratamento térmico em células de levedura não afetou sua susceptibilidade a floculação.

Mill (1964b) observou que quando uma suspensão de leveduras floculentas utilizada na produção de cerveja era aquecida de 23°C para 62°C, acontecia inicialmente uma progressiva diminuição da floculação e, entre 50°C a 62°C, ocorria uma drástica inibição do processo. Similarmente verificou-se que flocos da levedura *Schizosaccharomyces pombe* mostraram-se estáveis na faixa de 20-50°C, enquanto que temperaturas mais altas causavam uma desfloculação reversível, a qual atingiu o máximo em valores maiores que 80°C (Calleja, 1970).

No trabalho de Yokoya & Oliva-Neto (1991) foi constatado que o tratamento térmico e enzimático com protease resultava na perda da capacidade floculante das células bacterianas, sugerindo que um fator de natureza protéica seria responsável pela capacidade floculante de *L. fermentum*.

De acordo com Santos & Yokoya (1993) são necessárias temperaturas próximas a 50°C para inativar o processo de floculação causado por *L. fermentum*.

Jin & Speers (1999b) avaliaram o comportamento de cepas de *S. cerevisiae* com os genes Flo1 e New flo com relação a temperatura e concluíram que a diminuição da temperatura de 25°C para 5°C retardou o processo de floculação para ambas as cepas.

Tabela 6: Capacidade flocculante de bactérias frente à levedura FT 134L/PE-2, nas temperaturas de 33 °C e 39°C

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Flocculação T°C 33°C	Teste de Flocculação T°C 39°C
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	2,0x10 ⁸ : 3,0x10 ⁸	0,191	0,186
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	2,0x10 ⁸ : 1,5x10 ⁸	0,100	0,112
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	2,0x10 ⁸ : 5,0x10 ⁷	0,212	0,302
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	2,0x10 ⁸ : 2,5x10 ⁷	0,822	0,874
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	2,0x10 ⁸ : 2,6x10 ⁸	1,318	1,286
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	2,0x10 ⁸ : 1,3x10 ⁸	1,026	1,048
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	2,0x10 ⁸ : 6,5x10 ⁷	1,098	1,076
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	2,0x10 ⁸ : 4,3x10 ⁸	1,254	1,190
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	2,0x10 ⁸ : 2,2x10 ⁸	1,104	1,142
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	2,0x10 ⁸ : 5,4x10 ⁷	0,968	1,014
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	2,0x10 ⁸ : 1,8x10 ⁸	0,088	0,103
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	2,0x10 ⁸ : 6,0x10 ⁷	0,472	0,424
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	2,0x10 ⁸ : 3,0x10 ⁷	1,066	0,998
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	2,0x10 ⁸ : 3,1x10 ⁸	0,712	0,810
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	2,0x10 ⁸ : 1,6x10 ⁸	0,698	0,704
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	2,0x10 ⁸ : 7,8x10 ⁷	0,671	0,530
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	2,0x10 ⁸ : 2,8x10 ⁸	0,336	0,229
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	2,0x10 ⁸ : 7,0x10 ⁷	0,213	0,218
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	2,0x10 ⁸ : 3,5x10 ⁷	0,201	0,117
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	2,0x10 ⁸ : 8,8x10 ⁶	0,814	0,790

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação T°C 33°C	Teste de Floculação T°C 39°C
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	2,0x10 ⁸ : 1,6x10 ⁸	0,811	0,901
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	2,0x10 ⁸ : 8,0x10 ⁷	0,622	0,589
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	2,0x10 ⁸ : 4,0x10 ⁷	0,580	0,579
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	2,0x10 ⁸ : 1,6x10 ⁷	0,977	1,002

<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	2,0x10 ⁸ : 1,9x10 ⁸	0,418	0,386
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	2,0x10 ⁸ : 6,3x10 ⁷	0,390	0,298
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	2,0x10 ⁸ : 3,2x10 ⁷	0,229	0,202
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	2,0x10 ⁸ : 1,9x10 ⁷	0,732	0,819

<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	2,0x10 ⁸ : 2,9x10 ⁸	0,452	0,391
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	2,0x10 ⁸ : 7,3x10 ⁷	0,102	0,115
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	2,0x10 ⁸ : 2,9x10 ⁷	0,304	0,298
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	2,0x10 ⁸ : 9,7x10 ⁶	0,488	0,513

<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	2,0x10 ⁸ : 3,6x10 ⁸	0,081	0,092
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	2,0x10 ⁸ : 9,0x10 ⁷	0,077	0,080
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	2,0x10 ⁸ : 3,6x10 ⁷	0,309	0,294
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	2,0x10 ⁸ : 9,0x10 ⁶	0,582	0,602

<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	2,0x10 ⁸ : 2,2x10 ⁸	0,226	0,232
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	2,0x10 ⁸ : 7,3x10 ⁷	0,598	0,505
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	2,0x10 ⁸ : 5,5x10 ⁷	0,833	0,788
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	2,0x10 ⁸ : 2,2x10 ⁷	0,917	0,894

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação T°C 33°C	Teste de Floculação T°C 39°C
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$2,0 \times 10^8 : 1,5 \times 10^8$	1,012	0,988
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$2,0 \times 10^8 : 7,5 \times 10^7$	0,986	0,916
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	$2,0 \times 10^8 : 1,5 \times 10^7$	0,992	0,948

<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$2,0 \times 10^8 : 2,5 \times 10^8$	1,030	1,077
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$2,0 \times 10^8 : 6,3 \times 10^7$	0,922	1,010
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	$2,0 \times 10^8 : 2,5 \times 10^7$	0,958	0,988

Tabela 7: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT 136L/VR-1, nas temperaturas de 33 °C e 39 °C

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação T°C 33°C	Teste de Floculação T°C 39°C
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,8 \times 10^8 : 3,0 \times 10^8$	0,922	0,979
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,8 \times 10^8 : 1,5 \times 10^8$	0,582	0,601
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,8 \times 10^8 : 5,0 \times 10^7$	0,870	0,777
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$1,8 \times 10^8 : 2,5 \times 10^7$	1,122	1,012

<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,8 \times 10^8 : 2,6 \times 10^8$	1,350	1,252
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,8 \times 10^8 : 1,3 \times 10^8$	1,172	1,129
<i>L. fermentum</i> (FT 108B)	$1,8 \times 10^8 : 6,5 \times 10^7$	1,010	1,110

<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,8 \times 10^8 : 4,3 \times 10^8$	1,196	1,148
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,8 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	1,120	1,088
<i>L. fermentum</i> (FT 256B)	$1,8 \times 10^8 : 5,4 \times 10^7$	0,979	0,913

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação T°C 33°C	Teste de Floculação T°C 39°C
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,8 \times 10^8 : 1,8 \times 10^8$	0,550	0,575
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,8 \times 10^8 : 6,0 \times 10^7$	0,788	0,801
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$1,8 \times 10^8 : 3,0 \times 10^7$	0,890	0,911

<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,8 \times 10^8 : 3,1 \times 10^8$	1,222	1,197
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,8 \times 10^8 : 1,6 \times 10^8$	1,112	1,077
<i>L. plantarum</i> (FT 158B)	$1,8 \times 10^8 : 7,8 \times 10^7$	1,030	0,986

<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,8 \times 10^8 : 2,8 \times 10^8$	0,699	0,711
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,8 \times 10^8 : 7,0 \times 10^7$	0,512	0,488
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,8 \times 10^8 : 3,5 \times 10^7$	0,378	0,329
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,8 \times 10^8 : 8,8 \times 10^6$	0,968	0,901

<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,8 \times 10^8 : 1,6 \times 10^8$	0,800	0,718
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,8 \times 10^8 : 8,0 \times 10^7$	0,688	0,643
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,8 \times 10^8 : 4,0 \times 10^7$	0,555	0,502
<i>L. fructivorans</i> (FT146B)	$1,8 \times 10^8 : 1,6 \times 10^7$	1,001	0,963

<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,8 \times 10^8 : 1,9 \times 10^8$	0,599	0,610
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,8 \times 10^8 : 6,3 \times 10^7$	0,441	0,491
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,8 \times 10^8 : 3,2 \times 10^7$	0,782	0,689
<i>L. fructivorans</i> (FT 189B)	$1,8 \times 10^8 : 1,9 \times 10^7$	1,190	1,018

<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	$1,8 \times 10^8 : 2,9 \times 10^8$	0,718	0,820
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	$1,8 \times 10^8 : 7,3 \times 10^7$	0,659	0,620
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	$1,8 \times 10^8 : 2,9 \times 10^7$	0,702	0,670
<i>L. fructosus</i> (FT 138B)	$1,8 \times 10^8 : 9,7 \times 10^6$	0,918	0,879

Microrganismo	População levedura:bactéria	Teste de Floculação T°C 33°C	Teste de Floculação T°C 39°C
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,8x10 ⁸ : 3,6x10 ⁸	0,098	0,089
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,8x10 ⁸ : 9,0x10 ⁷	0,220	0,232
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,8x10 ⁸ : 3,6x10 ⁷	0,588	0,505
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,8x10 ⁸ : 9,0x10 ⁶	0,986	1,012

<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,8x10 ⁸ : 2,2x10 ⁸	0,139	0,194
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,8x10 ⁸ : 7,3x10 ⁷	0,618	0,742
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,8x10 ⁸ : 5,5x10 ⁷	0,628	0,583
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,8x10 ⁸ : 2,2x10 ⁷	0,951	1,038

<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	1,8x10 ⁸ : 1,5x10 ⁸	0,982	1,054
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	1,8x10 ⁸ : 7,5x10 ⁷	0,970	0,932
<i>B. subtilis</i> (FT 014B)	1,8x10 ⁸ : 1,5x10 ⁷	0,922	0,965

<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	1,8x10 ⁸ : 2,5x10 ⁸	1,131	1,044
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	1,8x10 ⁸ : 6,3x10 ⁷	1,018	0,987
<i>B. coagulans</i> (FT 003B)	1,8x10 ⁸ : 2,5x10 ⁷	0,996	0,999

Para se verificar o efeito de temperaturas mais elevadas no processo de floculação das leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1, procurou-se selecionar as cepas bacterianas fortemente floclulentas (*L. fermentum* e *L. fructosus*) e a seguir submeteu-se as respectivas cepas destes microrganismos ao tratamento com temperaturas de 45°C, 55°C e 60°C por 30 minutos.

Testes de floculação foram conduzidos com estes microrganismos e os resultados são apresentados na Tabela 8.

Os resultados observados neste ensaio mostraram que em temperaturas próximas a 55 °C já foi observada a redução da capacidade floculante das células bacterianas e em temperaturas mais elevadas os efeitos foram mais pronunciados. Estas observações concordam com os relatos de Mill (1964b), Santos (1991) e Santos & Yokoya (1993).

Tabela 8: Efeito da temperatura na floculação de leveduras

Temperatura	LEVEDURA PE-2		LEVEDURA VR-1	
	<i>L. fermentum</i> FT 038B	<i>L. fructosus</i> FT 243B	<i>L. fermentum</i> FT 038B	<i>L. fructosus</i> FT 243B
25°C	0,126	0,099	0,301	0,371
45°C	0,188	0,145	0,494	0,393
55°C	1,081	0,556	0,544	0,548
65°C	1,109	1,122	0,551	0,673

Comparando-se os resultados encontrados para as duas cepas de leveduras, notou-se que a redução na intensidade de floculação com o tratamento térmico foi menor para a levedura FT 136L/VR-1 do que para a levedura FT 134L/PE-2.

Em complementação a este ensaio foi feito o tratamento enzimático com papaina nas células floculadas de leveduras por estas cepas bacterianas, e foi observado que esta enzima revertia o processo de floculação causado por *L. fermentum* (FT 038B), porém a floculação provocada por *L. fructosus* (FT 243B) foi menos afetada por esta enzima. Devido a isto supõe-se que o fator de floculação parece não ser exatamente o mesmo para estas espécies bacterianas.

De qualquer forma estes resultados concordam com as afirmações de Yokoya & Oliva-Neto (1991) de que o tratamento enzimático com protease resulta na perda da capacidade floculante de *L. fermentum*.

De acordo com os resultados obtidos, supõe-se que a floculação de *S. cerevisiae* causada por essas bactérias do gênero *Lactobacillus* deve envolver a parede celular destes microrganismos. O mecanismo deste processo pode estar relacionado a superfície celular sendo que os íons cálcio, por sua vez, também atuam diretamente neste sistema.

4.5. Efeito do tratamento enzimático sobre a capacidade floculante de leveduras e bactérias

A Tabela 9 apresenta os resultados dos testes de floculação realizados, utilizando cepas bacterianas tratadas e cepas bacterianas não submetidas ao tratamento com a enzima protease de *Streptomyces griseus*. Os resultados observados indicaram que houve perda total da capacidade floculante para as espécies *L. plantarum* (FT 032B), *L. fermentum* (FT 038B), *L. buchneri* (FT 048B) e *L. fructivorans* (FT 091B). Estes resultados concordam com os observados por Santos (1991) onde foi constatada a perda da capacidade floculante de *L. fermentum* após 40 minutos de tratamento com esta enzima; já o tratamento com protease nas células de levedura (*S. cerevisiae*) não afetou o processo de floculação.

Tabela 9: Efeito na floculação do tratamento enzimático de células bacterianas com protease de *Streptomyces griseus* frente às leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1.

Microrganismo	FT 134L/PE-2		FT 136L/VR-1	
	sem tratamento	com tratamento	sem tratamento	com tratamento
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	0,239	1,309	0,338	1,401
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	0,200	1,329	0,340	1,429
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	0,101	1,351	0,096	1,388
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	0,126	1,323	0,097	1,403
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	0,214	0,314	0,276	0,389

A perda da capacidade floculante após o tratamento com protease de *Streptomyces griseus* nas células bacterianas sugere que o fator de floculação entre bactérias e leveduras possui natureza proteica.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Conway & Kjelleberg (1989), os quais verificaram que o fator de adesão responsável pela colonização da cepa 737 de *L. fermentum* ao epitélio gástrico de camundongo era sensível ao tratamento térmico e com a pronase E, indicando sua natureza proteica.

Estudos realizados por Henriksson et al. (1991) também citam ser de natureza proteica como o fator de adesão entre cepas de *L. fermentum* e a superfície epitelial gástrica de suínos.

Por outro lado, para *L. fructosus* (FT 243B) o tratamento enzimático com protease de *Streptomyces griseus* não impediu o efeito da floculação desta cepa bacteriana com as leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1, sugerindo com isto que o fator responsável pela floculação possa não ser de natureza proteica.

Na Tabela 10 são mostrados os resultados referentes ao ensaio de desfloculação utilizando a enzima papaina. Neste ensaio foi observado que esta enzima apresentou habilidade em desflocular flocos envolvendo as leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1 com as bactérias *L. plantarum* (FT 032B), *L. fermentum* (FT 038B) e *L. fructivorans* (FT 091B). Já o processo de floculação estabelecido por *L. buchneri* (FT 048B) e *L. fructosus* (FT 243B) com as referidas leveduras não foi revertido na presença da papaina, confirmando assim o possível envolvimento de um outro fator não protéico no processo de floculação.

Tabela 10: Teste de desfloculação com papaina

Microrganismo	FT 134L/PE-2		FT 136L/VR-1	
	sem papaina	com papaina	sem papaina	com papaina
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	0,301	1,035	0,310	1,070
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	0,249	0,939	0,130	1,120
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	0,100	0,232	0,133	0,236
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	0,089	0,823	0,089	0,833
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	0,236	0,250	0,212	0,273

4.6. Efeito do tratamento com modificadores químicos dos componentes da parede celular sobre a capacidade floculante de leveduras e bactérias

4.6.1. Modificadores químicos de proteínas

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com células bacterianas tratadas com modificadores químicos de proteínas dos componentes da parede celular mostraram que houve inibição na capacidade de floculação para as espécies *L. plantarum* (FT 032B), *L. fermentum* (FT 038B) e *L. buchneri* (FT 048B), já para as espécies *L. fructivorans* (FT 091B) e *L. fructosus* (FT 243B) ainda ocorreu floculação das leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1 nos testes de floculação utilizando células bacterianas tratadas. Estes resultados são apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Bromberg (1994), a qual verificou que células de *L. fermentum* quando tratadas com os reagentes acilantes anidrido acético e anidrido maleico, apresentaram inibição de sua capacidade de flocular células de *S. cerevisiae*. Por outro lado, estes mesmos tratamentos quando realizados em células de *S. cerevisiae* não acarretaram alterações no processo de floculação, segundo a pesquisadora.

Estes reagentes acilantes podem atuar sobre os grupos funcionais amina, sulfidril, fenol e indol, sendo que os resultados obtidos para *L. fermentum*, *L. plantarum*

e *L. buchneri* sugerem a participação direta ou indireta destes grupamentos no processo de floculação. Já para *L. fructivorans* e *L. fructosus* o processo de floculação deve envolver outros grupamentos e/ou fatores. Estes resultados também reforçam a hipótese de que o mecanismo envolvido na floculação entre *S. cerevisiae* e *L. fermentum* não deve ser o mesmo mecanismo responsável pela floculação entre *S. cerevisiae* e *L. fructosus*, ou pelo menos não deve envolver os mesmos componentes celulares.

Tabela 11: Efeito na floculação do tratamento com modificadores químicos de proteínas em células bacterianas frente à levedura FT 134L/PE-2.

Microrganismo	Anidrido Maleico		Anidrido Acético	
	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	1,5x10 ⁸ : 1,8x10 ⁸	1,191	1,5x10 ⁸ : 2,0x10 ⁸	1,280
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	1,5x10 ⁸ : 9,0x10 ⁷	0,878	1,5x10 ⁸ : 1,0x10 ⁸	1,046
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	1,5x10 ⁸ : 1,8x10 ⁷	1,024	1,5x10 ⁸ : 2,0x10 ⁷	1,016
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,5x10 ⁸ : 2,2x10 ⁸	1,092	1,5x10 ⁸ : 2,4x10 ⁸	1,382
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,5x10 ⁸ : 1,1x10 ⁸	1,059	1,5x10 ⁸ : 1,2x10 ⁸	1,277
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,5x10 ⁸ : 2,2x10 ⁷	1,047	1,5x10 ⁸ : 2,4x10 ⁷	1,088
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,5x10 ⁸ : 4,4x10 ⁸	0,846	1,5x10 ⁸ : 1,6x10 ⁸	1,349
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,5x10 ⁸ : 2,2x10 ⁸	0,396	1,5x10 ⁸ : 8,0x10 ⁷	1,038
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,5x10 ⁸ : 4,4x10 ⁷	0,522	1,5x10 ⁸ : 1,6x10 ⁷	0,556

Microrganismo	Anidrido Maleico		Anidrido Acético	
	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,5 \times 10^8$: $3,0 \times 10^8$	0,366	$1,5 \times 10^8$: $2,8 \times 10^8$	0,509
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,5 \times 10^8$: $1,5 \times 10^8$	0,164	$1,5 \times 10^8$: $1,4 \times 10^8$	0,377
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$1,5 \times 10^8$: $3,0 \times 10^7$	0,107	$1,5 \times 10^8$: $2,8 \times 10^7$	0,240

<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	$1,5 \times 10^8$: $4,4 \times 10^8$	1,445	$1,5 \times 10^8$: $6,0 \times 10^8$	1,640
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	$1,5 \times 10^8$: $2,2 \times 10^8$	1,380	$1,5 \times 10^8$: $3,0 \times 10^8$	1,370
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	$1,5 \times 10^8$: $4,4 \times 10^7$	0,383	$1,5 \times 10^8$: $6,0 \times 10^7$	0,142

Tabela 12: Efeito na floculação do tratamento com modificadores químicos de proteínas em células bacterianas frente à levedura FT 136L/VR-1.

Microrganismo	Anidrido Maleico		Anidrido Acético	
	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$3,8 \times 10^8$: $1,8 \times 10^8$	1,223	$3,8 \times 10^8$: $2,0 \times 10^8$	1,387
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$3,8 \times 10^8$: $9,0 \times 10^7$	0,970	$3,8 \times 10^8$: $1,0 \times 10^8$	1,061
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	$3,8 \times 10^8$: $1,8 \times 10^7$	1,977	$3,8 \times 10^8$: $2,0 \times 10^7$	0,974

<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$3,8 \times 10^8$: $2,2 \times 10^8$	1,040	$3,8 \times 10^8$: $2,4 \times 10^8$	1,407
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$3,8 \times 10^8$: $1,1 \times 10^8$	0,951	$3,8 \times 10^8$: $1,2 \times 10^8$	1,260
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	$3,8 \times 10^8$: $2,2 \times 10^7$	1,021	$3,8 \times 10^8$: $2,4 \times 10^7$	1,096

<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	$3,8 \times 10^8$: $4,4 \times 10^8$	0,722	$3,8 \times 10^8$: $1,6 \times 10^8$	1,357
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	$3,8 \times 10^8$: $2,2 \times 10^8$	0,387	$3,8 \times 10^8$: $8,0 \times 10^7$	1,029
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	$3,8 \times 10^8$: $4,4 \times 10^7$	0,538	$3,8 \times 10^8$: $1,6 \times 10^7$	0,645

Microrganismo	Anidrido Maleico		Anidrido Acético	
	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$3,8 \times 10^8 : 3,0 \times 10^8$	0,276	$3,8 \times 10^8 : 2,8 \times 10^8$	0,598
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$3,8 \times 10^8 : 1,5 \times 10^8$	0,131	$3,8 \times 10^8 : 1,4 \times 10^8$	0,296
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	$3,8 \times 10^8 : 3,0 \times 10^7$	0,104	$3,8 \times 10^8 : 2,8 \times 10^7$	0,214

<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	$3,8 \times 10^8 : 4,4 \times 10^8$	1,660	$3,8 \times 10^8 : 6,0 \times 10^8$	1,789
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	$3,8 \times 10^8 : 2,2 \times 10^8$	0,675	$3,8 \times 10^8 : 3,0 \times 10^8$	1,301
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	$3,8 \times 10^8 : 4,4 \times 10^7$	0,393	$3,8 \times 10^8 : 6,0 \times 10^7$	0,212

4.6.2. Modificadores químicos de carboidratos

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com células de leveduras tratadas com modificadores químicos de carboidratos dos componentes da parede celular mostraram que houve inibição no processo de floculação para as leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1, como pode ser observado na Tabela 13.

Trabalhos realizados por Bromberg (1994) também fazem referência as células de *S. cerevisiae* submetidas aos tratamentos com NaIO_4 0,01M e 0,02M indicando que estes tratamentos apresentaram inibição na capacidade floculante da levedura por células de *L. fermentum* não tratadas. Isto sugere que os carboidratos da parede celular da levedura são essenciais para a interação com a bactéria, resultando na floculação.

Ainda a mesma autora verificou que células de *L. fermentum* tratadas com NaIO_4 apresentaram capacidade de flocular a levedura indicando assim que o fator responsável pela capacidade floculante da bactéria não deve ser formado por carboidratos.

No processo de floculação envolvendo leveduras floculantes vários autores (Miki et al., 1982b; Stratford & Keenan, 1988) sugerem o envolvimento das fosfomananas constituintes da parede celular como sítios de interação. Esta consideração pode ser extrapolada também para a floculação envolvendo leveduras e bactérias, supondo que as

mananas da parede celular das leveduras compõem a parte ligante das mesmas na adesão com células de bactérias. Esta hipótese é reforçada pelo trabalho de Santos (1991), a qual verificou que a presença do carboidrato manose provocou nítida inibição da floculação entre leveduras e *L. fermentum*.

Desta forma, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que o processo de floculação entre as leveduras industriais *S. cerevisiae* (FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1) e bactérias do gênero *Lactobacillus* sp apresenta um mecanismo intercelular a nível da parede celular destes microrganismos. Para as espécies *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. buchneri* este processo deve envolver componentes protéicos da superfície celular da bactéria, mais especificamente os grupos funcionais fenol e indol, e carboidratos da parede celular da levedura. Já para as espécies *L. fructivorans* e *L. fructosus* a presença de outros grupamentos ou fatores deve também estar envolvida no processo de floculação.

Tabela 13: Efeito na floculação do tratamento com modificadores químicos de carboidratos nas leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1.

Microrganismo	FT 134L/PE-2		FT 136L/VR-1	
	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	1,8x10 ⁸ : 1,5x10 ⁸	0,743	2,0x10 ⁸ : 1,5x10 ⁸	0,515
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	1,8x10 ⁸ : 7,5x10 ⁷	0,706	2,0x10 ⁸ : 7,5x10 ⁷	0,574
<i>L. plantarum</i> (FT 032B)	1,8x10 ⁸ : 3,8x10 ⁷	0,700	2,0x10 ⁸ : 3,8x10 ⁷	0,509
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,8x10 ⁸ : 2,2x10 ⁸	0,815	2,0x10 ⁸ : 2,2x10 ⁸	0,524
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,8x10 ⁸ : 1,1x10 ⁸	0,664	2,0x10 ⁸ : 1,1x10 ⁸	0,491
<i>L. fermentum</i> (FT 038B)	1,8 x10 ⁸ : 5,5x10 ⁷	0,661	2,0x10 ⁸ : 5,5x10 ⁷	0,499

Microrganismo	FT 134L/PE-2		FT 136L/VR-1	
	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm	levedura:bactéria no teste de floculação	leitura (A) 600 nm
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,8x10 ⁸ : 5,0x10 ⁸	0,483	2,0x10 ⁸ : 5,0x10 ⁸	0,799
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,8x10 ⁸ : 2,5x10 ⁸	0,349	2,0x10 ⁸ : 2,5x10 ⁸	0,666
<i>L. buchneri</i> (FT 048B)	1,8x10 ⁸ : 1,3x10 ⁸	0,353	2,0x10 ⁸ : 1,3x10 ⁸	0,660

<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	1,8x10 ⁸ : 3,5x10 ⁸	0,831	2,0x10 ⁸ : 3,5x10 ⁸	0,913
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	1,8x10 ⁸ : 1,8x10 ⁸	0,678	2,0x10 ⁸ : 1,8x10 ⁸	0,857
<i>L. fructivorans</i> (FT 091B)	1,8x10 ⁸ : 9,0x10 ⁷	0,685	2,0x10 ⁸ : 9,0x10 ⁷	0,833

<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,8x10 ⁸ : 7,2x10 ⁸	0,810	2,0x10 ⁸ : 7,2x10 ⁸	0,999
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,8x10 ⁸ : 3,6x10 ⁸	0,750	2,0x10 ⁸ : 3,6x10 ⁸	0,852
<i>L. fructosus</i> (FT 243B)	1,8x10 ⁸ : 1,8x10 ⁸	0,801	2,0x10 ⁸ : 1,8x10 ⁸	0,848

4.7. Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à outras leveduras

Foram também realizados testes de floculação com as leveduras *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia ohmeri* e *Candida krusei*; espécies de leveduras encontradas como contaminantes de processos industriais de fermentação alcoólica (Cabrini, 1997).

Os resultados destes experimentos são apresentados na Tabela 14.

De acordo com esta Tabela nota-se que *S. kluyveri*, *C. krusei* e *S. chevalieri* foram as espécies de levedura mais susceptíveis à floculação e *Sch. pombe* e *P. ohmeri* as espécies de levedura menos susceptíveis à floculação. Como *Sch. pombe* não possui manana como constituinte da parede celular, a observação da não floculação desta

levedura pelas cepas bacterianas testadas reforça a hipótese de que este carboidrato deve participar no processo de floculação.

Calleja & Johnson (1977) citam que cepas de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces bulgaricus* podem produzir agregados reversíveis causados por propriedades inerentes das células ou por agentes externos (químicos ou microbiológicos). Hussain et al. (1986) citam que *S. uvarum* só apresenta floculação na fase final de crescimento enquanto *K. bulgaricus* apresenta floculação em todas as fases de crescimento.

Tabela 14: Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à outras leveduras

BACTÉRIAS	LEVEDURAS				
	<i>S. chevalieri</i>	<i>S. kluyveri</i>	<i>S. pombe</i>	<i>P. ohmeri</i>	<i>C. kruzei</i>
<i>L. fermentum</i> FT 038B	floculou	floculou	não floculou	não floculou	floculou
<i>L. plantarum</i> FT 032B	não floculou	floculou	não floculou	não floculou	floculou
<i>L. fructivorans</i> FT 091B	floculou	floculou	não floculou	não floculou	floculou
<i>L. fructosus</i> FT 243B	floculou	floculou	não floculou	floculou	floculou
<i>L. buchneri</i> FT 048B	floculou	floculou	não floculou	não floculou	floculou

As variações observadas nestes testes de floculação podem estar relacionadas a quantidade de manana presente na parede celular das leveduras. Entretanto, não existem ainda dados experimentais que comprovem esta afirmativa.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados conclui-se que:

- 5.1. *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus* e *L. buchneri* podem provocar a floculação das leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1. Porém não são todas as espécies ou cepas de *Lactobacillus* que provocam a floculação do fermento industrial.
- 5.2. Há necessidade de uma certa relação levedura:bactéria para que ocorra floculação, e esta relação é diferente para as espécies de *Lactobacillus*.
- 5.3. *B. subtilis* e *B. coagulans* não provocaram a floculação das leveduras FT134L/PE-2 e FT 136L/VR-1.
- 5.4. Na ausência de álcool no meio de floculação a levedura FT 134L/PE-2 parece ser mais susceptível ao processo de floculação do que a levedura FT 136L/VR-1.
- 5.5. Com teor alcoólico de 7,0% e 9,0% a levedura FT 136L/VR-1 tornou-se mais susceptível à floculação e a levedura FT 134L/PE-2 menos susceptível à floculação.
- 5.6. As temperaturas de 30°C e 39°C têm pouca influência sobre a floculação das leveduras FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1; apenas notou-se uma ligeira diminuição da floculação com o aumento da temperatura. O tratamento térmico com temperaturas próximas a 55 °C reduz a capacidade floculante das células bacterianas.

- 5.7. O tratamento enzimático com protease de *Streptomyces griseus* resultou na perda da capacidade floculante para as bactérias *L. plantarum* (FT 032B), *L. fermentum* (FT 038B), *L. buchneri* (FT 048B) e *L. fructivorans* (FT 091B). Ao contrário, este mesmo tratamento sobre células de *L. fructosus* (FT 243B) não afetou o processo de floculação.
- 5.8. O tratamento enzimático com papaina reverteu o processo de floculação envolvendo as leveduras *S. cerevisiae* (FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1) com as bactérias *L. plantarum* (FT 032B), *L. fermentum* (FT 038B) e *L. fructivorans* (FT 091B) mas não atuou nos flocos envolvendo *L. buchneri* (FT 048B) e *L. fructosus* (FT 243B).
- 5.9. Componentes protéicos da parede celular de *L. plantarum* (FT 032B), *L. fermentum* (FT 038B) e *L. buchneri* (FT 048B) devem participar do processo de floculação, uma vez que, modificadores químicos que reagem com os grupos funcionais fenol e indol da cadeia lateral de aminoácidos (anidrido maleico e anidrido acético) inibiram a capacidade floculante dessas bactérias, sugerindo o envolvimento destes grupamentos no processo de floculação. Já para as espécies *L. fructivorans* (FT 091B) e *L. fructosus* (FT 243B) a presença de outros grupamentos ou fatores deve estar envolvida no processo de floculação.
- 5.10. Células de *S. cerevisiae* (FT 134L/PE-2 e FT 136L/VR-1) submetidas a tratamento com modificadores químicos de carboidratos (NaIO_4 0,01M) apresentaram inibição em sua capacidade de ser floculada por bactérias, indicando que carboidratos são essenciais no processo de floculação.
- 5.11. A floculação de *Saccharomyces cerevisiae* causada por bactérias do gênero *Lactobacillus* deve apresentar um mecanismo intercelular a nível da parede celular destes microrganismos. Este processo deve envolver componentes protéicos da

superfície celular das bactérias *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. buchneri* e carboidratos da parede celular das leveduras. Já para as espécies *L. fructivorans* e *L. fructosus* a presença de outros componentes celulares deve também estar envolvida no processo de floculação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTHERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, D.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, 3(1): 42-9, 1984.
- AMORIM, H.V. de; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. *Processos de produção de álcool*. Piracicaba, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1996. 103p.
- AMORIM, H.V. de; OLIVEIRA, A.J. de; ZAGO, E.A.; BASSO, L.C.; GALLO, C.R. *Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento*. Piracicaba, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1989. 145p.
- AMORY, D.E.; ROUXHET, P.G.; DUFOUR, J.P. Flocculence of brewery yeasts and their surface properties: chemical composition, eletrostatic charge and hydrophobicity. *Journal of the Institute of Brewing*, v.94, n.2, p.79-84, 1988.
- ATKINSON, B.; DAOUD, I.S. Microbial flocs and flocculation in fermentation process engineering. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 4, p. 41-124, 1976.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.de; OLIVEIRA, A.J. de. Pesquisa em levedura e fermentação. Relatório de atividades, Piracicaba: Fermentec/Esalq/USP, 1996 51p.
- BIELECKI, S.; BRZESKI, H. Characterization of non-flocculation cells isolated from a culture of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001. *FEMS Microbiol. Lett.* 61: 189-194, 1989.

BROMBERG, R. Estudo do mecanismo de floculação de leveduras causado por *Lactocabillus fermentum*. Campinas, 1994. 74p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

BURNS, J.A. Yeast flocculation. *Journal of the Institute of Brewing*. v. 43, p. 31, 1937.

CABRINI, K.T. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica. Piracicaba, 1997. 115p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP).

CALLEJA, G.B. Flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Applied Microbiology*. v. 64, p. 247-250, 1970.

CALLEJA, G.B. *Microbial aggregation*. Boca Raton CRC Press Incorporated 1984.

CALLEJA, G.B. Cell agregation. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. eds. *The yeasts*. 2.ed. London, Academic Press, 1987 v.2 p. 165-238.

CALLEJA, G.B.; JOHNSON, B.F. A comparison of quantitative methods for measuring yeast floccutation. *Canadian Journal of Microbiology*. v.23, p.68-74, 1977.

CONWAY, P.L.; KJELLEBERG, S. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach aquamous epithelium. *Journal of General Microbiology*., **135**: 1175-1186, 1989.

EDDY, A.A. Flocculation characteristics of yeasts. III. General role of flocculating agents and special characteristics of a yeast flocculated by alcohol. *Journal of the Institute of Brewing*. v. 65, p. 318, 1955.

EDDY, A. A.; PHIL, M.A.D. Flocculation characteristics of yeasts. II. Sugars as dispersing agents. *Journal of the Institute of Brewing*. 61: 313-317, 1955.

FORSTER, C.F.; KNIGHT, N.J.B.; WASE, D.A.J. Flocculating agents of microbial origin. *Adv. Biotechnol. Proc.* 4: 211-240, 1985.

GALLO, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Campinas, 1989, 338p. (Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP).

GARCIA, C.E. Efeito do nível de contaminação de bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica na floculação de leveduras. Piracicaba, 1999. 80p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

GILLILAND, R.B. *European Brewing Convention Proceedings Of The 3th Congress, Brighton*. v.35, 1951.

GREENSHIELDS, R.N.; YATES, J.; SHARP, P.; DAVIES, T.M.C. Studies in tower continuous fermentation. I. Methods for the characterization of flocculent yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*. v.78, n.3, p. 236-242, 1972.

HELM, E.; NOHR, B.; THORNE, R.S.W. *Wallerstein Laboratories Communications*. v. 16, p. 315, 1953.

- HENRIKSSON, A; SZEWZYK, R.; CONWAY, P.L. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum*. *Applied Environmental Microbiology*, **57**: 449-502, 1991.
- HUSSAIN, T.; SALHI, O.; LEMATRE, J.; CHARPENTIER, C.; BONALY, R. Comparative studies of flocculation and deflocculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 260-273, 1986.
- ISERENTANT, D. Practical aspects of yeast flocculation. *Belgium Journal of Brewing and Biotechnology*. v. 21, n.3, p. 30-33, 1996.
- JIN, Y-L; SPEERS, R.A. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food. Res. Inst.* **31**:421-440, 1999a.
- JIN, Y-L; SPEERS, R.A. The effect of environmental conditions of the *Saccharomyces cerevisiae*. In: *ASBC Annual Meeting*. Phoenix, p. 19-23, 1999b.
- KAJI, D.A. Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica. Campinas, 1989. 136p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- KAMADA, K. & MURATA, M. On the mechanism of brewers yeast flocculation. *Agric. Biol. Chem.* **48** (10): 2423-2433, 1984.
- KIHN, J.C.; MASY, C.L.; MESTDAGH, M.M. Yeast flocculation: factors affecting the measurement of flocculence. *Canadian Journal of Microbiology*. v.34, n.6, p.79-81, 1988a.

KIHN, J.C.; MASY, C.L.; MESTDAGH, M.M.. Yeast flocculation: composition between nonspecific repulsion and specific bonding in cell adhesion. *Canadian Journal of Microbiology*, v.34, n.6, p.773-778, 1988b.

KURIYAMA, H.; UMEDA, I.; KOBAYASHI, H. Role of cations in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* and discrimination of the corresponding proteins. *Canadian Journal of Microbiology*, v.37, n.5, p.397-403, 1991.

LEWIS, C.W.; JOHNSTON, J.R.; MARTIN, P.A. . The genetics of yeast flocculation. *Journal of the Institute of Brewing*. **82**: 158-160, 1976.

MASY, C.L.; DENGIS, P.; GARSOUX, G.; MALOTTE, L.; DUFOUR, J.P.; MESTDAGH, M.M.; ROUXHET, P.G. A simple test for screening flocculence of brewer's yeast. *Louvain Brewing Letters*, v.4, p.31-34, 1991.

MIKI, B.L.A.; POON, N.H.; JAMES, A.P.; SELIGY, V.L. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. v. 150, n.2, p.878-889, 1982a.

MIKI, B.L.A.; POON, N.H.; JAMES, A.P.; SELIGY, V.L. Repression and induction of flocculation interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. v. 150, p. 890, 1982b.

MILL, P.J. The effect of nitrogeous substances on the time of flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, v. 35, p.53-60, 1964a.

MILL, P.J. The nature of the interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, v. 35, p.61-68, 1964b.

- MOMOSE, H.; IWARO, K.; TONOIKE, R. Studies on the aggregation of yeast caused by *Lactobacilli*. IV. Force responsible for aggregation. *Journal of General Applied Microbiology*, v.15, p.19-26, 1969.
- NAKAMURA, J.; MIYASHIRO, S.; HIROSE, Y. Screening isolation, and some properties of microbial cell flocculants. *Agric. Biol. Chem.* **40** (2): 377-383, 1976.
- NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Factors affecting flocculation of brewer's yeast. *Journal of Fermentation Technology*. v. 54, n.6, p.351-355, 1976.
- OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica por batelada-alimentada. Campinas, 1990. 199p. (Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP).
- PARODI, A.J. Biosynthetic mechanisms for cell envelope polysaccharides. In: ARNOLD, W.N. *Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysics, and ultrastructure*. Florida, Academic Press, 1981, v.3, chap. 2, p. 48-64.
- PATEL, G.B.; INGLEDEW, W.M. A flocculation test for moderately flocculent brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, v.81, p.123-6, 1975.
- REID, G.; HAWTHORN, L.A.; MANDATORI, R. Adhesion of lactobacilli to polymer surfaces *in vivo* and *in vitro*. *Microbiol Ecology*. v. 16, p. 241-251, 1988.
- RODINI, M.A.T. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Piracicaba, 1985. 92p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

ROSALES, S.Y.R. Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. Rio Claro, 1989. 200p. (Doutorado - Universidade Júlio de Mesquita Filho/UNESP).

RUSSEL, I.; STEWART, G.G.; READER, H.P.; JONSTON, J.R.; MARTIN, P.A. Revised nomenclature of genes that control yeast flocculation. *Journal of the Institute of Brewing*. v.86, n.3, p.120-121, 1980.

SANTOS, M.T. Características da floculação de leveduras causada por *Lactobacillus fermentum*. Campinas, 1991.94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

SANTOS, M.T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *J. Ferment. Bioeng*, **75** (2): 151-4, 1993.

SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOSO, M.T.; VICENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica: "floculação do fermento". *Brasil Açucareiro*. **93**: 336-41, 1976.

SMIT, G.; STRAVER, M.H.; LUTGENBERG, B.J.J.; KIJNE, J.W. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Applied Environmental Microbiology*. v. 58, n.11, p.3709-3714, 1992.

SOARES, E.V.; MOTA, M. Quantification of yeast flocculation. *Journal of the Institute of Brewing*. v. 103, n.2, p. 93-98, 1997.

SOUZA, M.J.; TEIXEIRA, J.A .; MOTA, M. Differences in the flocculation mechanism of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biothechnology Letters*. 14 (3): 213-218, 1992.

SPEERS, R.A.; TUNG, M.A.; DURANCE, T.D.; STEWART, G.G. Biochemical aspects of yeast flocculation and its measurament: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, v.98, n.4, p.293-300, 1992.

STAHL, U.; KÜES, U.; ESSER, K. Flocculation in yeast, an assay on the inhibition of cell agregation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. v.17, p.109-202, 1983.

STEWART, G.G. Yeast flocculation - Practical implications and experimental findings. *Brewer's Digest*. v. 50, p.42, 1975.

STEWART, G.G.; RUSSEL, I. Centenary review – one hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *Journal of the Institute of Brewing*.. 92: 537-558,1986.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specifity. *Yeast*. v.5, n.6, p.487-496, 1989.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: reconciliation of physiological and genetics viewpoints. *Yeast*. v. 8, n.1, p.25-38, 1992.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: restructuring the theories in line with recent research. *Cerevisia*. v.21, n.1, p.38-45, 1996.

STRATFORD, M.; ASSINDER, S. Yeast flocculation: Flo1 and newflo phenotypes and receptor structure. *Yeast* v.7, n.6, p.559-574, 1991.

STRATFORD, M & BOND, C.J. Selective separation of microorganisms by lectins: yeast and concanavalin A as a model system. *Biotechnol.Bioeng.* 40: 835-843, 1992.

STRATFORD, M. & BRUNDISH, H.M. Yeast flocculation: cationic inhibition. *Yeast* 6: 77-86, 1990.

STRATFORD, M.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: Quantification. *Yeast*, v.4, n.2, p.107-115. 1988.

STRATFORD, M.; WILSON, P.D.G. Yeast flocculation: pH depeendence. *Letters in Applied Microbiology.* v. 11, p. 1, 1990.

STRATFORD, M.;COLEMAN, H.P.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: a dinamic equilibrium. *Yeast* v.4, n.3, p.199-208, 1988.

STRAVER, M.H.; SMIT, G.; EN KIJNE, J.W. Induced cell surface hydrofobicity influences flocculation of brewer's yeast in a flocculation assay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* v. 2, p. 173-180, 1993.

SUZZI, G.; ROMANO, P.; ZAMBONELLI, C. Flocculation of wine yeasts: frequency, differences and stability of the character. *Canadian Journal of Microbiology.* 30: 36-39, 1984.

TAYLOR, N.W.; ORTON, W.L. Calcium in flocculence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Intitute of Brewing,* 81: 53-57, 1975.

- TILBURY, R.H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CAN, J.G.; CUTING, C.V.; WHITING, G.C. *Lactic acid bacteria in beverages and foods*. London, Academic Press, 1975. p.177-91.
- VEZINHET, F.; BLONDIN, B.; BARRE, P. Mapping of the FLO5 gene *Saccharomyces cerevisiae* by transfer of a chromosome during cytoduction. *Biotechnol. Lett.* **13** (1): 47-52, 1991.
- WATARI, J.; TAKATA, Y.; OGAWA, M.; MURAKAMI, J.; KOSHINO, S. Breeding of flocculent industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains by introducing the flocculation gene FLO1. *Agri. Biol. Chem.* **55** (6): 1547-1552, 1991.
- WILKIE, D.; EVANS, I. Mitochondria and the yeast cell surface: implications for carcinogenesis. *Trends Biochem. Sci.* **7**(4): 147-151, 1982.
- YAMASHITA, I.; FUKUI, S. Meeting signals control expression of both starch fermentation genes and a novel flocculation gene FLO8 in the yeast *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **47**(12): 2889-2896, 1983.
- YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*, **22**: 12-16, 1991.
- YOKOYA, F. Microbiologia de processo de fermentação. In: EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.P.; GALLO, C.R. *Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool*. Campinas; Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello". 1989. p.1-22.

ZARATTINI, R.; WILLIAMS, J.W.; ERNANDES, J.R. Bacterial induced flocculation in selected brewing strains of *Saccharomyces*. *Cerevisia and Biotechnology*. v.8, n.4, p. 65-70, 1993.