



18º Congresso de Iniciação Científica

**FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS: ESTUDO DO COMPORTAMENTO DA LEVEDURA
SACCHAROMYCES CEREVISIAE EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Autor(es)

NATÁLIA DE MORAES FURTADO

Orientador(es)

VALMIR EDUARDO ALCARDE

Apoio Financeiro

FAPIC/UNIMEP

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 contaminação bacteriana é um dos fatores preponderantes dentre aqueles que afetam a fermentação alcoólica, posto que é o mais frequente agente estressante presente. Segundo Amorim (2005), o maior efeito das bactérias na levedura e no rendimento da fermentação é físico. As bactérias se unem com as leveduras provocando floculação, que vão ao fundo da dorna ocasionando na centrifugação entupimento de bicos, canalizações ocorrendo muita perda de levedura, resultando uma queda no rendimento. Este fenômeno, bastante comum nas destilarias tem motivado a indústria de álcool e pesquisadores na busca de alternativas para esta questão.

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

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

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 combinado do pH, concentração de íons e teor alcoólico no processo de floculação;
- Investigar o mecanismo de floculação entre leveduras e bactérias.

3. Desenvolvimento

3.1. Culturas de leveduras

Para este estudo foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT 134 L). 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).

3.2. Culturas de bactérias

As culturas de bactérias utilizadas nos experimentos foram: *Lactobacillus fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B) e *L. 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.

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

As leveduras foram cultivadas em caldo YEPD por 24-48 horas a 30°C, utilizando como inóculo 1% de um cultivo de 24 horas em caldo. As bactérias foram cultivadas em caldo MRS 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 10-1M, pH 7,0-7,5.

3.4. Relação entre as concentrações celulares na floculação

Para os testes de floculação foi utilizada cultura de levedura com concentração de 10% v/v, com uma população entre 1 a 5,0 x 10⁸ células de levedura/mL.

Os testes de floculação foram conduzidos com população superior a 1,0 x 10⁸ células de bactéria/mL.

3.5. Teste de floculação

Os testes de floculação foram realizados de acordo com o método de Stratford & Keenan (1988), adaptado para a utilização de suspensões mistas de leveduras e bactérias. Este método baseia-se na velocidade de sedimentação e clarificação do sobrenadante da suspensão de microrganismos. Desta forma adicionou-se a tubos de ensaio (16 x 150 mm) 3 mL da suspensão de leveduras, 3 mL da suspensão de bactérias e solução de CaCl₂ 5x10⁻²M em quantidade suficiente para se obter uma concentração final de 1x10⁻²M. A seguir os tubos foram agitados manualmente por 2 minutos, mantido em repouso por 5 minutos e depois, com auxílio de um pipetador automático, coletou-se 3 mL da amostra do sobrenadante, medindo-se sua absorbância em espectrofotômetro a 600nm.

3.6. Efeito do pH x concentração de íons x teor alcoólico na floculação

Para se verificar o efeito combinado do pH, presença de íons e teor alcoólico no processo de floculação, foram realizados testes de floculação na condição de tampão Tris - HCl 10-1M, pH 7,0-7,5, e testes de floculação na condição de pH 4,5 e pH 3,0 na presença de Ca⁺⁺ - 400 ppm, Mg⁺⁺ - 200 ppm e K⁺ - 1500 ppm, e na presença de 10% de álcool (efeito combinado pH x íons x teor alcoólico), uma vez que estas variáveis podem ocorrer em conjunto em processos industriais de fermentação alcoólica.

4. Resultado e Discussão

A floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L) ocasionada pela presença das bactérias *Lactobacillus plantarum* (FT025B), *Lactobacillus fermentum* (FT282B) e *Lactobacillus buchneri* (FT414B) 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 diminuiu vagarosamente, mas na presença de bactérias floculantes a redução da turbidez é acelerada.

Os resultados dos testes de floculação realizados entre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L), e *Lactobacillus plantarum* (FT025B), *Lactobacillus fermentum* (FT282B), *Lactobacillus buchneri* (FT414B) encontram-se na Tabela 2. Para interpretação dos resultados utilizou-se a padronização de acordo com Santos (1991), considerando fortemente floculante (+++) as espécies bacterianas

que proporcionaram uma leitura da absorvância 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 (absorvância) superiores a 0,65.

4.1 Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L)

Os resultados dos testes de floculação realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L) e as bactérias contaminantes encontram-se na Tabela 1.

Os resultados obtidos indicam que *Lactobacillus fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B) e *L. buchneri* (FT414B) suspensas em tampão Tris – HCl 10-1M, pH 7,0-7,5 apresentaram capacidade de provocar a floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L).

Para os testes de floculação foi utilizada cultura de levedura com concentração entre 1 a 5,0 x 10⁸ células de levedura/mL e culturas de bactérias com concentração superior a 1,0 x 10⁸ células de bactéria/mL, concentrações estas comumente encontradas em dorna de fermentação alcoólica.

Os resultados obtidos nessa pesquisa confirmam que as bactérias, *Lactobacillus fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B) e *L. buchneri* (FT414B) são hábeis em provocar floculação de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L), como já havia sido citado por outros autores (ALCARDE; YOKOYA, 2003 e ALCARDE & PASCHOALINI, 2008).

4.2 Avaliação da capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT134L, na presença de íons, teor alcoólico 10%, pH 3,0 e pH 4,5

A capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT134L, na presença de íons, teor alcoólico 10%, pH 3,0 e pH 4,5 estão dispostos na Tabela 2.

Na presença de Ca⁺⁺400ppm + Mg⁺⁺200ppm + K⁺1500ppm + 10% de álcool e pH 3,0, *L. fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B) e *L. buchneri* (FT414B), não apresentaram capacidade de provocar a floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L).

Na presença de Ca⁺⁺400ppm + Mg⁺⁺200ppm + K⁺1500ppm + 10% de álcool e pH 4,5, *L. fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B) e *L. buchneri* (FT414B), não apresentaram capacidade de provocar a floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L).

Através desses resultados pode-se perceber que a presença de álcool na dorna de fermentação pode influenciar a capacidade floculante da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L) frente às bactérias contaminantes. Alcarde (2001) observou que a presença de etanol no meio apresentou efeito inibitório no processo de floculação entre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L) e as espécies bacterianas *Lactobacillus fermentum* (FT0282B); *Lactobacillus plantarum* (FT025B); e *Lactobacillus buchneri* (FT414B) uma vez que as leituras de absorvância encontradas para as cepas bacterianas que haviam apresentado habilidade em flocular esta levedura foram superiores as leituras de absorvância quando não havia a presença de etanol no meio de floculação. Portanto, para os mesmos níveis bacterianos estudados, as leituras de absorvância encontradas nos testes de floculação foram crescentes na ausência de álcool no meio, com 10% de teor alcoólico respectivamente.

5. Considerações Finais

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados conclui-se que *Lactobacillus plantarum* (FT025B), *Lactobacillus buchneri* (FT414B) e *Lactobacillus fermentum* (FT282B) podem provocar a floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L) em tampão Tris – HCl 10-1M, pH 7,0-7,5

O teor alcoólico de 10% em meio com presença de Ca⁺⁺400ppm + Mg⁺⁺200ppm + K⁺1500ppm + 10% de álcool e pH 3,0 e 4,5, *L. fermentum* (FT282B), *L. plantarum* (FT025B) e *L. buchneri* (FT414B), não apresentaram capacidade de provocar a floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FT134L).

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. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

ALCARDE, V.E. & YOKOYA, F. Efeito da população de bactérias na floculação de leveduras isoladas de processos industriais de

fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**. Piracicaba: mar/abr, 2003.

ALCARDE, V.E.; LACERDA, T.H.M.; OLIVEIRA, F.C. Efeito de parâmetros que afetam o processo de floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Anais da I Mostra Acadêmica da UNIMEP**. Piracicaba: UNIMEP, 2003.

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: UNIMEP, 2008.

AMORIM, H.V. de. Fermentação alcoólica: **Ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 103p.

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

STRATFORD, M. & KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: quantification. **Yeast**, v.4, p. 107-115, 1988.

Anexos

Tabela 1: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT134L, em tampão Tris – HCl 10⁻¹ M, pH 7,0-7,5.

Microrganismo	População Levedura: Bactéria	Teor alcoólico (%)	Leitura (A) 600nm	Grau de floculação
<i>L. fermentum</i> (FT282B)	3,0 x 10 ⁸ : 9,0 x 10 ⁸	-	0,272	++
<i>L. plantarum</i> (FT025B)	3,0 x 10 ⁸ : 5,0 x 10 ⁸	-	0,369	++
<i>L. buchneri</i> (FT414B)	3,0 x 10 ⁸ : 2,0 x 10 ⁸	-	0,404	+

Tabela 2: Capacidade floculante de bactérias frente à levedura FT134L, na presença de íons, teor alcoólico 10%, pH 3,0 e pH 4,5.

Microrganismo	População Levedura: Bactéria	Teor alcoólico (%)	pH 3,0 Leitura (A) 600nm	pH 3,0 Grau de floculação	pH 4,5 Leitura (A) 600nm	pH 4,5 Grau de floculação
<i>L. fermentum</i> (FT282B)	3,0 x 10 ⁸ : 3,0 x 10 ⁸	10	1,456	-	1,454	-
<i>L. plantarum</i> (FT025B)	3,0 x 10 ⁸ : 8,0 x 10 ⁸	10	1,465	-	0,839	-
<i>L. buchneri</i> (FT414B)	3,0 x 10 ⁸ : 2,0 x 10 ⁸	10	1,329	-	0,916	-