

**17º Congresso de Iniciação Científica****INFLUÊNCIA DO PH E DO TEOR ALCOÓLICO NO PROCESSO DE FLOCULAÇÃO ENTRE
LEVEDURAS E BACTÉRIAS****Autor(es)**

RENATA DÉDALO RIBEIRÃO DE FREITAS

Orientador(es)

VALMIR EDUARDO ALCARDE

Apoio Financeiro

PIBIC/CNPQ

1. Introdução

A floculação é um fenômeno apresentado por leveduras, as quais se unem em agregados denominados flocos constituídos por várias células. A ocorrência da floculação na fermentação alcoólica pode ser causada pela presença de linhagens floculentas do gênero *Saccharomyces* e por bactérias contaminantes. Nas usinas de álcool a contaminação bacteriana é considerada a principal responsável pela floculação do fermento (ALCARDE, 2001; ALCARDE & PASCHOALINI, 2008). A floculação é classicamente descrita como um fenômeno reversível em que células de levedura aderem-se umas as outras formando flocos que sedimentam-se rapidamente no meio em que estão suspensas (STEWART, 1975). 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 do fermento (ALCARDE, 2001; ALCARDE & PASCHOALINI, 2008). Muitos fatores exercem influência na floculação de leveduras a agitação mecânica, sendo uma delas, é requerida para superar a repulsão eletrostática entre as células (STRATFORD, 1989). Verificou-se a existência de um limite mínimo de agitação, abaixo do qual a floculação não ocorre, sendo este dependente da linhagem do microrganismo. À medida que a agitação se intensifica, as colisões tornam-se mais frequentes e fortes e uma grande proporção de células podem ser encontradas livres no meio, ocorrendo então, a desfloculação. A floculação de *Saccharomyces cerevisiae* pode ocorrer em valores de pH variando entre 1,4 a 6,0 (STRATFORD & KEENAN, 1988). Valores de pH menores que 3,0 no meio de crescimento, foram considerados antagônicos a floculação de células de *Saccharomyces cerevisiae* e também, de *Saccharomyces ludwigii* (NISHIHARA; et al., 1976); (STRATFORD; BRUNDISH, 1990). A contaminação bacteriana na fermentação alcoólica é um dos problemas que afeta diretamente o desempenho do processo de produção de álcool (AMORIM et al., 1996). A floculação de leveduras é uma das conseqüências desta contaminação, onde as células de levedura aglomeram-se formando flocos que dificultam o contato com o substrato, reduzindo o rendimento e aumentando o tempo de fermentação.

2. Objetivos

Verificar as condições de ocorrência da floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* causada por espécies de *Lactobacillus* contaminantes do processo de produção de álcool. Avaliar o efeito do teor alcoólico e o efeito combinado do pH e concentração de etanol no processo de floculação envolvendo espécies de *Lactobacillus* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Investigar o

mecanismo de floculação entre leveduras e bactérias.

3. Desenvolvimento

Culturas de leveduras Para este estudo foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L) uma vez que esta é a espécie utilizada como agente fermentativo nas unidades produtoras de álcool. Para reativação das células de levedura foi utilizado o meio de cultivo líquido YEPD (extrato de levedura-1,0%; peptona-1,0%; dextrose-2,0%). **Culturas de bactérias** As culturas de bactérias utilizadas nos experimentos foram: *Lactobacillus fermentum* (FT282B), *Lactobacillus plantarum* (FT025B), *Lactobacillus fructivorans* (FT421B), *Lactobacillus fructosus* (FT432B) e *Lactobacillus buchneri* (FT414B). Para a reativação e crescimento das culturas de *Lactobacillus* foi utilizado o meio de cultivo "De Man, Rogosa, Sharp" - MRS Difco 0881-01-3. Condições de cultivo de células para o teste de floculação As leveduras foram cultivadas em caldo YEPD por 24-48 horas a 30°C, utilizando como inóculo 1% de um cultivo de 24 horas em caldo. As bactérias foram cultivadas em caldo MRS por 24-48 horas a 30°C, utilizando como inóculo 1% de um cultivo de 24 horas em caldo. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 3600 G por 10 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com solução de etilenodiaminotetracético dissódico dihidratado (Na₂EDTA) 0,025M, sendo posteriormente ressuspensa em água deionizada, em tampão Tris-HCl 10-1 M, pH 7,0-7,5. **Teste de floculação** Os testes de floculação foram realizados de acordo com o método de Stratford & Keenan (1988), adaptado para a utilização de suspensões mistas de leveduras e bactérias. **Efeito do pH na floculação** Para se verificar o efeito do pH foram realizados testes de floculação na condição de pH 4,5 e pH 3,0, uma vez que estes níveis de pH podem ser observados na prática de tratamento do fermento industrial. **Efeito combinado do pH e teor alcoólico na floculação** Para se verificar o efeito combinado do pH e teor alcoólico serão conduzidos testes de floculação na presença de 10% e 15% de álcool e em condição de pH 4,5 e pH 3,0 combinados, uma vez que estas variáveis podem ocorrer em conjunto em processos industriais de fermentação alcoólica.

4. Resultado e Discussão

A floculação da levedura ocasionada pela presença das bactérias pôde ser avaliada pela rápida diminuição da turbidez da suspensão das células da levedura, com o decorrer do tempo. Na ausência da floculação, a turbidez da suspensão diminui vagarosamente, mas na presença de bactérias floculantes a redução da turbidez é acelerada. Para interpretação dos resultados utilizou-se a padronização de acordo com Santos (1991), considerando fortemente floculante (+++) as espécies bacterianas que proporcionaram uma leitura da absorbância inferior a 0,25, mediamente floculante (++) as leituras entre 0,25 a 0,40, fracamente floculante (+) as bactérias que proporcionaram leitura entre 0,40 a 0,65 e como não floculante (-) as leituras (absorbância) superiores a 0,65. **Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L)** TABELA 1 Os resultados obtidos indicam que *L. fructosus* (FT432B), *L. fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B) e *L. buchneri* (FT414B) suspensas em tampão Tris – HCl 10-1 M- pH 7,0-7,5 apresentaram capacidade de provocar a floculação da levedura *S. cerevisiae* (FT134L), diferente da bactéria *L. fructivorans* (FT421B) que não apresentou capacidade de floculação. O pH influencia na capacidade floculante das bactérias *L. fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B), *L. buchneri* (FT414B) e *L. fructosus* (FT432B) frente à levedura *S. cerevisiae* (FT134L). O pH 4,5 reduziu a capacidade de floculação entre estas bactérias citadas, mantendo constante o grau de floculação entre a bactéria *L. buchneri* (FT414B) e a levedura; no pH 3,0 ocorreu inibição deste processo de floculação para todas as bactérias. **Efeito do teor alcoólico na floculação** TABELA 2 O teor alcoólico influencia a capacidade floculante de bactérias frente à levedura *S. cerevisiae* (FT134L): para *L. fructivorans* (FT421B), *L. plantarum* (FT025B), *L. fermentum* (FT282B) e *L. buchneri* (FT414B) não houve alteração na capacidade floculante com teor alcoólico de 10% e para *L. fructosus* (FT432B) houve a redução desta capacidade com a presença de teor alcoólico de 10% no meio. O teor alcoólico de 15% influenciou na redução da capacidade floculante das bactérias *L. plantarum* (FT025B), *L. fermentum* (FT282B) e *L. fructosus* (FT432B); entre a levedura e *L. buchneri* (FT414B) não ocorreu alteração da capacidade floculante; *L. fructivorans* (FT421B) manteve sua não capacidade de floculação. **Efeito combinado do pH e do teor alcoólico na floculação** TABELA 3 O aumento do teor de alcoólico de 10% e 15% em um meio com pH 4,5 diminuiu a intensidade e capacidade floculante das bactérias *L. plantarum* (FT025B) e *L. fermentum* (FT0282B) frente a levedura testada, porém *L. buchneri* (FT414B); *L. fructivorans* (FT421B) e *L. fructosus* (FT432B) nestas condições não foram influenciadas. O aumento do teor de alcoólico de 10% e 15% em um meio com pH 3,0 não alterou a capacidade floculante das bactérias.

5. Considerações Finais

L. fructosus (FT432B), *L. fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B), *L. buchneri* (FT414B) podem provocar a floculação da levedura *S.s cerevisiae* (FT134L). Já *L. fructivorans* (FT421B) não foi capaz de induzir a floculação deste levedura. O pH 4,5 influenciou a capacidade floculante das bactérias *L. fermentum* (FT282B), *L. fructosus* (FT432B) e *L. plantarum* (FT025B) frente à levedura e o pH 3,0 inibiu o processo de floculação. O teor alcoólico influenciou a capacidade floculante das bactérias frente à levedura *S. cerevisiae* (FT134L): para *L. fructivorans* (FT421B), *L. plantarum* (FT025B), *L. fermentum* (FT282B) e *L. buchneri* (FT414B); não houve alteração na capacidade floculante com teor alcoólico de 10% e para *L. fructosus* (FT432B) houve a redução

desta capacidade com a presença de teor alcoólico de 10% no meio. O teor alcoólico de 15% reduziu a capacidade floculante das bactérias *L. plantarum* (FT025B), *L. fermentum* (FT282B) e *L. fructosus* (FT432B). O aumento do teor de alcoólico de 10% e 15% em um meio com pH 4,5 diminuiu a intensidade floculante das bactérias *L. plantarum* (FT025B) e *L. fermentum* (FT0282B). Na presença de pH 3,0 com os teores alcoólicos citados anteriormente, não ocorreu floculação entre os microrganismos analisados.

Referências Bibliográficas

ALCARDE, V.E. Avaliação de parâmetros que afetam a floculação de leveduras e bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. Campinas, 2001. 91p. (Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP). ALCARDE, V.E. & PASCHOALINI, G. Influência do teor alcoólico e de íons cálcio no processo de floculação entre leveduras e bactérias. Anais da VI Mostra Acadêmica da UNIMEP. Piracicaba, 2008. AMORIM, H.V. de; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. Processos de produção de álcool. Piracicaba, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1996. 103p. NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Factors affecting flocculation of brewer's yeast. *Journal of Fermentation Technology*. v. 54 n.6, p.351-355, 1976. STEWART, G.G. Yeast flocculation - Practical implications and experimental findings. *Brewer's Digest*. v. 50, p.42, 1975. STRATFORD, M. BRUNDISH, H.M. Yeast flocculation: cationic inhibition. *Yeast* 6: 77-86, 1990. STRATFORD, M. Yeast flocculation: calcium specificity. *Yeast*, v.5, n.6, p.487-496, 1989. STRATFORD, M. & KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: quantification. *Yeast* 4: 107-115, 1988. YOKOYA, F. & OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*, 22: 12-16, 1991.

Anexos

Tabela 1: Efeito combinado do pH na floculação entre levedura e bactérias

Microrganismo	População Levedura: Bactéria	Grau de floculação	pH 4,5	pH 3,0
<i>L. fermentum</i> (FT282B)	5,0 x 10 ⁸ : 3,0 x 10 ⁸	+++	++	-
<i>L. fructosus</i> (F 432B)	5,0 x 10 ⁸ : 3,0 x 10 ⁸	+++	+	-
<i>L. plantarum</i> (FT025B)	5,0 x 10 ⁸ : 10 x 10 ⁸	+++	++	-
<i>L. buchneri</i> (FT414B)	5,0 x 10 ⁸ : 9 x 10 ⁸	+	+	-
<i>L. fructivorans</i> (FT421B)	5,0 x 10 ⁸ : 4 x 10 ⁸	-	-	-

Tabela 2: Efeito do teor alcoólico na floculação entre levedura e bactérias

Microrganismo	População	Grau de floculação	10% de T.A.	15% de T.A.
	Levedura: Bactéria			
<i>L. fermentum</i> (FT282B)	$5,0 \times 10^8$: $3,0 \times 10^8$	+++	+++	++
<i>L. fructosus</i> (F 432B)	$5,0 \times 10^8$: $3,0 \times 10^8$	+++	++	+
<i>L. plantarum</i> (FT025B)	$5,0 \times 10^8$: 10×10^8	+++	+++	++
<i>L. buchneri</i> (FT414B)	$5,0 \times 10^8$: 9×10^8	+	+	+
<i>L. fructivorans</i> (FT421B)	$5,0 \times 10^8$: 4×10^8	-	-	-

T.A.: teor alcoólico

Tabela 3: Efeito combinado pH e teor alcoólico na floculação entre levedura e bactérias

Microrganismo	População Levedura: Bactéria	Grau de floculação	pH 4,5	pH 4,5	pH 3,0	pH 3,0
			T.A. 10%	T.A. 15%	T.A. 10%	T.A. 15%
<i>L. fermentum</i> (FT282B)	12×10^8 : 12×10^8	+++	++	+	-	-
<i>L. fructosus</i> (F 432B)	12×10^8 : 18×10^8	+++	+	+	-	-
<i>L. plantarum</i> (FT025B)	12×10^8 : 19×10^8	+++	+	+	-	-
<i>L. buchneri</i> (FT414B)	12×10^8 : 17×10^8	+	+	+	-	-
<i>L. fructivorans</i> (FT421B)	12×10^8 : 10×10^8	-	-	-	-	-

T.A.: teor alcoólico