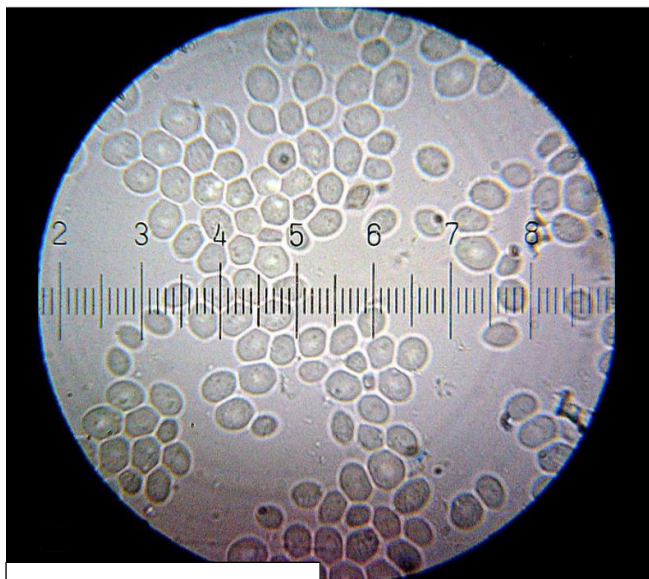




SACCHAROMYCES CEREVISIAE

CTESP EM VITICULTURA E ENOLOGIA MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

1º ano, 1º semestre 2019/2020

Antonio Madeira (nº3700)

Alexandre Silva (nº 3688)

Hugo Cardoso (nº 3715)

João Garcês (nº 3782)

CENTRO 2020

PORTUGAL
2020

UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

Índice

1. Introdução.....	2
2. Realização da vindima:	3
3. Demonstração da fermentação alcoólica em micro vinificadores	4
4. Monitorização da fermentação alcoólica.....	6
5. Execução de bioprocesso conducente imobilização de leveduras em esferas de alginato de cálcio	8

1. Introdução

Na realização de vinhos a utilização de microrganismos é fundamental, durante o seu metabolismo, estando na presença de mosto, realizam a transformação do açúcar em álcool etílico.

As leveduras são microrganismos fundamentais para a realização da fermentação alcoólica. A *Saccharomyces cerevisae* é a leveduras mais utilizada industrialmente para a realização da fermentação alcoólica, por ser uma levedura muito resistente aos altos teores de álcool e elevada resistência ao sulfuroso.

Nestas atividades praticas pretende-se realizar fermentações alcoólicas, num tamanho reduzido, recorrendo á utilização de várias técnicas, para que no final, seja possível avaliar o processo que possa ser mais eficiente para a produção em grandes quantidades.

2. Realização da vindima:

Realização da vindima: dia 1/10/2019

Esmagamento de uvas para obtenção de mosto.

Determinação do grau Brix por refratômetro manual

3. Demonstração da fermentação alcoólica em micro vinificadores

No dia 1/10

Lavagem e sanitização dos fermentadores.

-Preparação de 4 fermentadores:

- Fermentador 1: sem inoculação;
- Fermentador 2: Leveduras imobilizadas;
- Fermentador 3: Leveduras viáveis e
- Fermentador 4: LSA (Leveduras secas activas).

Em cada fermentador 1 litro de mosto + sulfuroso a 60mg/100L:

-Para o fermentador 2:

- 1g de leveduras em 23,8g de esferas
- Para termos 0,2g de leveduras, necessitamos 4,76g de esferas. Arredondamos para 5g

-Para o fermentador 3:

- Suspensão de H₂O destilada e esterilizada
- Contagem das leveduras pelo Método das Câmaras de contagem:
- Nas 2 câmaras existem quadriculas, sendo na parte central, quadrados de 0,05mm, com profundidade de 0,1mm
- Contar em 10 quadriculas aleatórias (têm que ter entre 10 a 20 células)
- $N = V (\text{área} \times \text{profundidade}) = 0,05^2 \times 0,1$

-Para o fermentador 4:

- Recomendação do fornecedor de LSA: utilizar 20g/100L
- Como temos apenas 1 litro de mosto, utilizámos 0,2g de LSA

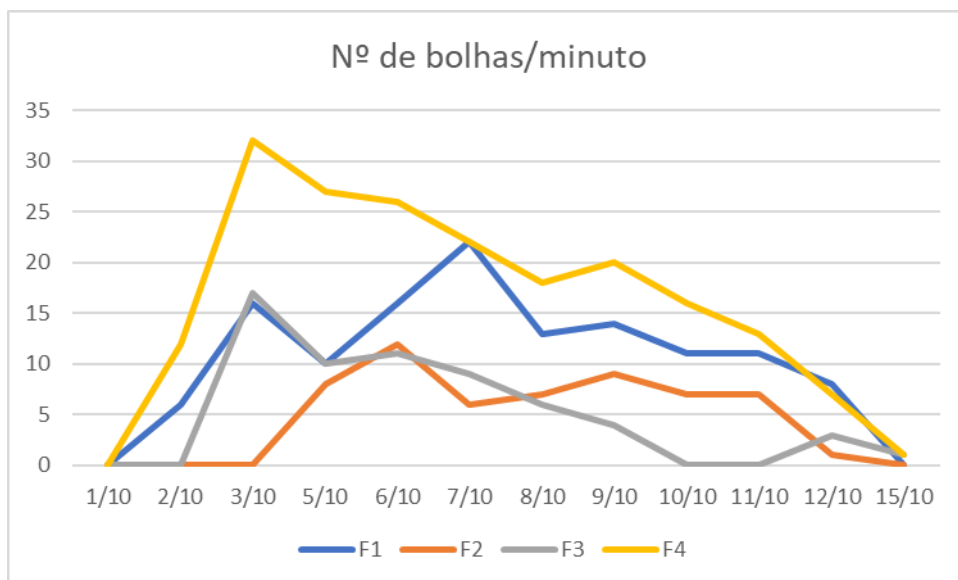
$$N/ml = (n \times 1000) / V_{mm^3}$$

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	média
17	12	16	12	18	16	12	16	14	11	14,4

Cálculos:

- Volume = $0,00025 \text{ mm}^3$
- $N/ml = (14,4 \times 1.000) / 0,00025 = 57.600.000 = 5,8 \times 10^7$
- 1ml de suspensão contém $5,8 \times 10^7$ leveduras
- $(1 \times 10^9) / 5,8 \times 10^7 = 17 \text{ ml}$ (na prática vamos meter apenas 10ml, porque não temos mais leveduras)

	1/10	2/10	3/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	10/10	11/10	12/10	15/10
F1	0	6	16	10	16	22	13	14	11	11	8	0
F2	0	0	0	8	12	6	7	9	7	7	1	0
F3	0	0	17	10	11	9	6	4	0	0	3	1
F4	0	12	32	27	26	22	18	20	16	13	7	1



4. Monitorização da fermentação alcoólica

determinação diária da densidade, peso, produção de CO₂ e da temperatura

Determinação da conversão dos açúcares em álcool:

-Teor original = 215g/L = 21,5% (no refratómetro manual)

	Teor refract. Manual					
	origem	nº dias			Δ	velocidade
		5	6	7		g/L dia
F1	215			160	55	7,9
F2	215	130			85	17,0
F3	215		150		65	10,8
F4	215			140	75	10,7
	Teor refract. Digital					
	origem	nº dias			Δ	velocidade
		5	6	7		g/L dia
F1	215			141	74	10,6
F2	215		115		100	20,0
F3	215		94		121	20,2
F4	215			109	106	15,1

-Contagem das Leveduras

F1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	média
	21	19	11	7	14	21	14				15,3
	N/ml =		(15,3x1000)/0,00025 =			61142857,1	6,1E+07				
F3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	média
	15	11	15	15	11	11	9	8	11	12	11,8
	N/ml =		(11,8x1000)/0,00025 =			47200000	4,7E+07				
F4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	média
	5	6	7	4	6	4	7	6	5	7	5,7
	N/ml =		(5,7x1000)/0,00025 =			22800000	2,3E+07				

-Avaliação das populações microbianas ao longo da fermentação

Método das placas > contagem das colónias > implica crescimento no laboratório > contagem de microrganismos viáveis > unidade de medida =

- UFC (Unidades Formadoras de Colónias)/ml
- UFC (Unidades Formadoras de Colónias)/g

			1,0E-01	1,0E-02	1,0E-03	1,0E-04	1,0E-05	1,0E-06	Resultado
Leveduras	Início		Inc	74	-	-	-	-	7,4E+03
	Meio		Inc	Inc	Inc	Inc	42	-	4,2E+06
	Fim		60	-	-	-	-	-	6,0E+02
FMT	Início	bactérias	Inc	Inc	400	-	-	-	4,0E+05
		bolores	Inc	Inc	6	-	-	-	6,0E+03
	Meio	bactérias	Inc	37	-	-	-	-	3,7E+03
		bolores	Inc	0	-	-	-	-	sem bolores
	Fim	bactérias	12	-	-	-	-	-	1,2E+02
		bolores	0	-	-	-	-	-	sem bolores

(FMT: Flora Microbiana Total)

Conclusões:

Ao avaliar os resultados obtidos podemos observar que:

- A quantidade de bolores é sempre inferior à das bactérias;
- Os bolores só aparecem no início da fermentação, concluindo que não são resistentes á formação de álcool etílico;
- Bactérias filamentosas (actinomicetos) só existem no solo, e são sinal de contaminações na altura da vindima;
- Aumento considerável das populações de leveduras do início para o meio da fermentação (570x);
- Diminuição significativa das leveduras no fim da fermentação;
- População de bolores (Fungos Filamentosos) não resistem à fermentação alcoólica (de $6,0 \times 10^3$ UFC/ml no início, para <10 UFC/ml no final). Na prática significa que não há bolores;
- Diminuição significativa das populações de FMT (de $4,0 \times 10^5$ UFC/ml no início, para $1,2 \times 10^2$ UFC/ml no final). Pode dizer-se que a fermentação se auto-higieniza;
- As únicas populações que parecem resistir ao longo da fermentação são as populações de Actinomicetos (bactérias filamentosas do solo).

5. Execução de bioprocesso conducente imobilização de leveduras em esferas de alginato de cálcio

No dia 24/09/2019, procedemos à imobilização, ou encapsulamento, de leveduras

Leveduras utilizadas na fermentação alcoólica: *SACCHAROMYCES cerevisiae*

- Execução do processo de imobilização de leveduras em esferas de alginato de cálcio;
- Execução de preparações a fresco. Observação de microrganismos ao microscópio (leveduras e bactérias).

Imobilização de leveduras:

- 2g de leveduras secas ativas (LSA);
- Solução a 1% de Alginato de sódio;
- Solução a 1% de Cloreto de cálcio.

Procedimento:

Adicionou-se + 2g de LSA a 25ml de água destilada a 30°C

Adicionou-se 0,5g de alginato de sódio a 25ml de água destilada e procedeu-se ao seu aquecimento

Misturou-se as preparações, ficando assim o alginato em concentração de 1%

Regra: LSA = 20g/hectolitro

Água = 10x peso das LSA

250ml de H₂O + 2,5g CaCl₂

1g LSA + 25ml H₂O na estufa a 37°C (durante 10 horas?)

0,5g de Alginato + 25ml H₂O

2,5 CaCl₂ + 250ml H₂O

Injetar com pipeta na solução anterior



