

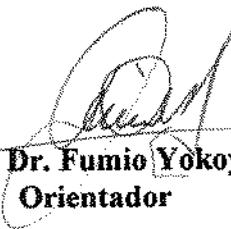
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DO MECANISMO DE FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS
CAUSADO POR *Lactobacillus fermentum*

Parer

Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por Renata Bromberg e aprovada pela Comissão Julgadora em 22/03/94.

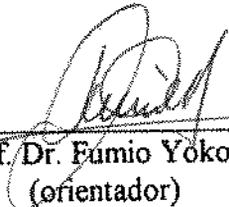
Renata Bromberg


Prof. Dr. Fumio Yokoya
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção de título de mestre em Ciências de Alimentos

Campinas
1994

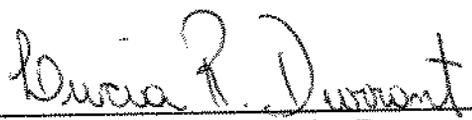
BANCA EXAMINADORA



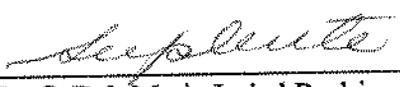
Prof. Dr. Eumio Yokoya
(orientador)



Prof. Dr. Vanderley Perez Canhos
(membro)



Prof. Dr. Lucia Regina Durrant
(membro)



Prof. Dr. Maria Isabel Rodriguez
(membro)

Campinas, 22 de março de 1994.

Para
minha mãe e meu pai,

dedico

AGRADECIMENTOS

Tenho uma dívida de gratidão com as seguintes pessoas e instituições que contribuíram para a realização deste trabalho:

Prof. Dr. Fumio Yokoya pela competente orientação.

Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, que proporcionou as condições necessárias para a realização dos estudos e desenvolvimento da pesquisa.

CNPq e FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e FAEP pelo suporte financeiro na compra de reagentes, indispensáveis para a execução deste projeto.

Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André de Tosello" pelas culturas de microrganismos cedidas.

Prof. Dr. Jayme Amaya-Farfán pela orientação na execução da análise de modificação química de proteínas dos microrganismos.

Funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, em especial a Creuza Kasume Nomura pela correção das referências bibliográficas.

Funcionários da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos e de Pós-Graduação da FEA pela gentileza e atenção.

Rosa, Norma, Daniela pelas colaborações "práticas".

D. Olívia que contribuiu na organização do material de laboratório.

Mariko Ueno, Míriam Terezinha dos Santos e Maria Raquel Oriane pelas incansáveis correções desta dissertação, valiosas sugestões e amizade.

Antonio Marcos Pupin pelo intenso apoio e companherismo demonstrados durante a realização desse trabalho, assim como pelo auxílio "técnico" prestado.

Fátima, Marquinhos e Miro pela ajuda na digitação desse trabalho.

Ao pessoal dos laboratórios da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, especialmente do laboratório de Microbiologia de Alimentos, que indiretamente colaboraram na realização deste trabalho

A todos os outros amigos da pós-graduação, professores, e funcionários da FEA que me auxiliaram e incentivaram no transcorrer desse trabalho.

Às demais amigas, que sempre estiveram presentes.

Meu carinho e gratidão.

ÍNDICE

Índice	i
Índice de Tabelas	iv
Índice de Figuras	vi
Resumo	vii
Summary	viii

1. INTRODUÇÃO	01
----------------------------	-----------

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
2.1. Aspectos gerais	02
2.2. Agregação celular	04
2.2.1. Agregação de células de leveduras	05
2.3. Características da floculação de leveduras de cerveja	06
2.4. Controle da floculação	08
2.4.1. Fatores genéticos	09
2.4.2. Fatores fisiológicos	10
2.4.3. Fatores ambientais	11
2.4.3.1. Efeitos físicos	11
2.4.3.1.1. Agitação	11
2.4.3.1.2. Temperatura	12
2.4.3.2. Efeitos químicos	12
2.4.3.2.1. pH	12
2.4.3.2.2. Íons	13
2.4.3.2.3. Açúcares	14
2.4.3.2.4. Modificação química e enzimática	14
2.4.3.2.5. Solventes orgânicos	15
2.4.3.2.6. Substâncias nitrogenadas	16
2.4.3.3. Efeitos biológicos	16
2.5. Participação da parede celular na floculação	16

2.6. Modelos moleculares da floculação	18
2.6.1. Modelo coloidal	18
2.6.2. Modelo das pontes de cálcio	19
2.6.3. Modelo das lectinas	19
2.6.4. Modelo simbiótico	22
2.6.4.1. Agentes floculantes	22
2.6.4.2. Lectinas	24
2.6.4.3. Lactobacilos floculantes	25
2.6.4.3.1. Adesão de <i>L. fermentum</i> à superfícies epiteliais	25
2.6.4.3.2. Floculação de leveduras causada por lactobacilos	25
3. MATERIAL	27
3.1. Reagentes	27
3.2. Equipamentos	28
3.3. Meios de cultura	28
3.4. Microrganismos	29
4. MÉTODOS	30
4.1. Condições de cultivo de células para teste de floculação	30
4.2. Determinação da relação entre as concentrações celulares na floculação	30
4.3. Teste de floculação	30
4.4. Tratamento com íons	31
4.4.1. Teste de substituição do cálcio por diferentes íons	31
4.4.2. Teste da adição de íon sódio e magnésio em presença e ausência de cálcio	32
4.5. Teste de agregação com concanavalina A	32
4.5.1. Agregação de <i>Sacch. cerevisiae</i>	32
4.5.2. Agregação de <i>L. fermentum</i>	33
4.6. Modificação química dos componentes da parede celular	33
4.6.1. Modificação química de proteínas	33
4.6.1.1. Iodoacetamida	33
4.6.1.2. Sulfito de Sódio	33
4.6.1.3. Mercaptoetanol	34
4.6.1.4. Ácido Nitroso	34
4.6.1.5. Anidrido Acético	34
4.6.1.6. Anidrido Maléico	34
4.6.1.7. N-Acetilimidazol	34
4.6.1.8. Iodo	34
4.6.1.9. Azul de Metileno / Rosa de Bengala	34
4.6.1.10. Ácido Perfórmico	34
4.6.2. Modificação química de carboidratos	35

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Determinação das condições experimentais ótimas para a ocorrência de floculação	36
5.2. Tratamentos com íons	37
5.2.1. Efeito da adição de diferentes íons na floculação	37
5.2.2. Efeito do íon sódio na floculação em presença e em ausência de cálcio	40
5.2.3. Efeito do íon magnésio na floculação em presença e em ausência de cálcio	42
5.3. Agregação celular por concanavalina A	44
5.3.1. Agregação de <i>Sacch. cerevisiae</i> por concanavalina A	45
5.3.2. Agregação de <i>L. fermentum</i> por concanavalina A	46
5.4. Tratamento de células de bactéria e de levedura com modificadores químicos de proteínas	47
5.4.1. Efeito da foto-oxidação de células	48
5.4.2. Efeito da acilação de células	49
5.4.3. Efeito da desaminação de células	51
5.4.4. Efeito da iodinação de células	52
5.4.5. Efeito da óxido-redução de células	53
5.4.6. Efeito da alquilação de células	55
5.5. Tratamento de modificação química de carboidratos	60
5.6. Considerações finais	61
 6. CONCLUSÕES	 62
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 64

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Efeito de íons na floculação de <i>Sacch. cerevisiae</i> por <i>L. fermentum</i>	38
TABELA 2. Efeito na floculação, do tratamento de foto-irradiação de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com azul de metileno (em temperatura ambiente por 15 min, pH 7,0). As células foram mantidas sob agitação e irradiadas com projetor de slide a 10 cm de distância	48
TABELA 3. Efeito na floculação, do tratamento de foto-irradiação de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com rosa de bengala (em temperatura ambiente por 15 min, pH 7,0). As células foram mantidas sob agitação e irradiadas com projetor de slide a 10 cm de distância	49
TABELA 4. Efeito na floculação, do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com anidrido acético (temperatura ambiente por 30 min, pH 6,0)	50
TABELA 5. Efeito na floculação, do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com anidrido maléico (temperatura ambiente por 30 min, pH 7,5)	50
TABELA 6. Efeito na floculação, do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com N-acetilimidazol (30°C por 2 h, pH 7,5)	51
TABELA 7. Efeito na floculação, do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com ácido nitroso (0°C por 30 min)	52
TABELA 8. Efeito na floculação, do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com iodo (0°C por 3 h pH 7,5)	53

TABELA 9. Efeito na floculação, do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com ácido perbórmico (4°C por 1 h)	54
TABELA 10. Efeito na floculação, do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com sulfito de sódio (30°C por 2 h, pH 7,5)	54
TABELA 11. Efeito na floculação, do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com mercaptoetanol (30°C por 2 h, pH 7,5)	55
TABELA 12. Efeito na floculação, do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com iodoacetamida (30°C por 2 h, pH 7,5)	56
TABELA 13. Porcentagem de inibição obtida por tratamento de <i>Sacch. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> com modificadores químicos de proteínas	57
TABELA 14. Efeito da modificação química de aminoácidos de <i>L. fermentum</i> na floculação	59
TABELA 15. Efeito na floculação do tratamento de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> com periodato de sódio (20°C por 30 min, no escuro)	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Floculação em leveduras - modelo das lectinas	07
FIGURA 2. Controle direto ou indireto da floculação de microrganismos	09
FIGURA 3. Floculação em concentrações variáveis de <i>Sacch. cerevisiae</i> na presença de uma concentração fixa de <i>L. fermentum</i> (0,45 de absorbância)	37
FIGURA 4. Ordem crescente de ions em função do efeito na floculação	39
FIGURA 5. Efeito da concentração de ions cálcio na floculação	41
FIGURA 6. Efeito do íon sódio na floculação em presença e em ausência. de cálcio 8×10^{-4} M	42
FIGURA 7. Efeito do íon magnésio na floculação em presença e em ausência de cálcio 8×10^{-4} M	43
FIGURA 8. Efeito da agregação de células de <i>L. fermentum</i> e de <i>Sacch. cerevisiae</i> por con A	47

RESUMO

A floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* provocada pela bactéria *Lactobacillus fermentum* causa sérios prejuízos à fermentação alcoólica, uma vez que reduz o número de células utilizado durante o processo e propicia a proliferação de contaminantes. O mecanismo de floculação foi estudado através do efeito de modificadores químicos de proteínas e de carboidratos da parede celular, da ação de íons, e da lectina concanavalina A. Determinou-se uma relação entre as concentrações de células da bactéria e da levedura, a qual resulta na condição de máxima floculação, compreendendo, respectivamente, valores de 0,16 g/l e de 3,39 g/l (massa seca). Dentre os íons analisados, verificou-se: que os íons Ba^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2} , Mg^{+2} , K^+ , Na^+ (8×10^{-4} M) promoveram a floculação, sendo que, os íons divalentes apresentaram efeitos promotores mais intensos que os monovalentes, enquanto que os íons trivalentes (Al^{+3} e Fe^{+3}) praticamente não apresentaram efeito promotor; a concentração mínima de cálcio requerida para a promoção da floculação compreendeu valores iguais ou maiores a 2×10^{-4} M; os íons sódio em concentração de 4,0 M em presença de cálcio 8×10^{-4} M, apresentaram efeito sinérgico na inibição da floculação, enquanto que, os íons magnésio em concentrações entre 0,8 e 4,0 M causaram progressiva inibição do processo, independentemente da presença de cálcio. Foi verificada a presença de sítios receptores para a lectina concanavalina A nas superfícies celulares de *Sacch. cerevisiae* e de *L. fermentum*, sendo que, para a ocorrência da agregação de cada célula de levedura e de bactéria foram necessárias, respectivamente, $4,04 \times 10^6$ e $1,46 \times 10^6$ moléculas de concanavalina A. Testes com modificadores químicos de proteínas mostraram que os grupos funcionais fenol e indol de aminoácidos, presentes na superfície celular de *L. fermentum*, devem participar do processo de floculação. Contudo, não foi verificada a participação, neste fenômeno, de grupos funcionais de aminoácidos da parede celular de *Sacch. cerevisiae*. A presença de uréia 7,5 ou 8,0 M, em reações de modificações químicas de proteínas, não tornou os grupos funcionais de aminoácidos mais acessíveis a ação dos reagentes. Constatou-se que carboidratos da superfície celular de *Sacch. cerevisiae* devem estar envolvidos nessa interação, uma vez que houve inibição da floculação após o tratamento da levedura com periodato de sódio (0,01 M). Por outro lado, não se verificou a participação de carboidratos no fator floculante de *L. fermentum*.

SUMMARY

The flocculation of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, by bacterium, *Lactobacillus fermentum*, causes serious loss in alcoholic fermentation due to reduction in yeast cell numbers in suspension and increase in growth of contaminants. The mechanism of flocculation was studied with protein and carbohydrate modifying chemicals, action of cations and concanavalin A. The optimum ratio between bacterial and yeast cells for maximum flocculation was 0.16 g/L and 3.39 g/L (d.w.) respectively. Among cations, barium, calcium, strontium, magnesium, potassium and sodium (8×10^{-4} M) stimulated flocculation, but trivalent ions (Al^{+3} and Fe^{+3}) had no effect. The minimum calcium concentration for flocculation was 2×10^{-4} M. Sodium ion showed synergistic effect when added at high concentration (4.0 M) in solution with 8×10^{-4} M calcium ions. Magnesium ions showed progressive inhibition between 0.8 to 4.0 M when added to cell suspension with or without added calcium ions (8×10^{-4} M). Treatment with concanavalin A showed receptor site of lectins in yeast and bacterial cells. *Sacch. cerevisiae* required 4.04×10^6 molecules of concanavalin A per cell and *L. fermentum* 1.46×10^6 molecules. Tests with protein modifying chemicals showed that the functional groups phenol and indol of amino acids on cell surface of *L. fermentum* were essential for flocculation. Urea (7.5 or 8.0 M) did not change functional groups of cell surface. Carbohydrate of *Sacch. cerevisiae* is important for flocculation because treatment of its cells with sodium periodate (0.01 M) inhibited the flocculation. Same treatment on *L. fermentum* had no effect, which showed that carbohydrate from bacterial cell surface did not participate in flocculation.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação da fermentação alcoólica é um dos problemas que atinge diretamente o processo de obtenção do etanol. A floculação da levedura produtora de álcool é uma das consequências mais sérias da contaminação, acarretando a diminuição da produtividade pela distribuição irregular das células de levedura durante a fermentação, causando problemas na etapa de centrifugação da suspensão, e propiciando a proliferação de contaminantes. Este fenômeno, bastante comum nas destilarias, tem motivado a indústria de álcool e pesquisadores na busca de soluções para esta questão.

A floculação é um fenômeno apresentado por leveduras, as quais se unem em agregados denominados flocos, constituídos por centenas e milhares de células. A ocorrência da floculação na fermentação alcoólica, pode ser causada pela presença de linhagens floculentas do gênero *Saccharomyces*, e por bactérias contaminantes. Nas usinas de álcool a contaminação bacteriana é considerada a principal responsável pela floculação, sendo a espécie *Lactobacillus fermentum* a mais conhecida.

O mecanismo de floculação não é totalmente esclarecido. Na floculação de leveduras floculentas, o modelo mais aceito é o "modelo das lectinas", proposto por MIKI *et alii* (1982a). Este modelo, propõe a ocorrência de uma ligação específica entre as proteínas (lectinas) de células floculantes, e os receptores de manana da parede celular de células adjacentes, requerendo ainda, a presença de íons cálcio, cuja função é a de manter as lectinas em sua conformação ativa.

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o esclarecimento do mecanismo de floculação de *Saccharomyces cerevisiae* provocado por *Lactobacillus fermentum*, através da avaliação do efeito da modificação química de proteínas e de carboidratos da parede celular, mostrando o envolvimento desses componentes nessa interação; da ação de íons e da lectina concanavalina A.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ASPECTOS GERAIS

A atual tecnologia disponível para produção de etanol combustível no Brasil, é susceptível a contaminação bacteriana, sendo que esta pode chegar a destilaria, principalmente através do uso de águas utilizadas na lavagem da cana-de-açúcar (SERRA *et alii*, 1976).

A contaminação bacteriana durante a fermentação acarreta a diminuição da produção de álcool. Esta pode ser ocasionada através dos seguintes mecanismos: consumo do álcool produzido no processo pelo microrganismo infectante; morte das células de leveduras por toxinas lançadas ao meio pelo microrganismo infectante; pelo excesso de ácido ou de outro produto utilizado para combater a infecção; ou devido a floculação do fermento, a qual propicia perdas de células de levedura no fundo das dornas ou nas centrífugas. Existem ocasiões em que a infecção é tão intensa que a fermentação se perde por completo, sendo necessário reiniciar o processo. Justifica-se então, o interesse pelo controle microbiológico durante a fermentação alcoólica, objetivando-se, principalmente, o aumento do rendimento final do processo (AMORIM & OLIVEIRA, 1982).

Uma das consequências mais graves causada pela contaminação bacteriana durante a produção industrial de álcool, é a floculação da levedura ocasionada por *Lactobacillus fermentum*, provocando, principalmente, a redução da produtividade, além de dificultar o processo de separação da levedura por centrifugação. Este problema tende a se acentuar com o uso do reciclo de células, o qual é empregado com o objetivo de aumentar a produtividade do processo, reduzindo o tempo e o custo da fermentação (YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991). De acordo com um levantamento realizado por GALLO (1990), aproximadamente 65% dos contaminantes microbianos isolados das dornas de fermentação da indústria de álcool do Estado de São Paulo, pertencem ao gênero *Lactobacillus*.

A floculação é um fenômeno apresentado por determinadas leveduras, as quais se unem em agregados denominados flocos, constituídos por milhares de células. A floculação é uma das propriedades importantes de certas linhagens de leveduras utilizadas em determinadas fermentações industriais, tais como, cervejaria (GREENSHIELDS & SMITH, 1974; STEWART & RUSSEL, 1986); na produção de etanol (LEE *et alii*, 1982); e na produção de biomassa (ESSER & KÜES, 1983).

Uma vez que a fermentação depende da concentração de células ativas em contato com o substrato, e que a floculação atua eficientemente na remoção das células do mosto (CALLEJA, 1987), esta possui importância para a etapa de separação de células ao final do processo, garantindo-lhe características de alta produtividade e baixo custo (PRINCE & BARDFORD, 1982; NETTO *et alii*, 1985). Porém, em condições de crescimento celular, a floculação parece ser desvantajosa, devido a redução da área de absorção de nutrientes disponível nos flocos de células (TEIXEIRA & MOTA, 1990).

Como resultado do interesse industrial na melhoria da produtividade do processo fermentativo, desenvolveram-se muitas pesquisas a respeito da floculação de leveduras, concentrando-se sobretudo, na produção de cerveja (STEWART & RUSSEL, 1986; STRATFORD, 1992b). O microrganismo mais estudado em relação a floculação é o *Saccharomyces cerevisiae* (MILL, 1964a; JAYATISSA & ROSE, 1976; STRATFORD, 1989b), porém, mais recentemente, a floculação foi encontrada em vários outros gêneros que incluem, *Hansenula* (SAITO *et alii*, 1990); *Kluyveromyces* (HUSSAIN *et alii*, 1986); *Schizosaccharomyces* (CALLEJA, 1970); e *Saccharomycodes* (STRATFORD & PEARSON, 1992).

Deve-se enfatizar que a floculação das leveduras utilizadas na fermentação para produção de cerveja é um fenômeno benéfico ao processamento, à medida que se selecionem linhagens com características adequadas (RAINBOW, 1970; TAKAGI & KADOWAKI, 1985a). Por outro lado, a floculação das leveduras produtoras de etanol, causada por linhagens floculentas de *Lactobacillus fermentum*, é prejudicial ao processo de fermentação alcoólica (YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991). Embora se saiba da importância da floculação da levedura na fermentação alcoólica, a base bioquímica deste fenômeno é pouco conhecida (RAINBOW, 1970).

O entendimento e a quantificação do processo de floculação de leveduras tem sido o objetivo dos cientistas desde o último século, havendo um incremento das pesquisas nos últimos 20 anos (STEWART & RUSSEL, 1986; STRATFORD, 1992b). Apesar desse esforço, a literatura apresenta aspectos contraditórios, principalmente em relação às diferentes linhagens utilizadas e dos diversos procedimentos empíricos empregados na quantificação da floculação (CALLEJA & JOHNSON, 1977; DAVIS & HUNT, 1986), não existindo portanto, uma padronização dos métodos quantitativos utilizados (SPEERS *et alii*, 1992a).

2.2. AGREGAÇÃO CELULAR

A agregação celular é um fenômeno comum entre os organismos inferiores, podendo ser encontrada em bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas e protozoários (CALLEJA, 1987), assim como entre os organismos superiores (EDELMAN, 1985).

Além de sua importância para a fermentação (ATKINSON & DAOUD, 1976; STEWART & RUSSEL, 1986), a agregação celular pode desempenhar um papel decisivo na patogenicidade de um organismo (FIRON *et alii*, 1987), no condicionamento do solo (HARRIS & MITCHELL, 1973), e também no tratamento biológico de resíduos (TENNEY & VERHOFF, 1973).

Verifica-se na literatura, a utilização de uma terminologia imprecisa referente ao termo "agregação", sendo que este mesmo processo é designado por muitos pesquisadores como "adesão, aglomeração, coesão, associação e floculação" (ATKINSON & DAOUD, 1976). Porém, em biotecnologia e microbiologia, estudam-se vários processos referentes a associação de células com elas próprias (floculação) (MILL, 1964a; MIKI *et alii*, 1982a); com células estranhas (infecções) (SHARON, 1987; SERRA *et alii*, 1976), ou com um material inerte (adesão) (LEWIN, 1984; REID *et alii*, 1988).

2.2.1. AGREGAÇÃO DE CÉLULAS DE LEVEDURAS

A agregação de células de leveduras pode ser provocada por mecanismos aparentemente similares, entre eles a formação de cadeias (EDDY & PHIL, 1955a); a agregação sexual (CALLEJA, 1987); e a floculação (ROSE, 1980; STEWART & RUSSEL, 1986). Além disso, a adição de lectinas (STRATFORD & BOND, 1992) e a presença de substâncias floculantes de diversas composições também pode acarretar a agregação de células de leveduras (NAKAMURA *et alii*, 1976a).

Os agregados do tipo "mating" ocorrem como um prelúdio a fusão sexual entre as células complementares. A agregação sexual é devido a presença de moléculas complementares às superfícies celulares do tipo "mating" complementar, a qual se caracteriza por ser um estado temporário, dependente de colisões entre as células, não apresentando requerimento específico de cálcio, sendo ainda insensível a açúcares e a agentes quelantes, como o EDTA (etilenodiaminotetracetato de sódio) (CALLEJA, 1987). Esta agregação tem sido estudada nos gêneros *Saccharomyces* (SIJMONS *et alii*, 1987), *Shizosaccharomyces* (CALLEJA, 1973) e *Hansenula* (CALLEJA, 1987). Sugeriu-se a ocorrência de ponte proteína-proteína entre as células de sexos complementares em linhagens haplóides de *Saccharomyces cerevisiae* (JOHNSON *et alii*, 1988).

A formação de cadeias em leveduras constitui uma outra forma de agregação celular, que parece estar relacionada com o desenvolvimento, morfogênese e diferenciação celular (CALLEJA, 1987), sendo um fenômeno distinto da floculação (EDDY & PHILL, 1955a). Esta é considerada uma característica genética (GILLILAND, 1951; GILLILAND, 1957; citados por STRATFORD, 1992b), determinada por falhas de separação dos brotos (células-filhas) das células-mãe durante o crescimento (GILLILAND, 1951; citado por STRATFORD & ASSINDER, 1991). A formação de cadeias celulares pode também ser provocada por deficiência de biotina (DUFFUS *et alii*, 1982), de inositol (GHOSH *et alii*, 1960), ou pela falta de quitinase, a qual atua na separação celular entre células-mãe e células-filhas (VEINOT-DREBOT *et alii*, 1991). As cadeias de células dispersas por ruptura mecânica não mais se agregam (STRATFORD & ASSINDER, 1991).

O fenômeno da floculação em leveduras pode ser considerado, como um mecanismo de sobrevivência (STRATFORD, 1992b). Possivelmente, este ocorre através da interação proteína-carboidrato da parede celular dos microrganismos (MIKI *et alii*, 1982a), requerendo a presença de cátions metálicos (MILL, 1964b). Isto pôde ser sugerido, uma

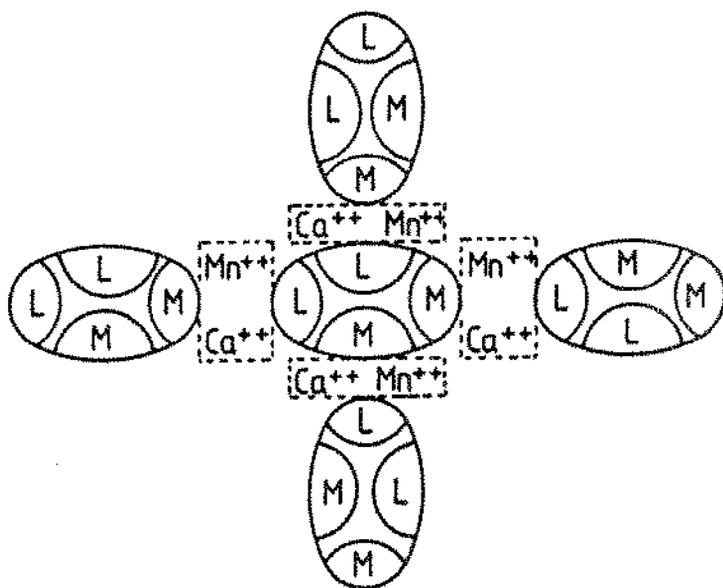
vez que se verificou a ocorrência de inibição da floculação causada por agentes quelantes, como o EDTA (STEWART & GORING, 1976), por solução de açúcares específicos (EDDY & PHIL, 1955b; TAYLOR & ORTON, 1978), ou por enzimas e agentes modificadores de proteínas (NISHIHARA *et alii*, 1977)

Utiliza-se determinados termos para se caracterizar alguns aspectos da floculação (FIGURA 1). Assim, a "auto-floculação" ocorre quando células de uma mesma linhagem se agregam (FORSTER *et alii*, 1985); a "co-floculação", quando duas linhagens isoladamente não apresentam características floculantes, adquirindo, porém a capacidade de flocular quando juntas (STEWART *et alii*, 1975). O termo "floculento" caracteriza uma linhagem de microrganismo que possui a capacidade de se "auto-flocular" e também de "co-flocular" outros indivíduos; a denominação "floculante" refere-se a linhagens de microrganismos, ou a agentes (como ions, carboidratos, etc), que têm a capacidade de flocular uma linhagem não-floculenta.

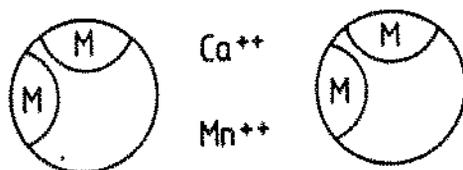
2.3. CARACTERÍSTICAS DA FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS DE CERVEJA

De acordo com citações de CALLEJA (1987), a floculação de leveduras foi descrita primeiramente por Pasteur em 1876, sendo que, a floculação de leveduras produtoras de cerveja foi o primeiro sistema de agregação estudado. A floculação na indústria de cerveja ocorre quando a fermentação primária está atingindo seu estágio terminal, quando então, diversos parâmetros já alcançaram o valor desejado, tais como: a maior parte do açúcar presente já foi consumido, o valor de pH atingiu um mínimo e a temperatura declinou. Se uma linhagem floculenta for usada, a turbidez da cerveja diminui, marcando o princípio da floculação. O número de células em suspensão diminui, à medida que os conglomerados se solidificam, emergindo ou submergindo na dorna, enquanto que, no caso de leveduras não-floculentas não ocorre tal diminuição na turbidez (CALLEJA, 1987).

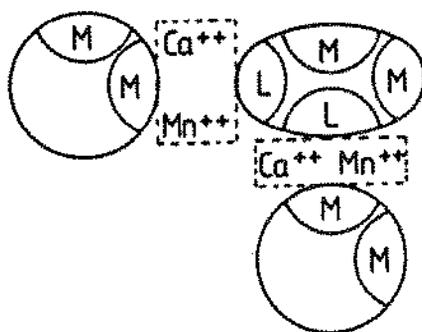
É importante que as leveduras utilizadas na produção de cerveja floculem em um momento apropriado do processo fermentativo, uma vez que, a floculação prematura resulta na não utilização de todos os açúcares fermentescíveis disponíveis no meio; enquanto que, a floculação tardia ou insuficiente, pode causar problemas relacionados ao "flavour" da cerveja (AIBA & NAGATANI, 1971; BOWEN & COOKE, 1989).



CULTURA "AUTO-FLOCULENTA" - (lectina presente)



CULTURA "NÃO-FLOCULENTA" - (lectina ausente)



"CO-FLOCULAÇÃO" ENTRE DUAS CULTURAS - (floculenta + não-floculenta)

L = lectina	M = resíduo de manose
-------------	-----------------------

FIGURA 1 - Flocculação em leveduras - Modelo das Lectinas (extraído de FORSTER *et alii*, 1985)

O fenômeno de floculação é então, amplamente utilizado pela indústria de cerveja na etapa de clarificação da bebida (CEREDA, 1983), sendo que, o critério usado na seleção de uma linhagem de microrganismo, é dependente do tipo do produto, das condições de fermentação empregadas (ROSE, 1980), bem como, de sua capacidade floculante (ESSER & KÜES, 1983). As leveduras denominadas "ale", são normalmente constituídas por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que emergem no topo do fermentador após o término da fermentação, enquanto que, as linhagens "lager" sedimentam no fundo do tanque de fermentação e são representadas por *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*). Possivelmente, os flocos formados pelas leveduras do tipo "ale" emergem no topo do fermentador devido a sua afinidade com dióxido de carbono, que se dirige para a superfície, após ser liberado pela célula durante a fermentação (RAINBOW, 1970).

2.4. CONTROLE DA FLOCULAÇÃO

Os vários aspectos relacionados ao processo de floculação podem ser determinados por fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Dessa forma, as alterações que caracterizam a floculação das células de levedura, refletem as mudanças na estrutura química de suas paredes celulares, resultantes dos processos metabólicos do organismo, os quais podem ser parcialmente controlados pela sua nutrição (MILL, 1964a). Desta forma, mesmo em circunstâncias onde o genótipo das células e as condições fisiológicas possibilitem a floculação, a sua realização depende ainda das condições ambientais (ESSER & KÜES, 1983). Como mostrado na FIGURA 2, tais fatores exercem uma influência direta ou indireta sobre a parede celular, como resultante do metabolismo celular.

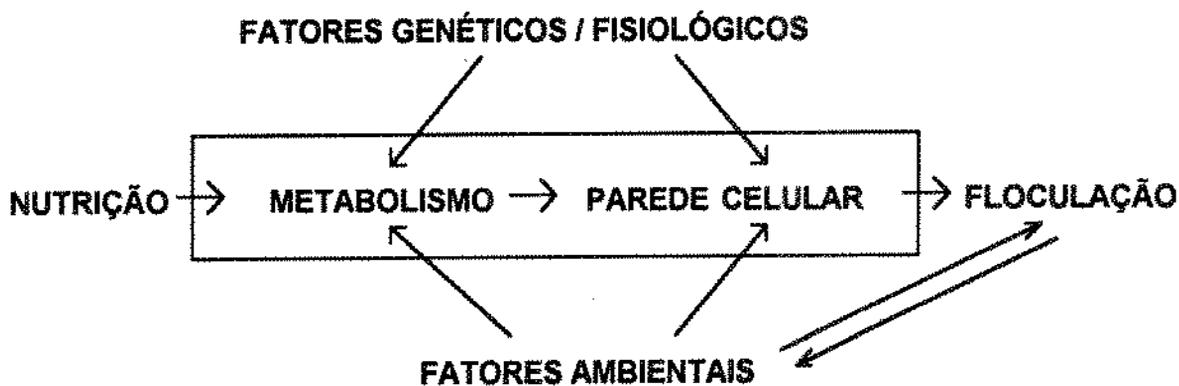


FIGURA 2 - Controle direto ou indireto da flocculação de microrganismos (adaptado de ATKINSON & DAOUD, 1976).

2.4.1. FATORES GENÉTICOS

A flocculação é um processo controlado geneticamente (LEWIS *et alii*, 1976; RUSSEL *et alii*, 1980). Este é originado por um complexo mecanismo, o qual é constituído por características genéticas cromossômicas (MIKI *et alii*, 1982a) e extracromossômicas (WILKIE & EVANS, 1982).

A ocorrência da flocculação relaciona-se com a presença dos genes FLO (LEWIS *et alii*, 1976), os quais compreendem, principalmente, os genes dominantes FLO1 (WATARI *et alii*, 1989; WATARI *et alii*, 1991); FLO2 (LEWIS *et alii*, 1976); FLO4 (STEWART & RUSSEL, 1977); FLO5 (VEZINHET *et alii*, 1991); e FLO8 (YAMASHITA & FUKUI, 1983); TUP1 (LIPKE & HULL-PILLSBURY, 1984). De acordo com análises realizadas, verificou-se que os genes FLO1, FLO2 e FLO4 são alelos, sendo então considerados como pertencentes ao locus FLO1 (RUSSEL *et alii*, 1980).

STRATFORD (1989b), encontrou dois grupos de fenótipos distintos de linhagens flocculentas FLO1, de *Sacch. cerevisiae*: um grupo denominado Flo1, que contém os genes FLO1, FLO5, FLO8, TUP1, juntamente com uma pequena parte das linhagens "ale"; e um outro grupo, denominado NewFlo, que inclui a maioria das linhagens "ale".

O DNA mitocondrial influencia a modulação de genes, podendo acarretar mudanças na parede celular, uma vez que foram obtidos mutantes respiratórios provenientes de leveduras flocculantes, que tiveram a capacidade de floccular modificada. Verificou-se que estes apresentaram alterações no metabolismo respiratório (WILKIE & EVANS, 1982; EVANS *et alii*, 1982; HINRICHS *et alii*, 1988).

Além de sua complexidade e grau de flocculência, a estabilidade das linhagens de leveduras de cerveja é também de grande importância para o seu processamento (SPEERS *et alii*, 1992a). Algumas linhagens são conhecidas por sofrerem mutações através de gerações, tornando-se menos flocculentas durante o cultivo (CHESTER, 1963). Verificou-se que a mutação de apenas um, dentre os vários genes envolvidos no processo de flocculação, influencia a capacidade flocculante do microrganismo (WILKIE & EVANS, 1982).

2.4.2. FATORES FISIOLÓGICOS

O metabolismo celular é necessário para a ocorrência da flocculação, porém, após o seu estabelecimento, este fenômeno torna-se uma propriedade da parede celular, uma vez que estas estruturas, mantêm a capacidade flocculante dos microrganismos (MILL, 1966).

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

Verificou-se que o nível de flocculação está diretamente relacionado com os níveis de glicogênio ácido-solúvel intracelular (PATEL & INGLEDEW, 1975), e que este é inibido pela ausência de glicose (MILL, 1964b).

A síntese de proteínas citoplásmicas também parece estar associada com o desenvolvimento das características floculantes de leveduras, uma vez que, a cicloheximida apresenta efeito inibitório sobre a floculação (NISHIHARA *et alii*, 1976b).

2.4.3. FATORES AMBIENTAIS

Os fatores ambientais que afetam a floculação podem exercer seu efeito através de vários mecanismos; direta ou indiretamente; de modo reversível ou permanente (ATKINSON & DAOUD, 1976), podendo-se agrupá-los em efeitos físicos, químicos e biológicos.

2.4.3.1. EFEITOS FÍSICOS

2.4.3.1.1. AGITAÇÃO

A agitação mecânica é requerida para superar a repulsão eletrostática entre as células (STRATFORD, 1989a). Verificou-se a existência de um limite mínimo de agitação, abaixo do qual a floculação não ocorre, sendo este dependente da linhagem do microrganismo. À medida que a agitação se intensifica, as colisões tornam-se mais freqüentes e fortes, e uma grande proporção de células podem ser encontradas livres no meio, ocorrendo então, a desfloculação. Sob agitação constante, um equilíbrio dinâmico é alcançado entre as células dispersas e os flocos, o qual é diretamente proporcional ao quadrado da concentração celular presente (STRATFORD & KEENAN, 1987).

2.4.3.1.2. TEMPERATURA

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

2.4.3.2. EFEITOS QUÍMICOS

2.4.3.2.1. pH

A mudança de pH acarreta um efeito profundo na floculação (ATKINSON & DAOUD, 1976), sendo que, o pH ótimo é dependente da linhagem do microrganismo (CALLEJA, 1987).

A floculação de *Saccharomyces cerevisiae* pode ocorrer em valores de pH variando entre 1,4 a 9,0 (STRATFORD *et alii*, 1988), sendo que, a desfloculação em valores inferiores a pH 1,4 é reversível (STRATFORD, 1992b). Porém, foi relatada a dispersão da levedura *Saccharomyces uvarum* em valores de pH acima de 5,5 (KAMADA & MURATA, 1984). Valores de pH menores que 3,0 no meio de crescimento, foram considerados antagônicos a floculação de células de *Saccharomyces cerevisiae* e também, de *Saccharomycodes ludwigii* (NISHIHARA *et alii*, 1976a; STRATFORD & PEARSON, 1992).

2.4.3.2.2. ÍONS

O efeito dos sais na floculação é complexo e dependente de algumas variáveis como: tipo do cátion, linhagem de levedura, valor de pH e força do tampão (STRATFORD & BRUNDISH, 1990).

A maioria dos autores concordam com a especificidade do cálcio, como agente promotor da floculação de leveduras (MILL, 1964b; TAYLOR & ORTON, 1975; MIKI *et alii*, 1982a; STRATFORD, 1989c). No entanto, esta opinião não é compartilhada por outros autores (STEWART & GORING, 1976; NISHIHARA *et alii*, 1976b; SOUZA *et alii*, 1992), que consideraram o magnésio, o manganês, além de outros íons, tão eficazes quanto o cálcio.

O efeito promotor da floculação de leveduras pelo íon cálcio pode ser suspenso ou reduzido através de lavagens com água destilada (JAYATISSA & ROSE, 1976), ou com o uso de agentes quelantes, como o EDTA (STEWART *et alii*, 1975). Esta inibição pode ser revertida com nova adição de íons cálcio (STRATFORD, 1989c).

A especificidade do íon cálcio na floculação é justificada pelas seguintes observações: o requerimento desses íons para induzir a floculação pode ser extremamente pequeno (10^{-8} M) (TAYLOR & ORTON, 1975); além disso, constatou-se a não ocorrência de floculação em leveduras, devido ao uso do agente quelante EGTA [Ácido etilenoglicolbis-(b-aminoetileter)-N-N-tetracético], uma vez que este possui maior afinidade por íons cálcio do que por outros íons divalentes, os quais permanecem livres na solução (STRATFORD, 1989c).

Os cátions Cs^+ , Rb^+ , Co^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Al^{+3} , Cr^{+3} e Fe^{+3} , a uma concentração de 5,0 mM, pH 7,0, tiveram seu papel de agentes promotores da floculação de leveduras associado ao efluxo de cálcio da célula, contribuindo, portanto, de maneira indireta para a ocorrência da floculação (STRATFORD, 1989c). Foram descritas também, a floculação em *Sacch. cerevisiae* causada por íons de metal pesado como estanho (NISHIHARA *et alii*, 1982) e níquel (WEEKS *et alii*, 1983).

Íons magnésio em altas concentrações (3 M), mostraram ser potentes inibidores da floculação de leveduras (STRATFORD & BRUNDISH, 1990). Os íons estrôncio e bário (NISHIHARA *et alii*, 1982), sódio (MILL, 1964b), potássio (STEWART & GORING, 1976) mostraram ser antagonistas do cálcio, inibindo a floculação de células de leveduras.

Sugeriu-se que a inibição da floculação de leveduras pela ação de sais não envolve o metabolismo celular, uma vez que este fenômeno foi também verificado em células inativadas por tratamento térmico. Considerou-se que a inibição da floculação por altas concentrações de sais, ocorre de maneira reversível, aditiva e dependente do tempo (STRATFORD & BRUNDISH, 1990).

2.4.3.2.3. AÇÚCARES

Os efeitos dos açúcares na floculação não estão relacionados com o metabolismo celular, uma vez que foi demonstrada a ocorrência de inibição da floculação por glicose e manose, em leveduras submetidas a tratamento térmico (STRATFORD & ASSINDER, 1991). Nesse trabalho, observou-se também, que quanto menos floclenta for a linhagem de levedura, menor é a concentração de açúcar requerida para provocar inibição da floculação.

Os efeitos dos açúcares na floculação de leveduras são específicos (TAYLOR & ORTON, 1978). Foram demonstrados os efeitos inibitórios da floculação de *Sacch. cerevisiae*, pelos açúcares sacarose, manose, maltose e glicose, (EDDY & PHILL, 1955a; EDDY & PHILL, 1955b; MILL, 1964b); assim como, da inibição da floculação de células de *Saccharomyces ludwigii* por D-galactose, D-fucose, e L-arabinose, (STRATFORD & PEARSON, 1992).

2.4.3.2.4. MODIFICAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA

NISHIHARA *et alii* (1977) demonstraram que a capacidade floclante de leveduras é quase completamente perdida ou enfraquecida por tratamento com papaína, tripsina, pepsina ou quimotripsina. Porém, os tratamentos com lipase, DNAase, RNAase ou lisozima não inibiram a floculação dos microrganismos (NISHIHARA *et alii*, 1982).

Células de leveduras flocculentas foram desfloculadas por tratamento com modificadores químicos de proteínas, indicando que vários grupos funcionais de cadeias laterais de aminoácidos, presentes na superfície celular são importantes para a formação de flocos de células (NISHIHARA *et alii*, 1977; KUNDU *et alii*, 1987; SOUZA *et alii*, 1992). A ocorrência da perda da capacidade flocculante das leveduras submetidas a modificação química, foi atribuída às mudanças na estrutura estérica de certas proteínas presentes na superfície celular (NISHIHARA *et alii*, 1977).

Foram relatados também, a redução da flocculação de células e de parede celular de leveduras com o uso de agentes desnaturantes, como a uréia e guanidina-HCl (NISHIHARA *et alii*, 1982).

Os componentes de carboidrato da superfície celular de leveduras flocculantes, ao serem submetidos à oxidação com periodato de sódio, não apresentaram alterações quanto a flocculação. Por outro lado, leveduras não-flocculantes, após serem submetidas ao mesmo tratamento, não puderam ser co-flocculadas, sugerindo o envolvimento de carboidratos da parede dessas células na flocculação (NISHIHARA *et alii*, 1987).

2.4.3.2.5. SOLVENTES ORGÂNICOS

A adição de solventes orgânicos tem a função de reduzir a constante dielétrica da solução aquosa, e esta, por sua vez, diminui o grau de ionização das ligações de sais, aumentando a sua força e a contribuição das pontes de hidrogênio. (ATKINSON & DAOUD, 1976).

MILL (1964b), observou a ocorrência de flocculação em suspensões de leveduras não-flocculentas, após a adição dos solventes orgânicos metanol, etanol, propanol, acetona e dioxano, em presença de cloreto de cálcio. Foram também descritas, a ocorrência de linhagens de leveduras que flocculam apenas em presença de baixas concentrações de etanol (AMORY *et alii*, 1988).

2.4.3.2.6. SUBSTÂNCIAS NITROGENADAS

A floculação de uma linhagem de levedura pôde ser retardada com a adição de altas concentrações de substâncias nitrogenadas, dentre elas a amônia, aminoácidos básicos, glutamina, asparagina, ácido aminobutírico ou uréia (MILL, 1964a).

Algumas linhagens de leveduras "ale", que em geral, são incapazes de flocular em meio definido, foram capazes de fazê-lo após a adição de peptídeo indutor no mosto, o qual contém alta proporção de resíduos de aminoácidos ácidos (STEWART *et alii*, 1975). Este material pode atuar, através da melhora do aspecto nutricional das leveduras, como foi sugerido por CALLEJA (1987), ou pela alteração das características da floculação, através de ligações com as paredes celulares (BOWEN & COOKE, 1989). Por outro lado, todas as linhagens floculentas "lager" são capazes de flocular após serem cultivadas em um meio definido e não parecem requerer a adição de peptídeo indutor no meio de crescimento (STEWART *et alii*, 1975).

2.4.3.3. EFEITOS BIOLÓGICOS

Dentre os fatores biológicos que podem influenciar a floculação destacam-se: a concentração microbiana inicial, a concentração de flocos já formados (ATKINSON & DAOUD, 1976), e a interação entre diferentes microrganismos numa cultura mista (ESSER & KÜES, 1983).

2.5. PARTICIPAÇÃO DA PAREDE CELULAR NA FLOCULAÇÃO

As superfícies celulares desempenham um papel importante na floculação (FORSTER *et alii*, 1985). Contudo, o conhecimento a respeito das superfícies é insuficiente, devido a sua complexidade e pela falta de métodos que proporcionem informações específicas sobre estas (AMORY *et alii*, 1988). Verificou-se que paredes celulares preparadas a partir de células floculentas são capazes de formar flocos, enquanto que, as paredes celulares provenientes de células não-floculentas não apresentam tal capacidade (NISHIHARA *et alii*, 1982; AMRI *et alii*, 1982).

A parede celular de *Sacch. cerevisiae* constitui-se de glicana e manana, e de quantidades menores de quitina, fosfato, lipídeo e proteína (PARODI, 1981). Esta é composta internamente por uma camada de glicana, e externamente por camada de fosfomanana, a qual forma complexos com proteínas (FORSTER *et alii*, 1985). O *Lactobacillus fermentum* é uma bactéria gram-positiva, tendo portanto, como principal constituinte de sua parede celular, uma camada externa de peptideoglicano, além de ácido teicóico, teicurônico e de polissacarídeos (FORSTER *et alii*, 1985).

De acordo com McMURROUGH & ROSE (1967), a porcentagem de glicana, manana, proteína e fósforo presentes na parede celular de leveduras, varia de acordo com a taxa de crescimento e com a limitação de substrato.

As mananas da parede celular parecem estar envolvidas na floculação, devido sua localização e também pela ocorrência de desfloculação pela manose (EDDY & PHILL, 1955b; CALLEJA, 1987). De acordo com MILL (1966), o conteúdo de manana e de glicana de leveduras floculentas e não-floculentas são praticamente iguais. Por outro lado, AMRI *et alii* (1982) mostraram que o nível de manana presente em leveduras floculentas, é maior do que o encontrado em células não floculentas.

Também, são apresentados dados controversos em relação a concentração de fósforo presente nas paredes celulares de linhagens floculentas e não-floculentas. Alguns autores demonstraram que a camada manana-proteína-fosfato de paredes de células floculentas possuem um nível mais alto de fósforo, quando comparadas a paredes de células não-floculentas (MILL, 1966; LYONS & HOUGH, 1971). Ao contrário, AMORY *et alii* (1988) relataram que a concentração de fósforo na superfície da parede celular diminuía, à medida que aumentava a propriedade floculante. Outros trabalhos, ainda, relataram não haver diferenças no conteúdo de fósforo entre células floculentas e não-floculentas (JAYATISSA & ROSE, 1976; AMRI *et alii*, 1982).

Observou-se que compostos nitrogenados quando adicionados ao meio retardavam o início da floculação. Isto foi atribuído ao conteúdo mais elevado de nitrogênio nas paredes celulares de células não-floculentas (MILL, 1964a; MILL, 1966).

As linhagens diferem em seu requerimento específico de cálcio (EDDY & PHILL, 1955a). Foi demonstrado que as paredes celulares de leveduras flocculentas ligam íons cálcio mais intensamente, do que as paredes celulares de células não-flocculentas (LYONS & HOUGH, 1971; STEWART *et alii*, 1975). A superfície celular de algumas leveduras quando examinadas sob microscópio eletrônico, mostrou a presença de fimbrias em células flocculentas, enquanto que, a superfície de células não-flocculentas apresentaram-se lisas (DAY *et alii*, 1975; STEWART *et alii*, 1975). No entanto, tais estruturas não foram encontradas por outros pesquisadores (MIKI *et alii*, 1982a).

2.6. MODELOS MOLECULARES DA FLOCULAÇÃO

Devido a ocorrência de vários aspectos controversos a respeito do processo de floculação, foram propostos alguns modelos, que visam elucidar o mecanismo do processo (STRATFORD, 1992b; SPEERS *et alii*, 1992a).

2.6.1. MODELO COLOIDAL

Um colóide é definido como sendo uma partícula que não se separa de uma suspensão sob a força de gravidade (SPEERS *et alii*, 1992b). Uma das propriedades mais importantes das dispersões coloidais é a tendência de agregação das partículas (SHAW, 1975).

As partículas coloidais têm normalmente diâmetros aproximados entre 1 nm e 1 μ m (SHAW, 1975). Apesar das células de leveduras e dos flocos possuírem tamanho superior ao limite considerado por esta definição, os princípios da ciência coloidal são aplicados ao processo de floculação (SPEERS *et alii*, 1992b).

Os colóides podem ser rapidamente agregados pela neutralização da carga da superfície, pela adição de sal ou mudança de pH, e pode-se relacionar com o início do processo de floculação (SHAW, 1975; STRATFORD, 1992b). Contudo, este modelo não considera o requerimento específico por íons cálcio, o qual é apresentado por muitas linhagens de leveduras (STRAVER *et alii*, 1993).

2.6.2. MODELO DAS PONTES DE CÁLCIO

Este modelo fundamenta-se em princípios físico-químicos, propondo que ions cálcio formem pontes entre os sítios receptores da superfície celular de duas células. Estas ligações são estabilizadas por pontes de hidrogênio entre carboidratos da parede celular das células envolvidas (MILL, 1964b).

Nas células onde ocorre a floculação, a competição entre as forças de repulsão geradas por grupos aniônicos da superfície celular é superada por forças de atração provenientes da formação da ponte de cálcio (JAYATISSA & ROSE, 1976). Alguns autores sugerem que as pontes de cálcio ocorrem entre os grupos fosfato das fosfomananas da superfície celular (LYONS & HOUGH, 1971), enquanto que outros, sugerem que os grupos carboxila da proteína da parede celular são os ânions envolvidos (MILL, 1964b; JAYATISSA & ROSE, 1976).

Esse modelo não considera os efeitos específicos, como a inibição da floculação por açúcares (manose, etc) ou por outros cátions (estrôncio, bário, sódio, etc), além do cálcio (KIHN *et alii*, 1988; STRATFORD, 1992b).

2.6.3. MODELO DAS LECTINAS

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos com alto grau de especificidade (BOYD & SHAPLEIGH, 1954). Estas são geralmente definidas e classificadas, pelas estruturas dos açúcares simples que as inibem (GOLDSTEIN *et alii*, 1965; GOLDSTEIN *et alii*, 1980), uma vez que, tais açúcares inibidores são estruturalmente similares aos receptores das lectinas (SHARON & LIS, 1972). As lectinas de leveduras podem reconhecer uma estrutura de carboidrato na superfície de outra célula e, dessa forma, se envolverem no processo de floculação (MIKI *et alii*, 1982a).

As lectinas microbianas são comumente encontradas nas superfícies celulares, desempenhando um papel importante nos processos de interação e de reconhecimento celular (SHARON, 1987; SHARON & LIS, 1989). Isso tem sido demonstrado em bactérias (FIRON *et alii*, 1982); vírus (SHARON & LIS, 1989); leveduras (CRITCHLEY & DOUGLAS, 1987); e bolores (ROSEN *et alii*, 1979).

A base do modelo das lectinas, foi determinada a partir da descoberta de que algumas linhagens de leveduras não-floculentas, tornavam-se capazes de flocular quando juntas, sugerindo que a floculação ocorre através da ligação entre dois grupos diferentes (EDDY & RUDDIN, 1958a; citado por STRATFORD, 1992b). Foi sugerido que a floculação é ocasionada por adesão específica entre estruturas da parede celular (TAYLOR & ORTON, 1978; MIKI *et alii*, 1982a).

Através do tratamento de leveduras floculentas com enzimas proteolíticas (NISHIHARA *et alii*, 1982), modificadores químicos de proteínas (NISHIHARA *et alii*, 1977) e da inibição da floculação por manose (TAYLOR & ORTON, 1978), sugeriu-se que os sítios envolvidos na floculação seriam constituídos por proteína e manana.

De acordo com o modelo das lectinas, as células floculentas possuem moléculas proteicas, do tipo lectina, que se ligam aos resíduos carboidráticos da manana de células adjacentes (MIKI *et alii*, 1982a). O íon cálcio é requerido para manter essas proteínas em correta conformação (KIHN *et alii*, 1988). Esse modelo considera que apenas as células floculentas possuem as proteínas ligantes, enquanto que, os receptores de açúcares para floculação são encontrados tanto nas células floculentas como nas não-floculentas. Não foram relatados efeitos inibitórios de sais sobre os receptores de células não-floculentas mas as linhagens floculentas se mostraram incapazes de flocular devido a inibição por sais, tais como o sódio e magnésio (NISHIHARA *et alii*, 1982; STRATFORD & BRUNDISH, 1990). O isolamento definitivo das lectinas promotoras da floculação, bem como a determinação de sua localização são ainda desconhecidas (SPEERS *et alii*, 1992a).

De acordo com STRATFORD (1992a) os açúcares livres adicionados às células, mimetizam os receptores de carboidratos e inibem a floculação ocupando os sítios de ligação de açúcares das lectinas. Além disso, a levedura *Schizosaccharomyces pombe*, a qual não apresenta manana em sua parede celular (TKACZ *et alii*, 1971), não pôde ser floculada por outras leveduras floculentas (MIKI *et alii*, 1982a).

AMRI *et alii* (1982), ao compararem as leveduras floculentas com as não floculentas, observaram a presença de uma porcentagem maior de manose nas paredes de leveduras floculantes. Em relação as proteínas, observaram que, a porcentagem de alguns aminoácidos como a lisina, prolina e ácido aspártico, sofreram alterações devido a floclulação. Tais modificações fornecem evidências para a formação de estruturas específicas na parede celular onde a floclulação ocorre, vindo de encontro com a presença de compostos do tipo lectina.

A inibição por açúcares na floclulação em *Sacch. cerevisiae*, sugeriram o envolvimento de dois tipos de lectinas presentes em sua superfície celular (STRATFORD & ASSINDER, 1991). A lectina manose-específica do fenótipo Flo1 apresenta semelhanças com a lectina de *Escherichia coli* tipo I e a lectina do fenótipo NewFlo é glicose e manose-específica, similar a lectina con A (MASY *et alii*, 1990). Os prováveis receptores de carboidratos para os dois tipos, são as cadeias laterais da manana das leveduras (STRATFORD & ASSINDER, 1991). Tais receptores foram confirmados com o uso de mutantes (STRATFORD, 1992a).

A concanavalina A (con A), é uma lectina extraída de *Canavalia ensiformes*, sendo que, além dos açúcares específicos (manose, glicose, frutose ou arabinose) (SHARON & LIS, 1972), esta liga também os íons manganês e o cálcio (LIS & SHARON, 1973). Os sítios de ligação do cálcio e manganês são próximos ao sítio de ligação do carboidrato (BLAKE, 1975). A con A aglutina eritrócitos e outros tipos de células de diferentes animais, assim como muitos microrganismos, particularmente, as células de leveduras (LIS & SHARON, 1973). Foi mostrado que o pH baixo inibe a con A através da remoção dos íons cálcio (McKENZIE *et alii*, 1972), de modo semelhante ao observado na floclulação (STRATFORD, 1992b).

De acordo com o modelo das lectinas, define-se a floclulação de leveduras como sendo um processo reversível, não sexual, mediado por lectina, cujas células podem ser dispersas por agentes quelantes ou açúcares simples (STRATFORD, 1992b).

2.6.4. MODELO SIMBIÓTICO

Este modelo sugere a adesão entre diferentes tipos celulares, como por exemplo, de leveduras por outros microrganismos, geralmente bactérias (HARRIS & MITCHELL, 1973; STRATFORD, 1992b). Essa interação celular pode ser causada por substâncias floculantes, lectinas e fimbrias, e outros compostos.

2.6.4.1. AGENTES FLOCULANTES

Existe um grande requerimento na fermentação e indústria alimentícia por agentes floculantes eficientes, uma vez que, a remoção de microrganismos do meio de cultura utilizado é uma etapa de importância na indústria de fermentação. Ocorre porém, que esta fase do processamento onera muito o custo de produção, dessa forma, os agentes floculantes podem ser úteis no melhoramento do processo, atuando como um substituto da etapa de centrifugação e filtração (TAKAGI & KADOWAKI, 1985a).

TAKAGI & KADOWAKI (1985b) verificaram que o fungo *Paecilomyces sp* I-1, produz uma substância floculante que é um polissacarídeo composto, principalmente por galactosamina. De acordo com esses pesquisadores, a cadeia de poligalactosamina absorve partículas iônicas e neutraliza suas cargas, podendo formar pontes intermoleculares que resultam em flocos estáveis e, conseqüentemente, acarreta a precipitação. Esse floculante é não-específico, podendo flocular várias espécies de microrganismos, destacando-se a *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis candida*, *Candida utilis*; assim como, vários sólidos em suspensão como hemáceas, pó de carvão, celulose, kieselguhr. A floculação resultante não é influenciada pela força iônica ou pela temperatura (TAKAGI & KADOWAKI, 1985a).

Verificou-se a ocorrência de uma substância floculante, a F-1, produzida por *Aspergillus sojae* AJ 7002, a qual é utilizada na remoção de microrganismos do lodo ativado, resultante do tratamento de esgoto industrial (NAKAMURA *et alii*, 1976a). A F-1 é constituída por aminoácidos, apresentando grandes quantidades de ácido glutâmico, valina

e tirosina (NAKAMURA *et alii*, 1976b). Sugeriu-se que a flocculação da levedura através deste agente pode ser ocasionada pela ligação entre as células e as cadeias de polímeros, constituindo uma matriz tridimensional, a qual é capaz de sedimentar sob condições estáticas (NAKAMURA *et alii*, 1976c).

Detectou-se um outro biofloculante de constituição proteica, denominado NOC-1, produzido por *Rhodococcus erythropolis* S-1, o qual apresenta a propriedade de formar micelas em meio de cultura, além de floccular vários tipos de sólidos em suspensão, incluindo o caulim (TAKEDA *et alii*, 1991a). Esse polímero é localizado na superfície celular, ligando as células adjacentes, permitindo assim, a formação de flocos (TAKEDA *et alii*, 1991b).

Verificou-se que *Streptomyces sp.* A-3315 produz dois tipos de fatores agregantes, denominados 3315-AF (SUZUKI *et alii*, 1988) e 3315-AF2 (UYEDA *et alii*, 1990). O fator agregante 3315-AF é um triglicerídeo, constituído pelos ácidos mirístico, pentadecanóico e palmítico. Uma vez que, o fator 3315-AF é um triglicerídeo, considerou-se que, devido sua natureza lipofílica, ele deve apresentar alguma interação com os sítios hidrofóbicos da membrana celular. O 3315-AF2 é um agente flocculante constituído de bis (2-etilhexil) ftalato. Esse fator, assim como o 3315-AF, agrega principalmente, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, e células HeLa. A atividade agregante dos flocculantes 3315-AF e 3315-AF2 não foi inibida por mono e dissacarídeos e, ambos os fatores, foram inibidos por ácido hialurônico e albumina de soro bovino.

A bactéria *Alcaligenes cupidus* KT201 produz um agente flocculante denominado AI-201, o qual é constituído por glicose, galactose e ácido glucurônico. O agente AI-201 agrega caulim, independentemente da presença de cátions (TOEDA & KURANE, 1991). Verificou-se que algumas linhagens de bactérias flocculantes *Flavobacterium*, isoladas de lodo ativado, foram desfloculadas por tratamento com pronase e também por EDTA. Observou-se que a flocculação é dependente da presença de cálcio no meio (ENDO *et alii*, 1976).

Relatou-se a ocorrência de algumas linhagens de bactérias pertencentes aos gêneros *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Corynebacterium*, as quais produzem substâncias que flocculam argila caulim. A bactéria *Rhodococcus erythropolis* produz um tipo diferenciado de

floculante microbiológico, o qual apresenta uma ampla atividade sobre materiais orgânicos e inorgânicos. Este agente flocula eficazmente diversos tipos de sólidos em suspensão e microrganismos, como, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Microcystis aeruginosa*, lodo ativado, argila caulim, sedimentos de rio, carvão e outros materiais (KURANE *et alii*, 1986).

2.6.4.2. LECTINAS

A agregação de leveduras pode ocorrer através de lectinas produzidas na superfície celular de outros grupos de microrganismos, as quais muitas vezes se encontram em forma de filamentos, denominados fimbrias (SHARON, 1987). Este mesmo pesquisador, examinou o fenômeno de agregação de leveduras por fimbrias do tipo I de *Escherichia coli*, relatando que o sítio receptor específico para esta fimbria difere do sítio para a lectina con A. A atividade aglutinante de con A é inibida por manose e glicose, enquanto que, a *E. coli* não é inibida pela glicose. Foi estudada a especificidade a açúcares em *Escherichia coli* 346 (FIRON *et alii*, 1982), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* (FIRON *et alii*, 1983), através da inibição de agregação da levedura *Sacch. cerevisiae* por diversos derivados de D-manose. FIRON *et alii* (1987), por sua vez, relataram a existência em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, de uma região de ligação hidrofóbica, próxima ao sítio de ligação da manose.

FIRON *et alii* (1984) sugeriram, que embora as lectinas bacterianas na forma de fimbria do tipo I, presentes em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter agglomerans*, sejam usualmente agrupadas sob a denominação "manose-específicas", existem diferenças entre esses gêneros, em relação a especificidade por carboidratos.

2.6.4.3. LACTOBACILOS FLOCULANTES

2.6.4.3.1. ADESÃO DE LACTOBACILOS À SUPERFÍCIES EPITELIAIS

A adesão e colonização do trato digestivo por espécies de *Lactobacillus*, tem sido demonstradas "in vivo" e "in vitro" em diferentes hospedeiros, tais como: galinhas (FULLER, 1973); suínos (HENRIKSSON *et alii*, 1991); e roedores; sendo que, o mecanismo das associações microbianas com as superfícies biológicas é dependente das estruturas da superfície da bactéria e das células hospedeiras (SUEGARA *et alii*, 1975). A agregação é considerada um mecanismo específico ao hospedeiro (LIN & SAVAGE, 1984), sendo que, os microrganismos que colonizam o epitélio gástrico devem ser capazes de se desenvolverem neste ambiente, de acordo com as condições nutricionais aí encontradas (SAVAGE, 1983).

O mecanismo pelo qual os lactobacilos associam-se ao epitélio é ainda desconhecido (SAVAGE, 1983). Porém, foram sugeridos diversos compostos presentes na parede celular do lactobacilos, como sendo os responsáveis pela adesão deste ao tecido epitelial, tais como: carboidratos (FULLER, 1975), proteínas (HENRIKSSON *et alii*, 1991), ácidos lipoteicóico (LTA) (SHERMAN & SAVAGE, 1986). Por outro lado, sugeriu-se que a habilidade do lactobacilos em colonizar determinada superfície celular pode estar mais relacionada com as condições nutricionais e ambientais, do que com a sua capacidade de se ligar à células animais específicas (KOTARSKI & SAVAGE, 1979).

2.6.4.3.2. FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS CAUSADA POR LACTOBACILOS

MOMOSE *et alii* (1969) verificou a ocorrência de agregação de leveduras causada por diferentes espécies de lactobacilos, atribuindo esse fato a força eletrostática existente entre a superfície da levedura e da bactéria.

YOKOYA & OLIVA-NETO (1991), relataram a ocorrência de contaminação da fermentação alcoólica pela bactéria *Lactobacillus fermentum*. Esta pode acarretar, dentre

outros problemas, a floculação da levedura utilizada no processo, ocasionando redução de produtividade, além de dificultar a etapa de separação da levedura por centrifugação. Esses pesquisadores verificaram que o fator responsável pela floculação está ligado a célula da bactéria, não sendo constituído, portanto, por metabólitos liberados no meio de cultivo durante o crescimento. Também mostraram que a floculação causada por *L. fermentum* ocorre numa ampla faixa de pH, compreendida entre 2,5 a 12,0. As células desfloculadas a pH inferior a 2,5 podem sofrer o restabelecimento da floculação, com o ajuste de pH a valores superiores a 2,5.

SANTOS & YOKOYA (1993) verificaram a intensificação da floculação, desses mesmos microrganismos, pela adição de íons cálcio em concentrações finais acima de 10^{-3} M; enquanto que, o íon manganês em concentrações finais de no mínimo 10^{-2} M, e do íon magnésio a 10^{-1} M, também promoveram a floculação. Por outro lado, os íons sódio, potássio, cobre e bário, em concentrações finais variando de 10^{-5} até 2×10^{-1} M, não influenciaram o processo. Foi observado, também, o efeito inibitório do carboidrato manose, em concentrações finais superiores a 7×10^{-2} M. Entretanto, outros carboidratos, tais como a glicose, frutose, galactose, maltose, lactose e sacarose não promoveram a alteração da capacidade floculante da bactéria. Esses mesmos pesquisadores, submeteram células da bactéria floculante *L. fermentum* a tratamento com pronase E de *Streptomyces griseus*, verificando que esta perdeu a sua capacidade floculante. As células de *Sacch. cerevisiae* submetidas ao mesmo tratamento não sofreram alterações quanto a floculação. O tratamento com lisozima e com zimoliase, em células de *L. fermentum* e em *Sacch. cerevisiae*, por sua vez, não ocasionaram alterações na floculação.

3. MATERIAL

3.1. REAGENTES

- Acetato de Sódio - Ecibra
- Ácido Acético - Ecibra
- Ácido Cítrico - Synth
- Anidrido Acético - Merck
- Anidrido Maléico - Merck
- Azul de Metileno - Ecibra
- Citrato de Amônia - Riedel
- Citrato de Sódio - Ecibra
- Cloreto de Alumínio - Merck
- Cloreto de Bário - Merck
- Cloreto de Cálcio - Reagem
- Cloreto de Estrôncio - Merck
- Cloreto Férrico - Reagem
- Cloreto de Lítio - Merck
- Cloreto de Magnésio - Synth
- Cloreto de Potássio - Synth
- Cloreto de Sódio - Reagem
- Concanavalina A tipo III / C-263 - Sigma
- Dextrose - Synth
- 1,4 Dioxano - Fisher Scientific Company
- Etilenodiaminotetracético dissódico dihidratado - Synth
- Extrato de Carne - Difco
- Extrato de Levedura - Biobrás
- Fosfato de Potássio Dibásico - Vetec
- Iodoacetamida I-6125 - Sigma
- Iodeto de Potássio - Incasa
- Iodo - Carlo Erba
- 2-Mercaptoetanol - BDH Biochemicals
- N-Acetilimidazol A-9625 - Sigma
- Nitrito de Sódio - Carlo Erba

- Peptona Bacteriológica - Difco
- Periodato de Sódio - Riedel
- Proteose Peptona - Difco
- Sulfato de Magnésio - Merck
- Sulfato de Manganês - Carlo Erba
- Sulfito de Sódio - B. Herzog
- Tris (Hidroximetil) Aminometano - Synth
- Tween 80 - Difco
- Uréia - Chemco

3.2. EQUIPAMENTOS

- Agitador Magnético - Tecnal, TE 089
- Autoclave - Lufenco (Lutz Ferrando), 39.209
- Balança Analítica - Mettler, H 35
- Balança Semi-Analítica - Micronal, B 2000
- Centrífuga - International Equipment Company, B-20
- Espectrofotômetro - Baush & Lomb, Spectronic 20
- Incubador-Agitador Orbital- New Brunswick Scientific, G-25
- pH-metro - Micronal, B 374
- Projetor de Slide - IEC

3.3. MEIOS DE CULTURA

YEPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose)

Dextrose	20,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
Peptona Bacteriológica	10,0 g
Água Destilada.....	1,0 l

MRS (Lactobacilli Man, Rogosa e Sharpe)

Acetato de Sódio	5,0 g
Citrato de Amônia.....	2,0 g
Dextrose.....	20,0 g
Extrato de Carne.....	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
Fosfato de Potássio Dibásico.....	2,0 g
Proteose Peptona.....	10,0 g
Sulfato de Magnésio	0,204 g
Sulfato de Manganês.....	0,055 g
Tween 80.....	1,0 g
Água Destilada.....	1,0 l

Os meios foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

3.4. MICRORGANISMOS

Para o presente trabalho foram utilizadas as linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* FTPT 0472 e de bactéria *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405, provenientes da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", isoladas de dornas de fermentação, de usinas de álcool do Estado de São Paulo.

4. MÉTODOS

4.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO DE CÉLULAS PARA TESTE DE FLOCULAÇÃO

A bactéria *L. fermentum* foi cultivada em 50 ml de caldo MRS (Lactobacilli Man, Rogosa e Sharpe), por 24 horas a 30°C, utilizando-se como inóculo (1%) um cultivo de 24 horas no mesmo meio.

A levedura *Sacch. cerevisiae* foi cultivada em 50 ml de caldo YEPD (Yeast-Extract-Peptide-Dextrose), e tratada nas mesmas condições das células de bactérias.

Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 8 000 rpm, por 10 minutos, 4°C. Seguiu-se duas lavagens com solução de etilenodiaminotetracético dissódico dihidratado (Na_2EDTA) 0,025 M, e então, de acordo com o teste realizado, as culturas foram ressuspensas em água deionizada, em tampão Tris-HCl 10^{-1} M pH 7,0 ou 7,5.

4.2. DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES CELULARES NA FLOCULAÇÃO

Fixou-se a concentração de células de *L. fermentum* em 0,16 g/l (massa seca), e variou-se a concentração de células de *Sacch. cerevisiae*. A seguir, realizou-se o teste de floculação conforme o descrito no item 4.3.

4.3. TESTE DE FLOCULAÇÃO

Os testes de floculação foram realizados de acordo com o método de STRATFORD & KEENAN (1988), adaptados para a utilização de suspensões mistas de levedura e bactéria. Foram adicionados 3 ml da suspensão de leveduras (3,39 g/l - massa seca), 3 ml da suspensão de bactérias (0,16 g/l - massa seca) e 1,5 ml de

solução de CaCl_2 5×10^{-2} M, em tubos de ensaio (16 x 150 mm), exceto para o teste 4.4, onde substituiu-se a solução de CaCl_2 5×10^{-2} M por outras soluções de íons. Os tubos foram agitados manualmente por 2 minutos. Após 5 minutos, com o auxílio de pipetador automático, coletou-se 3 ml da amostra do sobrenadante, medindo-se sua absorvância em espectrofotômetro, a 600 nm.

Para as análises de modificadores químicos e de íons, realizaram-se paralelamente aos testes um controle positivo em ausência do reagente testado, no qual a condição de máxima floculação era obtida; e um controle negativo, onde não se detectava floculação, realizado na ausência do reagente testado e também da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M, a qual foi substituída por água deionizada. Ambos os controles foram feitos nas mesmas condições dos experimentos. Para a análise dos resultados obtidos nestes testes, estimou-se porcentagem de inibição da floculação (% Inibição) da seguinte maneira:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{D.O. amostra} - \text{D.O. controle positivo}}{\text{D.O. controle negativo} - \text{D.O. controle positivo}} \times 100$$

4.4. TRATAMENTO COM ÍONS

Para verificação da influência de diferentes íons na floculação, as células de levedura e de bactéria foram preparadas de acordo com o item 4.1, e ressuspensas em água deionizada.

4.4.1. TESTE DE SUBSTITUIÇÃO DO CÁLCIO POR DIFERENTES ÍONS

Testou-se o efeito na floculação dos íons lítio, potássio, bário, ferro, alumínio, estrôncio, sódio, magnésio e cálcio, adicionados a uma concentração final de 8×10^{-4} M, em substituição a solução de CaCl_2 5×10^{-2} M. Seguiu-se o teste de floculação conforme descrito no item 4.3. Todos os íons utilizados estavam na forma de cloreto.

4.4.2. TESTE DA ADIÇÃO DE ÍONS SÓDIO E MAGNÉSIO EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CÁLCIO

Inicialmente foi determinada a concentração mínima de íon cálcio, necessária para promover a floculação de *Sacch. cerevisiae* por *L. fermentum*. Para isso, substituiu-se a solução de CaCl_2 5×10^{-2} M, por outras concentrações, que variavam entre 2×10^{-2} a 2×10^{-6} M. Realizou-se os testes de floculação conforme descrito no item 4.3.

A seguir, ressuspendeu-se células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae*, em soluções de NaCl, em concentrações finais variando entre 0,8 a 4,0 M, em presença e em ausência de CaCl_2 . O mesmo procedimento foi utilizado para se testar o efeito de MgCl_2 .

4.5. TESTE DE AGREGAÇÃO COM CONCAVALINA A

As células de levedura e de bactéria utilizadas para os testes de agregação com concanavalina A (con A), foram preparadas conforme descrito no item 4.1. As soluções de con A, foram preparadas em Tampão Fosfato Salino 5×10^{-2} M, pH 6,8 e testadas em concentrações finais variando entre 0 a 1600 mg/l.

4.5.1. AGREGAÇÃO DE *Sacch. cerevisiae*

Os testes de agregação com con A foram realizados de acordo com o item 4.3., com as seguintes alterações: a suspensão de células de bactérias foi substituída por soluções de con A, em concentrações finais variando entre 0 a 1600 mg/l e, a agitação manual dos tubos, foi substituída por agitação em incubador-agitador orbital a 150 rpm, 30°C, durante 45 minutos. Seguiu-se descanso por 5 minutos, e então realizou-se a leitura da absorbância do sobrenadante a 600 nm.

4.5.2. AGREGAÇÃO DE *L. fermentum*

Foi avaliado o efeito agregante da con A em presença de *L. fermentum*, através da substituição do *Sacch. cerevisiae* por diferentes concentrações de con A, nas mesmas condições descritas no item 4.5.1.

Paralelamente, verificou-se a ação agregante da con A em sobrenadante obtido após teste de floculação, no qual utilizou-se concentrações de *Sacch. cerevisiae* de 3,39 g/l (massa seca) e de *L. fermentum* de 2,1 g/l (massa seca).

4.6. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR

As culturas de *L. fermentum* e *Sacch. cerevisiae*, submetidas a tratamento com modificadores químicos foram preparadas conforme descrito no item 4.1.

4.6.1. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE PROTEÍNAS

De acordo com NISHIHARA *et alii* (1977), tratou-se separadamente, células da bactéria e da levedura com modificadores químicos de proteínas, em presença e ausência de uréia 8 M, exceto em testes com iodo, quando utilizou-se a concentração de uréia de 7,5 M. A seguir, as células tratadas foram lavadas duas vezes com água destilada, e submetidas a teste de floculação com células não tratadas conforme descrito no item 4.3.

4.6.1.1. Iodoacetamida As suspensões de células foram tratadas com iodoacetamida 10^{-1} M, a 30°C por 2 h, em tampão Tris-HCl 10^{-1} M (pH 7,5).

4.6.1.2. Sulfito de Sódio As suspensões de células foram incubadas em sulfito de sódio $1,4 \times 10^{-1}$ M, a 30°C por 2 h em tampão Tris-HCl 10^{-1} M (pH 7,5).

- 4.6.1.3. Mercaptoetanol** As suspensões de células foram incubadas em mercaptoetanol 10^{-1} M, a 30°C por 2 h em tampão Tris-HCl 10^{-1} M (pH 7,5).
- 4.6.1.4. Ácido Nitroso** As suspensões de células foram tratadas com ácido nitroso 2,0 M [preparado a "fresco" por reação de nitrito de sódio 2,0 M e ácido acético 2,0 M] por 30 min, a 0°C .
- 4.6.1.5. Anidrido Acético** As suspensões de células foram tratadas com solução de anidrido acético 4×10^{-1} M preparada em dioxano 2,0 M, e incubadas a temperatura ambiente por 30 min, ajustando-se o pH para 6,0 com NaOH 1 N.
- 4.6.1.6. Anidrido Maléico** As suspensões de células foram tratadas com solução de anidrido maléico 2×10^{-1} M preparada em dioxano 2,0 M, e incubadas a temperatura ambiente por 30 min, ajustando-se o pH para 7,5 com NaOH 1 N.
- 4.6.1.7. N-Acetilimidazol** As suspensões de células foram incubadas em N-acetilimidazol 2×10^{-1} M, a 30°C por 2 h em tampão Tris-HCl 10^{-1} M (pH 7,5).
- 4.6.1.8. Iodo** As suspensões de células foram tratadas com iodo 5×10^{-3} M, a 0°C por 3 h em tampão Tris-HCl 10^{-1} M (pH 7,5), contendo iodeto de potássio $2,4 \times 10^{-1}$ M.
- 4.6.1.9. Azul de Metileno / Rosa de Bengala** As suspensões de células foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 10^{-1} M (pH 7,0) contendo azul de metileno ou rosa de bengala 0,01%, mantidas sob agitação, e então irradiadas a temperatura ambiente por 15 min, com projetor de slide (lâmpada de halogênio-tungstênio, 150 W), a uma distância de 10 cm.
- 4.6.1.10. Ácido Perfórmico** As suspensões de células foram tratadas com ácido perfórmico 10% [obtido por reação de peróxido de hidrogênio 30% e ácido fórmico 88% (1:10), por 18 h, 4°C], durante 1 h, 4°C (comunicação pessoal Prof. Dr. AMAYA-FARFÁN, J.).

4.6.2. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE CARBOIDRATOS

Realizou-se tratamento de modificação química de carboidratos da parede celular da bactéria e da levedura, tratando-se separadamente as células com periodato de sódio (NaIO_4) 1×10^{-2} M e 2×10^{-2} M, a 20°C por 30 min, no escuro. A seguir, as células tratadas foram lavadas três vezes com água deionizada e submetidas a teste de floculação com células não tratadas, conforme descrito no item 4.3.

Verificou-se o efeito da lectina con A tratada com periodato de sódio e a seguir, submetida ao teste de agregação com células de *Sacch. cerevisiae* não tratadas. Utilizou-se a con A 10 vezes mais concentrada que a determinada pelo teste descrito em 4.5.1. e, após o tratamento, realizou-se uma diluição na mesma proporção. O teste de agregação foi realizado conforme descrito no mesmo item.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS ÓTIMAS PARA A OCORRÊNCIA DE FLOCULAÇÃO

A floculação de *Sacch. cerevisiae* por *L. fermentum* pôde ser quantificada pela rápida diminuição da turbidez da suspensão das células de levedura com o decorrer do tempo. Na ausência de floculação, a turbidez da suspensão diminui vagarosamente, mas na presença de bactérias floculantes, a queda na turbidez é bastante acelerada. A agitação da suspensão de células é essencial para o início do processo de floculação.

Obteve-se um valor máximo de floculação (portanto com leitura mínima da absorbância do sobrenadante do teste de floculação), utilizando-se *L. fermentum* com absorbância de 0,45 e *Sacch. cerevisiae* com absorbância de 4,1, correspondendo respectivamente a 0,16 g/l (massa seca) e 3,39 g/l (massa seca) de células de bactéria e de levedura (FIGURA 3). Dessa forma, obteve-se uma relação entre as massas de bactéria e de levedura igual a 0,047, enquanto que, YOKOYA & OLIVA-NETO (1991), utilizando os mesmos microrganismos, porém em diferentes condições experimentais (células suspensas em tampão citrato 5×10^{-2} M, pH 3,0 com EDTA 5×10^{-3} M e teste de floculação realizado em agitador-incubador orbital a 90 rpm, por 10 min a 30°C), obtiveram uma relação de 0,061 de massa de bactéria por levedura.

Esses resultados mostram a relação ótima entre as concentrações celulares onde a floculação atingiu o valor máximo, de acordo com as condições dos testes realizados. Dessa forma, quando havia um excesso de bactérias, a maioria das células de leveduras estavam floculadas; por outro lado, quando havia um excesso de leveduras, as bactérias presentes se encontravam associadas, enquanto que o excedente de leveduras permanecia no sobrenadante.

Após a determinação da concentração ótima entre células de *Sacch. cerevisiae* e de *L. fermentum*, utilizou-se essas concentrações celulares nos testes de floculação realizados neste trabalho.

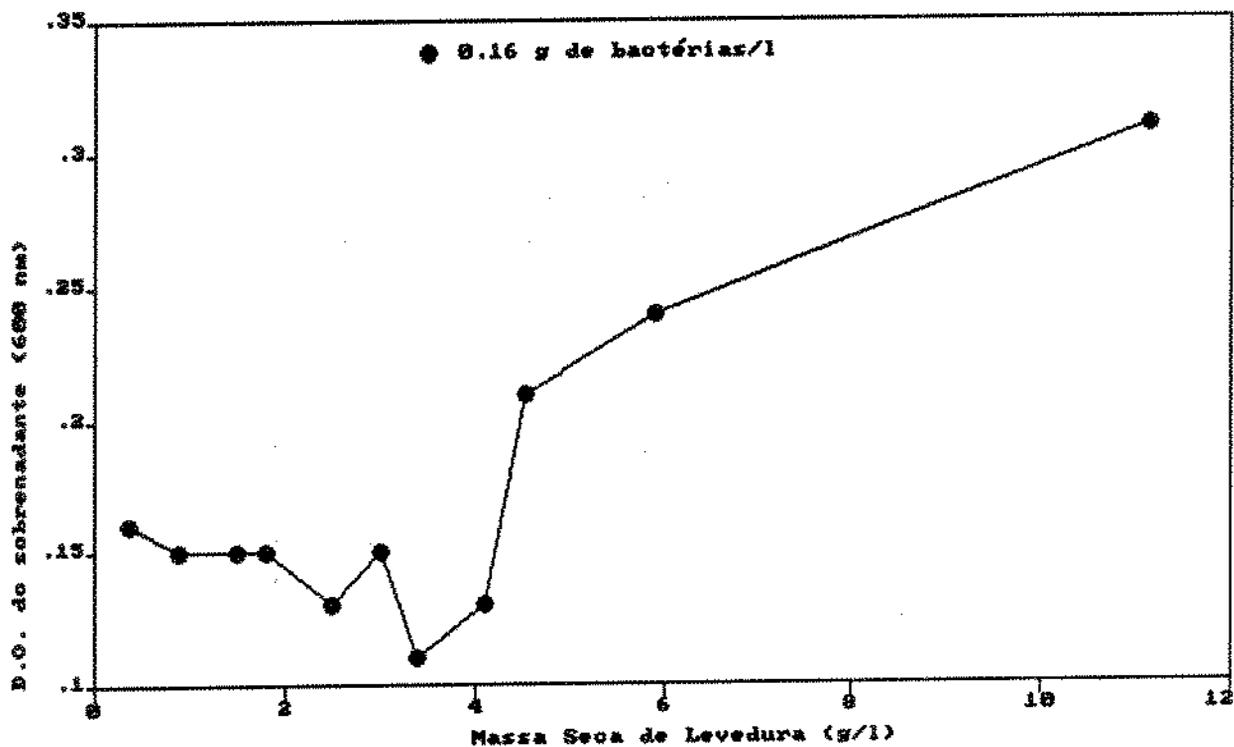


FIGURA 3 - Floculação em concentrações variáveis de *Sacch. cerevisiae* na presença de uma concentração fixa de *L. fermentum* (0,45 de absorvância).

5.2. TRATAMENTO COM ÍONS

5.2.1. EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES ÍONS NA FLOCULAÇÃO

Avaliou-se o efeito na floculação de *Sacch. cerevisiae* por *L. fermentum*, de íons monovalentes, divalentes e trivalentes, em concentrações finais de 8×10^{-4} M. Para todos os íons foram utilizados sais de um mesmo ânion (cloreto), evitando-se assim a interferência deste na avaliação dos resultados. Verificou-se que o Ba^{+2} e o Ca^{+2} foram os íons que promoveram a floculação mais intensamente, enquanto que, o íon Fe^{+3} apresentou uma forte ação inibitória ao processo TABELA 1.

TABELA 1 - Efeito de íons na floculação de *Sacch. cerevisiae* por *L. fermentum*.

ÍONS (8×10^{-4} M)	D.O. do sobrenadante (600 nm)
Controle (+)	0,06
Controle (-)	1,00
K ⁺	0,11
Li ⁺	0,24
Na ⁺	0,12
Ba ⁺²	0,02
Ca ⁺²	0,04
Mg ⁺²	0,08
Sr ⁺²	0,08
Al ⁺³	0,44
Fe ⁺³	0,72

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

Na floculação de leveduras flocculantes, a sua intensidade devido a presença de cátions é dependente da linhagem de microrganismo; da valência; tipo do cátion (KURIYAMA *et alii*, 1991) e do pH (MIKI *et alii*, 1982a). Em relação ao papel dos íons na floculação, a literatura sobre leveduras flocculantes relata que, em concentrações mais elevadas do que a testada em nosso experimento, ocorre a inibição da floculação causada por íons Ba^{+2} , enquanto que, os íons Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} (NISHIHARA *et alii*, 1982), Al^{+3} e Fe^{+3} (STRATFORD, 1989c) apresentaram efeitos promotores da floculação.

Muitos pesquisadores consideram o íon Ca^{+2} como essencial para a ocorrência da floculação (MILL, 1964b; TAYLOR & ORTON, 1975; MIKI *et alii*, 1982a; STRATFORD, 1989c). Porém, de acordo com os resultados obtidos em nosso experimento, verificou-se que o íon Ba^{+2} promoveu a floculação com intensidade similar. O efeito promotor da floculação por cátions não foi ainda completamente elucidado. Assim, a

floculação causada por outros cátions, além do cálcio, foi considerada como resultante de um efeito indireto desse íon, uma vez que, a iniciação deste processo foi atribuída a liberação do cálcio intracelular (STRATFORD, 1989c). Entretanto, STEWART *et alii* (1975) verificaram que as células de leveduras são relativamente impermeáveis aos íons divalentes, pois, na ausência de energia disponível, não há ocorrência de trocas entre íons divalentes extracelulares e de íons divalentes do interior da célula. Além disso, foi observado que células íntegras, bem como paredes celulares isoladas de leveduras flocculentas, comportam-se de modo semelhante na presença de outros cátions além do cálcio, o que é um indício da ação direta desses íons sobre a floculação (SOUZA *et alii*, 1992).

Dessa forma, pode-se atribuir o efeito promotor da floculação de *Sacch. cerevisiae* causada por *L. fermentum*, através de íons divalentes (com exceção do cálcio), como sendo devido tanto a ação direta desses íons no processo de floculação, quanto resultante da ação indireta de tais íons, os quais podem promover a liberação de íons cálcio.

Observou-se neste trabalho, que os íons divalentes apresentam um efeito flocculante mais intenso do que os monovalentes, os quais, por sua vez, apresentaram uma ação flocculante superior a dos trivalentes (FIGURA 4). Para melhor visualização da influência de cada um dos íons estudados, estabeleceu-se uma ordem crescente, referente ao efeito promotor da floculação.



FIGURA 4 - Ordem crescente de íons em função do efeito na floculação.

O efeito promotor da floculação dos íons divalentes foi considerado por STEWART & GORING (1976) como sendo devido a sua capacidade de atuar como ponte entre as cargas negativas da superfície celular. Os íons monovalentes, por sua vez, podem bloquear estericamente um grupo da superfície celular cuja presença é responsável pelo estado de não-flocculência (MILL, 1964b) ou podem induzir a floculação via contra-íon, efeito onde as

forças repulsivas das cargas negativas da superfície celular são neutralizadas, permitindo assim, a formação de flocos através de pontes de hidrogênio ou por outros tipos de ligação não-iônica entre as células (STEWART & GORING, 1976). De acordo com STRATFORD & BRUNDISH (1990) os sais atuam de formas diferentes na floculação de leveduras: em baixas concentrações são promotores da floculação; em concentrações intermediárias intensificam a floculação; e em altas concentrações são inibidores. No entanto, neste trabalho, em baixas concentrações de Al^{+3} e Fe^{+3} praticamente não foi observada a ocorrência de efeito promotor da floculação.

5.2.2. EFEITO DO ÍON SÓDIO NA FLOCULAÇÃO EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CÁLCIO

Para testar o efeito na floculação dos íons sódio e magnésio em presença de cálcio, determinou-se inicialmente a concentração mínima de cálcio necessária para promover a floculação. Verificou-se que a floculação mais intensa foi obtida, utilizando-se concentrações de cálcio em valores iguais ou maiores que 2×10^{-4} M (FIGURA 5). À medida que se diminuía estas concentrações até 2×10^{-6} M, a floculação foi fortemente inibida. Escolheu-se a concentração de $CaCl_2$ de 8×10^{-4} M, para a realização dos testes.

Testou-se o efeito de diversas concentrações do sal NaCl em presença e em ausência de $CaCl_2$ 8×10^{-4} M, em relação a floculação de *L. fermentum* e *Sacch. cerevisiae*. Observou-se que íons sódio, em concentrações de até 3,2 M tanto em presença como em ausência de cálcio, não causaram a inibição da floculação; porém, em concentração de 4 M, ocorreu uma súbita inibição da floculação em presença de cálcio (FIGURA 6). O mesmo efeito inibitório não foi observado, na presença exclusiva de sódio 4 M.

A inibição da floculação devido a presença de íon sódio e cálcio, pode ser considerada como um efeito aditivo da ação combinada dos dois íons. Considerando que o NaCl 4 M não foi inibitório à floculação, podemos supor que a inibição do processo, causado pelo Na^+ em presença de Ca^{+2} , possa ser atribuída ao sinergismo de ação de ambos os íons. Estes resultados estão de acordo com as observações de STRATFORD & BRUNDISH (1990), que relataram que a inibição causada por vários sais pode ser resultante de efeitos aditivos, uma vez que, diversos íons, tais como Na^+ e Ca^{+2} , em

concentrações sub-inibitórias quando em combinação, podem passar a exercer um efeito inibitório da floculação.

De acordo com alguns pesquisadores, o íon sódio em concentrações de $4,3 \times 10^{-5}$ a $4,3 \times 10^{-4}$ M causa a floculação de leveduras, enquanto que, em concentrações mais altas de $2,2 \times 10^{-3}$ a $4,3 \times 10^{-3}$ M apresenta efeitos inibitórios (STEWART & GORING, 1976). O efeito promotor da floculação devido a presença deste íon, foi atribuído ao efluxo de cálcio das células de leveduras provocado pelo sódio. Sob concentrações mais altas de sódio, a ação dos íons cálcio é inibida competitivamente pelo sódio e não ocorre a floculação (STRATFORD, 1989c). De acordo com MILL (1964b), o sódio antagoniza a ação do cálcio, deslocando competitivamente o íon cálcio de seus sítios específicos na parede celular, devido a similaridade entre os raios do cristal iônico do cálcio (0,99 Å) e do sódio (0,98 Å).

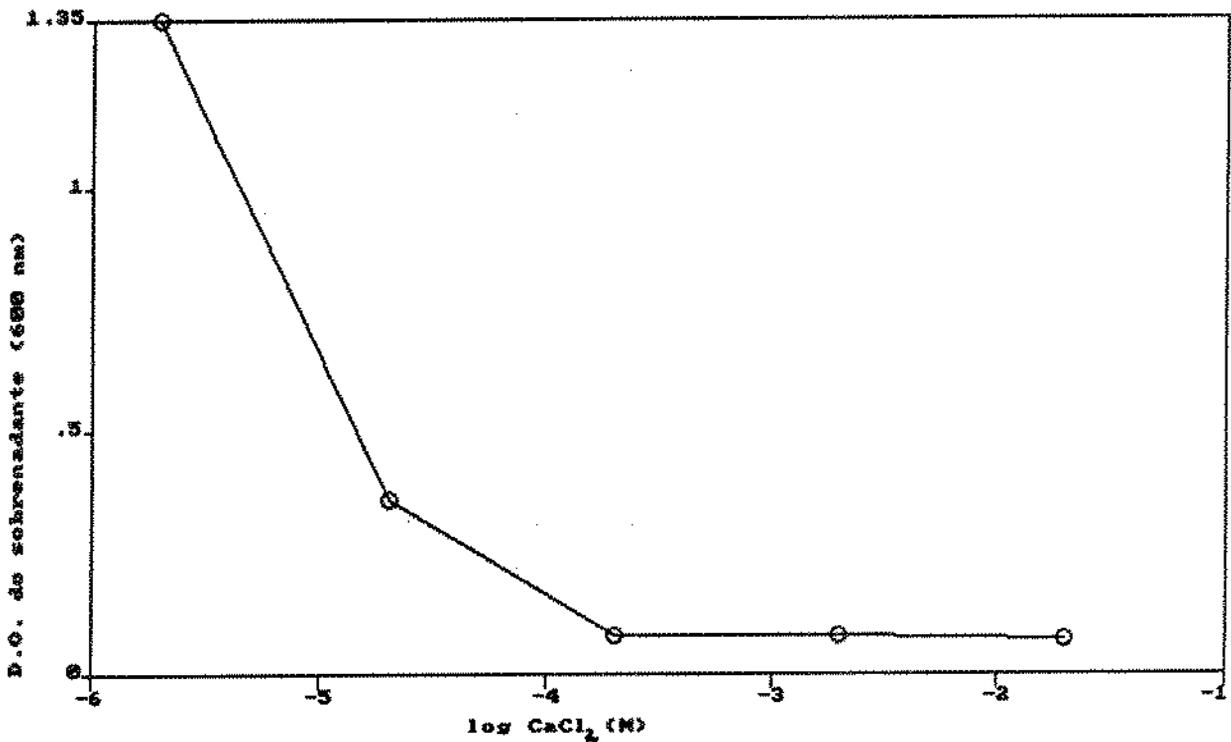


FIGURA 5 - Efeito da concentração de íons cálcio na floculação

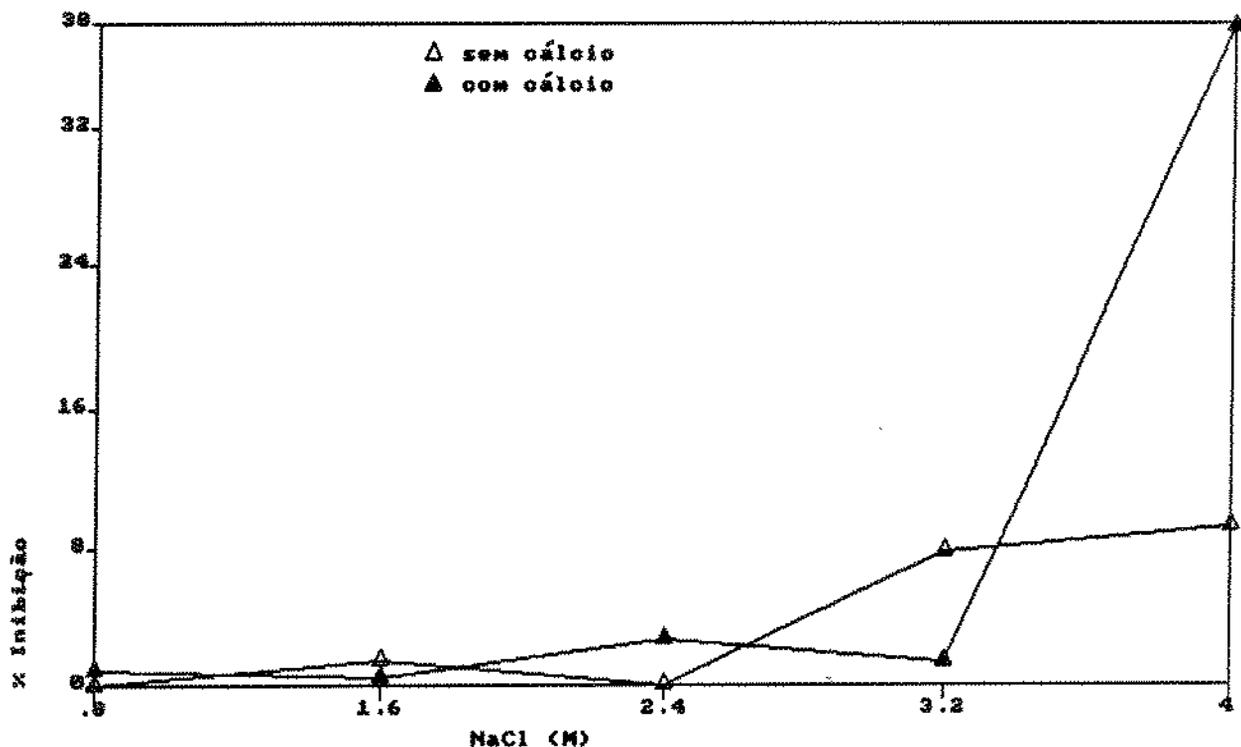


FIGURA 6 - Efeito do íon sódio na flocculação em presença e em ausência de cálcio 8×10^{-4} M.

5.2.3. EFEITO DO ÍON MAGNÉSIO NA FLOCULAÇÃO EM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CÁLCIO

Foi observada a relação existente entre o efeito promotor da flocculação de íons cálcio e a ação antagonista de magnésio. Verificou-se uma progressiva inibição da flocculação à medida que se aumentava a concentração de magnésio até 4 M, tanto em presença como em ausência de cálcio 8×10^{-4} M (FIGURA 7).

De acordo com STRATFORD (1989c), a inibição da floculação causada por altas concentrações de sais é de natureza queotrópica, sendo resultado da distorção proteica provocada por íons altamente carregados e pela desidratação da proteína. O queotropismo descreve distúrbios causados por sais a moléculas de grandes dimensões, tais como proteínas e lipídeos. Isto pode ocorrer diretamente, através de ligações com cátions altamente carregados, causando mudanças conformacionais em tais moléculas; ou indiretamente, através de alterações das moléculas de água intramoleculares, ou ainda por efeitos de desidratação, uma vez que, íons altamente carregados atraem moléculas de água e podem retirar água suficiente das moléculas de proteínas, causando então, distorções por desidratação.

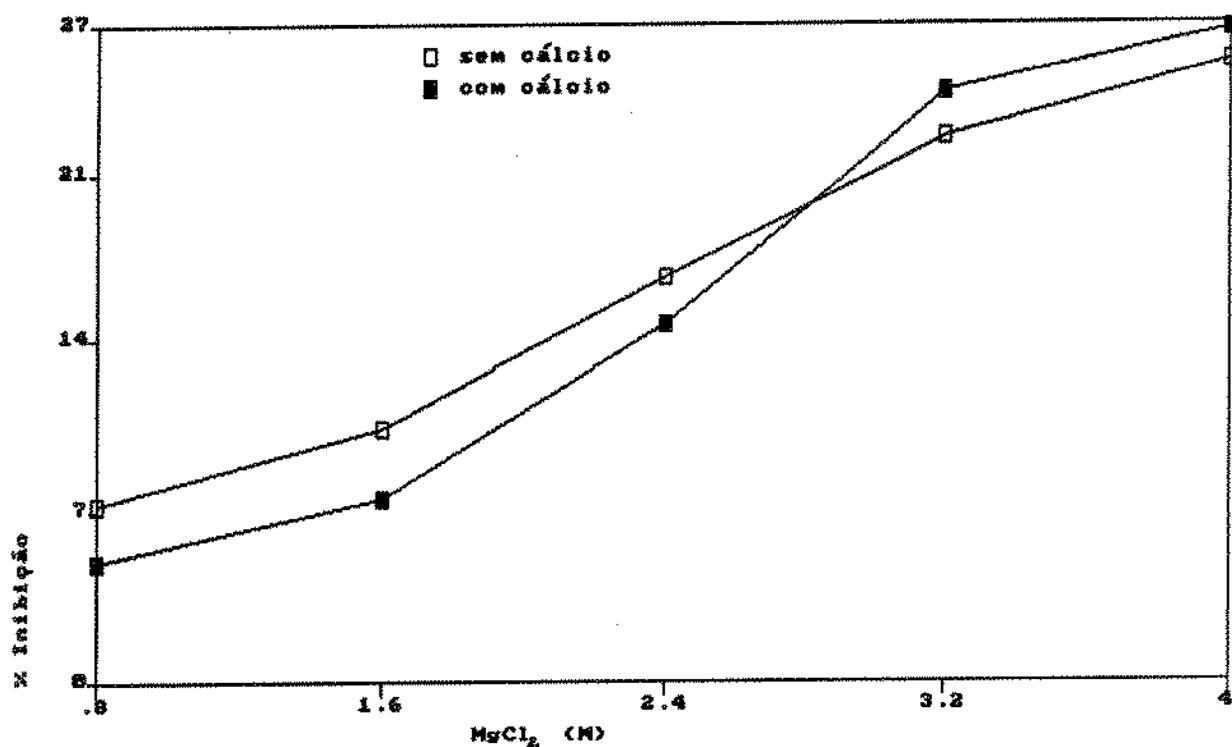


FIGURA 7 - Efeito do íon magnésio na floculação em presença e em ausência de cálcio 8×10^{-4} M.

STRATFORD & BRUNDISH (1990) mostraram que a capacidade inibitória de um íon sobre a floculação, coincide com a diminuição do raio iônico e o aumento da carga iônica, os quais constituem a densidade de carga do íon e descrevem uma série queotrópica. Os íons de maior densidade de carga (Ca^{+2} ou Mg^{+2}), em geral apresentam maiores efeitos queotrópicos. Conforme foi verificado neste experimento, a inibição progressiva da floculação por íons magnésio, independentemente da presença de cálcio, pode ser ocasionada pela ocorrência de distorções nas moléculas proteicas da parede celular, devido a densidade de carga do íon magnésio.

5.3. AGREGAÇÃO CELULAR POR CONCANAVALINA A

A interação entre os microrganismos estudados e a lectina concanavalina A (con A), foi referida neste trabalho pelo termo genérico "agregação", uma vez que esta apresenta alguns aspectos diferentes da floculação. STRATFORD (1992a) relatou que a agregação de leveduras por con A ocorre através de múltiplas ligações fracas envolvendo a lectina e os receptores das células, enquanto que, a floculação ocorre através de ligações fortes entre as lectinas floculantes, presentes na superfície das células, e os sítios receptores.

A con A em pH neutro, apresenta-se na forma de tetrâmero, sendo constituída por quatro subunidades (HARDMAN & AINSWORTH, 1976); porém, em valores de pH menores que 5,6 a con A se separa em dois dímeros idênticos (McKENZIE *et alii*, 1972). Nos experimentos realizados neste trabalho, foi utilizada a con A na forma tetramérica, uma vez que todos os testes foram realizados na faixa de pH neutro.

A agitação manual por 2 minutos, utilizada nos testes de floculação, não foi satisfatória para ação da con A, por esta razão, a agitação foi realizada em incubador-agitador orbital 150 rpm por 45 minutos.

5.3.1. AGREGAÇÃO DE *Sacch. cerevisiae* POR CONCANAVALINA A

Para verificar se o fator promotor da floculação de *Sacch. cerevisiae* possui as mesmas características de uma lectina, foram realizados testes de agregação com a con A. Pôde-se observar que, com a elevação da concentração de con A havia um aumento na proporção de células da levedura que eram agregadas, até atingir uma agregação máxima com valores de 320 mg/l de con A (FIGURA 8). Com o aumento da concentração de con A até aproximadamente 600 mg/l, pouca mudança foi observada, porém aumentos adicionais da concentração resultaram em uma progressiva inibição da agregação.

A inibição da agregação devido a presença de concentrações altas de con A foi atribuída à saturação dos sítios receptores de con A. Este comportamento é semelhante ao observado por STRATFORD & BOND (1992), que utilizaram a con A na forma dimérica, para a agregação da linhagem de *Sacch. cerevisiae* S646-8D.

A partir da obtenção da concentração ótima de con A necessária para agregar células de *Sacch. cerevisiae*, pôde-se calcular o número de moléculas de con A que se ligaram em cada célula da levedura. Foi verificado que, 320 mg/l de con A agregam $4,40 \times 10^{11}$ células/l. Sendo o peso molecular da con A tetramérica de 108 000 (HARDMAN *et alii*, 1971), isto implica em $6,72 \times 10^{-18}$ mol de con A por célula de levedura. Usando-se o número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$), obtem-se $4,04 \times 10^6$ moléculas de con A por célula de levedura. Estes valores são menores do que os requeridos para a agregação de uma linhagem de levedura não-floculenta (*Sacch. cerevisiae* S646-8D) utilizando-se con A em forma dimérica, pH 4,0, onde verificou-se serem necessárias $5,68 \times 10^7$ moléculas da lectina para agregar cada célula de levedura (STRATFORD & BOND, 1992). Esses mesmos pesquisadores afirmaram que as concentrações nas quais a con A causa a agregação e a inibição, variam com a concentração celular, sugerindo que a inibição por altos níveis de con A é mais dependente da ligação com as células do que por efeito químico, mostrando portanto, que a relação entre moléculas de lectina por células é um ponto crítico para se determinar a agregação.

Os resultados obtidos sugerem que deva existir uma especificidade similar pelos sítios receptores da superfície de *Sacch. cerevisiae*, entre a con A e a lectina floculante de *L. fermentum*.

5.3.2. AGREGAÇÃO DE *L. fermentum* POR CONCANAVALINA A

De acordo com o teste de agregação de células de *L. fermentum* por con A, observou-se que a concentração da lectina inicialmente testada de 20 mg/l, não causou a agregação da bactéria. Em concentrações de con A iguais ou superiores a 80 mg/l, observou-se a ocorrência de agregação da bactéria, a qual atingiu o valor mais intenso a 160 mg/l. Com o aumento da concentração da lectina, a agregação se manteve a níveis relativamente constantes (FIGURA 8).

O teste de agregação entre a con A e o sobrenadante proveniente de teste de floculação, o qual apresentava uma concentração excedente de células de *L. fermentum* (2,1 g/l - massa seca), resultou em agregação da bactéria pela lectina. Este fato foi constatado através da leitura da absorbância do sobrenadante, o qual diminuiu de 0,45 (teste de floculação) para 0,07 (teste de agregação).

A partir da obtenção da concentração ótima de con A, necessária para agregar células de *L. fermentum*, pôde-se calcular o número de moléculas de con A que se ligaram a cada célula da bactéria. Foi verificado que 160 mg/l de con A agregam $6,1 \times 10^{11}$ células/l; isto resulta em $2,43 \times 10^{-18}$ mol de con A por célula de bactéria; usando-se o número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$), obtem-se $1,46 \times 10^6$ moléculas de con A por célula de bactéria.

Estes resultados sugerem que existem sítios receptores para a con A na superfície celular de *L. fermentum*. Isto confirma o relato de FULLER (1975) que estudou os determinantes envolvidos na adesão de lactobacilos ao epitélio do "papo" de galinha, apresentando evidências de que este é constituído por carboidratos capazes de ligar a con A. CONWAY & KJELLEBERG (1989), por sua vez, verificaram a inibição da adesão de *L. fermentum* ao epitélio gástrico de camundongos devido a ação de con A. A especificidade da con A por moléculas de glicose, manose, frutose ou arabinose com configuração α -anomérica (SHARON & LIS, 1972) indicam a existência de um ou mais desses sítios na superfície destas bactérias, os quais podem estar envolvidos nos processos de adesão.

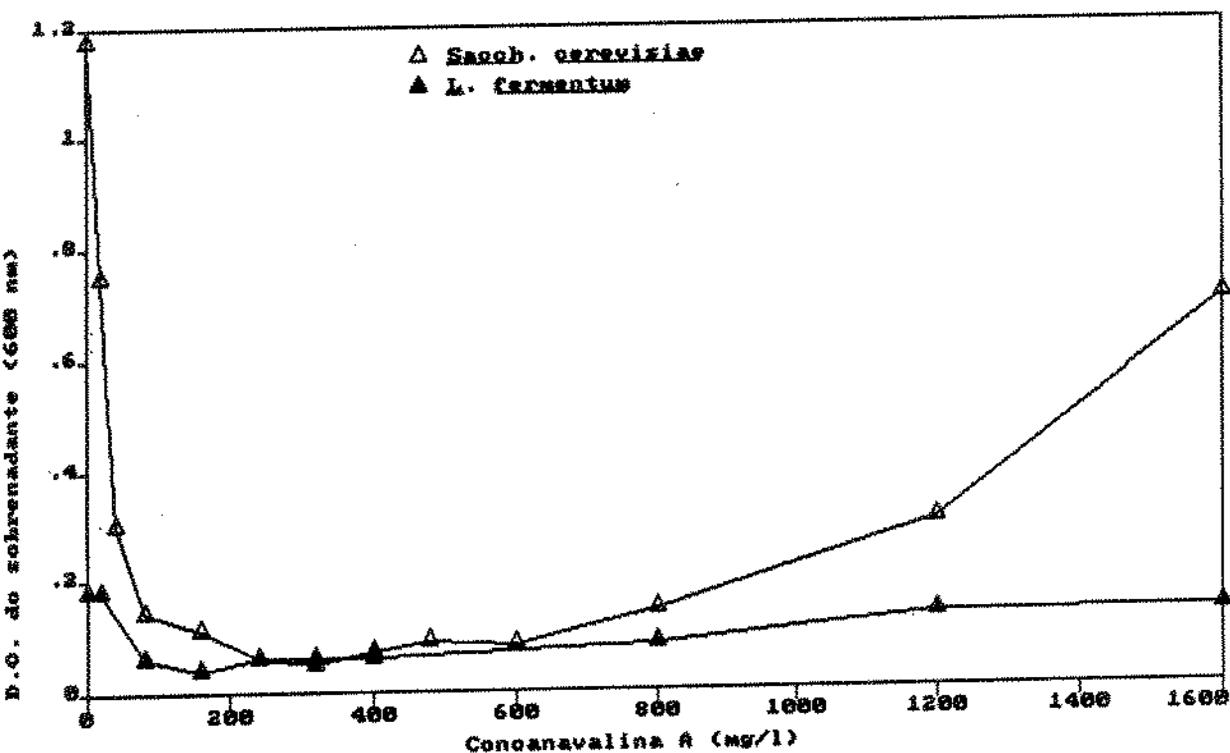


FIGURA 8 - Agregação de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* por con A.

5.4. TRATAMENTO DE CÉLULAS DE BACTÉRIA E DE LEVEDURA COM MODIFICADORES QUÍMICOS DE PROTEÍNAS.

O grau de reatividade dos grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos, depende principalmente da natureza química do grupo funcional; estado de exposição estérica ou acessibilidade da cadeia lateral; e do pH do meio (AMAYA-FARFÁN, 1990).

A modificação química dos grupos funcionais de aminoácidos, muitas vezes, requer condições severas de reação. Para se obter tais condições usa-se, frequentemente, altas concentrações de uréia. Embora este reagente não se envolva na reação química, este provoca a desnaturação de proteínas, aumentando assim, a acessibilidade e a reatividade das cadeias laterais dos aminoácidos aos modificadores químicos (MEANS & FEENEY, 1971).

5.4.1. EFEITO DA FOTO-OXIDAÇÃO DE CÉLULAS

As células de *L. fermentum* ao serem submetidas a tratamento de foto-oxidação com azul de metileno (TABELA 2) e rosa de bengala (TABELA 3) apresentaram sua capacidade de flocular inibida. Os mesmos tratamentos, quando realizados em *Sacch. cerevisiae*, tanto na presença como na ausência de uréia, não ocasionaram mudanças na floculação.

O tratamento de foto-oxidação com azul de metileno e rosa de bengala pode promover reações com os grupos funcionais sulfidríla, fenol, imidazol, indol, metionila e pontes dissulfeto. Dessa forma, sugere-se que alguns destes grupos presentes na parede celular de *L. fermentum*, podem estar envolvidos no processo de floculação.

TABELA 2. Efeito na floculação, do tratamento de foto-irradiação de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com azul de metileno (em temperatura ambiente por 15 min, pH 7,0). As células foram mantidas sob agitação e irradiadas com projetor de slide a 10 cm de distância.

MODIFICADOR QUÍMICO	IRRADIAÇÃO	<i>L.</i> <i>fermentum</i>	<i>Sacch.</i> <i>cerevisiae</i>
controle (+)	-	0,07	0,07
controle (-)	-	0,88	1,50
0,01% azul de metileno + 8 M uréia	+	1,60	0,20
0,01% azul de metileno + 8 M uréia	-	0,11	0,18
0,01% azul de metileno	+	1,13	0,18
0,01% azul de metileno	-	0,44	0,21

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

TABELA 3. Efeito na floculação, do tratamento de foto-irradiação de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com rosa de bengala (em temperatura ambiente por 15 min, pH 7,0). As células foram mantidas sob agitação e irradiadas com projetor de slide a 10 cm de distância.

MODIFICADOR QUÍMICO	IRRADIAÇÃO	<i>L.</i>	<i>Sacch.</i>
		<i>fermentum</i>	<i>cerevisiae</i>
controle (+)	-	0,07	0,06
controle (-)	-	0,88	1,35
0,01% rosa de bengala + 8 M uréia	+	1,52	0,06
0,01% rosa de bengala + 8 M uréia	-	0,06	0,11
0,01% rosa de bengala	+	1,46	0,05
0,01% rosa de bengala	-	0,08	0,05

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

5.4.2. EFEITO DA ACILAÇÃO DE CÉLULAS

Verificou-se que células de *L. fermentum* quando tratadas com os reagentes acilantes anidrido acético (TABELA 4), anidrido maléico (TABELA 5) e N-acetilimidazol (TABELA 6), apresentaram inibição de sua capacidade de flocular células de *Sacch. cerevisiae*. Por outro lado, estes mesmos tratamentos quando realizados em células de *Sacch. cerevisiae*, não acarretaram alterações no processo de floculação.

Esses reagentes acilantes podem atuar sobre os grupos funcionais amina, sulfidríla, fenol e imidazol. De acordo com os resultados obtidos em células de *L. fermentum*, sugere-se a participação direta ou indireta no processo de floculação, de pelo menos algum desses grupos.

TABELA 4. Efeito na floculação, do tratamento de células *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com anidrido acético (temperatura ambiente por 30 min, pH 6,0).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle (+)	0,10	0,09
controle (-)	1,28	1,55
0,4 M anidrido acético + 8 M uréia	1,66	0,10
0,4 M anidrido acético	1,60	0,16
2 M dioxano	0,10	0,21
8 M uréia	0,04	0,12

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

TABELA 5. Efeito na floculação, do tratamento de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com anidrido maléico (temperatura ambiente por 30 min, pH 7,5).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle (+)	0,04	0,06
controle (-)	1,40	1,37
0,4 M anidrido maléico + 8 M uréia	1,56	0,23
0,4 M anidrido maléico	1,86	0,16
2 M dioxano	0,21	0,28
8 M uréia	0,05	0,10

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

TABELA 6. Efeito na floculação, do tratamento de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com N-acetilimidazol (30°C por 2 h, pH 7,5).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle (+)	0,08	0,06
controle (-)	1,70	1,45
0,2 M N-acetilimidazol + 8 M uréia	1,70	0,08
0,2 M N-acetilimidazol	1,65	0,06
8 M uréia	0,14	0,06

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

5.4.3. EFEITO DA DESAMINAÇÃO DE CÉLULAS

Células de *L. fermentum* foram desaminadas ao serem tratadas com ácido nitroso, o que resultou em uma inibição de sua capacidade floculante. A levedura *Sacch. cerevisiae*, por sua vez, ao ser submetida ao mesmo tratamento, não apresentou alterações quanto a sua capacidade de ser floculada por *L. fermentum* (TABELA 7).

O ácido nitroso pode atuar sobre os grupos funcionais amina, sulfidril, fenol e ponte dissulfeto. Dessa forma, pode-se considerar que, alguns desses grupos, presentes na parede celular de *L. fermentum*, podem participar do processo de floculação.

TABELA 7. Efeito na floculação, do tratamento de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com ácido nitroso (0°C por 30 min).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle (+)	0,10	0,09
controle (-)	1,28	1,55
2 M NaNO ₂ + 2 M CH ₃ COOH + 8 M uréia	1,50	0
2 M NaNO ₂ + 2 M CH ₃ COOH	1,55	0,11
2 M NaNO ₂	0,12	0,05
2 M CH ₃ COOH	0,25	0,05
8 M uréia	0,12	0,10

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl₂ 5 X 10⁻² M.

5.4.4. EFEITO DA IODINIZAÇÃO DE CÉLULAS

O tratamento de células de *L. fermentum* com iodo ocasionou a inibição da capacidade floculante da bactéria, mas não afetou as células de *Sacch. cerevisiae* (TABELA 8). O iodo é um reagente que pode atuar sobre grupos sulfidríla, fenol e imidazol. Pode-se considerar com os resultados obtidos em células de *L. fermentum*, que pelo menos algum grupo dentre os citados pode estar envolvido direta ou indiretamente no processo de floculação.

TABELA 8. Efeito na floculação, do tratamento de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com iodo (0°C por 3 h, pH 7,5).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle (+)	0,06	0,06
controle (-)	1,60	1,45
0,05 M I ₂ + 0,24 M KI + 7,5 M uréia	1,71	0,06
0,05 M I ₂ + 0,24 M KI	1,65	0,04
0,24 M KI	0,05	0,06
7,5 M uréia	0,11	0,09

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl₂ 5 X 10⁻² M.

5.4.5. EFEITO DA ÓXIDO-REDUÇÃO DE CÉLULAS

Observou-se que células de *L. fermentum* tratadas com o reagente óxido-redutor ácido perfórmico (TABELA 9) tiveram sua capacidade floculante alterada. Por outro lado, os modificadores sulfito de sódio (TABELA 10) e mercaptoetanol (TABELA 11), tanto em presença como em ausência de uréia, não influenciaram o processo. As células de *Sacch. cerevisiae*, por sua vez, quando tratadas com estes reagentes óxido-redutores, em presença ou em ausência de uréia, não apresentaram alterações quanto a sua capacidade de serem floculadas por *L. fermentum*.

O sulfito de sódio pode reagir com os grupos sulfidríla e com pontes de dissulfeto; o mercaptoetanol pode atuar apenas sobre as pontes dissulfeto; e o ácido perfórmico pode agir sobre os grupos sulfidríla, metionila, indol e pontes dissulfeto. Esses resultados indicam que as pontes dissulfeto presentes na parede celular de *L. fermentum*, não devem participar do processo de floculação, uma vez que a óxido-redução com o reagente mercaptoetanol, o qual possui especificidade por estes grupos, não alterou a capacidade floculante da bactéria; os grupos sulfidríla, por sua vez, também não parecem se envolver no processo, pois não houve reação devido o tratamento com sulfito de sódio. Dessa forma, a inibição da

floculação após o tratamento das células de bactéria por ácido perbórmico, pode ser atribuída a reação ocorrida sobre os grupos funcionais metionila ou indol.

TABELA 9. Efeito na floculação, do tratamento de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com ácido perbórmico (4°C por 1 h).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle (+)	0,08	0,09
controle (-)	1,75	1,45
10% ácido perbórmico + 8 M uréia	0,93	0,13
10% ácido perbórmico	1,58	0,09
8 M uréia	0,13	0,13

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

TABELA 10. Efeito na floculação, do tratamento de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com sulfito de sódio (30°C por 2 h, pH 7,5).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle (+)	0,08	0,10
controle (-)	0,88	1,47
0,14 M Na_2SO_3 + 8 M uréia	0,11	0,09
0,14 M Na_2SO_3	0,05	0,11
8 M uréia	0,12	0,10

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

TABELA 11. Efeito na floculação, do tratamento de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com mercaptoetanol (30°C por 2 h, pH 7,5).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle (+)	0,05	0,05
controle (-)	1,50	1,50
0,1 M mercaptoetanol + 8 M uréia	0,13	0,09
0,1 M mercaptoetanol	0,05	0,05
8 M uréia	0,15	0,08

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

5.4.6. EFEITO DA ALQUILAÇÃO DE CÉLULAS

Verificou-se que as células de *L. fermentum* e *Sacch. cerevisiae* após serem submetidas a tratamento com iodoacetamida, em presença ou em ausência de uréia, não sofreram alterações em relação a floculação (TABELA 12).

A iodoacetamida é um reagente alquilante, que pode atuar sobre os seguintes grupos funcionais de aminoácidos: amina, sulfidril, imidazol e metionila. Sendo assim, embora estes grupos podem ter reagido ao serem tratados com este modificador químico, não há evidências de que estes participem, ao menos diretamente, do processo de floculação.

TABELA 12. Efeito na floculação, do tratamento de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com iodoacetamida (30°C por 2 h, pH 7,5).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle (+)	0,04	0,06
controle (-)	1,50	1,50
0,3 M iodoacetamida + 8 M uréia	0,06	0,09
0,3 M iodoacetamida	0,09	0,05
8 M uréia	0,05	0,09

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl_2 5×10^{-2} M.

Os experimentos com modificadores químicos de proteínas mostraram que a presença de uréia 8 M não influenciou a reação de floculação. Isto sugere que os grupos reativos dos aminoácidos da parede celular, que podem estar envolvidos na floculação, se apresentavam acessíveis a ação dos modificadores químicos.

Observou-se que células de *L. fermentum* apresentaram altas porcentagens de desfloculação ao serem submetidas aos seguintes tratamentos (TABELA 13): oxidação com ácido perfórmico (inibição de 90,1%); desaminação com ácido nitroso (inibição de 123,0%); acilação com anidrido maléico (inibição de 134,1%), anidrido acético (inibição de 114,9%) e N-acetilimidazol (inibição de 96,9%); iodinação com iodo (inibição de 103,2%); e foto-oxidação com azul de metileno (inibição de 130,9%) e com rosa de bengala (inibição de 171,6%). Por outro lado, o tratamento de *L. fermentum*, com o reagente alquilante iodoacetamida, e os oxidantes mercaptoetanol e sulfito de sódio, não interferiram na capacidade floculante da bactéria. Em nenhum dos tratamentos com modificadores químicos de proteínas realizados em células de *Sacch. cerevisiae*, verificou-se a interferência destes na capacidade da levedura de ser floculada por *L. fermentum*.

TABELA 13. Porcentagem de inibição obtida por tratamento de *Sacch. cerevisiae* e *L. fermentum* com modificadores químicos de proteínas.

MODIFICADOR QUÍMICO	% INIBIÇÃO	
	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
Iodoacetamida	3,42	-0,5
Sulfito de Sódio	-4,1	0,7
Mercaptoetanol	0	0,5
Ácido Nitroso	123,0	1,4
Anidrido Acético	114,9	4,6
Anidrido Maléico	134,1	7,6
N-Acetilimidazol	96,9	0
Iodo	103,2	-1,1
Azul de Metileno	130,9	8,0
Rosa de Bengala	171,6	-0,8
Ácido Perfórmico	90,1	0,2

Cada um dos grupos funcionais presentes nas cadeias laterais de determinados aminoácidos, da parede celular dos microrganismos submetidos aos tratamentos de modificação química de proteínas, apresentam reatividade por alguns dos reagentes testados (TABELA 14). Assim sendo, os resultados obtidos, sugerem que os grupos funcionais indol e fenol, presentes, respectivamente, nos aminoácidos triptofano e tirosina, da parede celular de *L. fermentum*, possivelmente participam, direta ou indiretamente do processo de floculação. No entanto, em relação aos grupos amina, sulfidrila, imidazol, metionila e pontes dissulfeto, presentes respectivamente nos aminoácidos lisina e em aminas terminais, cisteína, histidina, metionina, e cistina não se pôde concluir a respeito de seus envoltimentos na floculação, pois não se verificou uma uniformidade de resultados após as células serem submetidas aos tratamentos. Isto indica que, embora os modificadores mercaptoetanol, sulfito de sódio e iodoacetamida, podem ter reagido com os grupos funcionais presentes na parede celular da bactéria, estes grupos não parecem estar envolvidos no processo de floculação.

A literatura nos mostra (NISHIHARA *et alii*, 1977), que em leveduras flocculentas ocorre a participação de um maior número de grupos funcionais de aminoácidos presentes na parede, assim sendo, células de levedura flocculante *Sacch. cerevisiae*, tiveram a sua capacidade de floccular inibida ao serem submetidas as reações de foto-oxidação com azul de metileno e rosa de bengala; desaminação com ácido nitroso; iodinação com iodo; acilação com anidrido acético e anidrido maléico; e redução com mercaptoetanol. Isto indica que os grupos imidazol, amina, fenol e pontes dissulfeto, são importantes na capacidade flocculante da levedura. Nesse mesmo trabalho, foi verificado também, que os modificadores químicos N-acetilimidazol, azul de metileno e iodo, necessitam da presença de uréia 8 M para reagirem com os grupos funcionais dos aminoácidos, sugerindo que esses grupos não se encontram acessíveis aos modificadores de proteínas na ausência do desnaturante.

TABELA 14 - Efeito da modificação química de aminoácidos de *L. fermentum* na floculação.

GRUPO FUNCIONAL	AMINOÁCIDO	REAGENTE	REAÇÃO
Amina	Lisina Amina terminal	Ácido Nitroso	+
		Anidrido Acético	+
		Anidrido Maléico	+
		Iodoacetamida	-
		N-Acetilimidazol	+
Sulfidril	Cisteína	Ácido Nitroso	+
		Ácido Perfórmico	+
		Anidrido Acético	+
		Anidrido Maléico	+
		Azul de Metileno	+
		Iodo	+
		Iodoacetamida	-
		N-Acetilimidazol	+
		Rosa de Bengala	+
		Sulfito de Sódio	-
Indol	Tryptofano	Ácido Perfórmico	+
		Azul de Metileno	+
		Rosa de Bengala	+
Fenol	Tirosina	Ácido Nitroso	+
		Anidrido Acético	+
		Anidrido Maléico	+
		Azul de Metileno	+
		Iodo	+
		N-Acetilimidazol	+
		Rosa de Bengala	+
Imidazol	Histidina	Anidrido Acético	+
		Anidrido Maléico	+
		Azul de Metileno	+
		Iodo	+
		Iodoacetamida	-
		N-Acetilimidazol	+
		Rosa de Bengala	+
Dissulfeto	Cistina	Ácido Nitroso	+
		Ácido Perfórmico	+
		Azul de Metileno	+
		Mecaptoetanol	-
		Rosa de Bengala	+
		Sulfito de Sódio	-
Metionila	Metionina	Ácido Perfórmico	+
		Azul de Metileno	+
		Rosa de Bengala	+
		Iodoacetamida	-

+ (reagente inibitório)

- (reagente não inibitório)

5.5. TRATAMENTO DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE CARBOIDRATOS.

Verificou-se a participação de carboidratos da parede celular de *Sacch. cerevisiae* e de *L. fermentum* no processo de floculação (TABELA 15). Células de *Sacch. cerevisiae* submetidas a tratamento com periodato de sódio 0,01 M e 0,02 M apresentaram uma inibição em sua capacidade de serem floculadas por células de *L. fermentum* não tratadas (inibição de 100,0% e 105,1%). Isto sugere que os carboidratos da parede celular da levedura são essenciais para a interação com a bactéria, resultando na floculação

Verificou-se que as células de *L. fermentum* tratadas com periodato de sódio 0,02 M e então, submetidas a teste de floculação com células não tratadas de *Sacch. cerevisiae* apresentaram uma inibição em sua capacidade de floculante (inibição de 63,8%). Por outro lado, diminuindo-se a concentração do periodato de sódio para 0,01 M observou-se a não ocorrência de alterações na floculação. Este fato indica que o fator responsável pela capacidade floculante da bactéria não deve ser formado por carboidratos, sendo que, a ocorrência de inibição após o tratamento com periodato de sódio em concentração mais elevada (0,02 M), pode ser atribuída a presença de uma proteína sensível. No entanto, resta ainda a possibilidade desse fator ser constituído por uma glicoproteína, na qual a parte glicídica é importante para a manutenção da lectina em sua conformação ativa. Porém, para se assegurar de que o periodato de sódio não atua sobre proteínas, realizou-se teste de oxidação com este reagente sobre a lectina con A, utilizando-se a concentração de 320 mg/l, a qual foi considerada adequada para a agregação da levedura *Sacch. cerevisiae* (item 5.3.1.). Constatou-se que a con A não apresentou inibição de sua atividade agregante após ser submetida ao tratamento com periodato de sódio, o que foi observado após leitura do sobrenadante do teste de floculação (absorbância igual a 0,12).

TABELA 15. Efeito na floculação do tratamento de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae* com periodato de sódio (20°C por 30 min, no escuro).

MODIFICADOR QUÍMICO	<i>L. fermentum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
controle(+)	0,12	0,12
controle (-)	1,50	1,50
0,01 M NaIO ₄	0,20	1,50
0,02 M NaIO ₄	1,0	1,57
% Inibição (0,01 M NaIO ₄)	5,8	100,0
% Inibição (0,02 M NaIO ₄)	63,8	105,1

controle (+) realizado em ausência do reagente testado.

controle (-) realizado em ausência do reagente testado e acrescido de água destilada, em substituição da solução de CaCl₂ 5 X 10⁻² M.

5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que a floculação de *Sacch. cerevisiae* causada por *L. fermentum* envolva um mecanismo intercelular a nível da parede celular desses microrganismos. Este processo deve envolver componentes proteicos da superfície celular da bactéria, mais especificamente, os grupos funcionais fenol e indol, e carboidratos da parede celular da levedura.. Os íons divalentes e monovalentes, por sua vez, também atuam direta ou indiretamente neste sistema. Desta forma, embora o sistema de floculação de *Sacch. cerevisiae* causado por *L. fermentum* aqui estudado, tenha sido classificado de acordo com o modelo simbiótico (STRATFORD, 1992b), este pode ser enquadrado no modelo das lectinas, devido ao envolvimento de um componente proteico da parede celular do microrganismo floculante, o qual possui características de uma lectina e apresenta afinidade por sítios receptores constituídos por carboidratos; sendo que, a presença de íons se mostrou importante para a manutenção deste processo.

6. CONCLUSÕES

1. As concentrações de células de *L. fermentum* e de *Sacch. cerevisiae*, que resultaram na condição de máxima floculação, compreendem valores para o *L. fermentum* de 0,16 g/l (massa seca), e para o *Sacch. cerevisiae* de 3,39 g/l (massa seca).
2. Verificou-se que os íons Ba^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2} , Mg^{+2} , K^{+} , Na^{+} , em concentração de 8×10^{-4} M, promoveram a floculação. Observou-se que os íons divalentes apresentaram efeitos promotores mais intensos que os monovalentes, enquanto que, os íons trivalentes, praticamente não apresentaram efeitos promotores da floculação.
3. Verificou-se que a concentração mínima de íon cálcio requerida para promover a floculação máxima de *Sacch. cerevisiae* por *L. fermentum*, compreende valores iguais ou maiores a 2×10^{-4} M.
4. Os íons sódio em concentração de 4,0 M em presença de cálcio 8×10^{-4} M causaram efeito sinérgico na inibição da floculação de *Sacch. cerevisiae* por *L. fermentum*; enquanto que, os íons magnésio em concentrações entre 0,8 e 4,0 M causaram progressiva inibição da floculação, independentemente da presença de cálcio.
5. Verificou-se a presença de sítios receptores para a lectina concanavalina A na superfície celular de *Sacch. cerevisiae* e de *L. fermentum*, sendo que, para a ocorrência da agregação de cada célula de levedura foram necessárias $4,04 \times 10^6$ moléculas de concanavalina A, enquanto que, para a agregação de cada célula de bactéria foram necessárias $1,46 \times 10^6$ moléculas de concanavalina A.

6. Componentes proteicos da parede celular de *L. fermentum* devem participar do processo de floculação, uma vez que, modificadores químicos que reagem com os grupos funcionais fenol e indol da cadeia lateral de aminoácidos inibiram a capacidade floculante da bactéria, sugerindo a participação direta ou indireta destes grupamentos no processo de floculação.
7. Células de *Sacch. cerevisiae* tratadas com modificadores químicos de proteínas não apresentaram alterações quanto a capacidade destas de serem floculadas por *L. fermentum*, sugerindo que o fator presente na parede celular da levedura, responsável por seu envolvimento na floculação, não é de origem proteica.
8. A presença de uréia 8 M, em reações de modificações químicas, não tornou os grupos funcionais de aminoácidos mais acessíveis a ação de modificadores químicos de proteínas.
9. Células de *Sacch. cerevisiae* submetidas a tratamento com periodato de sódio, em concentrações de 0,01 M e 0,02 M, apresentaram inibição em sua capacidade de ser floculada pela bactéria, o que indica que os carboidratos são essenciais no processo de floculação.
10. Verificou-se que o tratamento de *L. fermentum* com periodato de sódio 0,01 M não alterou sua capacidade floculante; aumentando-se a concentração do reagente para 0,02 M observou-se a ocorrência de inibição da floculação. Este fato indica que o fator responsável pela capacidade floculante da bactéria não deve ser constituído por carboidratos, sendo que, a ocorrência de inibição após o tratamento com periodato de sódio na concentração mais elevada, pode ser atribuída à presença de uma proteína sensível a este tratamento. No entanto, existe ainda a possibilidade desse fator ser constituído por uma glicoproteína, na qual a parte glicídica desempenha um papel importante para a manutenção da lectina em sua conformação ativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIBA, S. & NAGATANI, M. Separation of cells from culture media. **Adv. Biochem. Eng.** 1:31-54, 1971.
2. AMAYA-FARFÁN, J. Modificação química de proteínas. In: AMAYA-FARFÁN, J. **Química de proteínas: aplicada a ciência e tecnologia de alimentos.** Campinas, Ed. UNICAMP, 1990. p. 65-105.
3. AMORIM, H.V. & OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar** 5: 12-18, 1982.
4. AMORY, D.E.; ROUXHET, P.G.; DUFOUR, J.P. Flocculence of brewery yeasts and their surface properties: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. **J. Inst. Brew.** 94: 79-84, 1988.
5. AMRI, M.A.; BONALY, R.; DUTEURTRE, B.; MOLL, M. Yeast flocculation: influence of nutritional factors on cell wall composition **J. Gen. Microbiol.** 128: 2001-2009, 1982.
6. ATKINSON, B. & DAOUD, I.S. Microbial flocs and flocculation in fermentation process engineering. **Adv. Biochem. Eng.** 4: 41-124, 1976.
7. BIELECKI, S. & BRZESKI, H. Characterization of non-flocculent cells isolated from a culture of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001. **FEMS Microbiol. Lett.** 61: 189-194, 1989.
8. BLAKE, C.C.F. Structure of lectin - Crystallographic results **Nature** 255: 278, 1975.
9. BOWEN, W.R. & COOKE, R.J. Studies of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation - an in vivo electrokinetic investigation **Biotechnol. Bioeng.** 33: 706-715, 1989.
10. BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science** 119: 419, 1954.
11. CALLEJA, G.B. Flocculation in *Schizosaccharomyces pombe*. **J. Gen. Microbiol.** 64: 247-250, 1970.
12. CALLEJA, G.B. Role of mitochondria in the sex-direct flocculation of a fission yeast. **Arch. Biochem. Biophys.** 154: 382-386, 1973.

13. CALLEJA, G.B. Cell aggregation. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. eds **The Yeasts**. 2.ed. London, Academic Press, 1987. v.2. p. 165-238.
14. CALLEJA, G.B. & JOHNSON, B.F. A comparison of quantitative methods for measuring yeast flocculation. **Can. J. Microbiol.** **23**: 68-74, 1977.
15. CEREDA, M.P. Cervejas. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. eds **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo. Edgard Blütcher Ltda, 1983. V.5, chap 3, p. 44-78.
16. CHESTER, V.E. A study of changes in flocculence in a single cell culture of a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Roy. Soc., Ser. B** **157**: 223-233, 1963.
17. 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.
18. CRITCHLEY, I.A. & DOUGLAS, J. Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.** **133**: 629-636, 1987.
19. DAVIS, R.H. & HUNT, T.P. Modeling and measurement of yeast flocculation. **Biotechnol. Progr.** **2**(2): 91-97, 1986.
20. DAY, A.W. POON, N.H.; STEWART, G.G. Fungal fimbriae III. The effect on flocculation in *Saccharomyces*. **Can. J. Microbiol.** **21**: 558-564, 1975.
21. DUFFUS, J.H.; LEVI, C.; MANNERS, D.J. Yeast cell-wall glucans. **Adv. Microbial Physiol.** **23**: 151-181, 1982.
22. EDDY, A.A. & PHIL, M.A.D. Flocculation characteristics of yeasts I. Comparative survey of various strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Inst. Brew.** **61**: 307-312, 1955a.
23. EDDY, A.A. & PHIL, M.A.D. Flocculation characteristics of yeasts II. Sugars as dispersing agents. **J. Inst. Brew.** **61**: 313-317, 1955b.
24. EDELMAN, G.M. Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. **Ann. Rev. Biochem.** **54**: 135-169, 1985.
25. ENDO, T.; NAKAMUR, K. TAKAHASHI, H. Pronase-susceptible floc forming bacteria: relationship between flocculation and calcium ion. **Agric. Biol. Chem.** **40**(11): 2289-2295, 1976.

26. ESSER, K. & KÜES, U. Flocculation and its implication for biotechnology. **Proc. Biochem.** **18**: 21-23, dez. 1983.
27. EVANS, I.H.; DIALA, E.S.; EARL, A.; WILKIE, D. Mitochondrial control of cell surface characteristics in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta** **602**: 201-206, 1982.
28. 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**(2): 472-476, 1987.
29. FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Com.** **105**(4): 1426-1432, 1982.
30. FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium*. **Carb. Res.** **120**: 235-249, 1983.
31. FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. **Infect. Immun.** **43**(3): 1088-1090, 1984.
32. FORSTER, C.F.; KNIGHT, N.J.B.; WASE, D.A.J. Flocculating agents of microbial origin. **Adv. Biotechnol. Proc.** **4**: 211-240, 1985.
33. FULLER, R. Ecological studies on the *Lactobacillus* flora associated with the crop epithelium of the fowl. **J. Appl. Bacteriol.** **36**: 131-139, 1973.
34. FULLER, R. Nature of determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. **J. Gen. Microbiol.** **87**: 245-250, 1975.
35. 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.
36. GHOSH, A.; CHARALAMPOUS, F.; SISON, Y.; BORER, R. Metabolic functions of myo-inositol I. Cytological and chemical alterations in yeast resulting from inositol deficiency. **J. Biol. Chem.** **235**(9): 2522-2528, 1960.
37. GOLDSTEIN, I.J.; HOLLERMAN, C.E.; SMITH, E.E. Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A and polisaccharides. **Biochemistry** **4**(5): 876-883, 1965.

38. GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, C.R.; MENSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N.
What should be called a lectin? *Nature* **285**(8): 66, 1980.
39. GREENSHIELDS, R.N. & SMITH, E.L. The tubular reactor in fermentation. *Proc. Biochem.* **9**: 11-17, 1974.
40. HARDMAN, K.D. & AINSWORTH, C.F. Structure of the concanavalin A - methyl- α -D-mannopyranoside complex at 6 Å resolution. *Biochemistry* **15**(5): 1120-1128, 1976.
41. HARDMAN, K.D.; WOOD, M.K.; SCHIFFER, M.; EDMUNDSON, A.B.; AINSWORTH, C.F. Structure of concanavalin A at 4.25-Ångstrom resolution (x-ray diffraction / electron density map / isomorphous replacement / subunits molecular weight). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**(7): 1393-1397, 1971.
42. HARRIS, R.H. & MITCHELL, R. The role of polymers in microbial aggregation. *Ann. Rev. Microbiol.* **27**: 27-50, 1973.
43. HINRICHS, J.; STAHL, U.; ESSER, K. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* and mitochondrial DNA structure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 48-54, 1988.
44. HENRIKSSON, A.; SZEWZYK, R.; CONWAY, P.L. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2): 499-502, 1991.
45. HUSSAIN, T.; SALHI, O.; LEMATRE, J.; CHARPENTIER, C.; BONALY, R. Comparative studies of flocculation and deflocculation of *Saccharomyces uvarum* and *Kluyveromyces bulgaricus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 269-273, 1986.
46. JAYATISSA, P.M. & ROSE, A.H. Role of wall phosphomannan in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **96**: 165-174, 1976.
47. JOHNSON, D.F.; WALKER, T.; CALLEJA, G.B.; SELIGY, V.L. Sexual co-flocculation and asexual self-flocculation in budding and fission yeasts: experimental establishment of fundamental difference. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1105-1107, 1988.
48. KAMADA, K. & MURATA, M. On the mechanism of brewer's yeast flocculation. *Agric. Biol. Chem.* **48**(10): 2423-2433, 1984.
49. KIHN, J.C.; MASY, C.L.; MESTDAGH, M.M. Yeast flocculation: competition between nonspecific repulsion and specific bonding in cell adhesion. *Can. J. Microbiol.* **34**: 773-778, 1988.

50. KOTARSKI, S.F. & SAVAGE, D.C. Models for study of the specificity by which indigenous lactobacilli adhere to murine gastric epithelia. **Infect. Immunol.** **26**(3): 966-975, 1979.
51. KUNDU, M.; BASU, J.; GHOSH, A.; CHAKRABARTI, P. Chemical modification studies on a lectin from *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast). **Biochem. J.** **244**: 579-584, 1987.
52. KURANE, R.; TAKEDA, K. SUZUKI, T. Screening for and characteristics of microbial flocculants. **Agric. Biol. Chem.** **50**(9): 2301-2307, 1986.
53. KURIYAMA, H.; UMEDA, I.; KOBAYASHI, H. Role of cations in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* and discrimination of the corresponding proteins. **Can. J. Microbiol.** **37**: 397-403, 1991.
54. LEE, J.H.; SKOTNINKI, M.L.; ROGERS, P.L. Kinetic studies on a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnol. Lett.** **4**(9): 615-620, 1982.
55. LEWIS, C.W.; JOHNSTON, J.R.; MARTIN, P.A. The genetics of yeast flocculation. **J. Inst. Brew.** **82**: 158-160, 1976.
56. LEWIN, R. Microbial adhesion is a sticky problem. **Science** **224**(4647): 375-377, 1984.
57. LIS, H. & SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Ann. Rev. Biochem.** **42**: 541-574, 1973.
58. 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.
59. LIPKE, P.N. & HULL-PILLSBURY, C. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* *tup1* mutants. **J. Bacteriol.** **159**(2): 797-799, 1984.
60. LYONS, T.P. & HOUGH, J.S. Further evidence for the Cross-Bridging hypothesis for flocculation of brewer's yeast. **J. Inst. Brew.** **77**: 300-305, 1971.
61. MASY, C.L.; HENQUINET, A.; SCOMAN, I.; MESTDAGH, M.M.; COLSON, A.M. Study of protein receptors on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* strains of the type Flo1 and NewFlo. **Yeast** **6**: 149, 1990.
62. MCKENZIE, G.H.; SAWYER, W.H.; NICHOL, L.W. The molecular weight and stability of concanavalin A. **Biochim. Biophys. Acta** **263**: 283-293, 1972.

63. McMURROUGH, I. & ROSE, A.H. Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and structure of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.** **105**: 189-203, 1967.
64. MEANS, G.E. & FEENEY, R.E. Proteins and their properties. In: MEANS, G.E. & FEENEY, R.E. **Chemical modification of proteins**. San Francisco, Holden-Day, 1971. p. 3-23.
65. 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**(2): 878-889, 1982a.
66. MILL, P.J. The effect of nitrogenous substances on the time of flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **35**: 53-60, 1964a.
67. MILL, P.J. The nature of the interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **35**: 61-68, 1964b.
68. MILL, P.J. Phosphomannans and other components of flocculent and non-flocculent walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** **44**: 329-341, 1966.
69. MOMOSE, H.; IWANO, K.; TONOIKE, R. Studies on the aggregation of yeast caused by lactobacilli IV. Force responsible for aggregation. **J. Appl. Microbiol.** **15**: 19-26, 1969.
70. NAKAMURA, J.; MIYASHIRO, S.; HIROSE, Y. Screening, isolation, and some properties of microbial cell flocculants. **Agric. Biol. Chem.** **40**(2): 377-383, 1976a.
71. NAKAMURA, J.; MIYASHIRO, S.; HIROSE, Y. Purification and biochemical analysis of microbial cell-flocculant produced by *Aspergillus sojae* AJ7002. **Agric. Biol. Chem.** **40**(3): 619-624, 1976b.
72. NAKAMURA, J.; MIYASHIRO, S.; HIROSE, Y. Modes of flocculation of yeast cells with flocculants produced by *Aspergillus sojae* AJ7002. **Agric. Biol. Chem.** **40**(8): 1565-1571, 1976c.
73. NETTO, C.B.; DESTRUHAUI, A.; GOMA, G. Ethanol fermentation by flocculating yeast: performance and stability dependence on a critical fermentation rate. **Biotechnol. Lett.** **7**(5): 355-360, 1985.
74. NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Factors affecting flocculation of brewer's yeast. **J. Ferment. Technol.** **54**(6): 351-355, 1976a.

75. NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Induction of floc-forming ability in brewer's yeast. **J. Ferment. Technol.** **54(6)**: 356-360, 1976b.
76. NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Effect of chemical modification of cell components of a brewer's yeast on the floc-forming ability. **Arch. Microbiol.** **115**: 19-23, 1977.
77. NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Flocculation of cell walls of brewer's yeast and effects of metal ions, protein-denaturants and enzyme treatments. **Arch. Microbiol.** **131**: 112-115, 1982.
78. NISHIHARA, H. & TORAYA, T. Essential roles of cell surface protein and carbohydrate components in flocculation of a brewer's yeast. **Agric. Biol. Chem.** **51(10)**: 2721-2726, 1987.
79. PARODI, A.J. Biosynthetic mechanisms for cell envelope polysaccharides. In: ARNOLD, W.N. **Yeasts cell envelopes: biochemistry, biophysics, and ultrastructure**. Florida Academic Press, 1981. v.3, chap. 2, p. 48-64.
80. PATEL, G.B. & INGLEDEW, W.M. The relationship of acid-soluble glycogen to yeast flocculation. **Can. J. Microbiol.** **21**: 1608-1613, 1975.
81. PRINCE, I.G. & BARDFORD, J.P. Induced flocculation of yeasts for use in the tower fermenter. **Biotechnol. Lett.** **4(10)**: 621-626, 1982.
82. RAINBOW, C. The Yeasts In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. **Brewer's Yeasts**. London Academic Press, 1970. vol. 3, chap. 4, p. 147-224.
83. REID, G. ; HAWTHORN, L.A.; MANDATORI, R. Adhesion of lactobacilli to polymer surfaces in vivo and in vitro. **Microb. Ecol.** **16**: 241-251, 1988.
84. 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**. London Academic Press, 1980. p. 103-121
85. ROSEN, S.D.; KAUR, J.; CLARK, D.L.; PARDOS, B.T.; FRAZIER, W.A. Purification and characterization of multiple species (isolectins) of a slime mold lectin implicated in intercellular adhesion. **J. Biol. Chem.** **254(19)**: 9408-9415, 1979.
86. RUSSEL, 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.

87. SAITO, K.; SATO, S.I.; SHIMOI, H.; IEFUJI, H.; TADENUMA, M. Flocculation mechanism of *Hansenula anomala* J224. **Agric. Biol. Chem.** **54**: 1425-1432, 1990.
88. SANTOS, M.T. & YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. **J. Ferment. Bioeng.** **75**(2): 151-154, 1993.
89. SAVAGE, D.C. Mechanisms by which indigenous microorganisms colonize gastrointestinal epithelial surfaces. **Prog. Food. Sci.** **47**: 65-74, 1983.
90. 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.
91. SHARON, N. Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. **FEBS Lett.** **217**(2): 145-157, 1987.
92. SHARON, N. & LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science** **177**(4053): 949-959, 1972.
93. SHARON, N. & LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science** **246**: 245-246, 1989.
94. SHAW, D.J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo. Edgard Blücher, 1975. 185 p.
95. SHERMAN, L.A. & SAVAGE, D.C. Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. **Appl. Environ. Microbiol.** **52**(2): 302-304, 1986.
96. SIJMONS, P.C.; NEDERBRAGT, A.J.A.; VAN DER ENDE, H. Isolation and composition of constitutive agglutinins from haploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Arch. Microbiol.** **148**: 208-212, 1987.
97. SOUZA, M.J.; TEIXEIRA, J.A.; MOTA, M. Differences in the flocculation mechanism of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.** **14**(3): 213-218, 1992.
98. SPEERS, R.A.; TUNG, M.A.; DURANCE, T.D.; STEWART, G.G. Biochemical aspects of yeast flocculation and its measurement: a review. **J. Inst. Brew.** **98**: 293-300, 1992a.
99. SPEERS, R.A.; TUNG, M.A.; DURANCE, T.D.; STEWART, G.G. Colloidal aspects of yeast flocculation: a review. **J. Inst. Brew.** **98**: 525-531, 1992b.

100. STEWART, G.G. & GORING, T.E. Effect of some monovalent and divalent metal ions on the flocculation of brewers yeast strains. **J. Inst. Brew.** 82: 341-342, 1976.
101. STEWART, G.G. & RUSSEL, I. The identification, characterization and mapping of a gene for flocculation in *Saccharomyces* sp. **Can. J. Microbiol.** 23: 441-447, 1977.
102. STEWART, G.G. & RUSSEL, I. Centenary review - one hundred years of yeast research and development in the brewing industry. **J. Inst. Brew.** 92: 537-558, 1986.
103. STEWART, G.G. ; RUSSEL, I.; GARRISON, I.F. Some considerations of the flocculation characteristics of ale and lager yeast strains. **J. Inst. Brew.** 81: 248-257, 1975.
104. STRATFORD, M. Yeast flocculation: the influence of agitation. **Yeast** 5: s97-s102, 1989a.
105. STRATFORD, M. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 5: s97-s102, 1989b.
106. STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. **Yeast** 5: 487-496, 1989c.
107. STRATFORD, M. Yeast flocculation: receptor definition by mnn mutants and concanavalin A. **Yeast** 8: 635-645, 1992a.
108. STRATFORD, M. Lectin-mediated aggregation of yeasts - yeasts flocculation. **Biotechnol. Gen. Eng. Rev.** 10: 283-341, 1992b.
109. STRATFORD, M. & ASSINDER, S. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. **Yeast** 7: 559-574, 1991.
110. STRATFORD, M. & BOND, C.J. Selective separation of microorganisms by lectins: yeast and concanavalin A as a model system. **Biotechnol. Bioeng** 40: 835-843, 1992.
111. STRATFORD, M. & BRUNDISH, H.M. Yeast flocculation: cationic inhibition. **Yeast** 6: 77-86, 1990.
112. STRATFORD, M.; COLEMAN, H.P.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: a dynamic equilibrium. **Yeast** 4: 199-208, 1988.
113. STRATFORD, M. & KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: kinetics and collision theory. **Yeast** 3: 201-206, 1987.

114. STRATFORD, M. & KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: quantification. *Yeast* **4**: 107-115, 1988.
115. STRATFORD, M. & PEARSON, B.M. Lectin-mediated flocculation of the yeast *Saccharomyces ludwigii* NCYC 734. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**: 214-216, 1992.
116. STRAVER, M.H.S.; KIJNE, J.W.; SMIT, G. Cause and control of flocculation in yeast. *Tibtech.* **11**: 228-232, 1993.
117. 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**(1): 173-179, 1975.
118. SUZUKI, K.; KOSAI, M.; YOKOMIZO, K.; UYEDA, M.; SHIBATA, M. Characterizatics and action mechanism of SAF, cell aggregation factor produced by *Streptomyces murinus* strain No. A-2805. *Agric. Biol. Chem.* **52**(2): 555-559, 1988.
119. TAKAGI, H. & KADOWAKI, K. Flocculant production by *Paecilomyces sp.* taxonomic studies and culture conditions for production. *Agric. Biol. Chem.* **49**(11): 3151-3157, 1985a.
120. TAKAGI, H. & KADOWAKI, K. Purification and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces sp.* *Agric. Biol. Chem.* **49**(11): 3159-3164, 1985b.
121. TAKEDA, M.; KURANE, R.; KOIZUMI, J.; NAKAMURA, I. A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Agric. Biol. Chem.* **55**(10): 2663-2664, 1991a.
122. TAKEDA, M.; KURANE, R.; NAKAMURA, I. Localization of a biopolymer produced by *Rhodococcus erythropolis* grown on n-pentadecane. *Agric. Biol. Chem.* **55**(10): 2665-2666, 1991b.
123. TAYLOR, N.W. & ORTON, W.L. Calcium in flocculence of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* **81**: 53-57, 1975.
124. TAYLOR, N.W. & ORTON, W.L. Aromatic compounds and sugars in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* **84**: 113-114, 1978.
125. TEIXEIRA, J.A. & MOTA, M. Experimental assessment of internal diffusion limitations in yeast flocs. *Chem. Eng. J.* **43**: B13-B14, 1990.

126. TENNEY, M.W. & VERHOFF, F.H. Chemical and autoflocculation of microorganisms in biological wastewater treatment. **Biotechnol. Bioeng.** **15**: 1045-1073, 1973.
127. TKACZ, J.S.; CYBULSKA, E.B.; LAMPEN, J.O. Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin A. **J. Bacteriol.** **105**: 1-5, 1971.
128. TOEDA, K. & KURANE, R. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. **Agric. Biol. Chem.** **55**(11): 2793-2799, 1991.
129. UYEDA, M.; SUZUKI, K.; SHIBATA, M. 3315-AF2 a cell aggregation factor produced by *Streptomyces* sp. strain No A-3315. **Agric. Biol. Chem.** **54**(1): 251-252, 1990.
130. VEINOT-DREBOT, L.M.; JONHSTON, G.C.; SINGER, R.A. The RSF 1 gene regulates septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** **173**(8): 2556-2561, 1991.
131. VEZINHET, F.; BLONDIN, B.; BARRE, P. Mapping of the FLO5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* by transfer of a chromosome during cytoduction. **Biotechnol. Lett.** **13**(1): 47-52, 1991.
132. WATARI, J.; TAKATA, Y.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, N.; KAMIMURA, M. Molecular cloning of a flocculation gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agric. Biol. Chem.** **53**(3): 901-903, 1989.
133. WATARI, J.; TAKATA, Y.; OGAWA, M.; MURAKAMI, J.; KOSHINO, S. Breeding of flocculent industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains by introducing the flocculation gene FLO1. **Agric. Biol. Chem.** **55**(6): 1547-1552, 1991.
134. WEEKS, M.G.; MUNRO, P.A.; SPEEDING, P.L. New concepts for rapid yeast settling. II. pH switching with an inert powder. **Biotechnol. Bioeng.** **25**: 699-711, 1983.
135. WILKIE, D. & EVANS, I. Mitochondria and the yeast cell surface: implications for carcinogenesis. **Trends Biochem. Sci.** **7**(4): 147-151, 1982.
136. YAMASHITA, I. & FUKUI, S. Mating signals control expression of both starch fermentation genes and a novel flocculation gene FLO 8 in the yeast *Saccharomyces*. **Agric. Biol. Chem.** **47**(12): 2889-2896, 1983.
137. YOKOYA, F. & OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Rev. Microbiol.** **22**: 12-16, 1991.