



Instituto Politécnico de Viseu
Escola Superior Agrária de Viseu

Ano letivo: 2019/2020

Curso Técnico Superior Profissional em Viticultura e Enologia

**Relatório das atividades práticas de
Microbiologia Enológica**



Docente: António Pinto

Trabalho realizado por:

Rafael Marques nº3719

Tiago Santos nº3557

Introdução

No processo de formação do vinho são intervenientes vários microrganismos que durante a sua atividade metabólica e na presença de mosto, transformando conseqüentemente o açúcar em álcool etílico. As leveduras fazem parte do reino fungi, a produção de ATP é realizada através da fermentação alcoólica.

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma das leveduras mais usada a nível industrial pois pode ser uma solução fermentativa para a indústria panificador na indústria cervejeira e de outras bebidas alcoólicas convertendo a glucose em etanol conferindo assim o teor alcoólico destas bebidas.

Com as microvinificações realizadas nesta atividade prática pretende-se saber utilizando várias técnicas qual será o processo mais adequado e com maior grau de eficiência, para quando se produzir em maior escala.

Microvinificações

Material utilizado

- Garrafas de plástico de 1,5L
- Mosto devidamente recolhido após esmagamento
- Mostímetro
- Refratómetro

Metodologia

Foram feitos 4 fermentadores com garrafas de plástico de 1,5L com um furo que continha uma palhinha e, por fora, um tubo de ensaio colado de forma a ficar a palhinha dentro do tubo.

Cada fermentador tinha um diferente tipo de fermentação a decorrer:

Fermentador 1 : fermentação espontânea com as leveduras indígenas.

Fermentador 2: fermentação com leveduras secas ativas liofilizadas (0,2 gramas de leveduras).

Fermentador 3: fermentação com leveduras secas ativas liofilizadas (0,1 gramas de leveduras).

Fermentador 4: fermentação com leveduras secas ativas encapsuladas (envolvidas numa esfera de alginato de cálcio).



Leveduras utilizadas

Espécie: *Saccaromyces cerevisiae*.

Dose de aplicação: 10g-30g por 100ml de mosto

Revitalização/hidratação: em 10 partes de água morna açucarada, Max. 38°C, pelo menos por 20-30min

Quantidade: existem aproximadamente 10^{10} leveduras por 1g de pó



Fig.2- Leveduras usadas na fermentação

Preparação fermentador 1:

Colocou-se 1L de mosto dentro do fermentador e deixou-se ficar.

Preparação fermentador 2:

Antes de introduzirmos as leveduras secas ativas no fermentador devemos hidratá-las/revitalizá-las para que o seu desempenho seja mais eficiente e para que a fermentação inicie mais rapidamente.

Para a hidratação das leveduras pode utilizar-se mosto, que já contém os açúcares naturais para as leveduras ou, pode também utilizar-se água açucarada. A quantidade de água ou mosto a utilizar deve ser 10 vezes superior á quantidade de leveduras e, para que o processo ocorra mais rapidamente e em melhores condições deve usar-se água morna, no máx. 38°C, e aguardar 20-30min.

De seguida, antes de colocar as leveduras já ativas no mosto, deve verificar-se que o mosto e as leveduras se encontram mais ou menos á mesma temperatura pois, caso contrário, pode ser prejudicial para as leveduras e para o seu bom funcionamento (evitando o choque termico

Para a nossa fermentação usámos 0,2g de leveduras secas ativas.



Fig.3-Hidratação das leveduras

Preparação fermentador 3: Processo igual ao do fermentador 2. Mas neste fermentador foram apenas inoculadas 0,1 gramas de leveduras secas ativas.

Preparação fermentador 4: Neste fermentador foi colocado cerca de um litro de mosto e foram inoculadas leveduras secas ativas encapsuladas (envolvidas numa esfera de alginato de cálcio).

Ao fim de preparados os fermentadores estes ficaram a fermentar durante aproximadamente 2 semanas. Ao longo das duas semanas registou-se o número de bolhas que os fermentadores libertavam pela palhinha durante 1min. O número de bolhas reflete a velocidade de fermentação do mosto.

Motorização de Produção de CO₂

| Resultados | | | | | | | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Data | 1/out | 2/out | 3/out | 4/out | 5/out | 6/out | 7/out | 8/out | 9/out | 10/nov |
| Fermentador | | | | | | | | | | |
| F1 | 0 | 6 | 16 | 10 | 16 | 22 | 13 | 14 | 11 | 8 |
| F2 | 0 | 0 | 0 | 8 | 12 | 6 | 7 | 9 | 7 | 1 |
| F3 | 0 | 0 | 17 | 10 | 11 | 9 | 6 | 4 | 0 | 3 |
| F4 | 0 | 12 | 32 | 27 | 26 | 22 | 18 | 16 | 13 | 7 |

Imobilização de LSA da Espécie *S. Cerevisiae*/ Encapsuladas em Esferas de Alginato

A aplicação de leveduras imobilizadas, nos processos enológicos, começa a ter um grande interesse uma vez que traz vantagens relativamente à utilização comum. Uma das vantagens reside no facto de que as leveduras poderem se utilizadas mais que uma vez, e conseguir-se parar o processo de uma forma muito prática, bastando para isso retirar as leveduras imobilizadas do processo.

Material:

Saccharomyces Cerevisiae

Material:

- Leveduras Secas Ativas – 2g- LSA
- Alginato de Sódio
- Cloreto de Cálcio
- - Balança
- - Coador
- - Água destilada esterilizada
- - Copos de vidro
- - Agitador
- - Proveta

Dissolução de leveduras

Pesar 1 g de leveduras;

25 ml de água destilada;

Colocar na estufa a uma temperatura de 36°C

Alginato de sódio

Pesar 0,5g de alginato de sódio

25 ml de água destilada

Dissolver com o auxílio da placa de aquecimento

CaCl₂

Pesar 2,5g de CaCl₂

Procedimento:

- Num copo de vidro de capacidade adequada, dissolver o alginato de sódio em água destilada (2.5 a 3 g de alginato de sódio em 25 ml de água destilada). Agitar bem

com uma vareta de vidro e se possível a quente (facilita a dissolução), até se obter um gel sem grumos. Deixar arrefecer.

- Suspende as leveduras secas activas, noutra copo de vidro, de capacidade adequada (2 g de leveduras secas +25 ml de água destilada). Homogeneizar e colocar numa estufa a 35 °C, para revitalizar as leveduras (reidratação), durante meia hora. A reidratação das leveduras secas activas deve ser realizada numa quantidade de água, correspondente a cerca 10 vezes o seu peso.

- Preparar uma solução de cloreto de cálcio de 1 a 2% (misturar num copo de vidro de 500 ml, 250 ml de água destilada + 2.5 g de cloreto de cálcio), para se obter uma solução a 1 %. - Num copo de 100 ml, misturar a solução de alginato de sódio com a suspensão de leveduras e agitar bem.

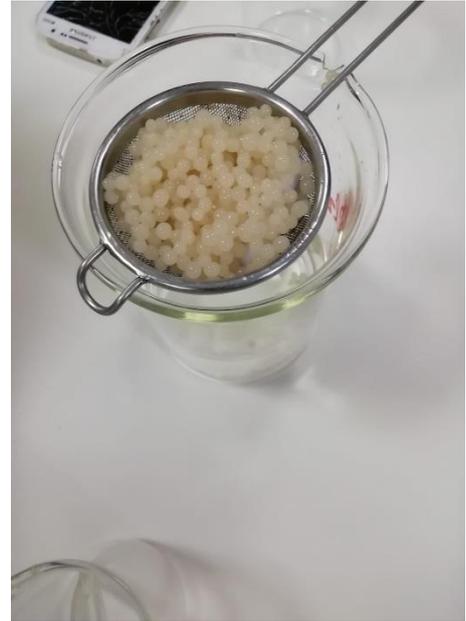
- Com uma seringa de 10 ml, sem agulha, deixar cair gota a gota a mistura de alginato de sódio com as leveduras, na solução de cloreto de cálcio, mantendo o líquido com uma agitação suave.

- Coar as esferas, utilizado um coador, para as separar da solução de cloreto. Lavar as esferas em água destilada esterilizada.

- Para a sua utilização, na fermentação, juntar o número de esferas adequado ao volume do substrato (um número que na prática se recomenda é de cerca de um milhão de leveduras por mililitro de mosto). As leveduras encapsuladas (esferas) devem ser colocadas no fermentador em saquinhos de rede ou outro recipiente poroso.

- Fazer os cálculos adequados em função do número médio de leveduras ou do peso de leveduras secas activas (LSA) que ficarão por esfera.

- Concluída a fermentação, retirar as esferas e lavá-las em água destilada esterilizada. Conservar as esferas em frigorífico numa solução de cloreto de cálcio a 1 a 2 %. As leveduras imobilizadas sobrevivem bastante tempo nestas condições.



Métodos de Avaliação Quantitativa de Populações Microbianas

Métodos diretos: Permitem a contagem direta dos microorganismos com o auxílio do microscópio fotônico para realizar a contagem, exceto o método Coulter Counter. Classificam-se, quanto à natureza, de métodos de contagens totais permitindo a avaliação de microorganismos viáveis e não viáveis.

Existem diversos tipos de métodos diretos:

- Método de Breed
- Métodos de Câmara de Contagem
- Métodos Eletrônicos
- Método de filtração

Relativamente aos métodos diretos utilizamos, neste caso, o das **câmaras de contagem**, que tem como vantagem ser rápido, econômico e preciso. Cabe ressaltar que este é um método de contagem de totais, restrita a avaliação quantitativa de populações elevadas de microorganismos: leveduras e bactérias.

Material:

- Amostra retirada de uma FA em curso
- Bico de Bunsen
- Câmaras de Neubauer
- LSA
- Microscópio Fotônico Composto
- Pipetas de 1ml
- Pipetas de Pasteur
- Tetinas
- Tubos de ensaio com 9ml de água destilada ou solução de Ringer e esterilizada
- Vortex

Procedimento:

- Prepare uma suspensão a partir das leveduras fornecidas. Utilize leveduras secas activas (LSA). Para isso, pese assepticamente 1 g de LSA e com os cuidados necessários coloque num tubo de ensaio contendo 9 ml de água ou de solução de Ringer esterilizadas. Neste tubo obtém a diluição 10⁻¹.
- Prepare a câmara de Neubauer. Esta deve estar perfeitamente seca e limpa. Coloque-a em posição adequada e coloque cuidadosamente a lamela.
- Execute, correctamente, o enchimento da câmara. Para isso, depois de homogeneizar o tubo que contém a suspensão por agitação no vortex ou a amostra de mosto/vinho, retire uma determinada quantidade, com uma pipeta de Pasteur, e deposite uma gota entre a lamela e a câmara e verifique que esta fica totalmente preenchida com a suspensão.
- Coloque, cuidadosamente, a câmara na platina do microscópio e foque correctamente com a objectiva x10. Faça as regulações necessárias à obtenção de uma imagem bem focada e correctamente iluminada.
- Antes de proceder à contagem, escolha a malha estatística. Entende-se por malha estatística, a quadrícula ou associações de quadrículas, cujas áreas contenham entre 10 e 20 células.
- Definida a malha estatística, conte o número de leveduras em cada uma, de 25 a 50 malhas estatísticas, (para maior rapidez conte em 10 malhas) anote esses números, percorrendo os dois lados da câmara. A contagem faz-se com a objectiva x40.
- Durante a contagem irá debater-se com um problema. Como contabilizar as células que ficaram colocadas em cima dos riscos que delimitam as malhas definidas? Uma forma a seguir, é considerar os microrganismos colocados, por exemplo, no risco de cima e da direita de cada malha, como pertencentes a essa malha. Seguir sempre este critério em todas as malhas contadas. Daqui resulta, obviamente, que os microrganismos colocados nos riscos inferior e esquerdo da malha não são incluídos nessa malha.
- No final da contagem lave cuidadosamente a câmara e a lamela em água corrente, coloque a escorrer e guarde-as depois de secas.
- No caso da suspensão com LSA contiver um número exagerado de células, prossiga as diluições e execute as necessárias para obter um número contável adequado.

Nas aulas práticas, utilizamos o **método de placas**. Este método tem uma execução fácil, pode ser adaptado á quantificação de população microbiana de qualquer grandeza ou substratos.

Material:

- Material Balão de 1000 ml vazio
- Água destilada
- Placa de aquecimento magnética
- Provetas Pipetas de 10 ml
- Tubos de ensaio de 16x160mm
- Distribuidor automático
- PCA
- R Bengal

Preparação dos meios de cultura:

O meio de cultura utilizado foi o PCA- Plate Count Agar (g/L)

- Com o auxílio de instruções do fabricante, calculamos qual a quantidade de PCA a adicionar em 500 ml.

Cálculo de PCA | 500ml

23,5G | 1000ML

Xg | 500ml

X = 11,75g

Cálculo de Rose Bengal | 500ml

32g | 1000ml

Xg | 500ml

X = 16g

- Foram preparados 48 tubos de ensaio na totalidade. Em 24 tubos foram colocados 9ml de água – em cada – e nos outros 24 18ml de PCA. Em seguida os tubos foram esterelizados na autoclave durante 15 minutos a 121°C. Finalizados a esterelização foram adicionados R Bengal de acordo com os cálculos supracitados.
- Executámos 7 diluições decimais: 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 .

Resultados do Método das Placas na avaliação das populações Microbianas ao longo da Fermentação Alcoólica

Conclusão

Para terminar concluímos que a microbiologia tem um papel fundamental para a produção de vinhos de qualidade, isentos de qualquer defeito.

Todos estes processos ajudaram-nos a perceber como funciona o ciclo microbiano e a entendê-lo melhor.

Tivemos também a oportunidade de conhecer novos métodos que são importantes do ponto de vista enológico.

Bibliografia

https://moodle.esav.ipv.pt/pluginfile.php/13781/mod_resource/content/1/PRATICMICENO16_17.pdf