

CARACTERÍSTICAS DA FLOCULAÇÃO
DE LEVEDURAS CAUSADA POR
Lactobacillus fermentum

23/91

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CARACTERÍSTICAS DA FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS
CAUSADA POR Lactobacillus fermentum

Miriam Teresinha dos Santos

Bióloga

Prof. Dr. Fumio Yokoya†

Orientador

8C/91 09460

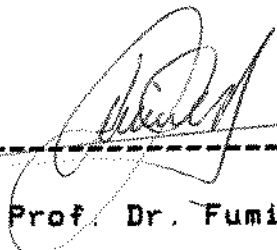
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Ciência de Alimentos

Parar

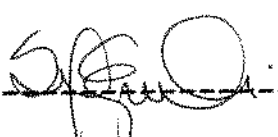
Este exemplar corresponde Campinas
à redação final da tese de 1991
aprovada por Miriam Teresinha
dos Santos e aprovada
pela Comissão Julgadora em
3.08.91.



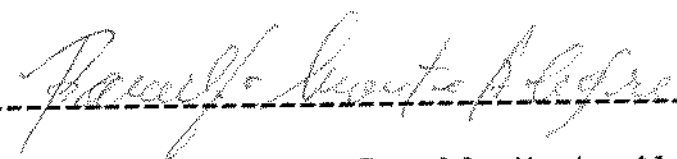
BANCA EXAMINADORA



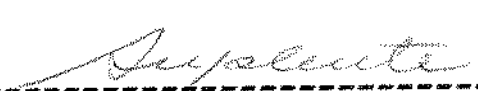
Prof. Dr. Fumio Yokoya
(orientador)



Profa. Dra. Sílvia Yuko Eguchi
(membro)



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(membro)



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(membro)

Campinas, 23 de agosto de 1991

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pela orientação e por permitir a livre escolha dos caminhos de investigação;
- Ao Prof. Dr. Vanderley Perez Canhos pelo constante incentivo e confiança;
- À Profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer pelo apoio e uso do laboratório;
- À Rosa Maria Tosello e Jaqueline Girnos Sonatti pela incansável disposição e amizade;
- À D. Terezinha e D. Olívia pelo material de laboratório em condições de uso;
- Aos companheiros de laboratório: Mari, Lurdinha, Liliana, Raquel, Margarida, Pedro, Héctor, Cláudio, Cristina, Roseane, Davina e Denise pela convivência;
- À Mari pelas valiosas colaborações na execução e elaboração do texto;
- À Cícera, Jardete e Franceli pela boa vontade e serviços prestados;

- A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho;
- À Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" pelo fornecimento das culturas;
- À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação - ABIA - pelas cópias xerográficas;
- À CAPES e FAEP pelo suporte financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- A alguns grandes amigos que embora distantes sempre contribuíram e acreditaram que este trabalho seria realizado;
- Aos amigos que fiz aqui em Campinas, responsáveis pela descontração dos fins de semana: Ângelo, Hiléia e Luca, Luizinho e Andréia, Aloízio e Regina;
- Ao amigo Sieghard Weiketz pela grande ajuda nos gráficos;
- Ao amigo Marquinhos pelo companheirismo, paciência e carinho sempre manifestados;
- Aos amigos Rose, Paulinho e Vítor pela força;
- Aos meus pais José Inácio e Terezinha e meus irmãos Giovanny, Quely e Ana Luisa e cunhados Zé Carlos e Cláudia e sobrinha Fernanda que tentam se acostumar com a distância;
- Ao Zig, meu maior achado, pela vida compartilhada;

meu muito obrigada.

Dedico não este trabalho, mas estes anos
aos frutos decorrentes deste aprendizado
que ainda hão de vir, com algum poder
de transformação.

INDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. FENÔMENOS DE AGREGAÇÃO CELULAR	4
2.2. LINHAGENS FLOCULENTAS DE LEVEDURAS	7
2.3. FLOCULAÇÃO CAUSADA POR CONTAMINANTES BACTERIAIS DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	14
2.4. ENVOLVIMENTO DE <u>Lactobacillus</u> EM FENÔMENOS DE AGREGAÇÃO CELULAR	17
2.5. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA FLOCULAÇÃO	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. CULTURAS DE MICRORGANISMOS	24
3.2. TESTE PARA SELEÇÃO DAS LINHAGENS FLOCULENTAS DE <u>Lactobacillus fermentum</u>	26
3.3. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA CAPACIDADE FLOCULANTE DE <u>Lactobacillus fermentum</u>	27
3.3.1. CONTAGEM EM PLACA	29
3.4. DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO NA PRESENÇA DE DIFERENTES ÍONS	30

3.5. DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO A pH 3,0; 4,5 E 6,2	30
3.6. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE CARBOIDRATOS SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE <u>L. fermentum</u>	31
3.7. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE <u>L. fermentum</u>	31
3.8. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE <u>L. fermentum</u>	32
3.9. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO ÁCIDO SOBRE O CRESCIMENTO DA CULTURA FLOCULENTE <u>L. fermentum</u>	33
4. RESULTADOS	34
4.1. SELEÇÃO DAS LINHAGENS FLOCULENTAS DE <u>L. fermentum</u>	34
4.2. A CAPACIDADE FLOCULANTE DE <u>L. fermentum</u>	36
4.2.1. CONTAGEM EM PLACA	38
4.3. EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS SOBRE A FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS POR <u>L. fermentum</u> A pH 6,2	40
4.3.1. A OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO A VALORES DE pH 3,0 E 4,5	45
4.4. EFEITO DA ADIÇÃO DE CARBOIDRATOS SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE <u>L. fermentum</u>	51
4.5. EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE <u>L. fermentum</u>	55
4.6. EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE <u>L. fermentum</u>	57
4.7. EFEITO DO TRATAMENTO ÁCIDO SOBRE O CRESCIMENTO DA CULTURA FLOCULENTE DE <u>L. fermentum</u>	62

5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	80
7. BIBLIOGRAFIA	82
APÊNDICE	88

RESUMO

O mecanismo da floculação de leveduras Sacch. cerevisiae causada por algumas linhagens de Lactobacillus fermentum foi investigada através da avaliação do efeito da presença de íons metálicos e de carboidratos e dos tratamentos térmico, enzimático e ácido, realizados em suspensões aquosas com aqueles microrganismos.

A adição de íons cálcio intensifica a ocorrência da floculação. Os íons manganês e magnésio foram capazes de promover a floculação, porém em concentrações maiores do que cálcio. Na presença dos íons potássio, sódio, cobre e bário, as células de leveduras não foram floculadas.

O valor de pH 4,5 favoreceu a ocorrência da floculação, quando não havia adição de íons cálcio. Ao contrário, em pH 3,0 e 6,2 não houve floculação na ausência de cálcio. Em pH 4,5, com a adição de íons magnésio e manganês em concentrações superiores a $2 \times 10^{-2}M$ e $10^{-2}M$ respectivamente, foi observada a inibição da floculação.

O carboidrato manose mostrou-se um agente desfloculante efetivo em concentrações superiores a $7 \times 10^{-2}M$. Frutose apresentou um efeito inibidor menor, enquanto glicose, sacarose, maltose não mostraram nenhum efeito.

O tratamento térmico das células bacterianas eliminou a sua ação floculadora; o efeito do calor mostrou-se dependente do pH, sendo mais eficiente em valor de pH mais baixo (4,5). O tratamento térmico das células de levedura não alterou suas propriedades floculativas. O tratamento com pronase E (protease de Streptomyces griseus) sobre as células de bactéria destruiu a sua habilidade floculante. O mesmo efeito não foi observado com este tratamento sobre as células de leveduras ou sobre o material floculado. Outras enzimas como lisozima e zimolase não afetaram as propriedades floculadoras das células.

Estes resultados mostraram que uma proteína bacteriana com atividade semelhante à lectina, capaz de interagir com a parede celular das células de leveduras, está envolvida na floculação. O possível mecanismo da floculação é discutido.

SUMMARY

The flocculation of yeast cells by some strains of Lactobacillus fermentum has been presently elucidated. The effect of metal ions, carbohydrates, pH, heat and enzymes treatments, was investigated.

Calcium ions were required for flocculation. Manganese and magnesium ions were able to replace calcium but large amount was required. Potassium, sodium, copper and barium ions were not effective.

The value of pH 4,5 favored flocculation compared to pH 3,0 or 6,0 when calcium ion was absent. With excess of magnesium ($2 \times 10^{-1}M$) or manganese ion ($10^{-2}M$), apparent flocculation inhibition was observed.

Mannose was effective deflocculant at concentration above $7 \times 10^{-2}M$. Fructose showed little effect but glucose, sucrose and maltose had any effect.

Heat treatment of bacterial cells destroyed flocculating ability. It was pH dependent and more effective at lower pH. Heat treatment of yeast cells did not affected flocculation properties. Pronase E (protease of Streptomyces griseus) treatment of bacterial cells destroyed flocculation ability. The same effect was not observed if treatment was carried out on yeast cells or on flocculated system. Other enzymes, such lysosyme and zymoliase did not affected flocculation of cells.

These results showed that yeast flocculation is involved with a lectin-like structure bacterial protein. The possible mechanism of flocculation is discussed.

1. INTRODUÇÃO

Na fermentação alcoólica para se alcançar a máxima conversão do açúcar em etanol e dióxido de carbono é essencial que a levedura permaneça suspensa no mosto em contato com o substrato. No entanto, em determinadas circunstâncias as células de levedura tendem a aglomerar-se e formar flocos que se depositam no fundo da dorna.

Este fenômeno denominado floculação é um dos mais sérios problemas enfrentados pelas usinas produtoras de álcool, resultando na redução da produtividade pela retirada precoce do fermento do mosto e dificuldades operacionais relacionadas principalmente com entupimentos de canalizações e problemas na separação do fermento nas centrífugas. Este problema é intensificado devido a prática do reciclo do fermento pelas usinas que acumula as causas a cada ciclo.

A floculação de leveduras pode ter pelo menos duas causas. A primeira, já amplamente explorada na literatura, é a floculação decorrente da presença de linhagens floculentas de Saccharomyces. A segunda refere-se à floculação causada por contaminantes bacterianos na fermentação.

Apesar da floculação do fermento ser citada na literatura como um dos possíveis efeitos da contaminação microbiana na fermentação alcoólica, este aspecto não foi ainda investigado com maior profundidade.

Estudos sobre a contaminação microbiana na indústria do álcool no estado de São Paulo, indicam que 60 % das espécies bacterianas encontradas nas dornas de fermentação pertencem ao gênero Lactobacillus, sendo que a espécie L. fermentum é o contaminante mais frequente (GALLO, 1990). YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) em estudo recente indicam uma linhagem de Lactobacillus fermentum como responsável pela floculação.

Este estudo pretende verificar as condições de ocorrência da floculação de leveduras causada por L. fermentum através da avaliação do efeito da presença de íons e de carboidratos, do abaixamento do pH, do tratamento enzimático e do aumento da temperatura sobre a capacidade floculante destas bactéria para uma maior compreensão do mecanismo envolvido na interação célula de levedura e célula de bactéria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Algumas leveduras Saccharomyces sp em certas circunstâncias tendem a aglomerar-se e formar flocos que se depositam no fundo da dorna de fermentação. Este fenômeno, denominado floculação, tem despertado grande interesse do ponto de vista industrial e também do estudo de fisiologia de leveduras (MIKI et al., 1982; CALLEJA, 1987; STRATFORD & KEENAN, 1987)

A eficiência de um processo fermentativo é função direta da manutenção do fermento em contato com o substrato, isto é, da permanência das células dispersas no mosto. Assim, nos vários tipos de fermentação, a remoção precoce das células devido à floculação provoca redução do rendimento e aumento do tempo de fermentação, resultando em significativas perdas econômicas (ATKISON & DAQUD, 1976; ROSE, 1980).

Quando a fermentação alcança o estágio desejado, é vantajoso para as indústrias de bebidas fermentadas como cerveja e vinho, a ocorrência da floculação das leveduras, onde é necessário retirar o fermento da bebida. Ao contrário, na produção de bebidas destiladas, as células de leveduras devem estar em suspensão até o esgotamento total dos açúcares no líquido fermentado, sendo desfavorável, então, a ocorrência da floculação (ROSE, 1980).

Em fermentações contínuas tem sido proposta a utilização da floculação controlada, ou seja, linhagens com certa

tendência a se depositar, para aumentar o tempo de residência das leveduras. Isto evitaria a lavagem excessiva das células, mantendo a concentração celular em níveis adequados (ATKISON & DAOUD, 1976; ESSER & KUES, 1983).

A tendência de aglomeração das leveduras nos processos fermentativos é conhecida a mais de um século tendo sido mencionada já nos trabalhos de Pasteur (1898). Os primeiros estudos investigaram o fenômeno conforme os princípios da floculação química e procuravam indicar que componentes presentes no mosto promoviam a formação de complexos que levariam à sedimentação das células de levedura de acordo com revisão de CALLEJA (1987).

No entanto, o avanço das pesquisas indicaram que a floculação trata-se de um fenômeno de caráter específico dependendo da linhagem de levedura utilizada e que ocorria entre células preparadas em solução tampão, através de interações envolvendo a parede celular de células adjacentes, enquanto a influência de substâncias do meio de cultura eram de menor importância (EDDY, 1955a e STEWART et al., 1975).

2.1. FENÔMENOS DE AGREGAÇÃO CELULAR

A floculação de células de leveduras é um tipo particular de agregação dentre os processos envolvendo adesão celular encontrados entre microrganismos, relacionados com

mecanismos sexuais como nas leveduras Hansenula wingei, Schizosaccharomyces pombe e mesmo Saccharomyces cerevisiae (CALLEJA, 1987) e também com mecanismos de colonização de hospedeiros desde a formação da placa dentária por Streptococcus mutans (CALLEJA, 1987) até à aderência de microrganismos às superfícies epiteliais do trato gastrointestinal de vários animais incluindo humanos (FIRON et al., 1983; SAVAGE, 1983).

Dois pontos importantes tem sido apontados nos estudos de agregação celular, primeiro a participação da superfície externa da célula e segundo, a similaridade dos fatores envolvidos e da maneira com que estes influenciam o processo. Isto sugere que devem existir mecanismos semelhantes envolvidos na floculação de diferentes células (ATKISON & DAUD, 1976; CALLEJA, 1987).

O mecanismo de adesão celular pode ser específico ou inespecífico. Em ambos os casos, ligações iônicas, dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas podem estar envolvidas. Em todos esses processos é fundamental as características da superfície mais externa das células, as quais determinam os tipos de interação (KIHN et al., 1988a).

A superfície das células procarióticas e eucarióticas tem natureza polimérica, possuindo, porém, composição química bastante diferente. A parede celular é constituída por peptidoglicano nas bactérias e fosfomananas nas leveduras, ambas apresentando proteínas incorporadas. Esta estrutura química, pela sua natureza, expõe diferentes grupos ativos que permitem a interação das células com o meio extracelular (ARNOLD, 1981).

As interações célula-célula que resultam na formação de agregados são possíveis através destes sítios de ligação potenciais das superfícies celulares. No entanto, pela própria necessidade de defesa destes organismos, as superfícies celulares são, em geral, uma barreira ao contato com outras células devido à repulsão eletrostática já que estas são carregadas negativamente e protegidas por uma camada de água de hidratação que dificulta a aproximação.

Os mecanismos gerais de agregação celular devem então envolver a neutralização de cargas, a desidratação mútua, além das interações com os grupamentos ativos das superfícies celulares (FORSTER et al., 1985).

Vários fenômenos de agregação celular envolvem reconhecimento da superfície celular determinando a especificidade dos processos (LIS & SHARON, 1986). A especificidade, geralmente, relaciona-se com a superação de impedimentos estereoquímicos decorrentes da conformação estrutural das moléculas da parede celular (HILL et al., 1988a).

Outros processos são possíveis devido à presença de polissacarídeos que formam uma matriz onde fixar-se as células, como na floculação que ocorre durante o tratamento biológico de águas residuárias pelo sistema de "lodo ativado" (FORSTER et al., 1985).

2.2. LINHAGENS FLOCULENTAS DE LEVEDURAS

Vários aspectos da floculação causada por linhagens floculentas de Sacch. cerevisiae vem sendo objeto de estudo nos últimos anos (CALLEJA, 1987).

MILL (1964) discutiu que a seleção de linhagens de Saccharomyces sp para a indústria cervejeira dependia da propriedade de flocular, dentre outras características de interesse em função do tipo de cerveja e das condições de fermentação.

STEWART et al. (1975) descreveram que todas as leveduras "lager" floculavam em meio definido enquanto algumas linhagens "ale" não floculavam na ausência de um agente indutor (peptídeo) presente no mosto.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, STEWART et al. (1975) propuseram uma classificação para as linhagens "ale" quanto à capacidade floculante: (a) Classe I - todas as linhagens não floculentas as quais não permitiam uma boa fermentação secundária; (b) Classe II - linhagens "ale" padrão rápidas e boas fermentadoras, que formavam agregados com mais de mil células ao final da fermentação, permitindo uma boa fermentação secundária; (c) Classe III - leveduras altamente floculentas ao final da fermentação; e (d) Classe IV - leveduras formadoras de cadeias que se separavam muito cedo do mosto, permitindo a proliferação de contaminantes e uma redução do rendimento, sendo indesejáveis na cervejaria. As leveduras

"lager" podiam pertencer às três primeiras classes.

Alguns autores indicaram que a tendência de flocular destas linhagens era uma característica determinada geneticamente. A presença de pelo menos um dos genes do locus conhecido como FLO1 conferia a propriedade floculante (LEWIS et al., 1976; STEWART & RUSSELL, 1977)

O fenótipo tem se mostrado instável. Assim, uma linhagem floculenta pode tornar-se não floculenta ou mais fortemente floculenta (RUSSELL et al., 1980). A expressão da característica também é governada por genes supressores (HOLMBERG, 1978).

Embora a importância da floculação de leveduras na produção de bebidas alcoólicas seja apreciada a quase um século, somente nos últimos anos, tem se procurado compreender a base bioquímica do fenômeno (ROSE, 1980).

Hoje sabe-se que tanto células íntegras lavadas como fragmentos de parede celular isolados de linhagens floculentas de Sacch. cerevisiae floculam em soluções contendo alguns sais, indicando que a floculação deve ser uma propriedade inerente das paredes celulares (NISHIHARA et al., 1982).

MIKI et al. (1982) e NISHIHARA et al. (1987) indicaram que fragmentos de parede celular ou células intactas de leveduras floculentas agregavam-se entre si e eram capazes de flocular paredes e células de leveduras não floculentas. Este último processo foi denominado co-floculação ou co-sedimentação.

MIKI et al. (1982) verificaram a importância da parede celular de leveduras na interação que resultava na formação de

flocos pela análise do material floculado por microscopia eletrônica, indicando que grandes extensões da superfície celular se aderiam durante a floculação.

Existe consenso na literatura em considerar que as leveduras são capazes de flocular somente na presença de íons metálicos, particularmente cátions divalentes (TAYLOR & ORTON, 1975; CALLEJA, 1987).

Poder-se-ia imaginar que estes cátions fossem necessários para neutralizar as cargas superficiais, reduzindo assim a repulsão eletrostática que mantém as células dispersas. No entanto, a baixa concentração de íons cálcio necessária e o efeito antagonista dos análogos bário e estrôncio sugerem a especificidade por cálcio (MIKI et al., 1982; STRATFORD, 1989).

MILL (1964) foi o primeiro a relatar que íons cálcio seriam requeridos especificamente para a floculação. A especificidade por íons cálcio foi indicada por NISHIHARA et al. (1982) através da inibição da floculação por agentes quelantes como EDTA, cuja atividade inibitória só era revertida pela adição de íons cálcio e também pela inibição por outros íons como sódio, bário e estrôncio que são competitivamente superadas pela adição de cálcio.

Os íons magnésio e manganês têm sido apontados como capazes de promover a floculação em determinadas condições de pH (NISHIHARA et al., 1982). MIKI et al. (1982) observaram que o pH ótimo para a promoção de floculação por íons magnésio era 4,0 e relataram que a presença tanto de magnésio como de manganês resultava em um grau de floculação menor que a promovida por

cálcio. Entretanto, segundo STRATFORD (1989a), esta habilidade está restrita a uma faixa estreita de pH próximo da neutralidade, diferente da floculação na presença de cálcio que ocorre a valores de pH entre 2,0 e 8,0.

KIHN et al. (1988a) indicaram que células íntegras ou fragmentos de parede celular podiam conter pequenas quantidades de cálcio ligado mesmo após a lavagem com EDTA. STRATFORD (1989) sugeriu que magnésio e manganês promoviam a floculação indiretamente, uma vez que estes íons poderiam liberar o cálcio existente ligado à parede celular.

Existem basicamente dois modelos para o mecanismo da floculação propostos na literatura que diferem quanto a especificidade das interações (MIKI et al., 1982; NISHIHARA & TORAYA, 1987).

O primeiro modelo baseia-se em princípios físico-químicos e propõe que pontes de hidrogênio cooperativas entre polissacarídeos da superfície celular e ligações cruzadas entre grupos funcionais aniônicos das superfícies de células adjacentes através de cátions divalentes tais como cálcio seriam responsáveis pelas interações célula-célula (MILL, 1964).

De acordo com LYONS & HOUGH (1970), os grupos aniônicos ligados por pontes salinas seriam os grupos fosfodiésteres componentes das fosfomananas das paredes de levedura. Vários trabalhos indicaram, porém, que estes grupos não participavam da interação (STEWART et al., 1975; JAYATISSA & ROSE, 1976).

Vários autores sugerem que os grupos carboxílicos das proteínas da parede celular ligados através de íons cálcio são

responsáveis pela interação das células. A participação de proteínas na floculação tem sido verificada através do tratamento com proteases (TAYLOR & ORTON, 1978), modificação química de proteínas (NISHIHARA et al., 1977), ação de agentes desnaturantes (NISHIHARA et al., 1982) e avaliação das diferenças no perfil de proteínas do extrato de células floculentas e não-floculentas (MARVEY et al., 1977; BEAVAN et al., 1979).

NISHIHARA et al., (1982) verificaram que altas concentrações de agentes desnaturantes como uréia e guanidina-HCl deprimem a capacidade floculadora de fragmentos de parede celular e de células íntegras. Os mesmos autores descreveram a inibição da floculação pelo tratamento das células e da parede isolada com enzimas proteolíticas como papaína e tripsina, enquanto outras enzimas como lipases, DNase, RNase ou lisozima não possuíam nenhum efeito sobre a capacidade floculante das mesmas.

A teoria das pontes com cálcio entre proteínas das paredes de células adjacentes propõe um mecanismo não específico para superar a repulsão eletrostática provocada pelas superfícies celulares carregadas negativamente. Este modelo seria inconsistente, considerando que, abaixo de pH 4,5, os resíduos carboxílicos estariam protonados e os flocos seriam dispersados. Como neste valor de pH, a floculação continua ocorrendo, tal fato tem sido atribuído a fatores adicionais como a estabilização dos flocos por pontes de hidrogênio entre hidroxilas de polissacarídeos constituintes da parede de células adjacentes (FORSTER et al., 1985).

Além disto, este mecanismo não estaria de acordo com os efeitos específicos de inibição por vários cátions tais como estrôncio, bário e sódio (NISHIHARA et al., 1982) e por carboidratos, como manose (TAYLOR & ORTON, 1978).

Vários estudos têm indicado que a adição de carboidratos resulta na desfloculação de leveduras (EDDY, 1955a; MILL, 1964; TAYLOR & ORTON, 1978).

Os estudos sugerem que a adição de carboidratos tem influência distinta de acordo com as linhagens utilizadas. STRATFORD (1989b) testou 41 linhagens de Sacch. cerevisiae, que foram divididas em dois grupos distintos: (1) incluindo todas as linhagens FLO1, FLO4, FLO5, FLO8 e TUP1, parcialmente inibidas por manose e (2) linhagens NewFLO, completamente inibidas por manose, maltose, glicose e sacarose.

TAYLOR & ORTON (1978) descreveram a inibição específica da floculação por manose e derivados. NISHIHARA & TORAYA (1987) observaram que D-manose foi o único carboidrato que inibiu a floculação da levedura IFD 2018. Neste estudo, verificou-se também que o derivado alfa-metil-D-manosídeo e preparações de mananas extraídas da parede de células de levedura não floculenta eram capazes de provocar a desfloculação da linhagem mencionada.

MIKI et al. (1982) sugeriram o envolvimento da manana na interação entre células de leveduras floculentas, em função da inibição específica por manose. A interação foi também inibida por concanavalina-A, uma lectina que se liga a resíduos manosil e glicosil.

Outros processos de adesão celular são inibidos por carboidratos. A aderência de algumas linhagens de Escherichia coli, bem como outras enterobactérias, é mediada por determinados tipos de fímbrias que são inibidas especificamente por D-manose e por alfa-metil-D-manosídeo (FIRON et al., 1982; FIRON et al., 1983; FIRON et al., 1984)).

Em função dessas evidências, um segundo mecanismo tem sido sugerido na literatura, no qual, a floculação envolveria um reconhecimento específico da superfície celular (MIKI et al., 1982; NISHIHARA & TORAYA, 1987; KIHN et al., 1988a).

Segundo MIKI et al (1982), as células floculentas possuiriam moléculas protéicas tipo lectinas ("lectin-like") que ligar-se-iam a resíduos das mananas de células adjacentes, sendo que os íons poderiam agir como cofatores na ativação da capacidade ligante dos componentes protéicos.

As proteínas do tipo lectinas têm sido implicadas em uma série de fenômenos de agregação microbiana relacionados com ciclo de vida e eventos sexuais que dependem de mecanismos específicos de reconhecimento (SHARON, 1987; SHARON & LIS, 1989).

Segundo FIRON et al. (1983), a aderência bacteriana aos epitélios de diversos animais é mediada por adesinas localizadas na superfície celular das bactérias que exibem propriedades semelhantes às lectinas.

O requerimento específico por íons cálcio para a ocorrência da floculação e a dispersão dos flocos por agentes quelantes como EDTA estariam de acordo com a teoria "lectin-like", uma vez que lectinas requerem íons metálicos para ligação

com carboidratos e atividade aglutinante (LIS & SHARON, 1986).

Cálcio poderia ter um papel na floculação análogo àquele que desempenha na atividade de concanavalina A. Esta lectina liga-se por monômeros a íons cálcio e manganês o qual induz uma mudança conformacional capaz de se ligar ao açúcar (REEKE et al., 1974; McEVEN, 1982).

2.3. FLOCULAÇÃO CAUSADA POR CONTAMINANTES BACTERIANOS DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Vários estudos sobre os efeitos da contaminação microbiana na fermentação alcoólica tem sido relatados na literatura (AMORIM & OLIVEIRA, 1980; KAJI, 1989). No entanto, apesar da floculação do fermento ser citada como um dos possíveis efeitos da contaminação, este aspecto não foi investigado com maior profundidade (YOKOYA, 1989).

O efeito do contaminante sobre a levedura é ainda pouco conhecido, porém sabe-se que um nível elevado de contaminação pode causar: (1) redução na produtividade e no rendimento fermentativo pela competição por substrato; (2) redução da vitalidade das células de levedura pela "intoxicação" por metabólitos do agente contaminante; e (3) floculação das leveduras pela ação das células bacterianas (YOKOYA, 1989).

Segundo YOKOYA (1989), a floculação da suspensão de leveduras pode ter pelo menos duas causas: (1) presença de linhagem floculante de levedura; (2) presença de bactéria que causa a floculação de leveduras.

A floculação da levedura nas dornas de fermentação alcoólica causada por bactérias é conhecida pela maioria dos técnicos de usina. Em alguns casos, o transtorno é grande, dificultando principalmente a separação das leveduras nas centrífugas e afetando a produtividade na fermentação (YOKOYA, 1989).

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

Estudos de contaminação microbiana na indústria do álcool no estado de São Paulo indicaram que provavelmente as espécies de Leuconostoc, bactérias sabidamente produtoras de goma não estariam implicadas na floculação, uma vez que não são capazes de sobreviver por longos períodos nas condições de fermentação do álcool (KAJI, 1989). Ao contrário, as bactérias pertencentes ao gênero Lactobacillus sobreviveriam sob tais condições e constituiriam aproximadamente 60% das espécies bacterianas encontradas na dorna de fermentação, sendo que a

espécie L. fermentum apresentou-se como a bactéria predominante entre os Lactobacillus (GALLO, 1990).

YOKOYA (1989) descreveu a floculação de leveduras por algumas linhagens de Lactobacillus, observando que íons cálcio intensificavam a agregação e que a agitação da mistura de células era essencial para o início da floculação, como no caso das leveduras floculantes.

YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) indicaram uma linhagem de Lactobacillus fermentum como responsável pela floculação. No entanto, para que houvesse floculação, o número de células de bactérias deveria atingir um valor crítico com relação ao número de células de leveduras. Assim para 84 mg/ 50 ml de suspensão bacteriana, a floculação máxima foi observada com 1380 mg de leveduras, ou seja, uma relação em massa seca de 0,061 e na contagem microscópica uma razão de 5:1 célula de bactéria/ célula de levedura.

A floculação causada por L. fermentum ocorre numa faixa mais ampla de pH entre 2,0 e 12,0 se comparada com a floculação provocada por leveduras floculentas (YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991).

Verificou-se 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" (YOKOYA, 1989). Essa prática provocaria o acúmulo dos agentes da floculação limitando o número de reciclos e diminuindo a eficiência da fermentação (DRIZU & GANNON, 1990).

Para que se possa reduzir o nível de 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 (1990).

SERRA et al (1976) observaram que a adição de ácido provocou a separação das células, desfazendo os flocos. YOKOYA (1989) apontou que a desfloculação com a acidificação da suspensão de levedura ("leite") 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 protease resultava na perda da capacidade floculante das células bacterianas, sugerindo que um fator de natureza proteica 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.

2.4. ENVOLVIMENTO DE Lactobacillus sp EM FENÔMENOS DE AGREGAÇÃO CELULAR

Vários fenômenos de adesão celular envolvendo espécies de Lactobacillus têm sido descritos na literatura relacionados à colonização do trato gastrointestinal de aves e mamíferos

(BROOKER & FULLER, 1975; SUEGARA et al., 1975; SHERMAN & SAVAGE, 1986).

A especificidade pelo hospedeiro tem sido constatada, sugerindo que as relações simbióticas entre os microrganismos da flora indígena gastrointestinal e seus animais hospedeiros envolveriam mecanismos altamente específicos (SUEGARA et al., 1975; FULLER, 1975; LIN & SAVAGE, 1984).

Em geral, o mecanismo pelo qual os microrganismos associam-se ao epitélio dos hospedeiros é pouco compreendido. Os microrganismos que colonizam os micronichos nos epitélios gástrico ou intestinal devem ser capazes de crescer nas condições nutricionais e ambientais encontradas nestes "habitats". Neste sentido, a capacidade de multiplicar em ambientes contendo concentrações altas de íon hidrogênio é importante para a colonização das superfícies gástricas pelas bactérias, enquanto a capacidade enzimática para digerir as glicoproteínas do muco e posterior utilização dos produtos de degradação como fonte de carbono, nitrogênio e energia são importantes para os colonizadores da maioria das superfícies epiteliais (SAVAGE, 1983).

SUEGARA et al. (1975) descreveram a inibição da aderência pelo tratamento térmico, sugerindo que componentes termolábeis da bactéria tais como substâncias contendo proteínas mediarão a adesão dos lactobacilos às células do hospedeiro.

Ao contrário, FULLER (1975) indicou que o tratamento térmico a 100 C por 10 minutos não inibiu a aderência. Este autor verificou que o tratamento com EDTA ou substâncias detergentes não tinha efeito, enquanto a adição de periodato de sódio reduziu

a adesão. Foi observada uma ligeira redução da adesão após o tratamento com enzimas proteolíticas tripsina, pepsina e uma protease não específica. Neste trabalho, o autor sugeriu o envolvimento de carboidratos, em função do efeito do periodato de sódio e da redução da associação por concanavalina A.

Estudos utilizando microscopia eletrônica revelaram que as camadas de material rico em carboidrato nas superfícies das células bacterianas e do hospedeiro ficavam aderidas, sendo indicadas como sítios de adesão (HOOD & ZOTTOLA, 1987; PEDERSEN & TANNOCK, 1989). Estes autores sugeriram que a adesão específica era uma função da interação mútua.

SHERMAN & SAVAGE (1986) sugeriram que as linhagens de Lactobacillus associam-se ao epitélio gástrico de camundongos através de macromoléculas complexas contendo ácidos lipoteicóicos geralmente envolvidos nos processos de aderência de bactérias Gram positivas patogênicas.

Segundo BROOKER & FULLER (1975), acredita-se que a adesão seletiva contribui para a virulência de bactérias patogênicas, não estando restrita aos microrganismos da flora normal. Assim, a compreensão do mecanismo de adesão é de interesse.

As espécies Lactobacillus fermentum e L. acidophilus têm sido frequentemente encontradas em associação com as superfícies epiteliais dos animais (SHERMAN & SAVAGE, 1986; HOOD & ZOTTOLA, 1987; CONWAY & KJELLEBERG, 1989). As espécies L. salivarius (PEDERSEN & TANNOCK, 1989), L. reuteri e L. murinus (SHERMAN & SAVAGE, 1986) também são citadas como colonizadores do

epitélio do trato gastrointestinal de aves e mamíferos, dentre outras.

CONWAY & KJELLEBERG (1989) investigaram o mecanismo de adesão da linhagem 737 de Lactobacillus fermentum capaz de colonizar o epitélio gástrico de camundongos. Verificou-se que o fator promotor da adesão encontrava-se no sobrenadante da cultura. Este fator de adesão não era capaz de promover a adesão de duas outras linhagens de Lactobacillus isoladas de outros animais, sugerindo a especificidade pelo hospedeiro. A adesina mostrou-se sensível ao tratamento térmico e enzimático com pronase E indicando sua natureza protéica. Este tipo específico de proteína não apresentou grupos carboidratos ativos no processo de aderência, constatado pela observação da não afinidade por concanavalina A e da ineficiência do tratamento com periodato de sódio e com tunicamicina durante o crescimento, visando impedir a formação de glicoproteínas.

HENRIKSSON et al. (1991) estudaram a capacidade de aderência da linhagem 104 de Lactobacillus fermentum ao epitélio gástrico de suínos. Estes autores verificaram que os determinantes adesivos da linhagem possuíam natureza proteica e estariam fortemente ligados à parede celular, não sendo facilmente retirados através de lavagens com tampão ajustado para valores baixos de pH (pH 1,2) ou soluções de doedecil sulfato de sódio (SDS).

Neste trabalho, HENRIKSSON et al. (1991) verificaram que as variantes lisa e rugosa da linhagem 104 de L. fermentum naturalmente presentes no epitélio gástrico de suínos

apresentavam um padrão diferente de aderência. A variante lisa compreendia 10 % da população desta linhagem e apresentava uma característica adesiva mais específica para o epitélio escamoso do estômago desses animais, enquanto a variante rugosa era capaz de colonizar o epitélio de outras regiões do trato gastrointestinal. Os autores sugeriram que a variante rugosa garantiria a passagem da linhagem pelo trato digestivo até chegar à porção do epitélio gástrico escamoso que permitiria o desenvolvimento da variante lisa pelo seu maior poder adesivo nesta região.

2.5. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA FLOCULAÇÃO

As leveduras flocculentas são facilmente diferenciadas das não flocculentas através da observação visual. Porém, esta diferenciação é uma estimativa subjetiva do poder flocculante de uma determinada linhagem. Baseado no fato das leveduras não flocculentas permanecerem em suspensão por muito tempo, enquanto as leveduras flocculentas se depositam rapidamente, vários métodos de quantificação do processo têm sido propostos na literatura (KIHN et al., 1988b ; STRATFORD & KEENAN, 1988).

Alguns métodos estimam a intensidade ou a velocidade de sedimentação através da quantificação do material flocculado expresso em volume, massa ou número de células (STEWART et al., 1976; NISHIHARA et al., 1976). Outros métodos estimam o material

que permanece em suspensão no sobrenadante, principalmente através de medidas de turbidez (MIKI et al., 1982; STRATFORD & KEENAN, 1988; KIHN et al., 1988b). Alguns trabalhos utilizam métodos de desfloculação causada por adição de açúcares (EDDY, 1955b) ou por aumento da temperatura (TAYLOR & ORTON, 1978; NISHIHARA et al., 1977) para estimar a força floculadora das linhagens

Os trabalhos mais recentes tem indicado que a absorbância residual determinada após a sedimentação é uma medida da concentração de células dispersas e representa um parâmetro adequado para caracterizar a floculência de leveduras (KIHN et al. 1988b; STRATFORD & KEENAN, 1988).

STRATFORD & KEENAN (1988) enfatizaram que a quantificação da floculação era fortemente influenciada pelo tipo, tempo e velocidade de agitação, pela concentração de células e pela relação entre o volume de suspensão e o tamanho do frasco utilizado nos testes. Nesse trabalho, os autores encontraram que para uma determinada concentração celular era necessária uma velocidade mínima de agitação para a ocorrência da floculação. Este limite podia ser considerado como uma "energia de ativação", isto é, uma velocidade abaixo da qual a energia cinética ou mecânica disponível era insuficiente para permitir a aproximação das células floculentas. Estes autores discutiram a similaridade entre o efeito da temperatura em uma reação química e o efeito da agitação na floculação. O aumento da agitação fornecia este "input" de energia às células que colidiam com energia suficiente para penetrar a camada de água de hidratação e superar a barreira do potencial

elétrico da superfície, tornando as ligações possíveis.

Em estudos mais aprofundados sobre a influência da agitação na floculação, STRATFORD et al. (1988) e KIHN et al. (1988b) constataram que a agitação à velocidade constante acelerou a floculação pelo aumento da probabilidade de colisão entre as partículas até que um estágio de equilíbrio fosse alcançado, onde a relação entre células livres e floculadas foi mantida constante. O excesso de agitação passava a ter um efeito antagônico, destruindo os flocos e conseqüentemente, aumentando o número de células dispersas. Este equilíbrio à velocidade constante seria dinâmico, onde a agregação de células era compensada pela remoção de células pela própria agitação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTURAS DE MICRORGANISMOS

Foram utilizadas neste estudo, linhagens de Saccharomyces cerevisiae e Lactobacillus fermentum obtidas junto à Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello". As designações dos microrganismos utilizados estão indicadas no Quadro 1.

As linhagens de L. fermentum foram isoladas a partir de amostras do "leite" de leveduras sem tratamento ácido provenientes de usinas com e sem problemas de floculação (OLIVANETO, 1990).

As culturas de L. fermentum foram mantidas em MRS agar inclinado (Lactobacilli Man, Rogosa e Sharpe) a 4°C e cultivadas em caldo MRS a 30°C para a obtenção das células para os testes de floculação.

Foi utilizada uma cultura de levedura isolada a partir da semeadura em placa por estrias de uma suspensão de fermento comercial (Produtos Alimentícios Fleishmann Royal Ltda) em meio PDA (Potato Dextrose Agar). Esta cultura denominada F1 e a de Sacch. cerevisiae FTPT 0472 proveniente de mosto de usina foram mantidas em PDA inclinado a 4°C e cultivadas em caldo YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) a 30°C para a obtenção de células para os testes de floculação.

QUADRO 1 : Microrganismos utilizados neste trabalho

Microrganismo	Designação
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	FTPT 0472
levedura de fermento	F1
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1383
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1384
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1385
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1387
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1388
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1389
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1390
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1395
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1396
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1397
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1398
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1399
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1400
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1403
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1405
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1406
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1407
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1409
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1410
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1411
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1412
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1414
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1415
<u>Lactobacillus fermentum</u>	FTPT 1417

FTPT : Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello"

3.2. TESTE PARA A SELECÇÃO DE LINHAGENS FLOCULENTAS DE Lactobacillus fermentum

As bactérias foram cultivadas em 30 ml de caldo MRS durante 48 horas a 30°C. As culturas foram centrifugadas a 8000 g por 10 minutos a 4°C utilizando Centrífuga modelo IEC B-20-A, da International Equipment, lavadas duas vezes com solução de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 0,025 M. O sedimento foi ressuscitado em tampão citrato 0,05 M acrescido de EDTA 0,005 M pH 4,5 numa concentração de 0,5 g/ml de massa úmida de células.

Nesta etapa foram utilizadas suspensões de levedura preparadas a partir de fermento comercial que foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, lavadas duas vezes com EDTA 0,025 M e ressuscitadas em tampão citrato 0,05 M acrescido de EDTA 0,005 M pH 4,5 numa concentração de 5 g/ml de peso úmido.

Os testes preliminares de floculação foram realizados em tubos 16 X 150 mm misturando 4 ml da suspensão de bactéria e 6 ml da suspensão de leveduras preparadas conforme descrito no item anterior. Foram adicionados 2 ml de uma solução de cloreto de cálcio 10^{-3} M a cada tubo, o qual foi vigorosamente agitado e, posteriormente deixado em repouso por 5 minutos. Após este período de repouso, uma amostra de 3 ml do sobrenadante foi retirada cuidadosamente, para evitar turbulência do sedimento com a qual procedeu-se a leitura de turbidez em espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 20, utilizando um comprimento de onda de 600 nm. O teste foi realizado à temperatura ambiente.

3.3. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA CAPACIDADE FLOCULANTE DE Lactobacillus fermentum

A cultura de bactéria floculenta selecionada foi cultivada em frasco Erlenmeyer contendo 50 ml de caldo MRS por 24 horas a 30°C, utilizando como inóculo 1 % de uma cultivo de 24 horas em caldo.

A cultura foi então centrifugada e lavada duas vezes com uma solução de EDTA 0,025 M e ressuspendida numa concentração de aproximadamente 0,15 g/l (massa seca) em tampão citrato 0,05 M acrescido de EDTA 0,005 M cujo pH foi ajustado para 6,2.

As leveduras Saccharomyces cerevisiae FTPT 0472 e F1 foram cultivadas em frascos Erlenmeyer contendo 150 ml de caldo YEPD por 24 horas a 30°C, utilizando como inóculo 1 % de uma cultura de 24 horas no mesmo meio.

Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas a 8000 g por 10 minutos a 4°C e sofreram o mesmo processo de lavagem da cultura bacteriana. O sedimento obtido foi, então, ressuspendido no mesmo tampão para a obtenção de uma suspensão com concentração celular de aproximadamente 2,70 g/l (massa seca).

Os testes de floculação foram realizados em tubos de ensaio 16 X 150 mm conforme o esquema descrito a seguir. O controle negativo dos testes foi feito pela substituição da solução de cloreto de cálcio por tampão citrato preparado com água deionizada.

Procedeu-se os testes com adição de H_2SO_4 ou NaOH a uma concentração final de 0.2 N, para verificar a ocorrência de desfloculação.

2 ml da suspensão de levedura 2.70 g/l

+

2 ml da suspensão de bactéria 0.15 g/l

+

1 ml de uma solução de CaCl_2 5×10^{-2} M



agitação 10 segundos



repouso 10 minutos



retirada do sobrenadante (3 ml)



leitura de turbidez do sobrenadante

A agitação foi feita em agitador de tubo (Cyclo Mixer da Clay Adams veloc. II). As amostras do sobrenadante foram retiradas cuidadosamente utilizando um pipetador automático. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 600 nm. O teste foi feita a temperatura ambiente.

Os limites mínimo e máximo para os valores de absorbância encontrados para os controles negativo e positivo foram definidos arbitrariamente, sendo que a obtenção de um valor

de absorvância igual ou maior que 0,65 foi considerada resultado onde não havia floculação e valor menor ou igual a 0,10, onde havia floculação total.

3.3.1. CONTAGEM EM PLACA

Diluições seriadas das amostras do sobrenadante após o teste de floculação com e sem adição de cálcio foram semeadas em profundidade na placa com meio MRS Agar, acrescido de 0,2 mg/ml de actidiona para contagem bacteriana e com meio PDA contendo 0,1 mg/ml de cloranfenicol e 0,1 mg/ml de clorotetraciclina para contagem de leveduras e bolores. As placas foram incubadas a 30°C por 24 h (1ª leitura) e 48 h (2ª leitura). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por ml (UFC/ml).

As suspensões de células de leveduras e de bactérias com as concentrações celulares empregadas no teste de floculação foram também contadas em meios adequados.

3.4. DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO NA PRESENÇA DE DIFERENTES ÍONS

Seguindo o esquema básico do teste de floculação, foi avaliado o efeito da presença de cada um dos seguintes íons: cálcio, manganês, magnésio, sódio, potássio, cobre e bário. Todos estes íons foram utilizados na forma de cloretos, com concentração final variando de 10^{-5} até 2×10^{-1} M.

3.5. DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO EM PH 3,0, 4,5 e 6,2

A ocorrência da floculação foi testada utilizando suspensões de bactéria e levedura preparadas nas mesmas concentrações já mencionadas em tampão citrato 0,05 M acrescido de EDTA 0,005 M ajustado para pH 3,0, 4,5 e 6,2. O teste de floculação foi realizado na presença de diferentes concentrações de íons cálcio, manganês e magnésio.

3.6. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE CARBOIDRATOS SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE L. fermentum

Os carboidratos manose, frutose, glicose, galactose, maltose, sacarose, lactose foram adicionados aos tubos teste em concentrações finais variando de 10^{-5} a 10^{-1} M. Nestes testes, o procedimento para medida de floculação foi modificado adicionando-se 0,5 ml de uma solução de cloreto de cálcio 5×10^{-2} M e 0,5 ml de solução do carboidrato. As demais condições do teste foram mantidas conforme descrito no item 3.3.

3.7. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE L. fermentum

a. TRATAMENTO COM PROTEASE - Acrescentou-se a enzima protease de Streptomyces griseus (Sigma, cat. P.0605) numa concentração de 0,1 g/l a frascos Erlenmeyer contendo 50 ml de suspensão da cultura floculenta de L. fermentum ou da cultura Sacch. cerevisiae preparadas conforme descrito no item 4. Os frascos foram incubados sob agitação de 100 rpm a 30° C em incubador agitador New Brunswick Scientific G-25. Em intervalos de 15 minutos foram retiradas amostras de 2 ml para medir a capacidade floculadora.

b. TRATAMENTO COM LISOZIMA - Foi verificada a ação da enzima lisozima (Bacto-Lysozyme Difco 0465-10) sobre as células de bactéria flocculenta e levedura seguindo o mesmo procedimento utilizado para o tratamento com a enzima protease e a mesma concentração.

c. TRATAMENTO COM ZIMOLIASSE - O efeito do tratamento com a enzima zimoliasse (Novozym 234) foi determinado incubando-se a suspensão de células de leveduras com 0,1 g/l da enzima a 30° C sob agitação de 100 rpm. A cada intervalo de 15 minutos foram retiradas amostras para medir a capacidade flocculadora.

3.8. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A CAPACIDADE FLOCCULANTE DE L. fermentum

Suspensões de células da bactéria flocculenta preparadas conforme item 3. em tampão citrato com pH ajustado para 6,2 e 4,5 foram distribuídas em tubos de ensaio com rosca de 16 X 150 mm (5 ml) e submetidas às temperaturas de 50°, 55°, 60°, 70° e 80°C em banhos de água por diferentes tempos.

Nos tempos determinados, os tubos foram retirados do banho e resfriados rapidamente em banho de gelo. A seguir, o teste de flocculação foi conduzido, utilizando a suspensão de células tratadas pelo calor.

3.9. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO ÁCIDO SOBRE O CRESCIMENTO DA CULTURA FLOCULENTA *L. fermentum*

Células da linhagem floculenta com crescimento ativo obtidas após 4 cultivos sucessivos de 12 horas em caldo MRS foram centrifugadas a 8000 g e lavadas uma vez com água destilada.

O sedimento foi ressuspensionado em caldo MRS numa concentração correspondente a uma absorbância de 1,0. 50 ml desta suspensão foram distribuídos em frascos, cada frasco teve o pH ajustado com H_2SO_4 5 N para valores de 2,0 ; 2,5 ; 3,0 e 4,5. Os frascos foram então incubados sob agitação de 100 rpm a 30°C. As células da cultura floculenta ressuspensionada em tampão foram submetidas ao mesmo tratamento ácido. Paralelamente, procedeu-se o tratamento das células bacterianas e de leveduras em meio MRS a estes valores de pH sem agitação da suspensão.

Em diferentes tempos de tratamento, amostras das suspensões tratadas foram transferidas para cubetas estéreis contendo caldo MRS até uma absorbância inicial de aproximadamente 0,1 e incubadas em banho a 30°C.

A partir das medidas de turbidez obtidas a intervalos de 15 minutos durante 8 horas de cultivo, foram construídas curvas de crescimento.

4. RESULTADOS

4.1. SELEÇÃO DAS LINHAGENS FLOCULENTAS DE Lactobacillus fermentum

Das 24 linhagens de L. fermentum testadas, isoladas a partir de "leite" de leveduras sem tratamento ácido, 21 apresentaram capacidade de flocular células de leveduras (fermento comercial). Estas cepas podem ser separadas de acordo com a capacidade floculante em 3 grupos: (a) não floculentas; (b) fracamente floculentas; e (c) fortemente floculentas conforme indicado na Tabela 1. Os limites entre esses grupos foram arbitrariamente estabelecidos, considerando a absorbância do sobrenadante inferior a 0,40 como pertencente ao grupo fortemente floculento; de 0,40 a 0,65 como fracamente floculento e acima de 0,65 como sendo do grupo não floculento, nestas condições de experimentação.

A cultura FTPT 1405 foi selecionada para os testes seguintes como linhagem floculenta e a cultura FTPT 1407 foi mantida como cultura não floculenta.

A partir da semeadura em placa da cultura de L. fermentum FTPT 1405 foram selecionadas 398 colônias. Dentre estas, oito (2,01%) não apresentaram a capacidade de flocular leveduras, ou seja, teriam perdido essa capacidade durante a armazenagem e sub-cultivo.

Nos testes realizados com os 390 isolados que apresentavam capacidade floculadora, observou-se a formação de flocos com maior ou menor intensidade indicada pelo tamanho dos flocos e velocidade de sedimentação. O teste qualitativo com a cultura FTPT 1405 indicou a ocorrência da floculação através da observação visual, enquanto o sobrenadante do tubo teste com a cultura FTPT 1407 permaneceu turvo com característica de não floculenta.

TABELA 1 : Determinação da capacidade floculante das linhagens de Lactobacillus fermentum (teste p/ seleção)

LINHAGEM	ABSORBÂNCIA*	CARACTERÍSTICA
FTPT 1384	0,31	FORTEMENTE FLOCULENTAS ABS < 0,40
FTPT 1387	0,30	
FTPT 1388	0,33	
FTPT 1389	0,32	
FTPT 1395	0,36	
FTPT 1396	0,33	
FTPT 1399	0,28	
FTPT 1403	0,32	
FTPT 1405	0,29	
FTPT 1410	0,36	
FTPT 1417	0,38	
FTPT 1383	0,47	FRACAMENTE FLOCULENTAS 0,40 < ABS < 0,65
FTPT 1385	0,62	
FTPT 1397	0,42	
FTPT 1398	0,41	
FTPT 1406	0,46	
FTPT 1409	0,40	
FTPT 1411	0,48	
FTPT 1412	0,55	
FTPT 1414	0,60	
FTPT 1415	0,40	
FTPT 1390	2,00	NÃO FLOCULENTAS ABS > 0,65
FTPT 1400	1,50	
FTPT 1407	2,00	

* - leitura da absorbância do sobrenadante feita a 600 nm

4.2. A CAPACIDADE FLOCULANTE DE L. fermentum

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 (concentração final) com agitação vigorosa seguida de um período de repouso da mistura de células bacterianas de L. fermentum e leveduriformes de Saccharomyces cerevisiae FTPT 0472 ou da cultura denominada F1 (Figura 1).

Com a substituição da solução de cloreto de cálcio por tampão citrato pH 6,2, o sobrenadante permanecia turvo. A adição de H_2SO_4 ou NaOH ao tubo teste impediu a ocorrência da floculação (Tabela 2).

TABELA 2 : Avaliação quantitativa da capacidade floculante de L. fermentum

CULTURA DE LEVEDURA	LINHAGEM DE <u>L. fermentum</u>	ABSORBÂNCIA DO SOBRENADANTE A 600 nm	FLOCULAÇÃO
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> FTPT 0472	FTPT 1405 (a)	0,08 (e)	+
	FTPT 1405 (b)	0,76 (e)	-
	FTPT 1405 (c)	0,70 (e)	-
	FTPT 1405 (d)	0,70 (e)	-
<u>Saccharomyces cerevisiae</u> FTPT 0472	FTPT 1384 (a)	0,10	+
	FTPT 1410 (a)	0,14	+
	FTPT 1390 (a)	0,70	-
	FTPT 1400 (a)	0,68	-
	FTPT 1407 (a)	0,72	-
CULTURA F1	FTPT 1384 (a)	0,10	+
	FTPT 1405 (a)	0,10	+
	FTPT 1407 (a)	0,72	-

(a) adição de CaCl_2 10^{-3} M ; (b) adição de CaCl_2 10^{-3} M e H_2SO_4 0,2 N;
(c) adição de CaCl_2 10^{-3} M e NaOH 0,2 N; (d) adição de tampão citrato;
(e) média de 5 repetições

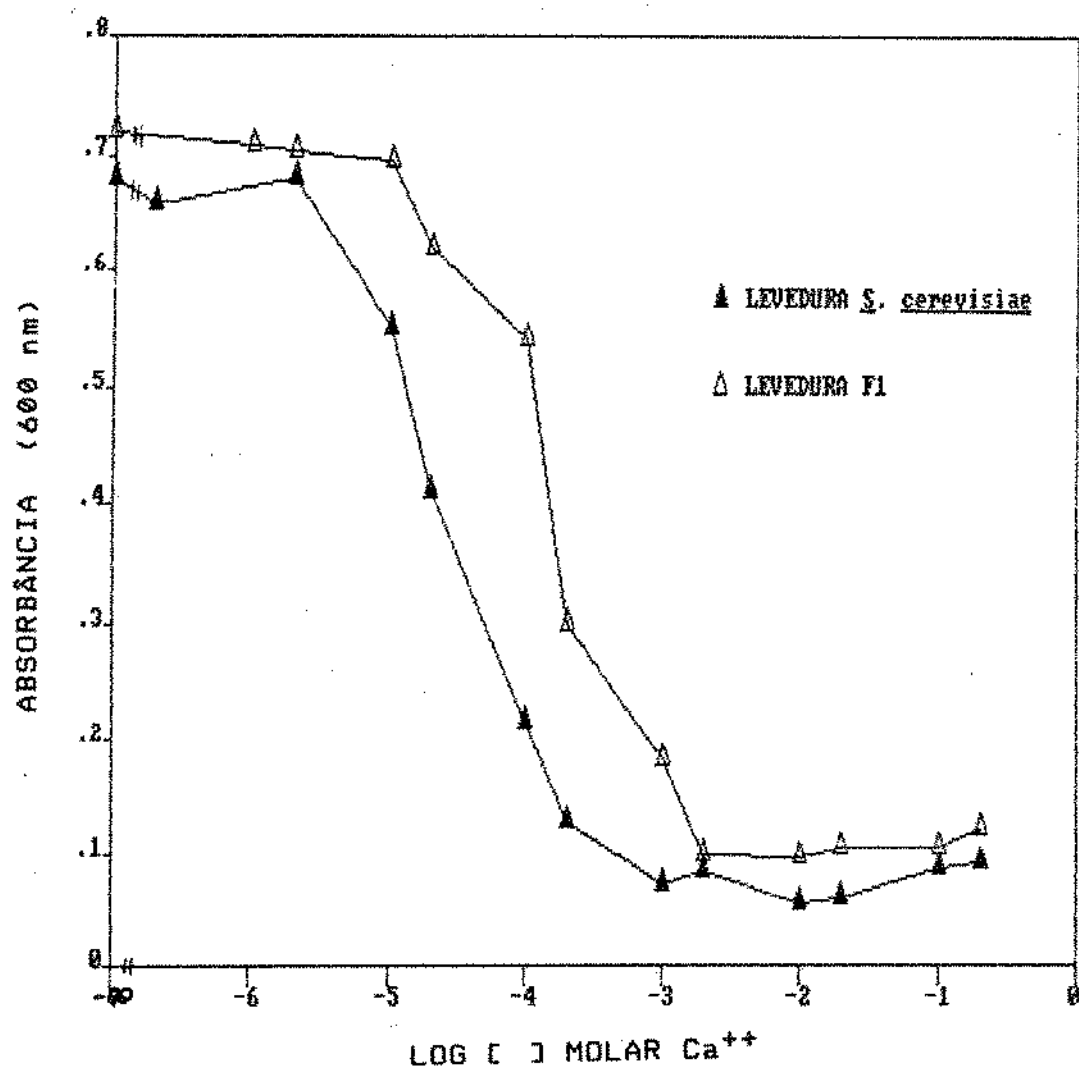


Figura 1: Efeito da concentração de íons cálcio na flocculação das células de levedura por *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 (pH 6,2)

Os resultados obtidos para o teste de floculação das linhagens floculentas FTPT 1384, 1405 e 1410 sobre as duas culturas de levedura foram similares. Houve similaridade entre os resultados das linhagens não floculentas FTPT 1390, 1400, 1407, demonstrando que a metodologia utilizada forneceu uma diferenciação nítida quanto a ocorrência ou não da floculação (Tabela 2).

O teste realizado com substituição do cálcio por tampão citrato foi considerado como controle negativo, onde não houve floculação, com absorbância igual ou superior a 0,65. Considerou-se totalmente floculado, o sobrenadante cuja leitura em espectrofotômetro correspondia a uma absorbância menor ou igual a 0,10 nas condições experimentais utilizadas, descritas no item 3.3.

4.2.1. CONTAGEM EM PLACA

Os resultados das contagens de leveduras Saccharomyces cerevisiae FTPT 0472 e de bactérias Lactobacillus fermentum FTPT 1405 presentes no sobrenadante após o teste de floculação são apresentados na Tabela 3.

Observou-se uma redução significativa na contagem de leveduras no sobrenadante após a floculação. A contagem de bactérias ainda presente após a floculação foi pouco menor que no controle negativo. Deve-se observar que os dados obtidos para as suspensões iniciais de leveduras e bactérias foram maiores que os

observados para o controle negativo, uma vez que no tubo teste as suspensões sofreram uma diluição de 2:5.

TABELA 3 : Contagens de bactérias e leveduras após o teste de floculação

AMOSTRA	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u> (UFC/ml)	<u>Lactobacillus</u> <u>fermentum</u> (UFC/ml)	ABSORBÂNCIA (600 nm)
sobrenadante 1	2,60 X 10 ⁵	1,97 X 10 ⁷	0,09
sobrenadante 2	4,60 X 10 ⁶	3,00 X 10 ⁷	0,65
sobrenadante 3	7,96 X 10 ⁶	5,00 X 10 ⁷	0,76
suspensão 1	3,20 X 10 ⁷	---	2,80
suspensão 2	---	1,14 X 10 ⁸	0,36

sobrenadante 1 - controle positivo do teste de floculação; sobrenadante 2 - controle negativo
sobrenadante 3 - adição de CaCl₂ e manose 10⁻¹ M; suspensão 1 - suspensão inicial de células de leveduras; suspensão 2 - suspensão inicial de células de bactérias

4.3. EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS SOBRE A FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS POR L. fermentum a pH 6,2

Concentrações de íons cálcio acima de $10^{-3}M$ foram suficientes para promover a floculação máxima da cultura de Sacch. cerevisiae, enquanto que para a levedura F1, uma floculação menor foi obtida para a mesma concentração (Figura 1).

Encontrou-se que na presença de íons manganês e magnésio havia formação de flocos entre as células. Ao contrário, a adição de íons sódio, potássio, cobre e bário, nas concentrações testadas, não resultou em floculação.

Os íons manganês e magnésio foram exigidos em concentrações superiores à de cálcio para provocar a máxima floculação (Absorbância $< 0,10$). As Figuras 2 e 3 indicam que concentrações de manganês de no mínimo $10^{-2}M$ e de magnésio de $10^{-1}M$ foram necessárias para ocorrência da floculação máxima da cultura de Sacch. cerevisiae FTPT 0472 e $2 \times 10^{-2}M$ de manganês e $10^{-1}M$ de magnésio para a cultura de levedura F1.

O efeito da presença de íons Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} para a promoção da floculação sobre as duas culturas de leveduras utilizadas neste experimento têm perfil semelhante. Entretanto, pequenas diferenças podem ser observadas, indicando que a floculação é mais intensa e alcançada em concentrações mais baixas para a cultura FTPT 0472 que para a cultura F1 (Figuras 1, 4 e 5).

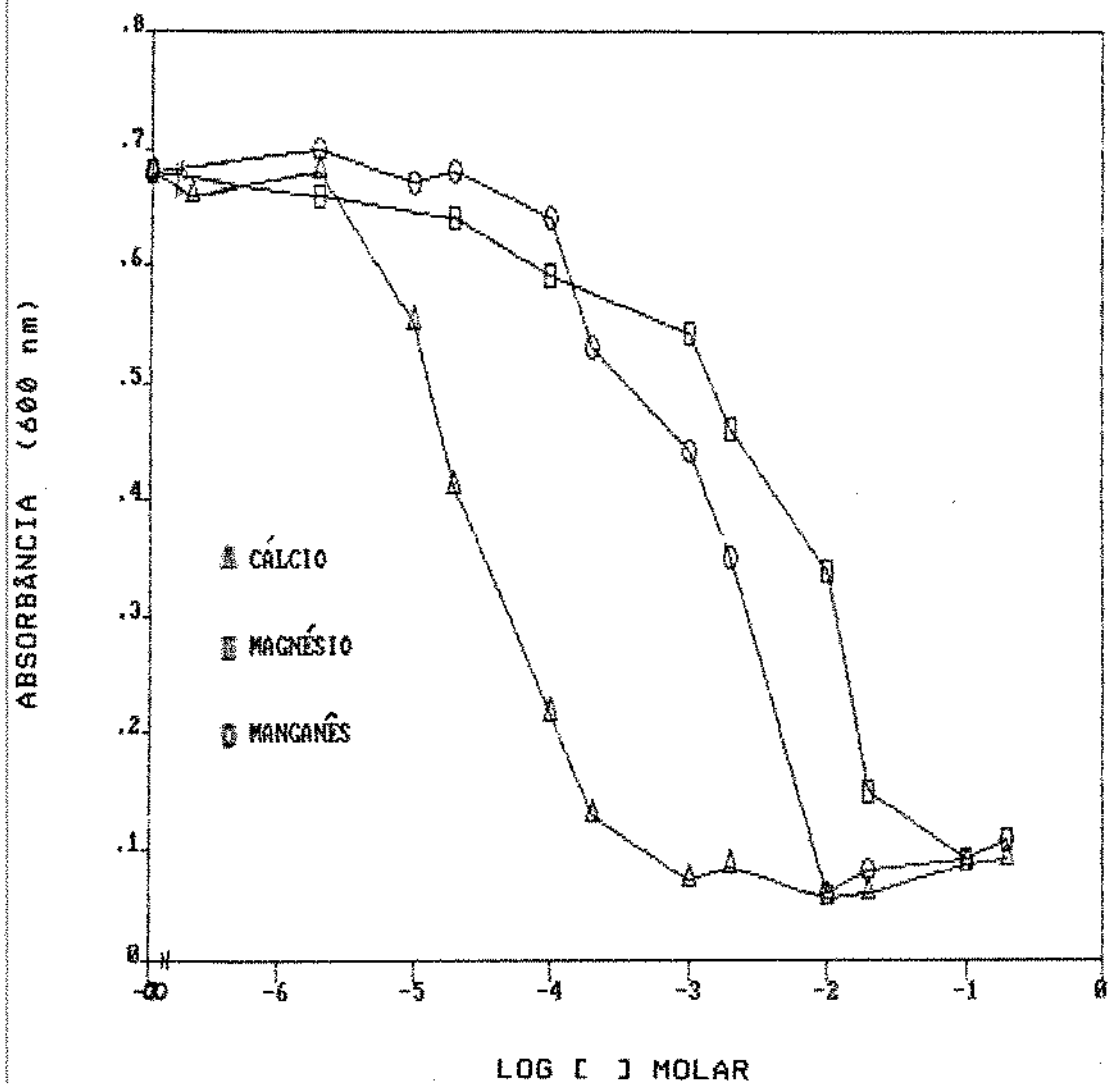


Figura 2: Efeito das concentrações de íons cálcio, manganês e magnésio na flocculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* FTPT 0472 por *L. fermentum* flocculante (pH 6,2)

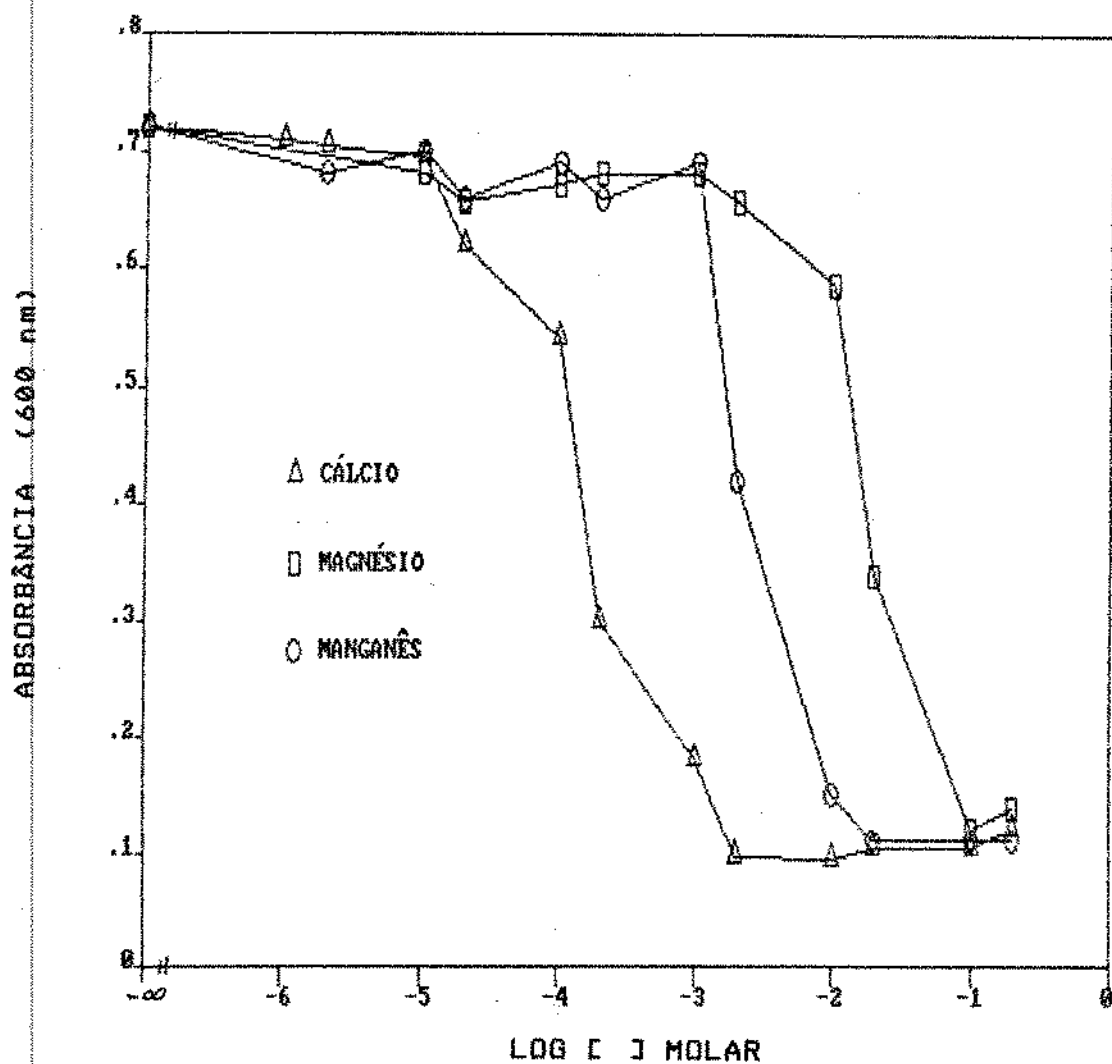


Figura 3: Efeito das concentrações de íons cálcio, manganês e magnésio na flocculação da levedura F1 por *L. fermentum* flocculante (pH 6,2)

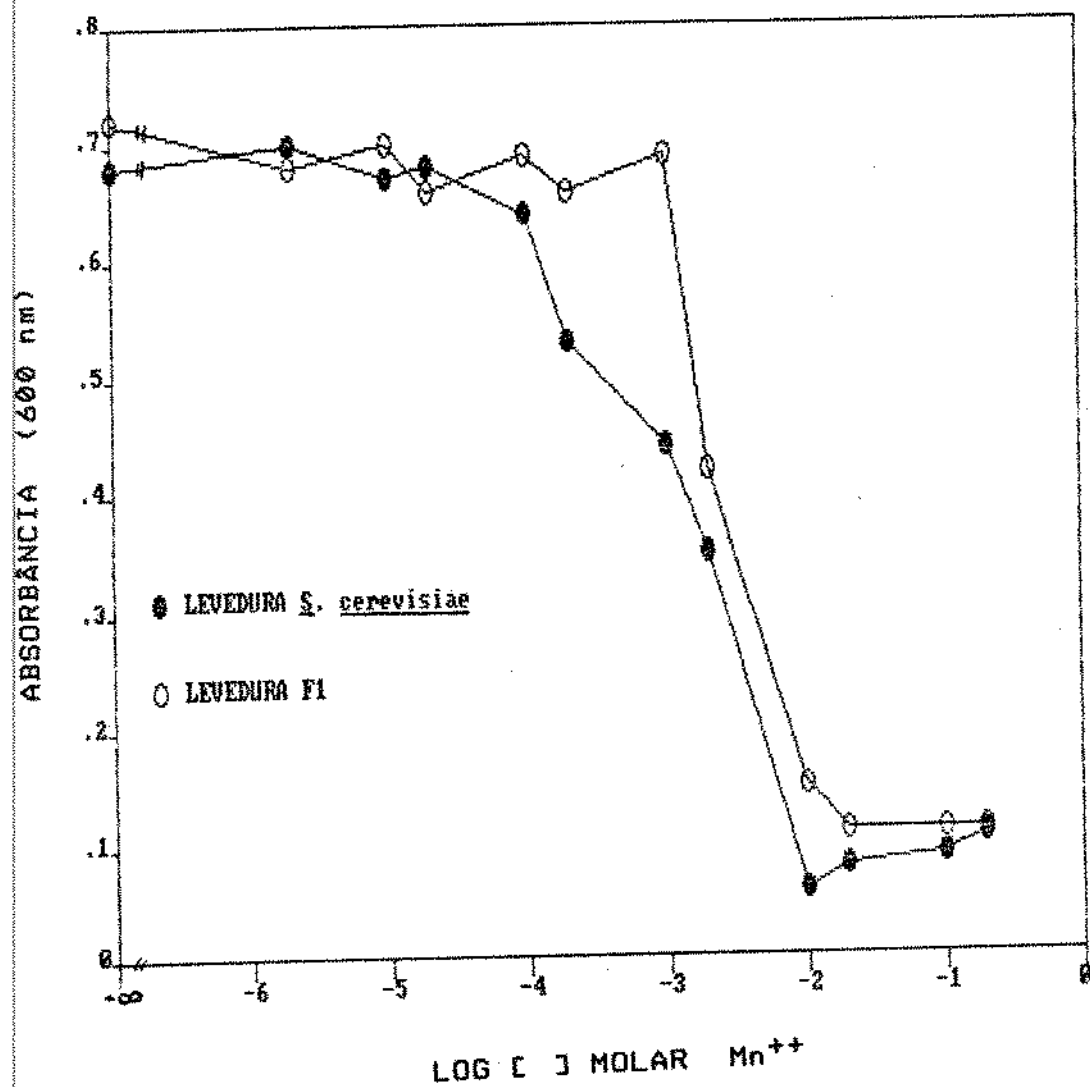


Figura 4: Efeito da concentração de íons manganês na flocculação das leveduras *Sacch. cerevisiae* FTPT 0472 e F1 por *L. fermentum* flocculante (pH 6,2)

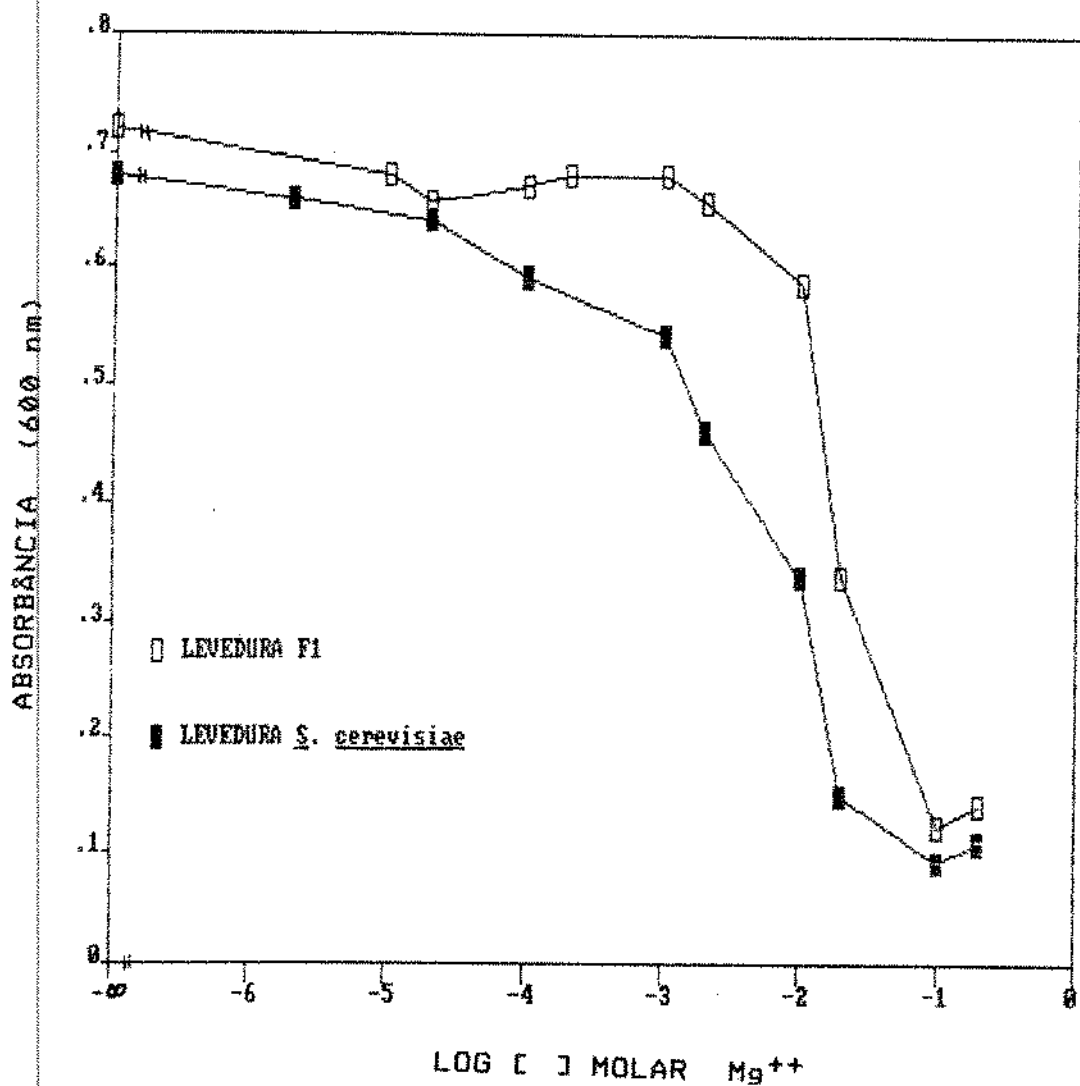


Figura 5: Efeito da concentração de íons magnésio na flocculação das leveduras *Sacch. cerevisiae* FTPT 0472 e F1 por *L. fermentum* flocculante (pH 6,2)

4.3.1. A OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO A VALORES DE pH 3,0 E 4,5

Verificou-se a capacidade dos íons cálcio, manganês e magnésio de promover a floculação em pH 3,0 e 4,5. Em pH 3,0, os íons cálcio continuaram permitindo a ocorrência da floculação, enquanto a presença de íons manganês e magnésio não tiveram efeito promotor da floculação (Figura 6). A pH 3,0 similarmente a pH 6,2, a ocorrência de certo grau de floculação só foi observado após a adição de no mínimo 2×10^{-4} M de cálcio (Figura 7).

A pH 4,5, houve um certo grau de floculação mesmo sem adição de íons. Porém, verificou-se a intensificação da floculação após a adição de íons cálcio (Figura 7).

A adição de concentrações crescentes de íons manganês a pH 4,5 promoveu a intensificação do grau de floculação, embora com menor eficiência que íons cálcio. No entanto, a adição de 2×10^{-1} M provocou um efeito inverso desta tendência, resultando na redução do nível de floculação (Figuras 8 e 9).

A presença de íons magnésio contribuiu fracamente para o aumento da floculação a pH 4,5 até concentrações de 10^{-2} M. Torna-se evidente, porém, um efeito inibidor destes íons em concentrações superiores a 10^{-2} M, resultando na perda total da capacidade floculante na presença de 10^{-1} M (Figuras 8 e 10).

A pH 3,0 os íons manganês e magnésio não foram capazes de promover a floculação das leveduras (Figuras 9 e 10). Neste pH, foi observada a ocorrência da floculação com a adição de íons cálcio (Figura 6).

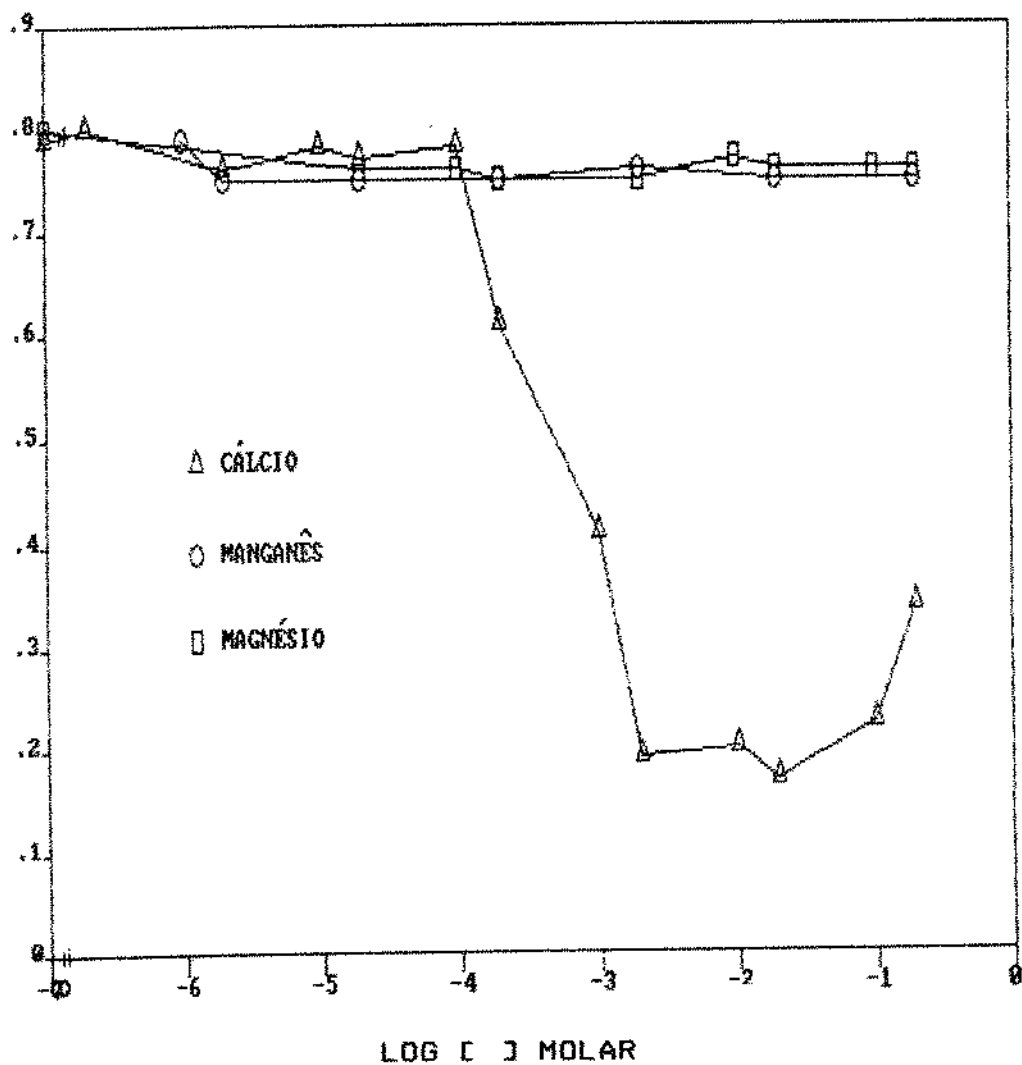


Figura 6: Efeito dos íons cálcio, manganês e magnésio a pH 3,0 na floculação da levedura Sacch. cerevisiae FTPT 0472 por L. fermentum floculante

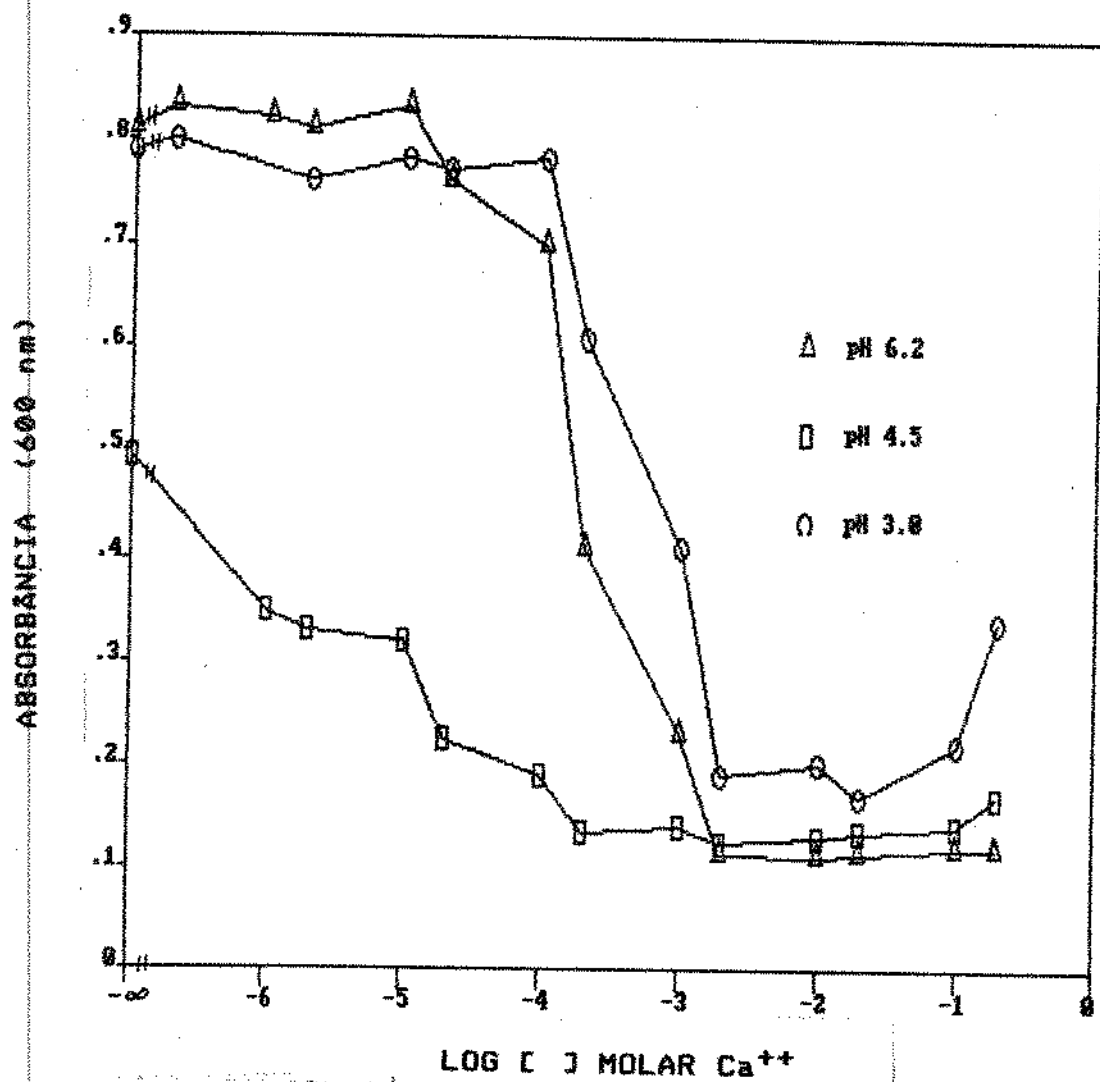


Figura 7: Efeito do pH e da concentração de íons cálcio na flocculação da levedura Sacch. cerevisiae FIPT 0472 por L. fermentum flocculante

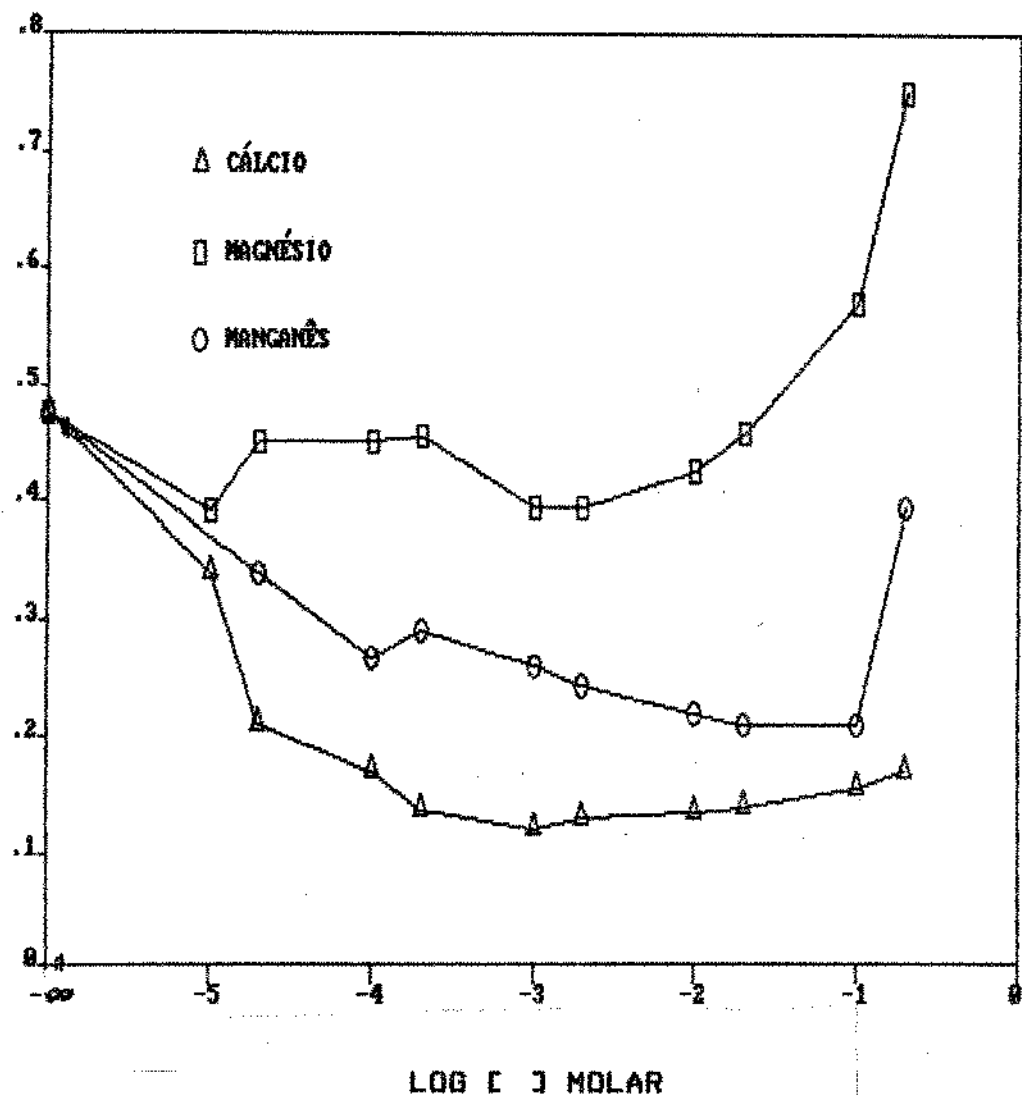


Figura 8: Efeito das concentrações dos íons cálcio, manganês e magnésio a pH 4,5 na floculação da levedura *Sacch. cerevisiae* FTPT 0472 por *L. fermentum* floculante

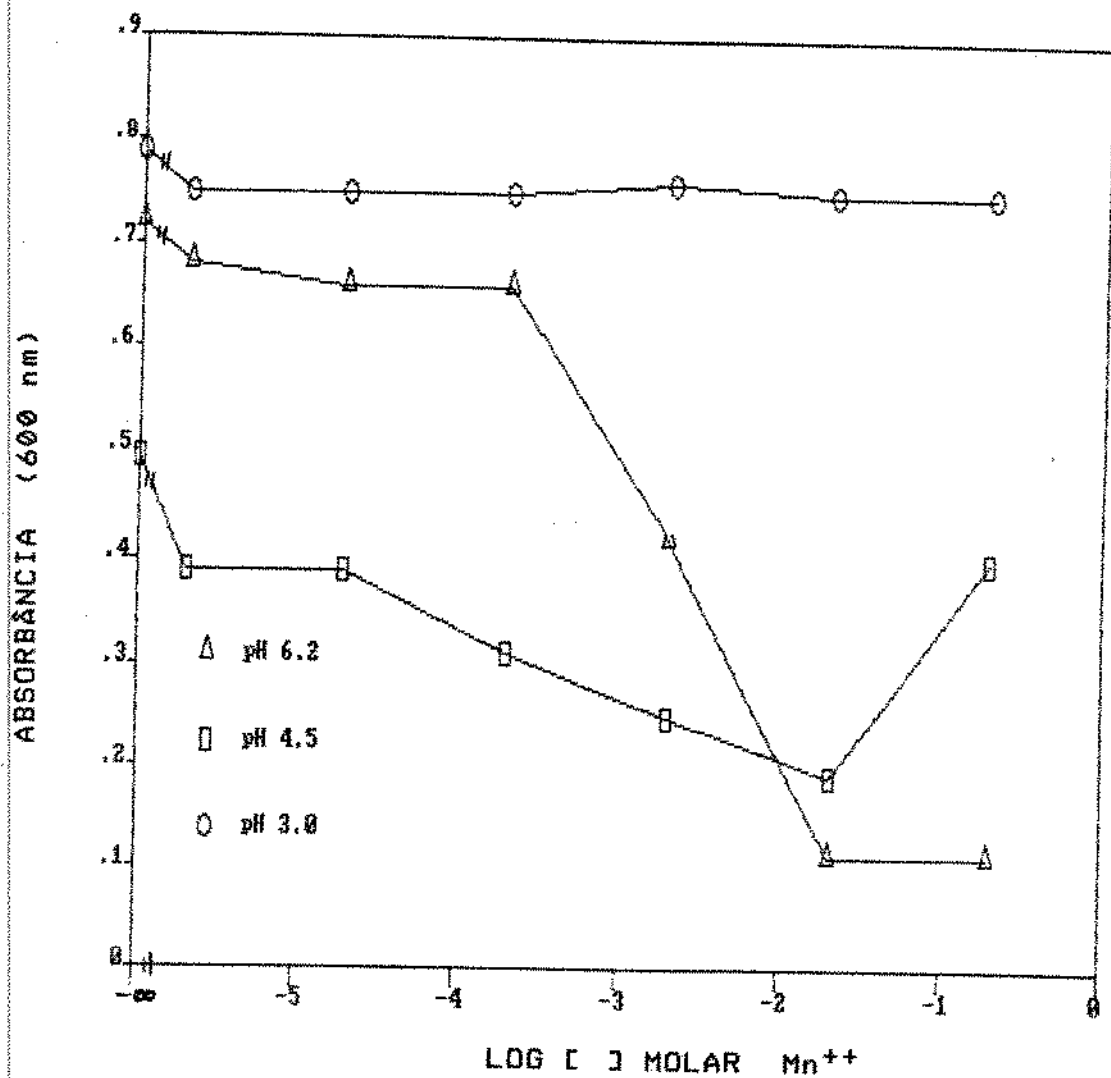


Figura 9: Efeito do pH e da concentração de íons manganês na floculação da levedura Sacch. cerevisiae FTPT 0472 por L. fermentum floculante

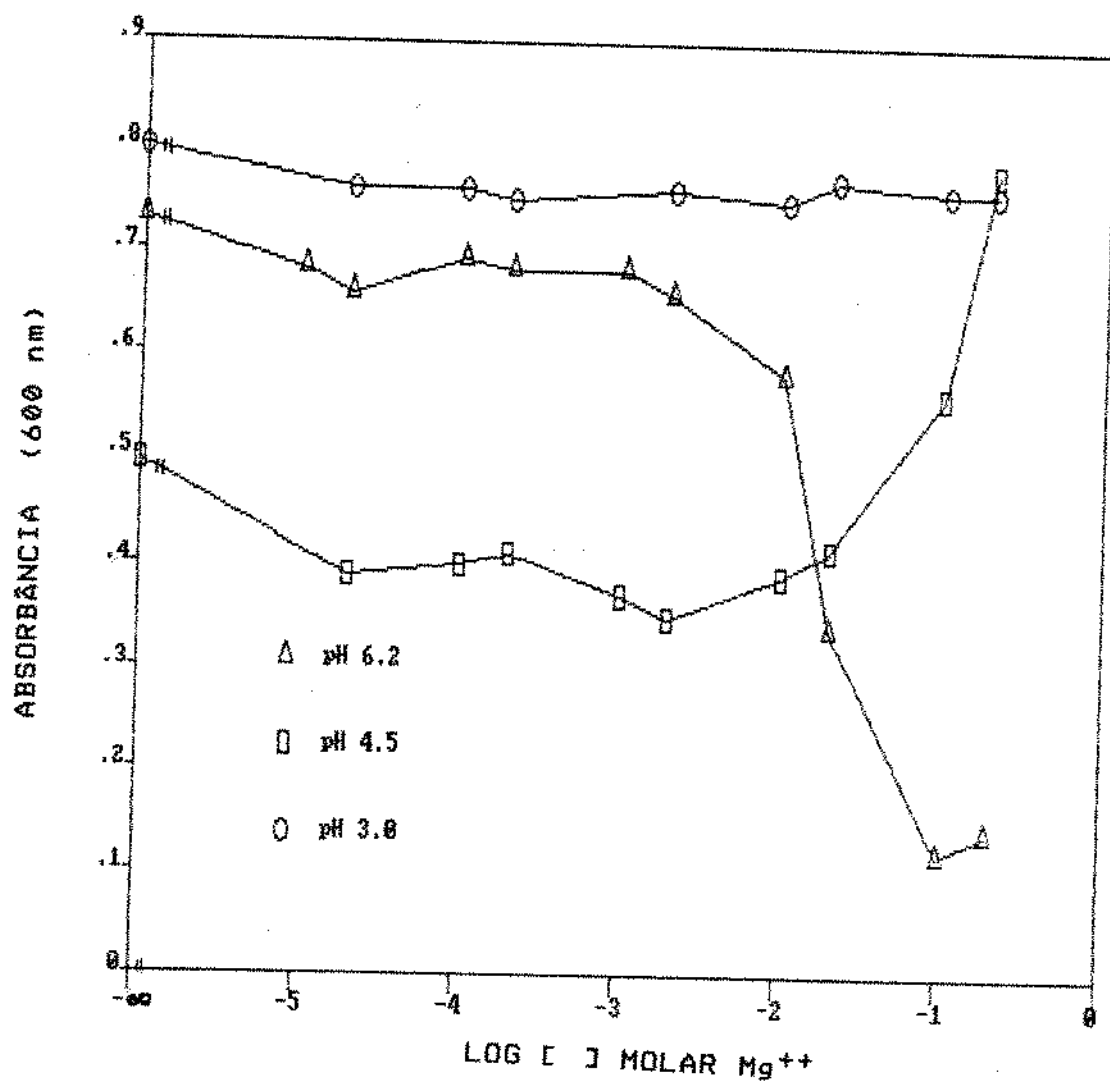


Figura 10: Efeito do pH e da concentração de íons magnésio na floculação da levedura Sacch. cerevisiae FTPT 0472 por L. fermentum floculante

4.4. EFEITO DA ADIÇÃO DE CARBOIDRATOS SOBRE A CAPACIDADE

FLOCULANTE DE L. fermentum

A adição dos carboidratos glicose, frutose, galactose, maltose, lactose e sacarose não alteraram a capacidade floculadora na presença de cálcio ($10^{-3}M$ concentração final) a pH 6,2 da cultura L. fermentum (Figura 11).

A presença de manose em concentrações acima de $2 \times 10^{-3}M$, resultou em uma redução gradual da capacidade floculante. O poder inibitório deste carboidrato foi constatado também na contagem em placa do sobrenadante após a adição de $10^{-1}M$ de manose (Tabela 3)

Os resultados apresentados na Figura 12 indicaram que uma concentração de $7 \times 10^{-2}M$ são suficientes para inibir totalmente a floculação. Entretanto, nas concentrações inferiores a sua ação é proporcional à concentração.

Na floculação da levedura F1, a manose também apresenta capacidade inibitória em concentrações superiores a $2 \times 10^{-3}M$. Na presença dos demais carboidratos testados, a cultura F1 é floculada normalmente, com excessão da frutose que em concentrações de $10^{-1}M$ também resulta na redução da floculação (Figura 13)

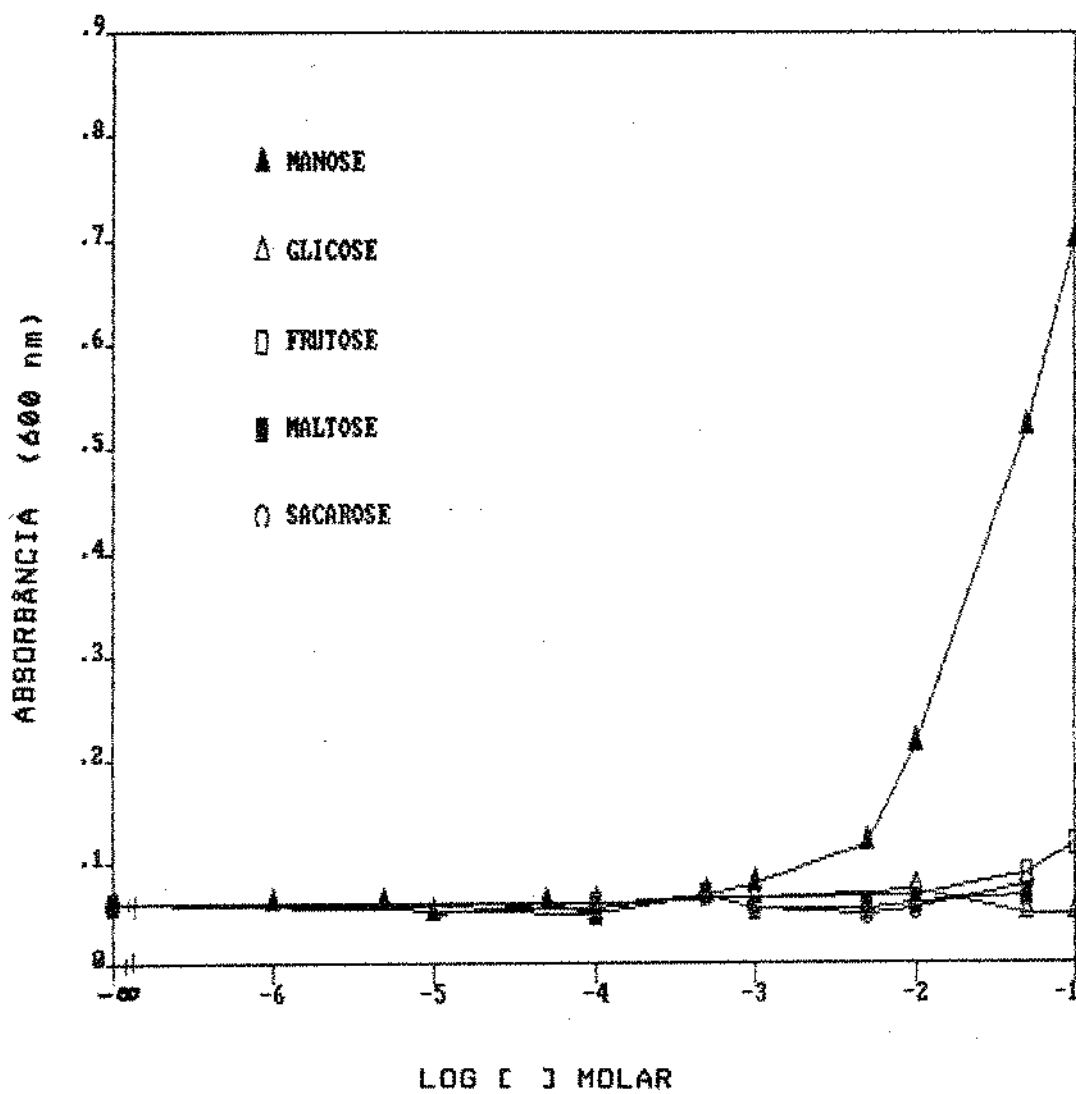


Figura 11: Efeito da adição de carboidratos na flocculação da levedura Sacch. cerevisiae FTPT 0472 por L. fermentum flocculante

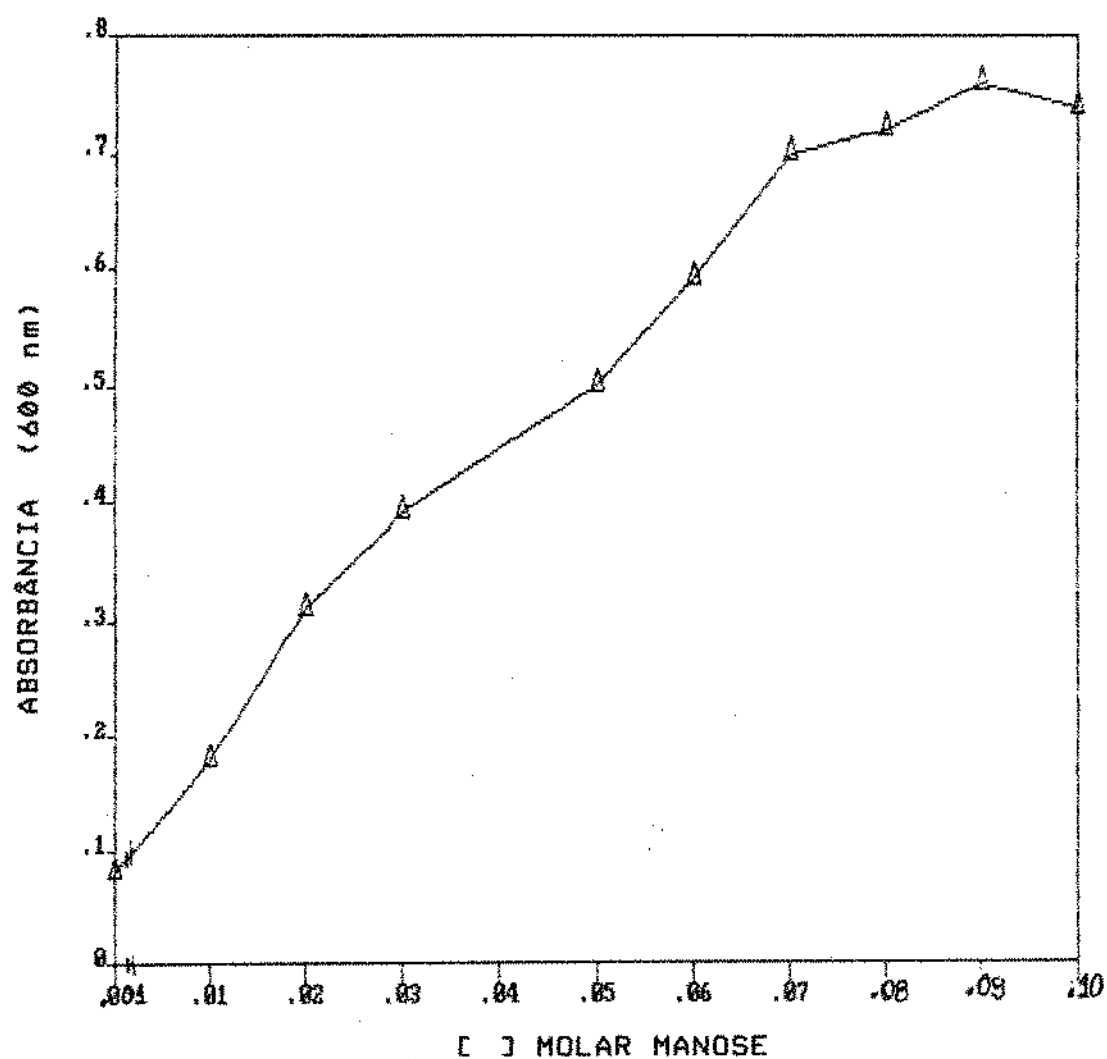


Figura 12: Efeito da concentração de manose na inibição da floculação da levedura Sacch. cerevisiae FTPT 0472 por L. fermentum flocculante

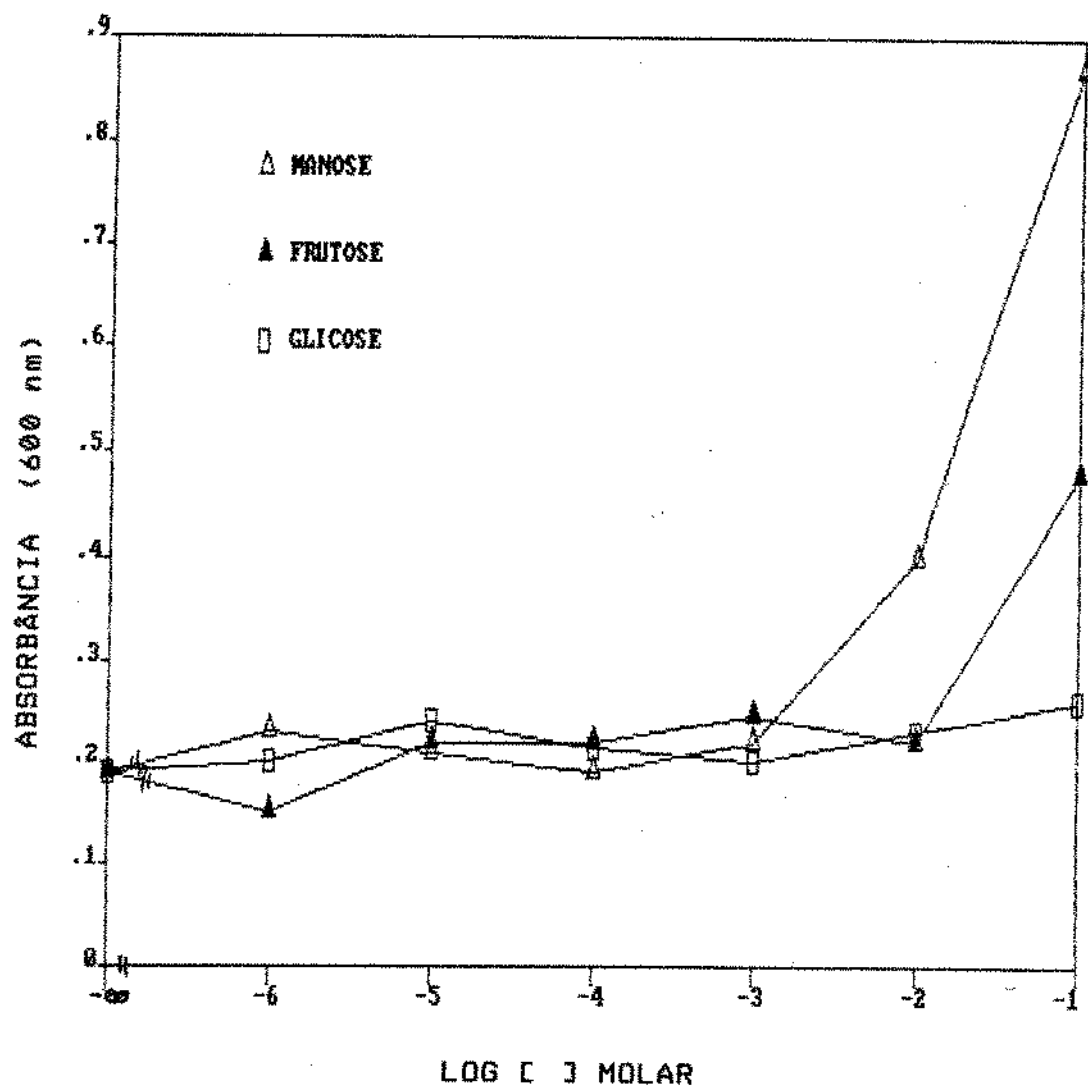


Figura 13: Efeito da adição de carboidratos na flocculação da levedura F1 por L. fermentum flocculante

4.5. EFEITO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE L. fermentum

Observou-se a redução gradual da floculação pela ação da enzima pronase E de Streptomyces griseus sobre as células da bactéria floculenta. A perda total da capacidade floculante foi verificada após 40 minutos do tratamento enzimático empregado (Figura 14). O tratamento com protease das células de levedura não afetou a floculação quando adicionou-se bactérias floculentas sem tratamento.

Constatou-se que as células bacterianas tratadas com lisozima mantiveram a capacidade de flocular as leveduras. O tratamento das células de levedura com lisozima e zimoliase também não impediu sua floculação por bactérias não tratadas enzimaticamente.

Não foi observada desfloculação pela ação de protease de Streptomyces griseus sobre o material floculado na concentração e tempos utilizados para o tratamento da suspensão de bactéria, provavelmente devido à dificuldade de penetração da enzima pela estrutura do floco.

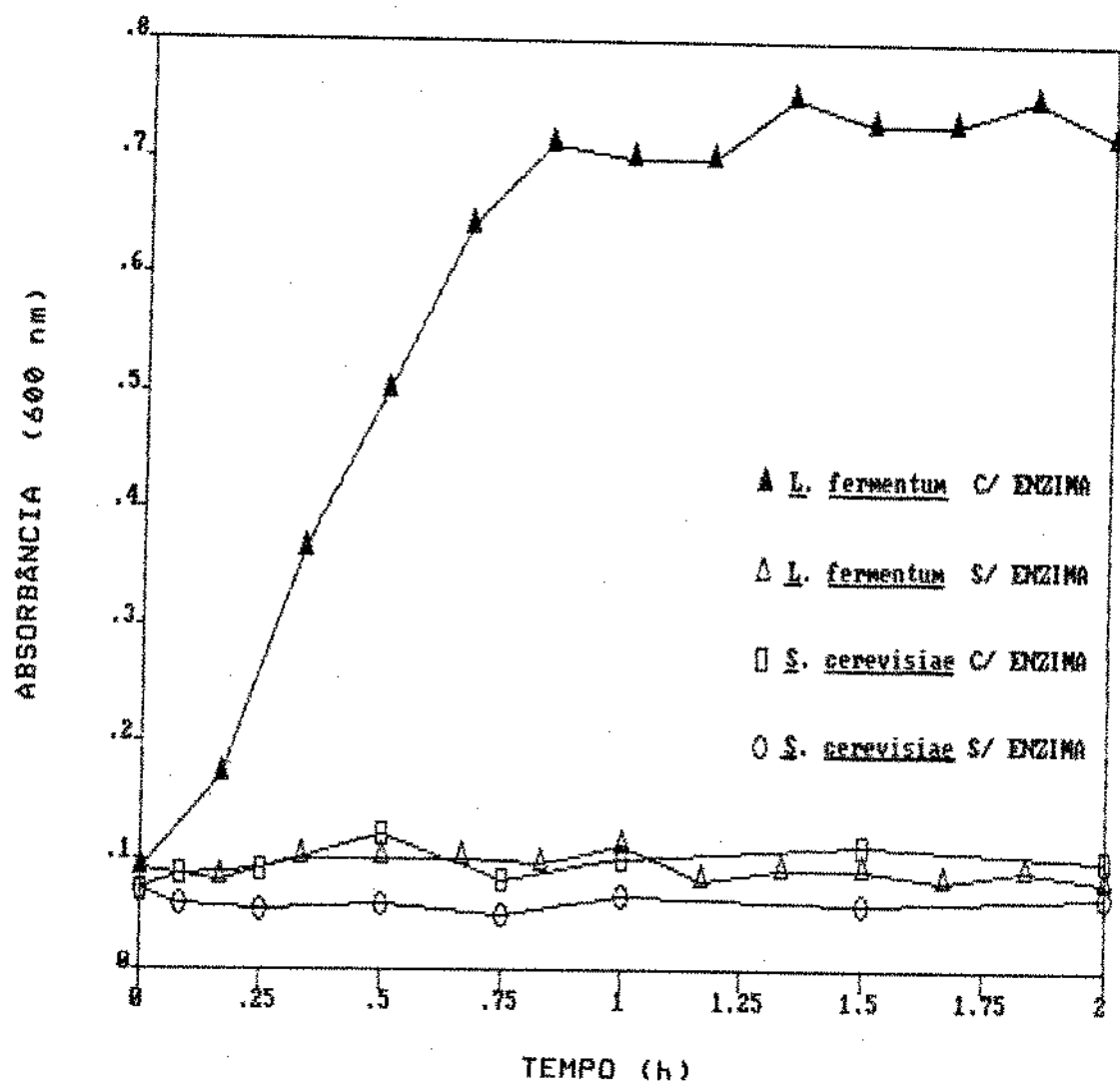


Figura 14: Efeito do tratamento com pronase E sobre as células de L. fermentum FTPT 1405 e Sacch. cerevisiae FTPT 0472 na floculação

4.6. EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE A CAPACIDADE FLOCULANTE DE L. fermentum

O tratamento a temperaturas elevadas das células floculentas de L. fermentum resultou na destruição da capacidade floculadora (Figuras 15 e 16). Esta destruição pelo calor foi mais eficiente a valor de pH 4,5 se comparado com tratamento realizado a pH 6,2 (Figura 17).

Após o tratamento térmico das células de levedura nas mesmas condições utilizadas para as células de bactérias, estas continuaram susceptíveis à floculação.

O material floculado obtido em pH 6,2 foi submetido às temperaturas nas quais as células de bactéria perdiam a capacidade de flocular e observou-se a desfloculação deste material após 60 minutos de tratamento pelo calor (Figura 18).

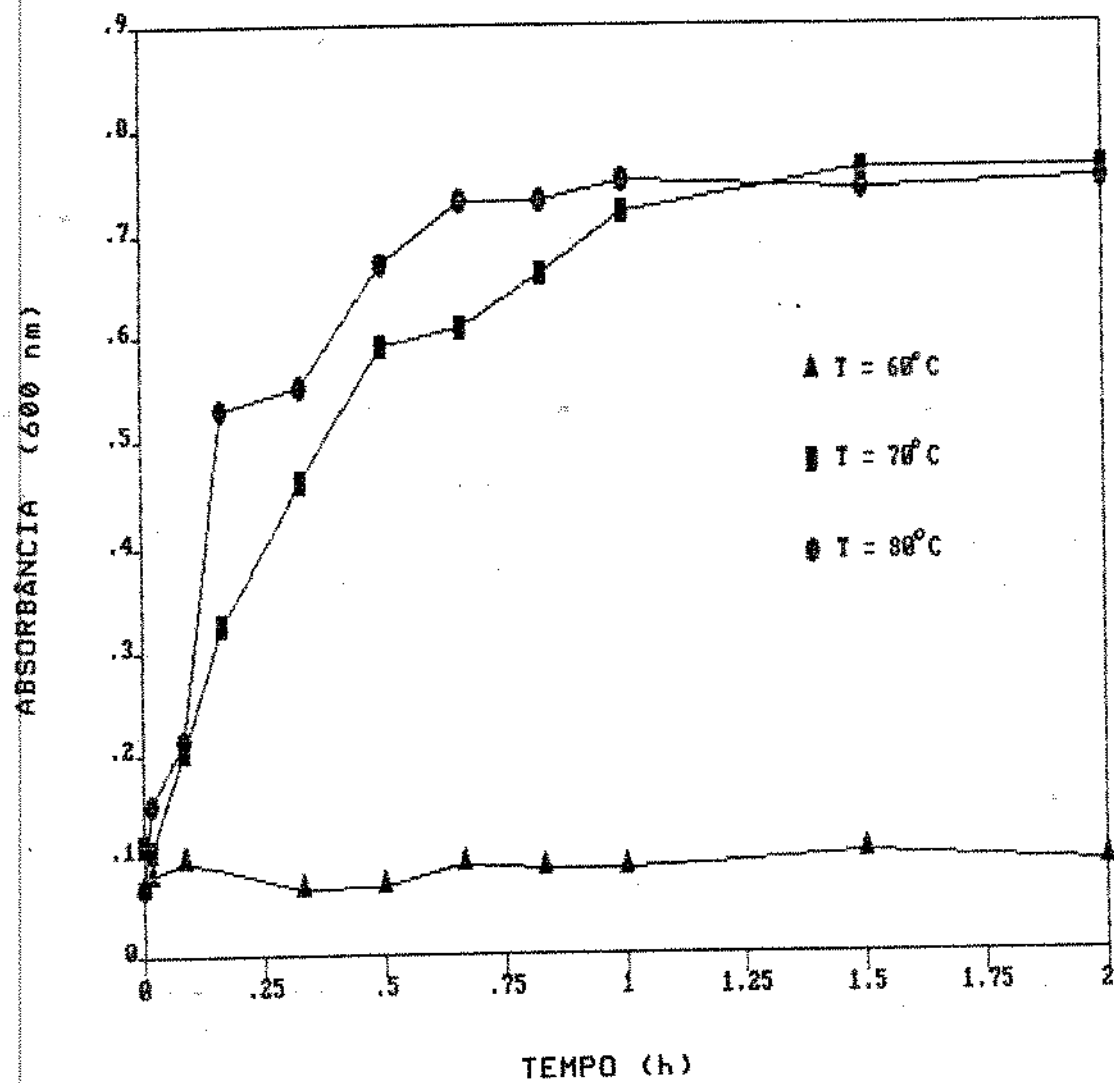


Figura 15: Efeito do tratamento térmico a pH 6,2 sobre a capacidade floculadora de *L. fermentum* FTPT 1405

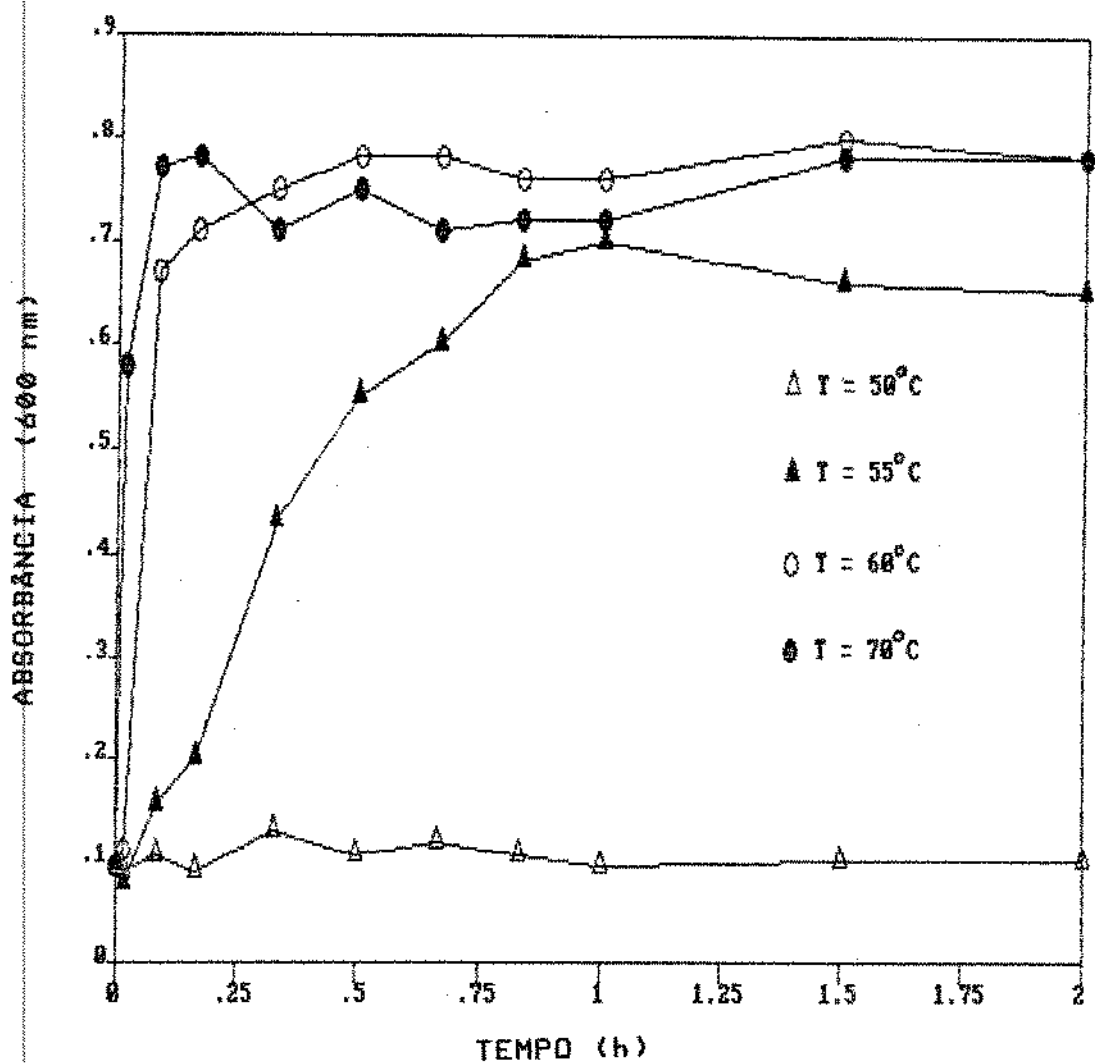


Figura 16: Efeito do tratamento térmico a pH 4,5 sobre a capacidade floculadora de *L. fermentum* FTPT 1405

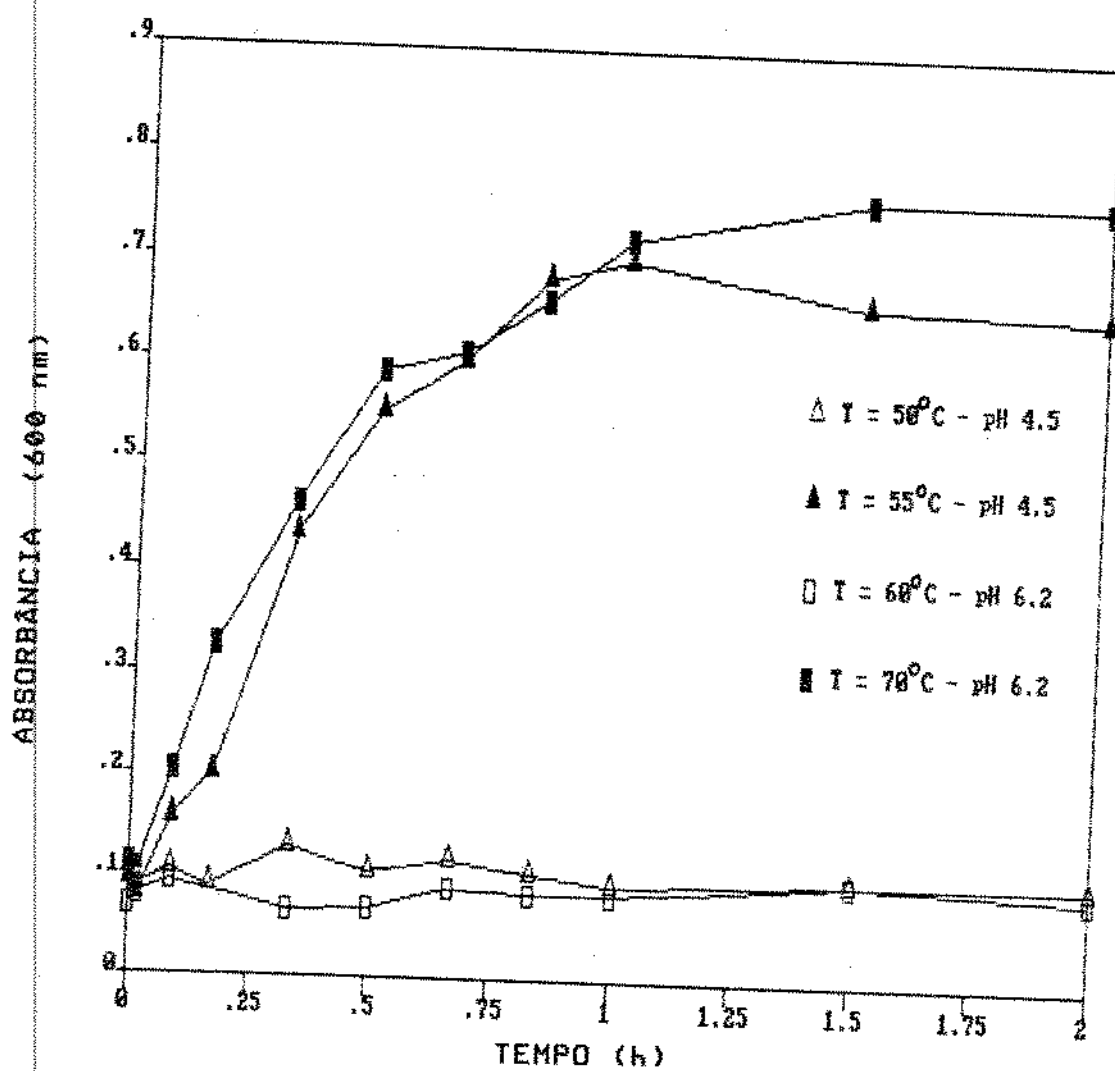


Figura 17: Efeito do tratamento térmico sobre a capacidade floculadora de L. fermentum FTPT 1405

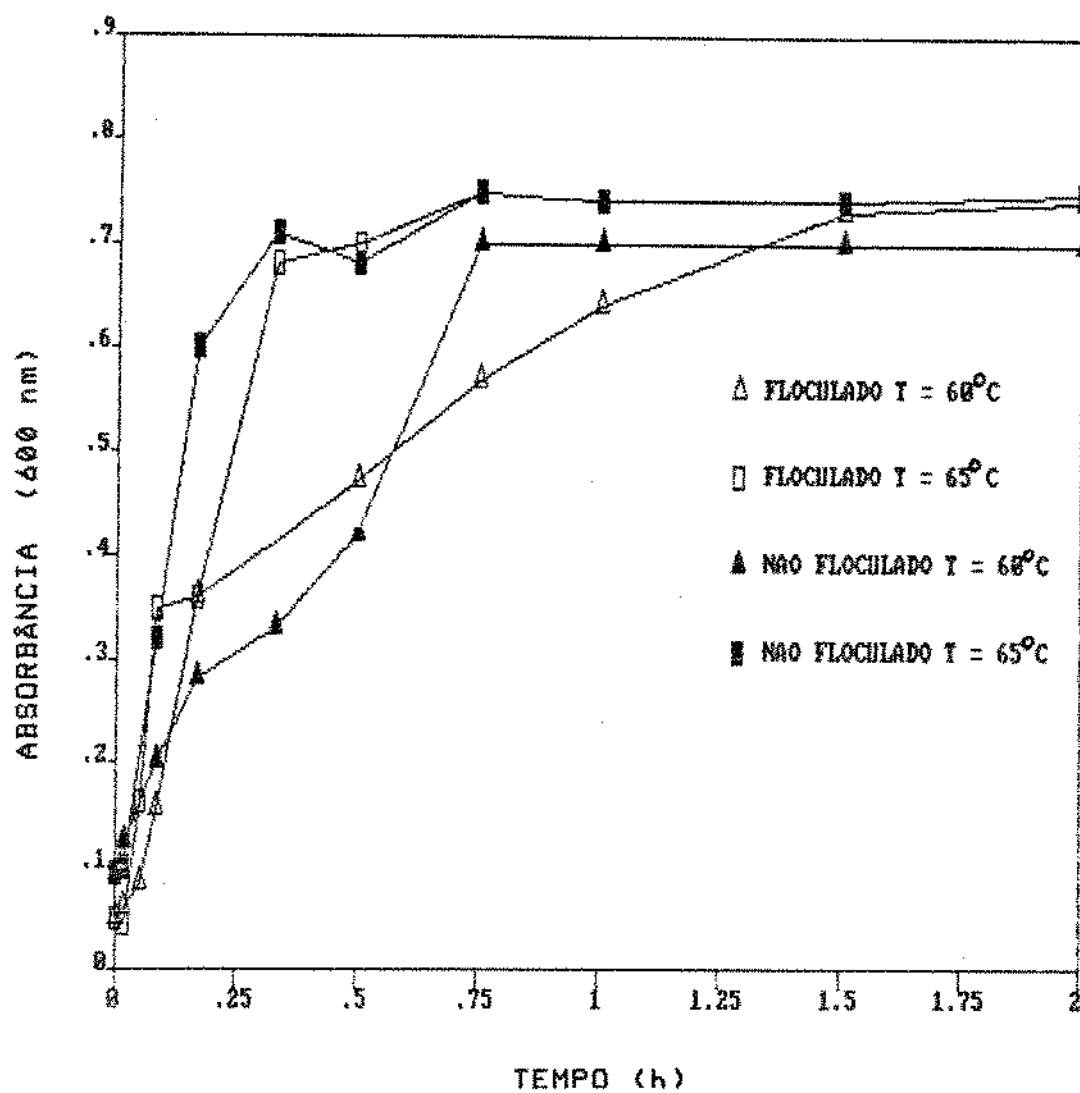


Figura 18: Desfloculação térmica das células de *Sacch. cerevisiae* FTPT 0472 floculada por *L. fermentum* floculante (pH 6,2)

4.7. EFEITO DO TRATAMENTO ÁCIDO SOBRE O CRESCIMENTO DA CULTURA FLOCULENTE DE L. fermentum

O tratamento ácido das células provocou o retardamento do crescimento da cultura floculante L. fermentum FTPT 1405 conforme demonstrado nas figuras 19, 20 e 21. A curva de crescimento em pH 4,5 foi considerada controle, uma vez que o pH nas dornas de fermentação, geralmente, encontra-se nessa faixa.

Na tabela 4, observamos que a constante específica de crescimento (μ) manteve-se relativamente constante, variando entre 0,33 e 0,35 h^{-1} no tratamento ácido em meio MRS sob agitação. Entretanto, o parâmetro latência -L- (LODGE & HINSHELWOOD, 1943 -modificado conforme apresentado no apêndice) aumentou com a diminuição do pH e com o aumento do tempo de tratamento. O parâmetro fator de latência -R- (IBARRA & YOKOYA, 1986) apresentou uma tendência descendente em função do abaixamento do pH e do prolongamento do tratamento.

Constatou-se que após um período de 2 horas de tratamento a valores de pH 3,0, 2,5 e 2,0 em meio MRS sob agitação, a bactéria floculante apresentou uma expansão progressiva da fase de latência de aproximadamente 4 até 6,5 horas (R de 0,25 a 0,12).

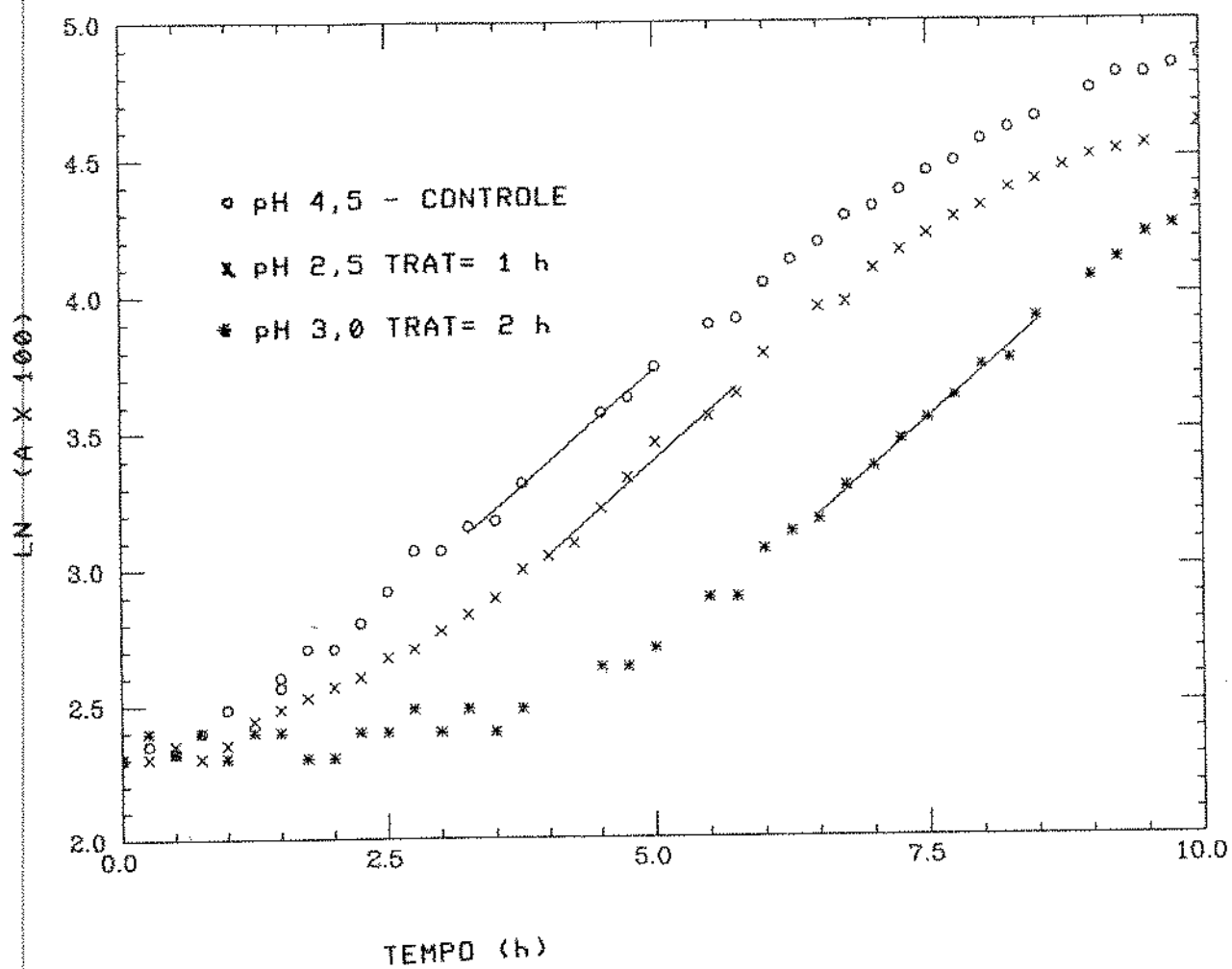


Figura 19: Efeito do tratamento ácido a pH 3,0 sobre o crescimento de L. fermentum FTPT 1405 com agitação em caldo MRS

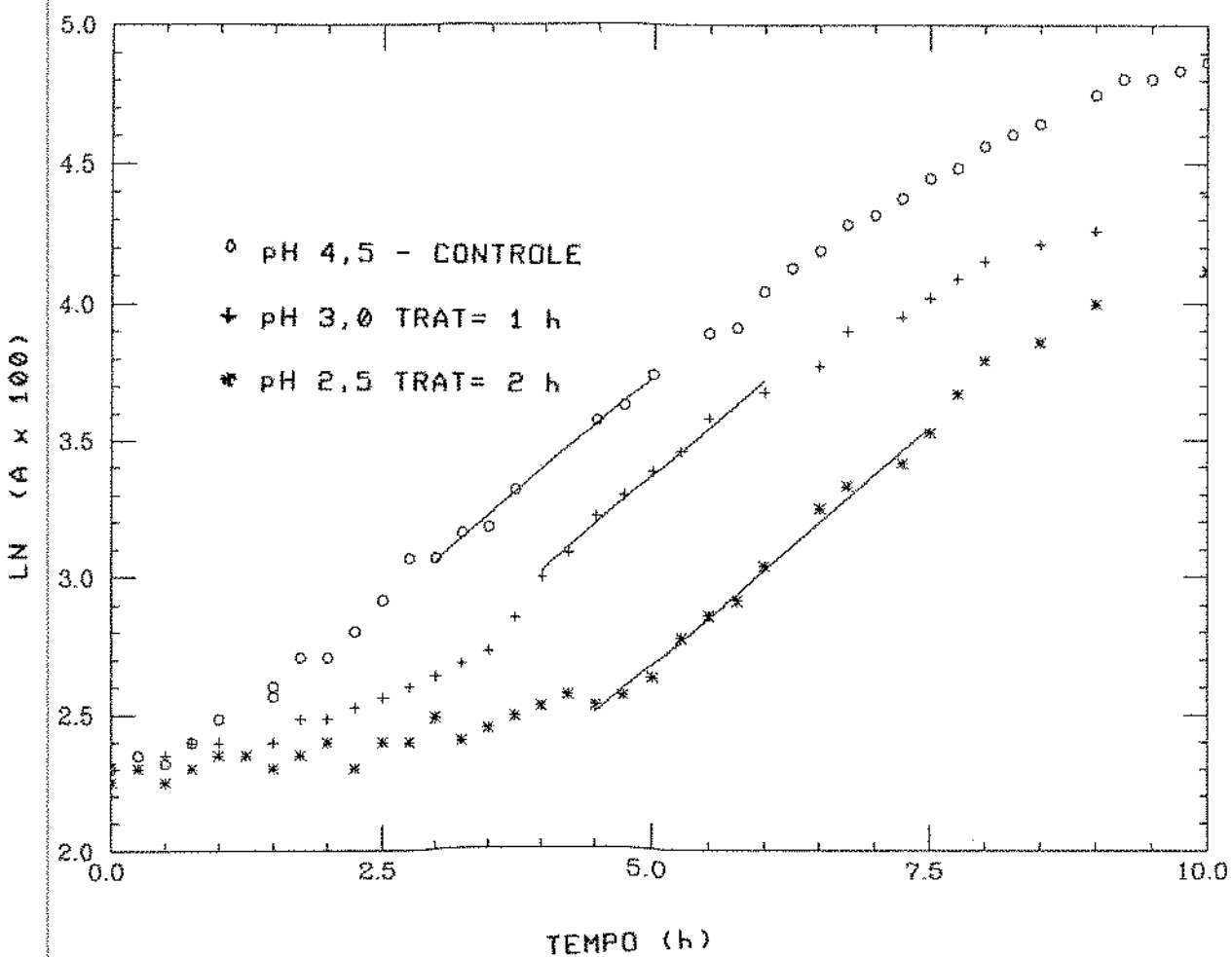


Figura 20: Efeito do tratamento ácido a pH 2,5 sobre o crescimento de *L. fermentum* FTPT 1405 com agitação em caldo MRS

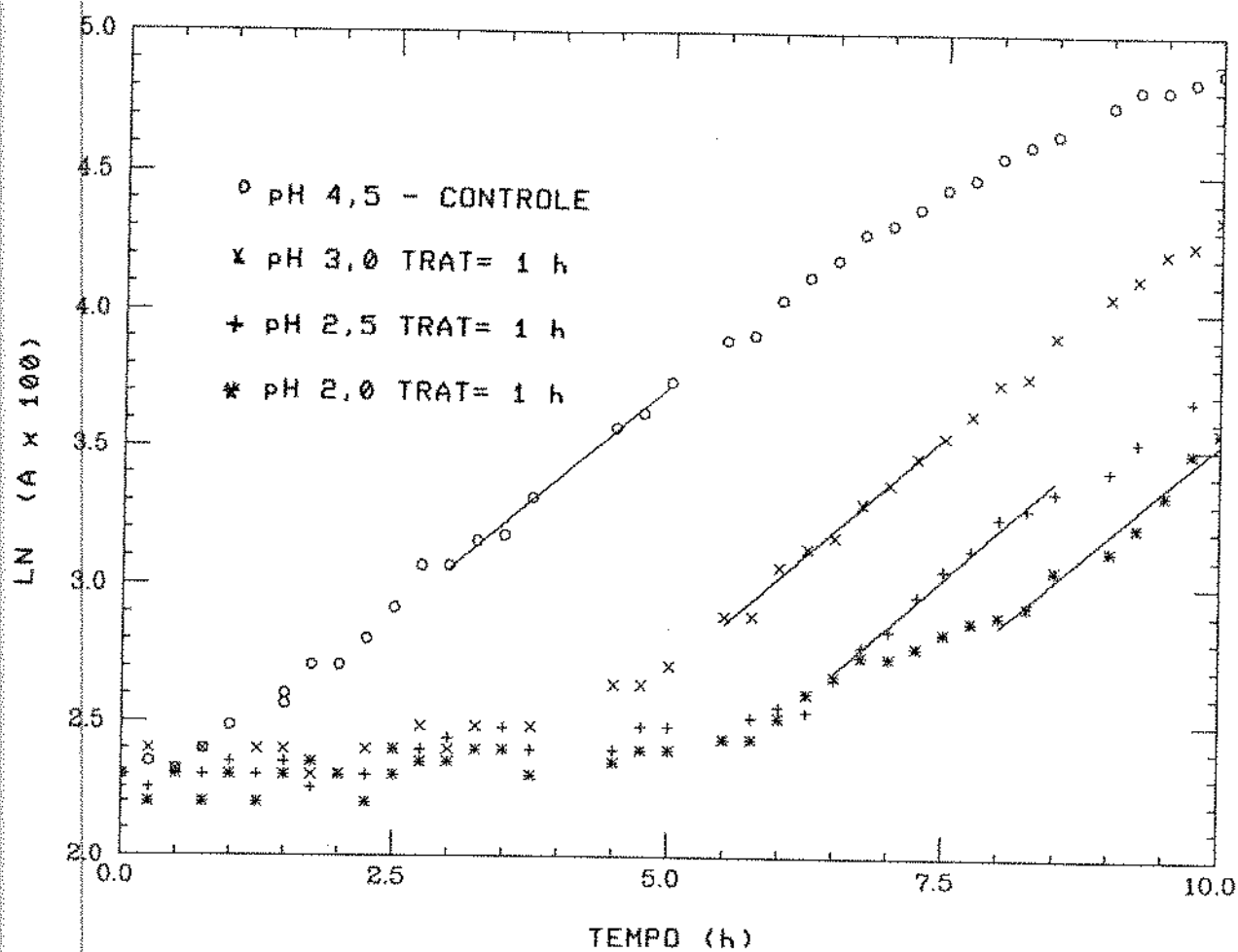


Figura 21: Efeito do tratamento ácido a pH 2,0 sobre o crescimento de L. fermentum FTPT 1405 com agitação em caldo MRS

TABELA 4 : Valores dos parâmetros: constante específica de crescimento máximo (μ); latência (L); e fator de latência (R) para tratamento ácido em meio MRS sob agitação sobre o crescimento de L. fermentum

TRATAMENTO		cte ESPECÍFICA	LATÊNCIA	FATOR DE
ÁCIDO		DE CRESCIMENTO		LATÊNCIA
pH	TEMPO (h)	(μ)	(L)	(R)
4,5	0	0,3348	0,7518	0,7775
3,0	1	0,3529	1,8912	0,5130
3,0	2	0,3484	3,9400	0,2534
2,5	1	0,3500	2,0451	0,5047
2,5	2	0,3485	2,1452	0,2677
2,0	0	0,3392	4,0654	0,2518
2,0	1	0,3474	5,2442	0,1617
2,0	2	0,3324	6,3240	0,1222

O tratamento ácido em meio MRS sem agitação foi menos eficiente que o mesmo tratamento com agitação (Figuras 22 e 23). No entanto, a velocidade de crescimento permaneceu relativamente constante entre 0,32 e 0,36, com exceção do tratamento a pH 2,0 por 2 h que apresentou um decréscimo no valor de μ (Tabela 5).

O tratamento a pH 3,0 e 2,5 não apresentaram fase de latência (L = 0) semelhante ao resultado obtido para o controle a pH 4,5. Somente a pH 2,0 observou-se um período de latência, ou seja, aproximadamente 1,5 horas para um tratamento de 1 hora e de 4 horas para o tratamento por 2 horas (Tabela 5). O fator de latência mostrou uma tendência descendente nos tratamentos a pH 2,0, enquanto, manteve-se próximo de 1,0 nos demais tratamentos.

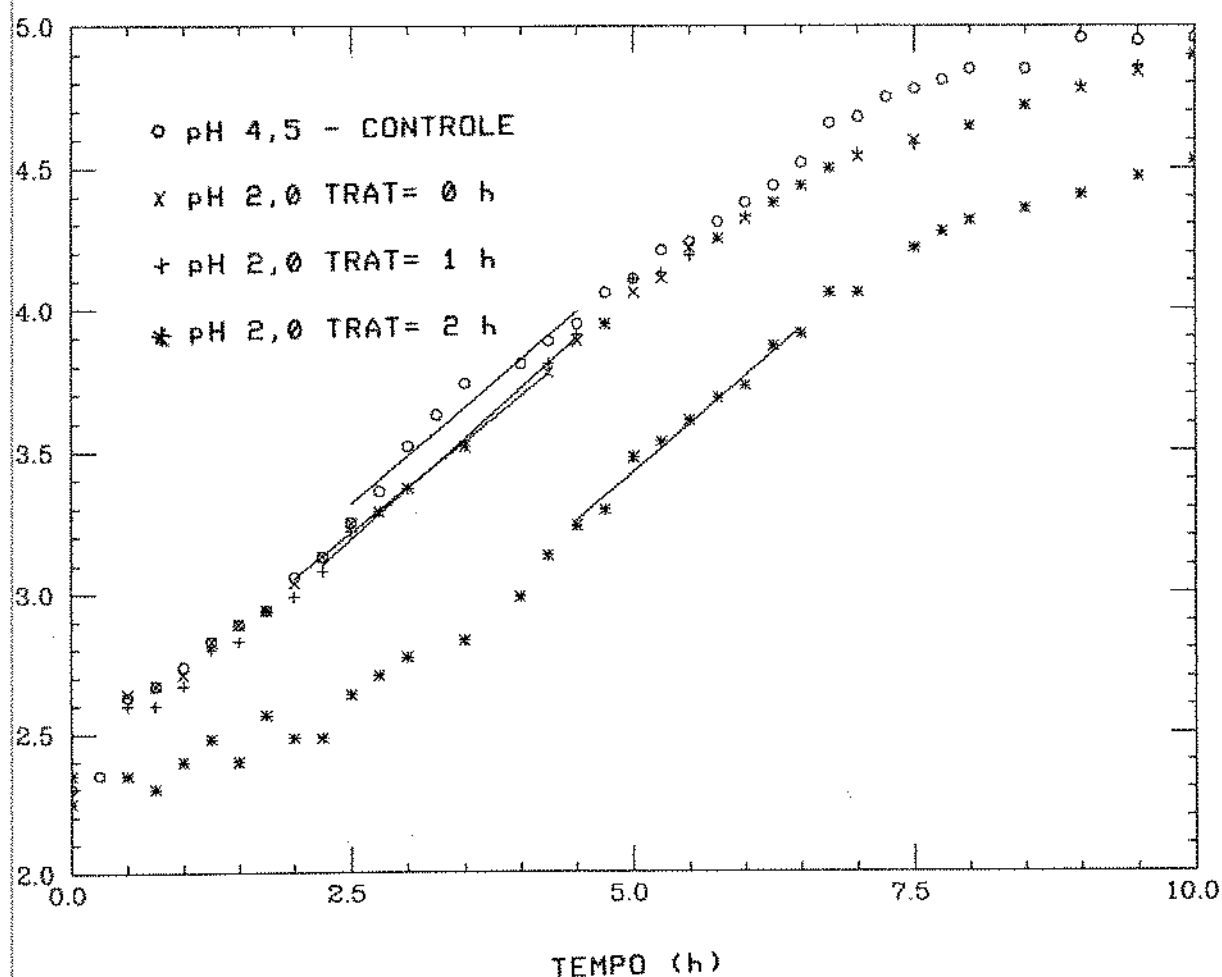


Figura 22: Efeito do tratamento ácido (1 hora) sobre o crescimento de *L. fermentum* FTPT 1405 sem agitação em caldo MRS

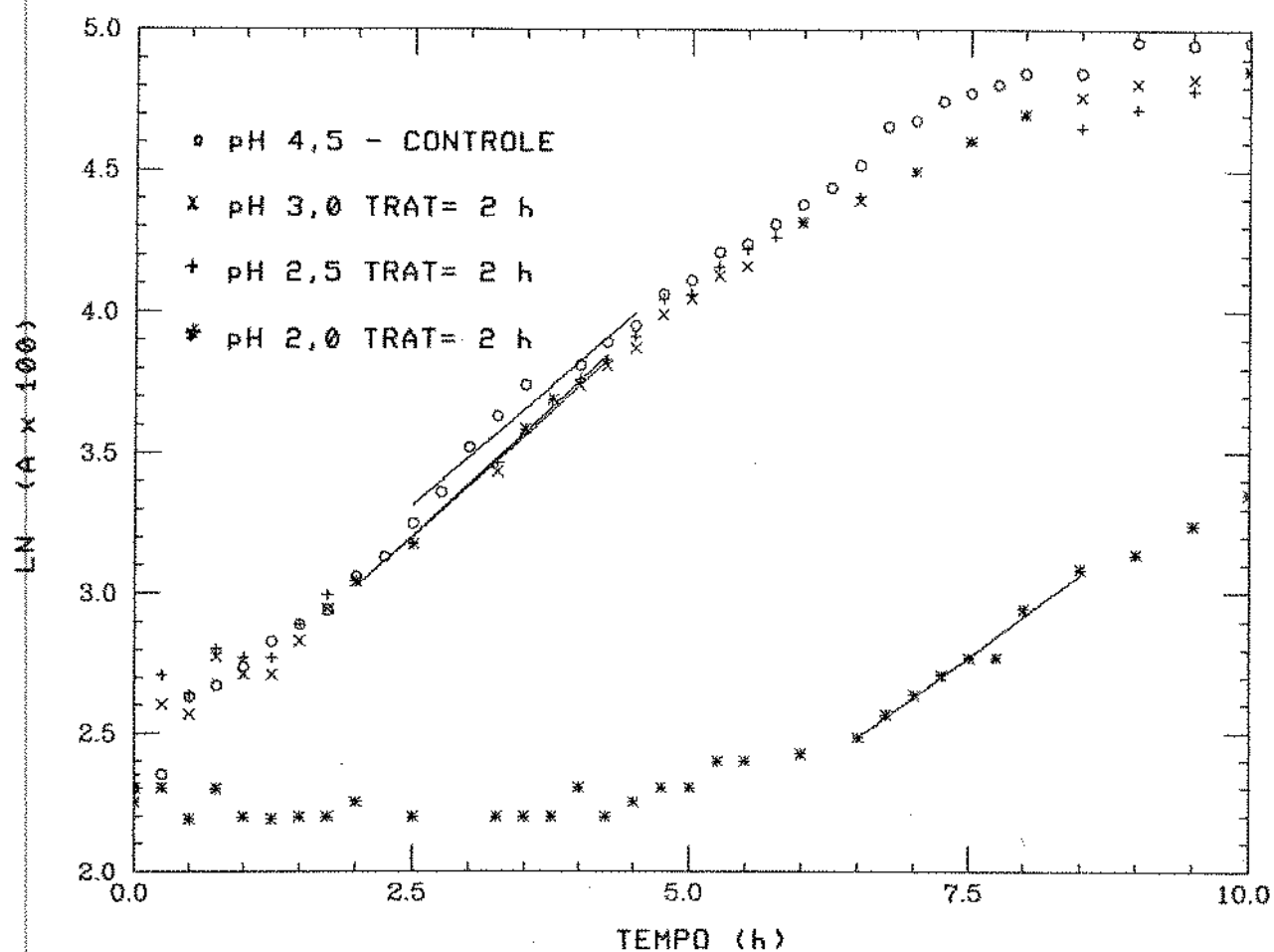


Figura 23: Efeito do tratamento ácido (2 horas) sobre o crescimento de L. fermentum FTPT 1405 sem agitação em caldo MRS

TABELA 5 : Valores dos parâmetros: constante específica de crescimento máximo (μ); latência (L); e fator de latência (R) para tratamento ácido em meio MRS sem agitação sobre o crescimento de L. fermentum

TRATAMENTO		cte ESPECÍFICA	LATÊNCIA	FATOR DE
ÁCIDO		DE CRESCIMENTO		LATÊNCIA
pH	TEMPO (h)	(μ)	(L)	(R)
4,5	0	0,3386	0	1,1813
3,0	1	0,3202	0	1,0643
3,0	2	0,3567	0	1,0087
2,5	1	0,3344	0,1306	0,9547
2,5	2	0,3652	0,1572	0,9442
2,0	1	0,3379	1,5233	0,5977
2,0	2	0,2899	3,7014	0,1916

Nas figuras 24 e 25, observa-se que o efeito do tratamento ácido feito sobre as células bacterianas suspensas em tampão e sob agitação foi mais severo. Isso pode indicar que o abaixamento do pH e a permanência das células em tampão, ou seja, sem nutrientes provocaram um choque, levando a danos irreversíveis, considerando a diminuição da taxa específica de crescimento (μ), de acordo com resultados apresentados na tabela 6.

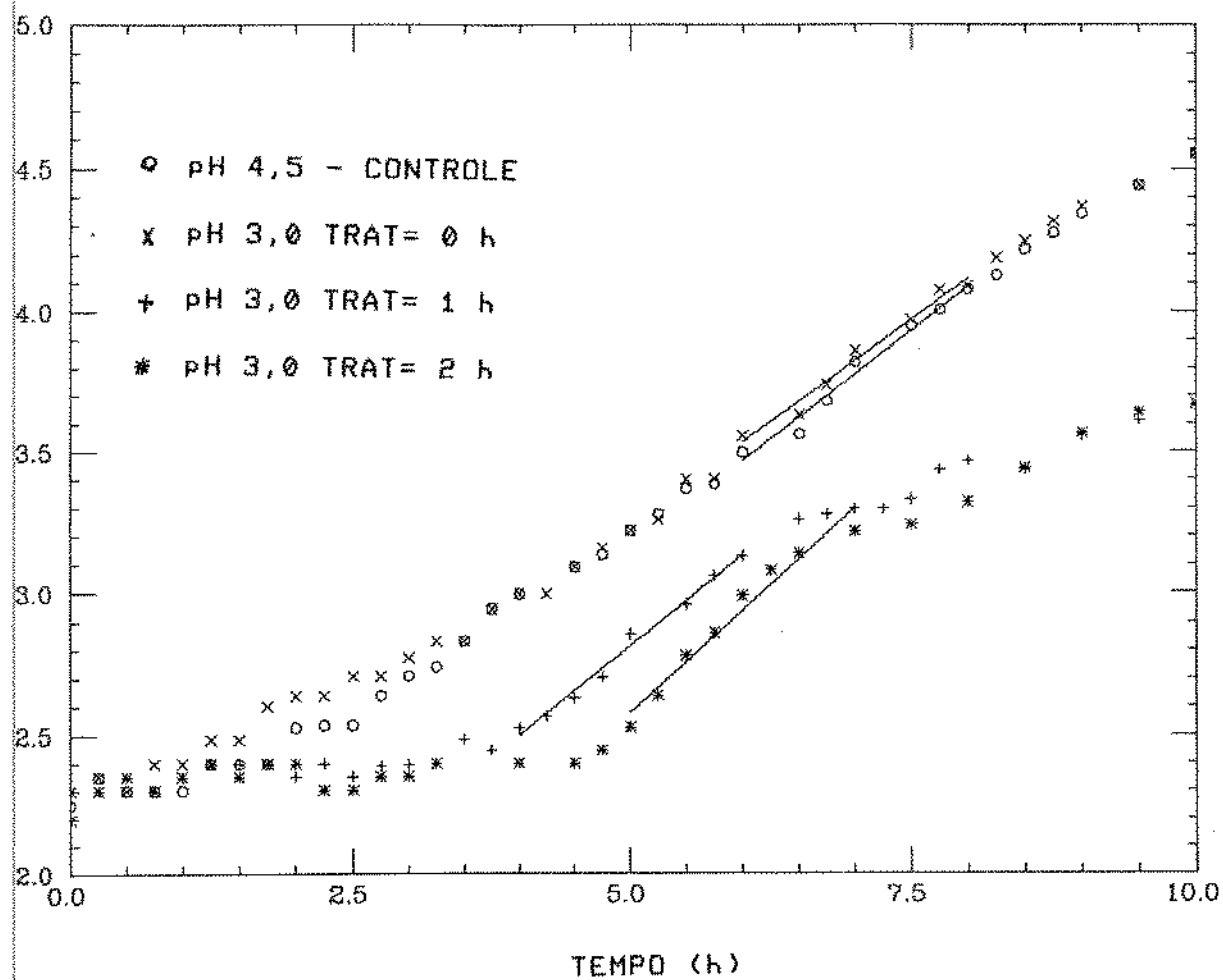


Figura 24: Efeito do tratamento ácido a pH 3,0 sobre o crescimento de L. fermentum FTPT 1405 com agitação em tampão citrato 0,05 M

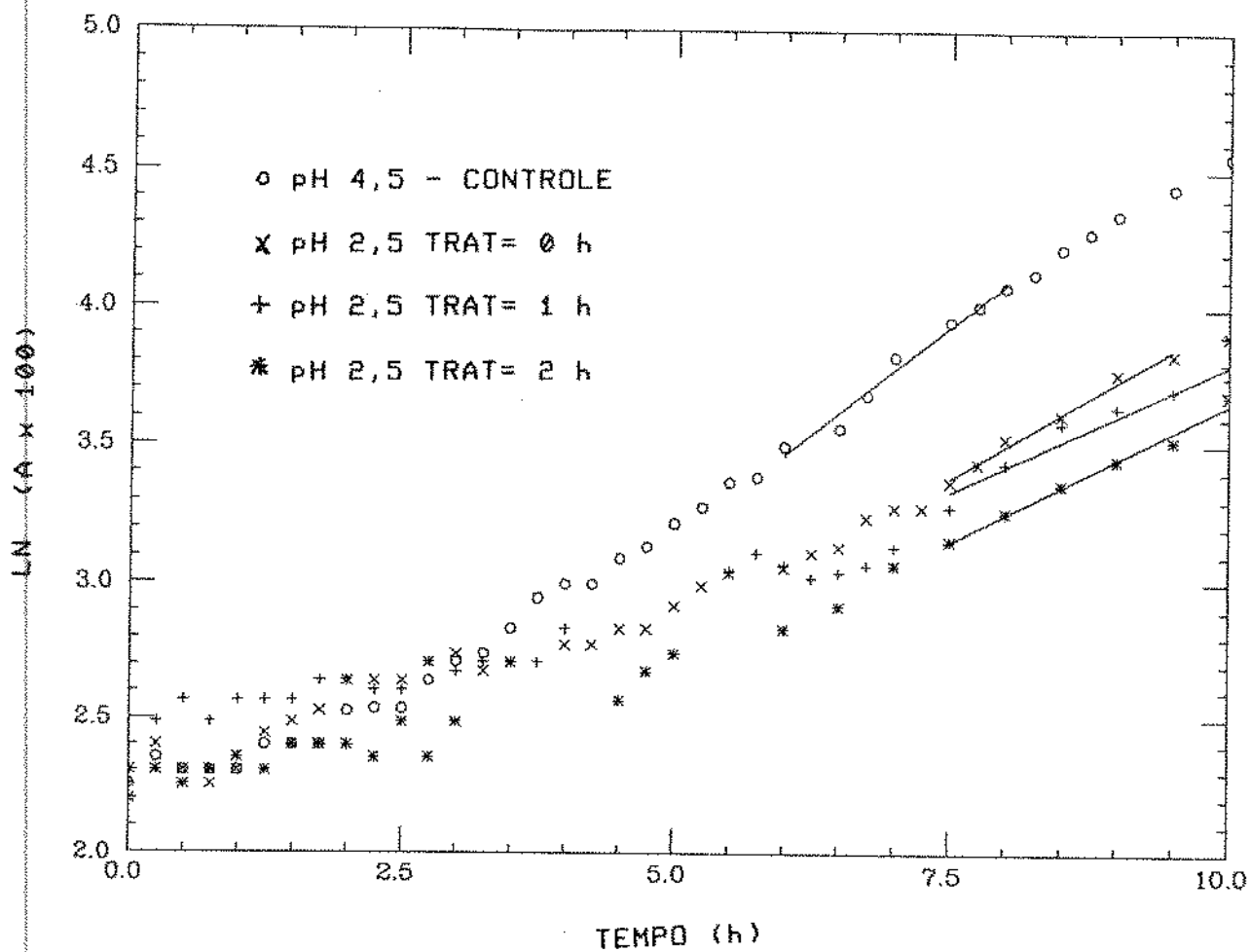


Figura 25: Efeito do tratamento ácido a pH 2,5 sobre o crescimento de *L. fermentum* FTPT 1405 com agitação em tampão citrato 0,05 M

TABELA 6 : Valores dos parâmetros: constante específica de crescimento máximo (μ); latência (L); e fator de latência (R) para tratamento ácido em tampão citrato 0,05 M sob agitação sobre o crescimento de L. fermentum

TRATAMENTO		Cte ESPECÍFICA	LATÊNCIA	FATOR DE
ÁCIDO		DE CRESCIMENTO		LATÊNCIA
pH	TEMPO (h)	(μ)	(L)	(R)
4,5	0	0,3118	2,1090	0,5181
3,0	0	0,2981	1,4148	0,6559
3,0	1	0,3178	3,3801	0,3416
3,0	2	0,3606	4,2396	0,2168
2,5	0	0,2344	2,4403	0,5644
2,5	1	0,1841	2,1789	0,6695
2,5	2	0,1995	3,2278	0,5252

6. DISCUSSÃO

A capacidade flocculadora de Lactobacillus fermentum foi evidenciada através da redução drástica da leitura de absorbância do sobrenadante. Adaptamos a metodologia que utiliza a medida da absorbância residual de STRATFORD & KEENAN (1987) para se trabalhar com cultura mista, a qual mostrou resultados satisfatórios na constatação da ocorrência da floculação, garantindo reprodutibilidade.

Observamos que algumas linhagens de L. fermentum são capazes de flocular leveduras, enquanto outras não, conforme apresentado na Tabela 1. Tais resultados estão de acordo e complementam as observações feitas por OLIVA-NETO (1990) para o gênero Lactobacillus. As linhagens flocculentas agregaram as células de leveduras tanto de Saccharomyces cerevisiae FTPT 0472 proveniente de usinas de açúcar e álcool como células preparadas a partir de uma cultura isolada de fermento comercial para panificação denominada F1 (Figura 1).

As bactérias consideradas flocculentas apresentaram diferenças quanto a força flocculadora (Tabela 1). Isto pode ser devido a existência de um número maior de sítios de interação com as células de leveduras nas linhagens fortemente flocculentas do que aquelas com menor poder flocculante.

A existência de linhagens flocculentas e não flocculentas de L. fermentum 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 linhagens floculentas pode explicar o fato destas últimas passarem a apresentar, repentinamente, problemas de floculação. Isso seria plausível, uma vez que segundo GALLO (1990) a predominância de espécies contaminantes varia durante a safra analisada.

Neste estudo, observamos que a capacidade floculante pode ser perdida durante o estoque e subcultivo das culturas, uma vez que, 2,0 % das colônias isoladas da linhagem floculenta selecionada L. fermentum FTPT 1405 perderam a propriedade floculante, o que sugere a instabilidade desta característica.

A característica floculante, provavelmente, é determinada geneticamente e pode estar relacionada com herança plasmidial, em função de sua instabilidade, relativamente, elevada. Esta 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 da coagulação da caseína, etc. Não se pode, porém, descartar a hipótese de herança cromossômica, sendo necessários estudos genéticos para esclarecer o mecanismo de transmissão desta característica.

Neste trabalho, constatamos que a presença de íons cálcio e agitação da suspensão de célula são necessários para que a floculação ocorra, confirmando a observação de YOKOYA (1989).

Na presença de íons cálcio (10^{-3} M), as leveduras foram totalmente floculadas nos valores de pH 3,0; 4,5 e 6,2 (Figura 1).

Os íons manganês e magnésio foram capazes de promover a floculação total de leveduras por L. fermentum em concentrações acima de 10^{-2} M e 10^{-1} M, respectivamente, a pH 6,2. Enquanto outros cátions mono e divalentes não, conforme indicado nas figuras 2 e 3. No entanto, o efeito promotor desses íons não foi observado a pH 3,0 (Figura 6). Em pH 4,5 (Figura 8), acima de determinadas concentrações estes íons passaram a ter um efeito inibidor da agregação (10^{-1} M para Mn^{2+} e 2×10^{-1} M para Mg^{2+}).

Estes resultados sugerem que o requerimento por íons cálcio é específico, considerando que manganês e magnésio podem promover a floculação somente em condições de pH próximo da neutralidade. Tais efeitos da presença de íons manganês e magnésio são comparáveis com aqueles observados por STRATFORD & KEENAN (1987) para a floculação por leveduras floculentas. Estes autores sugeriram que nestas condições de pH, estes íons são capazes de liberar o cálcio existente ligado à parede celular que torna-se, então, disponível para a interação.

Segundo YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) em condições de pH extremos ($< 2,0$ e $> 12,0$) não havia a formação de flocos por bactéria floculante. Isto foi confirmado pela adição de um ácido forte H_2SO_4 0,2 N e uma base forte NaOH 0,2 N que impediram a ocorrência da floculação indicado na Tabela 2.

Neste trabalho, verificamos que somente havia floculação a pH 6,2 e 3,0 após a adição de íons cálcio (Figura 7). Em pH 4,5, observamos um certo grau de floculação sem adição

de cálcio, isto pode estar associado a vários fatores como: (1) modificação estrutural das moléculas envolvidas direta ou indiretamente que favoreçam a interação das células pela formação de outros tipos de ligação; (2) alteração na estrutura da parede que levaria à liberação de íons cálcio ligados que estariam, então, disponíveis para a interação; (3) protonação de grupamentos carregados negativamente que favoreceria a aproximação das células pela redução da repulsão eletrostática; dentre outros.

Esta última possibilidade pode envolver a protonação dos grupos carboxílicos das proteínas da parede abaixo de pH 4,5 que reduziria a repulsão eletrostática conforme sugestão de FORSTER et al. (1985). ARNOLD (1981), através da avaliação da estrutura da parede celular de leveduras, descreveu as alterações sofridas por esta estrutura, considerando que algumas linhagens de Sacch. cerevisiae mostraram uma dependência pronunciada do pH, sendo que na região de pH 4,0 existia uma radical mudança de carga negativa para carga positiva.

A perda da capacidade floculante após o tratamento com pronase E de Streptomyces griseus das células de L. fermentum, sugere que o fator de floculação possui natureza protéica, além de apresentar termolabilidade, confirmando os resultados obtidos por YOKOYA & OLIVA-NETO (1991).

Estes resultados possuem semelhanças com os encontrados por CONWAY & KJELLEBERG (1989), uma vez que o fator de adesão responsável pela colonização da linhagem 737 de L. fermentum ao epitélio gástrico de camundongos era sensível ao tratamento

térmico e com pronase E, indicando sua natureza proteica, apesar deste fator ser encontrado no sobrenadante da cultura. Deve-se observar também a semelhança entre o determinante adesivo descrito por HENRIKSSON et al (1991) que também possui natureza proteica e está fortemente ligado à parede celular de uma linhagem de L. fermentum capaz de se aderir à superfície epitelial gátrica de suínos.

Verificamos a desfloculação através da adição do carboidrato manose (Figura 11). A inibição por carboidratos encontra paralelismo em vários fenômenos de adesão celular como relatado por NISHIHARA & TORAYA (1987) E STRATFORD (1989) para a floculação por leveduras e FIRON et al. (1982) para a aderência de Escherichia coli na colonização do trato gastrointestinal de animais.

Muitas linhagens de enterobactérias possuem fímbrias adesivas que podem reconhecer e se ligar a receptores manose na superfície de células epiteliais. Tais bactérias podem aglutinar células de leveduras S. cerevisiae. Este teste tem sido utilizado para selecionar isolados bacterianos que possuem adesinas específicas para manose (DOUGLAS, 1987).

No caso da floculação por leveduras floculantes, vários autores (MIKI et al., 1982; NISHIHARA & TORAYA, 1987; 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 causada por L. fermentum, supondo que as mananas das leveduras compõem a parte ligante das mesmas na adesão com células de

bactérias.

Estas similaridades com outros fenômenos de agregação celular corroboram as considerações de ATKINSON & DAOUD (1976) e CALLEJA (1987) quanto a semelhança dos fatores e da maneira com que influenciam os vários processos de adesão celular. Este fato permite supor que os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com o modelo de interação específica proposto na literatura (MIKI et al., 1982) para explicar o mecanismo da floculação por leveduras, segundo o qual as células floculentas possuíam moléculas proteicas tipo lectinas que ligar-se-iam a resíduos das mananas das células adjacentes. Segundo este modelo, os íons agiriam como cofatores específicos na ativação da capacidade ligante destes componentes proteicos.

Neste trabalho, observamos que o tratamento ácido em meio MRS sobre as células de L. fermentum provocou, provavelmente, a injúria das células, uma vez que nas curvas de crescimento observou-se a similaridade das inclinações das retas obtidas para a fase logarítmica, indicando que a taxa de crescimento é semelhante, apesar do alargamento da fase de latência. Estas observações foram comprovadas através do cálculo dos valores da constante específica de crescimento máximo (μ), latência (L) e fator de latência (R) para cada tipo e tempo de tratamento apresentados nas tabelas 4 e 5.

O tratamento ácido sobre a bactéria floculante mostrou-se eficiente no retardamento do crescimento desta cultura, apresentando um aumento progressivo da fase de latência proporcional ao abaixamento do pH e ao tempo de exposição a esta

condição. Verificamos que a eficiência do tratamento a baixos valores de pH é dependente da agitação da suspensão.

O tratamento ácido sob agitação e em condição de escassez de nutrientes (células preparadas em tampão) apresentou resultados mais drásticos sugerindo que houve danos irreparáveis para as células em função do forte efeito redutor da velocidade de crescimento indicada na tabela 6.

De acordo com GALLO (1990), o tratamento com ácido sulfúrico no preparo do pé-de-cuba ("leite de leveduras") provoca uma redução percentual de 45,0 % na flora contaminante. Este autor indica que além da redução no número de contaminantes, o tratamento ácido também promoveria a injúria das células que cresceriam mais lentamente. Segundo as considerações de YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) de que um valor crítico entre o número de células de bactéria floculante e de leveduras deve ser alcançado para que ocorra a floculação, compreende-se que um tratamento ácido eficiente que proporcione um retardamento no crescimento do contaminante com capacidade floculante irá contribuir em muito para a redução do problema da floculação nas usinas.

6. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões foram obtidas:

- (1) células de leveduras Sacch. cerevisiae foram floculadas na presença de algumas cepas de Lactobacillus fermentum, enquanto na presença de outras não; a capacidade floculante é uma característica instável, podendo ser perdida durante o subcultivo e armazenamento destas linhagens;
- (2) a floculação é intensificada pela adição de íons cálcio. A adição de íons manganês e magnésio promove a floculação em valor de pH 6,2, enquanto outros íons não são capazes de promover a floculação;
- (3) Em pH 4,5, a ocorrência da floculação é favorecida, sem a adição de íons cálcio. Neste valor de pH, concentrações mais altas de magnésio e manganês inibem a floculação. Ao contrário em 3,0, somente a adição de íons cálcio tem efeito promotor da floculação
- (4) A presença do carboidrato manose provoca nítida inibição da floculação, enquanto outros carboidratos testados não tem este efeito;

(5) O tratamento térmico e com pronase E de Streptomyces griseus resulta na perda da capacidade floculadora da bactéria floculante. Ao contrário, estes mesmos tratamentos sobre as células de leveduras não afetaram a floculação;

(6) As evidências indiretas obtidas neste trabalho permitem a proposição do seguinte modelo de mecanismo para a floculação: as linhagens floculentas de L. fermentum possuiriam moléculas de natureza proteica intimamente ligadas à superfície celular com propriedades semelhantes às lectinas que poderiam se ligar a resíduos de manose componentes das fosfomananas das paredes celulares de leveduras adjacentes.

BIBLIOGRAFIA

1. AMORIM, H.V. & OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: Como evitá-la. Alcool e Açúcar 5: 12-18, 1982
2. ARNOLD, W.N. Physical aspects of the yeast cell envelope. In: ARNOLD, W.N. ed. Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysics and ultrastructure. Florida, CRC Press, Inc. 1981
3. ATKINSON, B. & DAOUD, I.S. Microbial flocs and flocculation in fermentation process engineering. Adv. Biochem. Eng. 4: 41-124, 1976
4. BEAVAN, M.J.; BELK, D.M.; STEWART, G.G.; ROSE, A.H. Changes in electrophoretic mobility and lytic enzyme activity associated with development of flocculating ability in Saccharomyces cerevisiae. Can. J. Microbiol. 25: 888-895, 1979
5. BROOKER, B.E. & FULLER, R. Adhesion of Lactobacilli to the chicken crop epithelium. J. Ultrastruc. Res. 52: 21-31, 1975
6. CALLEJA, G.B. Cell aggregation. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. eds The Yeasts 2.ed. London, Academic Press, 1987. v.2. 309 p.
7. CONWAY, P.L. & KJELLEBERG, S. Protein-mediated adhesion of Lactobacillus fermentum strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. J. Gen. Microbiol. 135: 1175-1186, 1989
8. DOUGLAS, L.J. Adhesion to surfaces. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. eds. The Yeasts. 2 ed. London, Academic Press, 1987, v.2. 309 p.
9. EDDY, A.A. Flocculation characteristics of yeasts. I: Comparative survey of various strains of Saccharomyces cerevisiae. J. Inst. Brew. 61: 307-312, 1955a

10. EDDY, A.A. Flocculation characteristics of yeasts. II: Sugars as dispersing agents. J. Inst. Brew. 61: 313-317, 1955b
11. ESSER, K. & KUES, U. Flocculation and its implication for biotechnology. Proc. Biochem. 18: 21-23, 1983
12. FIRON, N.; OFEK, J.; SHARON, N. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Com. 105: 1426-1432, 1982
13. FIRON, N.; OFEK, J.; SHARON, N. Carbohydrate specificity of the surface lectins of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Salmonella typhimurium. Carbohydr. Res. 120: 235-249, 1983
14. FIRON, N.; ASHKENAZI, S.; MIRELMAN, D.; OFEK, I.; SHARON, N. Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated Escherichia coli to yeast and intestinal epithelial cells. Infect. Immunol. 55: 472-476, 1987
15. FORSTER, C.F.; KNIGHT, N.J.B.; WASE, D.A.J. Flocculating agents of microbial origin. Adv. Biotechnol. Proc. 4: 211-240, 1985
16. GALLO, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1990. 388 p. Tese (Dout.) - Univ. Est. Campinas
17. HENRIKSSON, A.; SZEWZYK, R.; CONWAY, P.L. Characteristics of the adhesive determinants of Lactobacillus fermentum 104. Appl. Environ. Microbiol. 57: 499-502, 1991
18. HOLMBERG, S. & KIELLAND-BRANDT, M.C. A mutant of Saccharomyces cerevisiae temperature sensitive for flocculation. Influence of oxygen and respiratory deficiency on flocculence. Carlsberg. Res. Commun. 43: 37-47, 1978
19. HOOD, S.K. & ZOTTOLA, E.A. Electron microscopic study of the adherence properties of Lactobacillus acidophilus. J. Food Sci. 52: 791-792, 1987

20. IBARRA, J.J. & YOKOYA, F. Estimation of chicken microbial load using the growth curve parameters of chicken microflora. Poultry Sci. 65: 58-62, 1986
21. JAYATISSA, P.M. & ROSE, A.H. Role of wall phosphomannan in flocculation of Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 96: 165-174, 1976
22. KAJI, D.A. Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1989. 136 p. Tese (mestr.) - Univ. Est. Campinas.
23. KHIN, J.C.; MASY, C.L.; MESTDAGH, M.M. Yeast flocculation: competition between nonspecific repulsion and specific bonding in cell adhesion. Can. J. Microbiol. 54: 773-778, 1988a
24. KHIN, J.C.; MASY, C.L.; MESTDAGH, M.M.; ROUXHET, P.G. Yeast flocculation: factors affecting the measurement of flocculence. Can. J. Microbiol. 54: 779-781, 1988b
25. LEWIS, C.W.; JOHNSTON, J.R.; MARTIN, P.A. The genetics of yeast flocculation. J. Inst. Brew. 82: 158-160, 1976
26. LIN, J.H.C. & SAVAGE, D.C. Host specificity of the colonization of murine gastric epithelium by Lactobacilli. FEMS. Microbiol. Lett. 24: 67-71, 1984
27. LIS, H. & SHARON, N. lectins as molecules and as tools. Ann. Rev. Biochem. 55: 35-69, 1986
28. LODGE, R.M. & HINSHELWOOD, C.N. J. Chem. Soc. 213, 1943
29. LYONS, T.P. & HOUGH, J.S. Flocculation of brewers yeasts. J. Inst. Brew. 76: 546-571, 1970
30. MARFEY, P.; SARENSEN, S.B.; OTTESEN, M. Studies on yeast flocculation: comparison of enzymatic digests of flocculent and nonflocculent cells of Saccharomyces carlsbergensis. Carlsberg. Res. Commun. 42: 353-367, 1977
31. McEUEEN, A.R. Manganese metalloproteins and manganese activated enzymes. Inorg. Biochem. 3: 314-343, 1982

32. 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. J. Bacteriol. 150: 878-889, 1982a
33. MILL, P.J. The nature of the interactions between flocculent cells in the flocculation of Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 35: 61-68, 1964
34. NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Induction of floc-forming ability in brewer's yeasts. J. Ferment. Technol. 54: 356-360, 1976
35. NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Effect of chemical modification of cell surface components of a brewers yeast on the floc-forming ability. Arch. Microbiol. 115: 19-23, 1977
36. NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Flocculation of cells walls of brewers yeast and effects of metal ions, protein-denaturants and enzymes treatments. Arch. Microbiol. 131: 112-115, 1982
37. OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1990. 207 p. Tese (mestr.) - Univ. Est. Campinas.
38. ORIZU, I.S. & GANNON, J.E. Co-sedimentation of lactic-acid bacteria and Saccharomyces spp from alcoholic fermentation of non-sterile sweet sorghum using yeast recycle by autoflocculation. In: ABSTRACTS OF THE 90th ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Anaheim, Calif. 13-17 maio, 1990. Washington, 1990. p 265
39. PEDERSEN, K. & TANNOCK, G.W. Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. 55: 279-283, 1989
40. REEKE, G.N.; BECKER, W.; CUNNINGHAM, B.A.; GUNTHER, G.R.; WANG, J.L.; EDELMAN, G.M. Relationships between the structure and activities of concanavalina A. Ann. N. Y. Acad. Sci. 234: 369-382, 1974

41. ROSE, A.P. Recent Research on Industrially Important Strains of Saccharomyces. In SKINNER, F.A.; PASSMORE, S.M. & DAVENPORT, R.R. eds Biology and Activities of Yeasts. Academic Press, Inc. Londres, 1980 p
42. RUSSELL, I.; STEWART, G.G.; READER, H.P.; JOHNSTON, J.R.; MARTIN, P.A. Revised nomenclature of genes that control yeast flocculation. J. Inst. Brew. 86: 120-121, 1980
43. SAVAGE, D.C. Mechanisms by which indigenous microorganisms colonize gastrointestinal epithelial surfaces. Prog. Food Nutr. Sci. 7: 65-74, 1983
44. 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: 336-341, 1976.
45. SHARON, N. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. FEBS Lett. 217: 145-157, 1987
46. SHARON, N. & LIS, H. lectins as cell recognition molecules. Science 246: 227-234, 1989
47. SHERMAN, L.M. & SAVAGE, D.C. Lipoteichoic acids in Lactobacillus strains that colonize the mouse gastric epithelium. Appl. Environ. Microbiol. 52: 302-304, 1986
48. STEWART, G.G.; RUSSELL, I.; GARRISON, I.F. Some considerations of the flocculation characteristics of ale and lager yeast strains. J. Inst. Brew. 81: 248-257, 1975
49. STEWART, G.G. & RUSSELL, I. The identification, characterization and mapping of a gene for flocculation in Saccharomyces sp. Can. J. Microbiol. 23: 441-447, 1977
50. STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. Yeasts 5: 487-496, 1989a.
51. STRATFORD, M. Evidence for two mechanisms of flocculation in Saccharomyces cerevisiae. Yeasts 5 (spec. iss.): 441-445, 1989b

52. STRATFORD, M. & BRUNDISH, H.M. Yeast flocculation: cationic inhibition. Yeasts 6: 77-86, 1990.
53. STRATFORD, M.; COLEMAN, H.P.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: a dynamic equilibrium. Yeasts 4: 199-207, 1988
54. STRATFORD, M. & KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: kinetics and collision theory. Yeasts 3: 201-206, 1987.
55. STRATFORD, M. & KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: quantification. Yeasts 4: 107-115, 1988
56. SUEGARA, N.; MOROTOMI, M.; WATANABE, T.; KAWAI, Y.; MUTAI, M. Behavior of microflora in the rat stomach: adhesion of Lactobacilli to the keratinized epithelial cells of the rat stomach in vitro. Infect. Immunol. 12: 173-179, 1975
57. TAYLOR, N.W. & ORTON, W.L. Effect of alkaline-earth metal salts on flocculence in Saccharomyces cerevisiae. J. Inst. Brew. 79: 294-297, 1973
58. TAYLOR, N.W. & ORTON, W.L. Calcium in flocculence of Saccharomyces cerevisiae. J. Inst. Brew. 81: 53-57, 1975
59. TAYLOR, N.W. & ORTON, W.L. Aromatic compounds and sugars in flocculation of Saccharomyces cerevisiae. J. Inst. Brew. 84: 113-114, 1978
60. YOKOYA, F. Microbiologia do processo de fermentação. In: EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.P.; GALLO, C.R. eds Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e tecnologia "André Tosello", 1989. p
61. YOKOYA, F. & OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por Lactobacillus fermentum. Rev. Microbiol. 22: 12-16, 1991

APÊNDICE 1

TABELA 1 : EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS CÁLCIO NA OCORRÊNCIA DA
FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS POR *Lactobacillus fermentum*
A pH 6.2 (CULTURA FTPT 0472)

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORVÂNCIA (600 nm)	FLOCULAÇÃO *
2 x 10 ⁻¹	0.09	+
10 ⁻¹	0.08	+
2 x 10 ⁻²	0.06	+
10 ⁻²	0.05	+
2 x 10 ⁻³	0.08	+
10 ⁻³	0.07	±
2 x 10 ⁻⁴	0.13	±
10 ⁻⁴	0.21	±
2 x 10 ⁻⁵	0.41	±
10 ⁻⁵	0.55	±
2 x 10 ⁻⁶	0.68	-
2 x 10 ⁻⁷	0.66	-

* (+) floculação total; (±) floculação parcial e (-) não há floculação

TABELA 2 : EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS CÁLCIO NA OCORRÊNCIA DA
FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS POR *L. fermentum* A pH 6.2
(CULTURA F1)

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORVÂNCIA (600 nm)	FLOCULAÇÃO
2 x 10 ⁻¹	0.12	±
10 ⁻¹	0.10	+
2 x 10 ⁻²	0.10	+
10 ⁻²	0.09	+
2 x 10 ⁻³	0.09	+
10 ⁻³	0.18	±
2 x 10 ⁻⁴	0.30	±
10 ⁻⁴	0.54	±
2 x 10 ⁻⁵	0.62	-
10 ⁻⁵	0.69	-
2 x 10 ⁻⁶	0.71	-

* (+) floculação total; (±) floculação parcial e (-) não há floculação

TABELA 3 : EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS MANGANÊS NA OCORRÊNCIA DA
FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS POR *L. fermentum* A pH 6.2
(CULTURA FTPT 0472)

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORBÂNCIA (600 nm)	FLOCULAÇÃO
2 x 10 ⁻¹	0.10	+
10 ⁻¹	0.09	+
2 x 10 ⁻²	0.08	+
10 ⁻²	0.06	+
2 x 10 ⁻³	0.35	±
10 ⁻³	0.44	±
2 x 10 ⁻⁴	0.53	±
10 ⁻⁴	0.64	±
2 x 10 ⁻⁵	0.68	-
10 ⁻⁵	0.67	-
2 x 10 ⁻⁶	0.70	-

* (+) floculação total; (±) floculação parcial e (-) não há floculação

TABELA 4 : EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS MAGNÉSIO NA OCORRÊNCIA DA
FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS POR *L. fermentum* A pH 6.2
(CULTURA FTPT 0472)

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORBÂNCIA (600 nm)	FLOCULAÇÃO
2 x 10 ⁻¹	0.10	+
10 ⁻¹	0.09	+
2 x 10 ⁻²	0.15	±
10 ⁻²	0.34	±
2 x 10 ⁻³	0.46	±
10 ⁻³	0.54	±
10 ⁻⁴	0.59	±
2 x 10 ⁻⁵	0.64	±
10 ⁻⁵	0.66	-
2 x 10 ⁻⁶	0.67	-

* (+) floculação total; (±) floculação parcial e (-) não há floculação

TABELA 5 : EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS MANGANÊS NA
OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS
POR *L. fermentum* A pH 6.2 (CULTURA F1)

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORBÂNCIA (600 nm)
2 x 10 ⁻¹	0.11
10 ⁻¹	0.11
2 x 10 ⁻²	0.11
10 ⁻²	0.15
2 x 10 ⁻³	0.42
10 ⁻³	0.69
2 x 10 ⁻⁴	0.66
10 ⁻⁴	0.69
2 x 10 ⁻⁵	0.66
10 ⁻⁵	0.70
2 x 10 ⁻⁶	0.68

TABELA 6 : EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS MAGNÉSIO NA
OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS
POR *L. fermentum* A pH 6.2 (CULTURA F1)

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORBÂNCIA (600 nm)
2 x 10 ⁻¹	0.14
10 ⁻¹	0.12
2 x 10 ⁻²	0.34
10 ⁻²	0.58
2 x 10 ⁻³	0.66
10 ⁻³	0.68
2 x 10 ⁻⁴	0.68
10 ⁻⁴	0.67
2 x 10 ⁻⁵	0.66
10 ⁻⁵	0.68

TABELA 7 : EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS CÁLCIO NA
OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS
POR *L. fermentum* A pH 4.5 (CULTURA F1)

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORBÂNCIA (600 nm)
2 x 10 ⁻¹	0.17
10 ⁻¹	0.15
2 x 10 ⁻²	0.14
10 ⁻²	0.13
2 x 10 ⁻³	0.13
10 ⁻³	0.12
2 x 10 ⁻⁴	0.14
10 ⁻⁴	0.17
2 x 10 ⁻⁵	0.21
10 ⁻⁵	0.34
0	0,47

TABELA 8 : EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS MANGANÊS NA
OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS
POR *L. fermentum* A pH 4.5 (CULTURA F1)

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORBÂNCIA (600 nm)
2 x 10 ⁻¹	0.39
10 ⁻¹	0.21
2 x 10 ⁻²	0.21
10 ⁻²	0.22
2 x 10 ⁻³	0.24
2 x 10 ⁻⁴	0.29
2 x 10 ⁻⁵	0.34
0	0,46

TABELA 9 : EFEITO DA PRESENÇA DE ÍONS MAGNÉSIO NA
OCORRÊNCIA DA FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS POR
L. fermentum A pH 4.5 (CULTURA F1)

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORVÂNCIA (600 nm)
2 x 10 ⁻¹	0.75
10 ⁻¹	0.57
2 x 10 ⁻²	0.46
10 ⁻²	0.42
2 x 10 ⁻³	0.39
10 ⁻³	0.39
2 x 10 ⁻⁴	0.45
10 ⁻⁴	0.45
2 x 10 ⁻⁵	0.45
10 ⁻⁵	0.39
0	0.47

TABELA 10 : EFEITO DA ADIÇÃO DE MANOSE SOBRE A CAPACIDADE

FLOCULANTE DE *L. fermentum*

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORBÂNCIA (600 nm)	DESFLOCULAÇÃO
10 ⁻¹	0.72	+
5 X 10 ⁻²	0.54	±
10 ⁻²	0.13	±
5 X 10 ⁻³	0.10	-
10 ⁻³	0.11	-
5 X 10 ⁻⁴	0.07	-
10 ⁻⁴	0.07	-
5 X 10 ⁻⁵	0.07	-
10 ⁻⁵	0.07	-
5 X 10 ⁻⁶	0.08	-
10 ⁻⁶	0.08	-

* (+) floculação total; (±) floculação parcial e (-) não há floculação

TABELA 11 : EFEITO DA ADIÇÃO DE MANOSE SOBRE A CAPACIDADE

FLOCULANTE DE *L. fermentum*

CONCENTRAÇÃO (M)	ABSORBÂNCIA (600 nm)	DESFLOCULAÇÃO
10 ⁻¹	0.75	+
9 X 10 ⁻²	0.75	+
8 X 10 ⁻²	0.76	+
7 X 10 ⁻²	0.68	+
6 X 10 ⁻²	0.70	+
5 X 10 ⁻²	0.54	±
4 X 10 ⁻²	0.29	±
3 X 10 ⁻²	0.21	±
2 X 10 ⁻²	0.16	±
10 ⁻²	0.13	±
5 X 10 ⁻³	0.08	-

* (+) floculação total; (±) floculação parcial e (-) não há floculação