



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIALIDADES ENOLÓGICAS

João Pedro Rodrigues Letras

Orientação: Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Professor Doutor António Candeias

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

Évora, 2017



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS COM POTENCIALIDADES ENOLÓGICAS

João Pedro Rodrigues Letras

Orientação: Ana Teresa Caldeira

António Candeias

Mestrado em Viticultura e Enologia

Dissertação

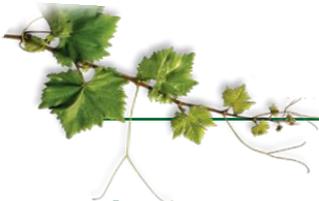
Évora, 2017

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

Albert Einstein

Dedicatória

A todas as pessoas que fazem parte da minha Vida



AGRADECIMENTOS

Após um percurso académico de cinco anos, inúmeras foram as pessoas que conheci nesta maravilhosa Universidade, e foi graças a elas que toda esta caminhada se tornou, mas fácil e interessante.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha família, aos meus pais porque sem eles nunca poderia ter alcançado os meus sonhos e, à minha irmã por todos os bons momentos passados juntos.

A todos os amigos que fiz em Évora, um obrigado por toda a companhia, paciência e companheirismo, que já deixam saudades, mas que serão levados comigo para onde for.

Aos meus orientadores, à Professora Ana Teresa Caldeira e ao Professor António Candeias pela oportunidade de estágio, por todos os conhecimentos transmitidos, assim como toda a sua ajuda na finalização deste trabalho.

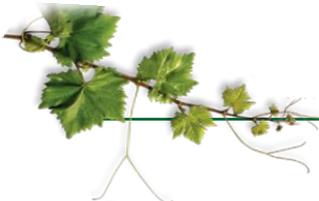
Um especial obrigado à Doutora Cátia Salvador, pela sua cooperação, pela sua inestimável ajuda, companhia, paciência e amizade.

À Doutora Marina González-Pérez pela colaboração na parte das sondas FISH e ao grupo de investigação que colaboram neste projeto.

Às técnicas de laboratório, D. Helena Carvalho, D. Esperança Alves e D. Anabela Cabeça, um obrigado por toda a ajuda prestada e boa disposição.

Agradeço ainda todo o suporte financeiro para a realização deste trabalho ao projeto “HIT3CH - HERCULES Interface for Technology Transfer and Teaming in Cultural Heritage”, Ref: ALT20-03-0246-FEDER-000004, co-financiado pela União Europeia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, enquadrado no ALENTEJO 2020, e também ao projeto “MICROTECH-ART – Desenvolvimento de uma Ferramenta Analítica para deteção de Microrganismos que proliferam no Património Cultural” Ref: PTDC/BBB-IMG/0046/2014, FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia.





RESUMO

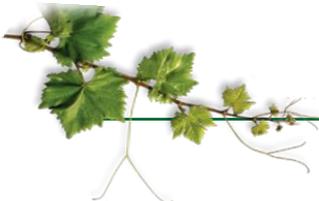
Este trabalho teve como principal objetivo a imobilização de leveduras isoladas de processos de vinificação de vinhos alentejanos, com vista à sua aplicação em processos enológicos.

Numa fase inicial isolaram-se várias estirpes de leveduras a partir de mostos de uva , em várias fases do processo fermentativo e, foram caracterizadas pelas suas características macroscópicas e microscópicas e identificados por sequenciação dos produtos de PCR obtidos após amplificação do domínio D1/D2 do DNA.

Efetuaram-se culturas dos microrganismos isolados em dois meios de cultura líquidos, com e sem arejamento, para caracterização fisiológica e seleção das estirpes promissoras para imobilização. Produziram-se sistemas de imobilização utilizando diferentes matrizes com dois consórcios distintos, tendo sido testados em ensaios de microvinificação com mosto sintético e analisados por microscopia eletrónica de varrimento. Efetuaram-se ensaios de reutilização dos consórcios imobilizados nas diferentes matrizes e por fim selecionou-se o mais promissor, testando-se num ensaio com mosto de uva branca.

PALAVRAS-CHAVE

Vinho, leveduras, microrganismos imobilizados, mosto, processos enológicos



IMMOBILIZATION OF MICROORGANISMS WITH OENOLOGICAL POTENTIALITIES

ABSTRACT

The main objective of this work was the immobilization of isolated yeasts from winemaking processes of Alentejo wines with a view to their application in oenological processes.

In an initial phase several yeast strains were isolated from grape must at various fermentation process stages, were characterized by their macroscopic and microscopic characteristics and identified by sequencing the PCR products obtained after amplification of the D1 / D2 domain of DNA.

Cultures of the isolated microorganisms were carried out in two liquid culture media, with and without aeration, for physiological characterization and selection of the promising strains for immobilization. Immobilization systems were produced using different matrices with two different consortia and were tested in microvinification assays with synthetic must and analyzed by scanning electron microscopy. Re-use tests were carried out on the immobilized consortia in the different matrices and finally the most promising was selected and tested in white grape must.

KEYWORDS

Wine, yeasts, immobilized microorganisms, must, oenological processes

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	ix
Resumo.....	xi
Abstract	xiii
Índice geral.....	xv
Índice de ilustrações.....	xvii
Índice de tabelas	xx
Abreviaturas.....	xxiii
Unidades de medida	xxiii
1. Nota prévia.....	1
1.1. Problemática e Objetivos	3
2. Enquadramento teórico	5
2.1. Setor vitivinícola.....	7
2.1.1. A produção Vinho a nível mundial	7
2.1.2. Portugal	8
2.1.3. Alentejo	10
2.2. Castas	11
2.2.1. Antão Vaz	12
2.2.2. Roupeiro ou Síria.....	13
2.2.3. <i>Cabernet Sauvignon</i>	14
2.2.4. Touriga Nacional.....	15
2.3. Vinho	17
2.3.1. Tipos de Vinho.....	17
2.3.2. Glicólise e Fermentação Alcoólica.....	18
2.3.3. Composição Química.....	20
2.4. Microrganismos no Vinho	21
2.5. Imobilização Celular	23
3. Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos	27
3.1. Introdução	29
3.2. Metodologia	30
3.2.1. Isolamento de Microrganismos.....	30
3.2.2. Obtenção de Culturas Puras e Caraterização Morfológica	30
3.2.3. Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente	30

3.2.4.	Extração de DNA.....	32
3.3.	Resultados	35
3.3.1.	dinâmica Populacional do processo enológico	35
3.3.2.	Caraterização Morfológica dos isolados	40
3.3.3.	Identificação dos isolados	43
3.4.	Conclusão	50
4.	Caracterização fisiológica de leveduras	51
4.1.	Introdução	53
4.2.	Metodologia	53
4.2.1.	Cultura Aeróbias.....	53
4.2.2.	Culturas sem arejamento	54
4.2.3.	Recolha e Tratamento de Amostras.....	54
4.3.	Resultados e discussão.....	55
4.3.1.	Caracterização do Crescimento das Estirpes Isoladas.....	55
4.3.2.	Avaliação das Potencialidades Fermentativas das Leveduras	63
4.4.	CONCLUSÃO	67
5.	Imobilização de leveduras.....	69
5.1.	Introdução	71
5.2.	Metodologia	71
5.2.1.	Imobilização em alginato de cálcio	71
5.2.2.	Imobilização das leveduras em suportes inorgânicos.....	72
	Preparação da mistura de leveduras	72
5.3.	Resultados	75
5.3.1.	Capacidade fermentativa das estirpes de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio	75
5.3.2.	Capacidade fermentativa de culturas mistas imobilizadas	79
5.3.3.	Capacidade de Reutilização dos sistemas de imobilização	89
5.3.4.	Ensaio dos sistemas de imobilização em mosto de uva branca.....	97
5.4.	Conclusão	98
6.	Conclusões e Perspetivas Futuras	99
	Referências bibliográficas	103
	Anexos.....	115



ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Evolução do Consumo Mundial de Vinho (Retirado de OIV- Organização Internacional da Vinha e do Vinho, 2017)	8
Figura 2- Evolução da produção nacional de vinho (Retirado de IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2017)	9
Figura 3- Regiões Vitivinícolas em Portugal (retirado de http://www.winesofportugal.com/br/vinhos-e-turismo/wine-regions/)	10
Figura 4- Evolução da Produção de vinho no Alentejo (Retirado de IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2017)	10
Figura 5- Representação das sub-regiões Vitivinícolas existentes no Alentejo (Infovini, 2017). 11	
Figura 6- Representação da casta Antão Vaz. A- Zona de maior incidência; B- morfologia do cacho e bago; C- morfologia da folha (Vine to Wine Circle, 2017)	13
Figura 7- Representação da casta Roupeiro ou Síria. A- Zona de maior incidência; B- morfologia do cacho e bago; C- morfologia da folha (Vine to Wine Circle, 2017)	14
Figura 8- Casta Cabernet Sauvignon. A- Cacho e Bago; B- Folha adulta; C- Folha jovem (Adaptado de Giscours et al., 2011)	15
Figura 9- Representação da casta Touriga Nacional. A- Zona de maior incidência; B- morfologia do cacho e bago; C- morfologia da folha	16
Figura 10- Tipos de vinhos existentes em Portugal (Adaptado do Artigo nº2 do Decreto-Lei nº 35846/46 de 02/09/1946).....	18
Figura 11- Esquema da glicólise e da fermentação alcoólica. Nota: cada passo dentro do tracejado ocorre duas vezes por cada mole de glucose (Wansbrough, 2000)	19
Figura 12- Síntese de metabolitos secundários longo da fermentação alcoólica(Adaptado de Moreno-Arribas & Carmen Polo, 2009)	20
Figura 13-Exemplo de leveduras presentes em mostos e vinhos (Joshi et al., 2016).....	22
Figura 14- Exemplo de leveduras acéticas. A- Acetobacter acetii; B- Gluconobacter oxydans; C- Gluconacetobacter liquefaciens (UCDAVIS- Viticulture and Enology, 2017)	23
Figura 15- Métodos de imobilização celular (Adaptado de Covizzi et al., 2007)	25
Figura 16- Região D1/D2 do gene do RNA ribossómico da subunidade 26S (Jarvis et al., 2014) 29	
Figura 17- Eletroforetograma obtido através de PCR, com amplificação do domínio D1/D2, correspondente às amostras de DNA extraídas das estirpes de leveduras isoladas dos mostos de uva. M - Marcador de DNA (NZYDNA Ladder V, NZYTech); 1 - controlo negativo; 2 - levedura I; 3 - levedura II; 4 - levedura III; 5 - levedura IV ₁ ; 6 - levedura IV ₂ ; 7 - levedura V ₁ ; 8 - levedura V ₂ ; 9 - levedura VI; 10 - levedura VII; 11 - levedura VIII; 12 - levedura IX; 13 - levedura X; 14 - levedura XI; 15 - levedura XII; 16 - levedura XIII; 17 - levedura XIV; 18 - 396. (A) corresponde às réplicas A e (B) às réplicas B.	44
Figura 18- Dendograma obtido por alinhamento das sequências genéticas para as estirpes de leveduras com amplificação do domínio D1/D2.	46

Figura 19- Eletroforetograma obtido através de M13 - PCR, correspondente às amostras de DNA extraídas das estirpes de leveduras isoladas dos mostos. M, M' - marcador de DNA (NZYDNA Ladder VII, NZYTech); 1 - controlo negativo; 2 - levedura I; 3 - levedura II; 4 - levedura III; 5 - levedura IV ₁ ; 6 - levedura IV ₂ ; 7 - levedura V ₁ ; 8 - levedura V ₂ ; 9 - levedura VI; 10 - levedura VII; 11 - levedura VIII; 12 - levedura IX; 13 - levedura X; 14 - levedura XI; 15 - levedura XII; 16 - levedura XIII; 17 - levedura XIV; 18 - levedura 396.	47
Figura 20- Dendograma baseado na análise dos perfis genéticos obtidos após M13-PCR fingerprinting para as estirpes de leveduras isoladas. Os valores de distância entre os clusters são expressos como percentagem de similaridade (0-100%).....	49
Figura 21- Culturas de células livres em condições aeróbias em meio de mosto sintético.....	53
Figura 22- Cultura de células livres sem arejamento em meio de mosto sintético.....	54
Figura 23- Curvas de crescimento das leveduras em cultura livre com arejamento em meio de mosto sintético obtidas pela monitorização da Abs a 600 nm e respetivos perfis de consumo de glucose. A- Levedura I; B- Levedura II; C- Levedura III. Os valores referentes ao perfil de consumo de glucose são a média ± desvio-padrão de 3 réplicas.	56
Figura 24- Curva de crescimento das leveduras sem cultura livre com arejamento em meio de mosto sintético modificada obtida pela da monitorização da Abs a 600 nm e respetivo perfil de consumo de glucose. A- Levedura IV ₁ ; B- Levedura IV ₂ ; C- Levedura V ₁ . Os valores referentes ao perfil de consumo de glucose são a média ± desvio-padrão de 3 réplicas.	61
Figura 25- Perfil de consumo de glucose e produção de etanol referente às culturas de células livres em meio de mosto sintético sem arejamento. A- Levedura I; B- Levedura II; C- Levedura III. Os valores apresentados são a média ± desvio-padrão de 3 réplicas.....	64
Figura 26- Perfis de consumo de glucose e produção de etanol para as leveduras imobilizadas na matriz de alginato de cálcio. A- Levedura I; B- Levedura II; C- Levedura III.	76
Figura 27- Perfis de consumo de glucose para os consórcios de leveduras 1 e 2. A- Cultura com os consórcios inoculados; B- Cultura com os consórcios imobilizados na matriz de alginato de cálcio.	80
Figura 28- Perfis de consumo de glucose para os consórcios de leveduras 1 e 2. A- Culturas com os consórcios imobilizados em matriz de barro; B- Cultura com os consórcios imobilizados em matriz de barro com polimerização.	81
Figura 29- Perfis de consumo de glucose para os consórcios de leveduras 1 e 2. A- Culturas com os consórcios imobilizados em matriz de tufo vulcânico; B- Cultura com os consórcios imobilizados em matriz de tufo vulcânico com polimerização.	82
Figura 30- Perfis de consumo de glucose para os consórcios de leveduras 1 e 2. A- Culturas com os consórcios imobilizados em matriz de argila expandida; B- Cultura com os consórcios imobilizados em matriz de argila expandida com polimerização.	83
Figura 31- Análise SEM-EDS do sistema de imobilização em suporte de barro com células do consórcio 2 ao final da fermentação. A- Micrografia de SEM da matriz de barro; B – Análise química da matriz de barro; C- Micrografia de SEM de amostra do sistema de imobilização evidenciando células imobilizadas no suporte de barro; D - Micrografia de SEM de amostra evidenciando células imobilizadas no suporte de barro com polimerização; E e F - Análise	

química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos alumínio (Al) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com células imobilizadas; G e H - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos cálcio (Ca) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com polimerização com células imobilizadas. 86

Figura 32- Análise SEM-EDS do sistema de imobilização em suporte de tufo vulcânico com células do consórcio 2 ao final da fermentação. A- Micrografia de SEM da matriz de tufo vulcânico; B – Análise química da matriz de tufo vulcânico; C- Micrografia de SEM de amostra do sistema de imobilização evidenciando células imobilizadas no suporte de tufo vulcânico; D - Micrografia de SEM de amostra evidenciando células imobilizadas no suporte de tufo vulcânico com polimerização; E e F - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos alumínio (Al) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com células imobilizadas; G e H - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos cálcio (Ca), silício(Si) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com polimerização com células imobilizadas. 87

Figura 33- Análise SEM-EDS do sistema de imobilização em suporte de argila expandida com células do consórcio 2 ao final da fermentação. A- Micrografia de SEM da matriz de argila expandida; B – Análise química da matriz de argila expandida; C- Micrografia de SEM de amostra do sistema de imobilização evidenciando células imobilizadas no suporte de argila expandida; D - Micrografia de SEM de amostra evidenciando células imobilizadas no suporte de argila expandida com polimerização; E e F - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos silício (Si) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com células imobilizadas; G e H - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos silício (Si) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com polimerização com células imobilizadas. 88

Figura 34- Perfis de consumo de glucose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de alginato de cálcio para os consórcios de leveduras C1 e C2. 90

Figura 35- Perfis de consumo de glucose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de barro para os consórcios de leveduras C1 e C2. 91

Figura 36- Perfis de consumo de glucose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de barro com polimerização para os consórcios de leveduras C1 e C2. 92

Figura 37- Perfis de consumo de glucose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de tufo vulcânico para os consórcios de leveduras C1 e C2. 93

Figura 38- Perfis de consumo de glucose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de tufo vulcânico com polimerização para os consórcios de leveduras C1 e C2. 94

Figura 39- Perfis de consumo de glucose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de argila expandida para os consórcios de leveduras C1 e C2. 95

Figura 40- Perfis de consumo de glucose obtidos para a cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de argila expandida com polimerização para os consórcios de leveduras C1 e C2. 96

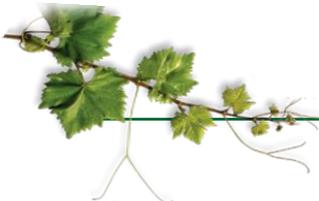
Figura 41- Perfis de consumo de glucose e produção de etanol nas culturas em mosto de uva branca. A- Consórcios na forma livre; B- Consórcios imobilizados em argila expandida com polimerização..... 97

Figura 42- Curva de calibração dos glúcidos utilizada para determinação da glucose nas culturas efetuadas com os consórcios de leveduras nas diferentes matrizes de imobilização e para a determinação dos glúcidos redutores no ensaio de mosto de uva. Os valores apresentados são a média \pm DP de oito determinações..... 123

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Evolução da Produção Mundial de Vinho (Adaptado de IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2017)	7
Tabela 2-Principais castas plantadas na Região do Alentejo (ATEVA- Associação Técnica de Viticultores do Alentejo, 2014)	12
Tabela 3- Vantagens e desvantagens dos sistemas de imobilização celular(Shuler & Kargi, 2002; Brena et al., 2013; Elakkiya et al., 2016).	24
Tabela 4- Contagem das colónias microbianas nas amostras em estudo.....	35
Tabela 5- Fotografias da autofluorescência das amostras em diferentes fases do processo de vinificação observada com o microscópio de epifluorescência nos filtros FITC e TRITC.	38
Tabela 6- Fotografias dos sinais fluorescentes obtidos após a aplicação da técnica FISH em amostras em diferentes fases do processo de vinificação observada com o microscópio de epifluorescência nos filtros FITC e TRITC.	39
Tabela 7- Caraterísticas macroscópicas e microscópicas das estirpes de leveduras isoladas	41
Tabela 8- Identificação das estirpes isoladas após sequenciação.....	45
Tabela 9- Taxa específica de crescimento e tempo de geração de leveduras em mosto sintético	60
Tabela 10- Taxa específica de crescimento e tempo de geração das culturas de leveduras em mosto sintético modificado	63
Tabela 11- Taxas volumétricas de consumo de glucose referentes às culturas de células livres em meio de mosto sintético sem arejamento	67
Tabela 12- Taxas volumétricas de consumo de glucose para as culturas sem arejamento de leveduras imobilizadas em esferas de alginato de cálcio em meio de mosto sintético	79
Tabela 13- Taxas volumétricas de consumo de glucose para as culturas livres e imobilizadas nas várias matrizes sem arejamento com os consórcios de leveduras 1 e 2 em meio de mosto sintético.....	84
Tabela 14- Taxas volumétricas de consumo de glucose para as culturas sem arejamento na forma livre e imobilizada com os consórcios de leveduras C1 e C2 em mosto de uva branca... 98	
Tabela 15- Constituição do meio de cultura CRB.....	117

Tabela 16- Constituição do meio de cultura MEA.....	117
Tabela 17- Constituição do meio de cultura NA	117
Tabela 18- Constituição do meio de cultura YPD.....	117
Tabela 19- Composição do mosto sintético líquido	118
Tabela 20- Composição do mosto sintético modificado líquido	118
Tabela 21- Concentração e grau de pureza do DNA extraído das amostras de leveduras	119
Tabela 22- Quantificação de DNA por fluorimetria dos produtos de PCR, com amplificação do domínio D1/D2, referentes aos diferentes tipos de leveduras.....	120
Tabela 23- Princípio do método do kit enzimático para quantificação da glucose	121
Tabela 24- Princípio do método do kit enzimático para quantificação do etanol	122
Tabela 25- Valores de acidez total e pH no mosto inicial e no final das culturas	124



ABREVIATURAS

Abs – Absorvância

CRB – *Cook Rose Bengal*

MEA - *Malt Extract Agar*

NA – *Nutrient Agar*

PCR - Polymerase chain reaction

SEM-EDS - Microscopia eletrónica de varrimento com espectroscopia de energia dispersiva de raios-x

YNB- *Yeast Nitrogen Base*

YPD - *Yeast extract peptone dextrose*

UNIDADES DE MEDIDA

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

µL - Microlitro

g - Força G

g - Grama

h - Hora(s)

mg - Miligrama

min. - Minuto(s)

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

nm - Nanómetros

rpm - Rotações por minuto

s - Segundo(s)

1. Nota prévia





1.1. PROBLEMÁTICA E OBJETIVOS

O setor vitivinícola tem atualmente extrema importância a nível Mundial, cada vez existem mais países a produzir vinhos, o que torna este setor muito competitivo. Neste contexto, é importante o desenvolvimento de novas metodologias que possam ser aplicadas em processos de produção enológica, tornando-os por um lado mais eficientes, com vista a melhorar a relação qualidade/preço do produto final e por outro mais diferenciados, com marcas de identidade e características específicas da região onde são produzidos. A produção por via biotecnológica de leveduras imobilizadas específicas para determinadas castas e/ou regiões vitivinícolas pode constituir um importante fator de inovação.

Atualmente, já existem alguns estudos de aplicações de leveduras imobilizadas em processos enológicos, nomeadamente em fermentações alcoólicas em contínuo, paragens de fermentação, desacidificação de vinhos, produção de vinhos doces (com elevado teor em glúcidos redutores) e ainda na produção de espumantes.

Estas aplicações permitem contornar e/ou eliminar etapas dos processos de produção dos vinhos, originando uma redução de tempo e custos despendidos em algumas fases de produção.

O conhecimento das potencialidades de novas espécies de leveduras e/ou consórcios com características fermentativas ou com propriedades sensoriais específicas pode constituir uma ferramenta importante no alargamento da complexidade microbiana nos processos enológicos, de forma controlada, conferindo uma maior qualidade ao vinho e inovação nas características organolépticas ao produto final.

Este trabalho pretende ser um contributo no desenvolvimento de metodologias de imobilização de consórcios de leveduras enológicas, isoladas de diversas castas de forma a serem utilizadas em processos enológicos. Através do uso sequencial de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* de forma controlada procura-se tirar partido do potencial sensorial e/ou fermentativo das estirpes de leveduras.

Os principais objetivos deste trabalho são:

- Identificação e caracterização de estirpes de leveduras isoladas de mostos de uva
- Imobilização de células de leveduras isoladas com vista à sua aplicação em processos enológicos

São objetivos específicos:

- Avaliar a dinâmica de populações presente nos mostos das diferentes castas, nas várias fases do processo fermentativo
- Caracterizar as estirpes de leveduras isoladas a nível macroscópico e microscópico
- Aplicar técnicas de biologia molecular na identificação das estirpes de leveduras isoladas:
 - Efetuar a extração de DNA das estirpes de leveduras em estudo
 - Quantificar o DNA extraído por Espectrofotometria de Absorção Molecular
 - Amplificar o DNA por PCR, na região do domínio D1/D2
 - Analisar os produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose
 - Quantificar os produtos de PCR por fluorimetria
 - Analisar sequências genéticas obtidas por sequenciação
 - Amplificar o DNA por PCR, através de *fingerprinting*
- Analisar os perfis de crescimento das estirpes de leveduras em culturas aeróbias em meio líquido
- Imobilizar células de leveduras em diferentes matrizes
- Analisar o sucesso de imobilização das células de levedura na matriz por SEM-EDS
- Testar a capacidade de reutilização os sistemas de imobilização
- Monitorizar o consumo de glúcidos redutores e produção de etanol nas diversas culturas

2. Enquadramento teórico



2.1. SETOR VITIVINÍCOLA

2.1.1. A PRODUÇÃO VINHO A NÍVEL MUNDIAL

A Tabela 1 apresenta alguns dados da Produção Mundial de Vinho no ano 2000 e no ano 2016. A produção de Vinho tem tido alguma estabilidade desde 2000 até 2016, com uma pequena quebra de 8% durante esse período, de 280 para 259 milhões de hectolitros produzidos (tabela 1).

A Europa, continente com forte tradição Vitivinícola é responsável por mais de 65% da produção Mundial de Vinho. Contudo tem vindo a diminuir a produção desde o ano 2000. França diminuiu mais de 27% a sua produção anual entre 2000 e 2016 e esta tendência também se observa nos restantes países com forte tradição, nomeadamente Itália, Espanha, Portugal e Alemanha. A Europa tem vindo a perder terreno para novos países emergentes no setor, em particular o Chile, Austrália, China e África do Sul.

Tabela 1- Evolução da Produção Mundial de Vinho (Adaptado de IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2017)

País	2000	2016	Varição (2000-2016) (%)
Itália	51,6	48,8	-5
França	57,5	41,9	-27
Espanha	41,7	37,8	-9
Estados Unidos	21,5	22,5	+5
Argentina	12,5	8,8	-30
Chile	6,7	10,1	+51
Austrália	8,1	12,5	+55
África do Sul	6,9	10,5	+51
China	10,5	11,5	+10
Alemanha	9,9	8,4	-15
Portugal	6,7	6,0	-10
Roménia	5,5	4,9	-10
Brasil	3,6	1,4	-62
Grécia	3,6	2,6	-27
Total	280	259	-8

Ao nível do consumo, este aumentou 6,2% a nível mundial, de 226 para 239 milhões de hectolitros, entre 2000 e 2016, com destaque para a quebra do consumo nos países com maior produção, nomeadamente França, Espanha e Itália. Já a Federação Russa, os Estados Unidos da América e a China lideram o aumento do consumo de vinho, em especial a

Federação Russa e Austrália, que nestes últimos 15 anos aumentaram o consumo anual de vinho em mais de 80% (IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2017). Na figura 1 é possível observar a evolução do consumo Mundial de vinho entre 2000 e 2015.

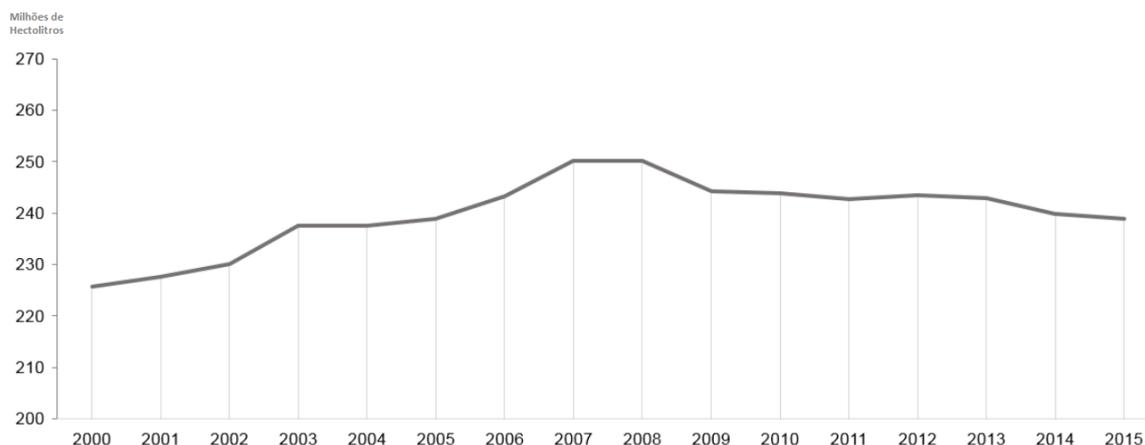


Figura 1- Evolução do Consumo Mundial de Vinho (Retirado de OIV- Organização Internacional da Vinha e do Vinho, 2017)

2.1.2. PORTUGAL

Em Portugal, a produção de vinho entre 2000 e 2016 foi bastante variável, com fortes subidas e descidas de volume produzido ao longo dos anos, conforme é possível verificar na Figura 2. Em 2016 foram produzidos 6,009 milhões de hectolitros, uma quebra de 20% relativamente a 2015, onde foram produzidos 7,047 milhões de hectolitros. O País ocupa atualmente a 12ª posição no ranking dos principais Países produtores do vinho (ver tabela 1).

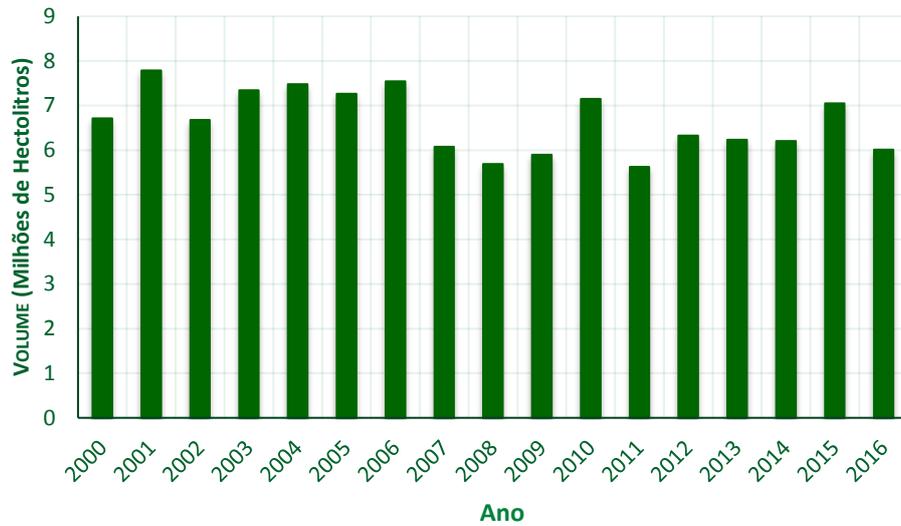
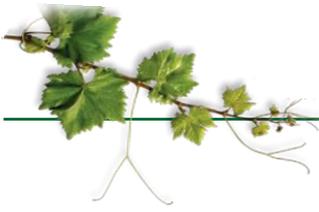


Figura 2- Evolução da produção nacional de vinho (Retirado de IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2017)

Portugal possui 14 regiões Vitivinícolas, e dentro de cada uma existem ainda sub-regiões. Cada região produz vinhos região, com características organolépticas bastante distintas, devido a diferentes condições edafo-climáticas e castas. Na Figura 3 podemos ver o mapa das diferentes regiões vitivinícolas existentes em Portugal.

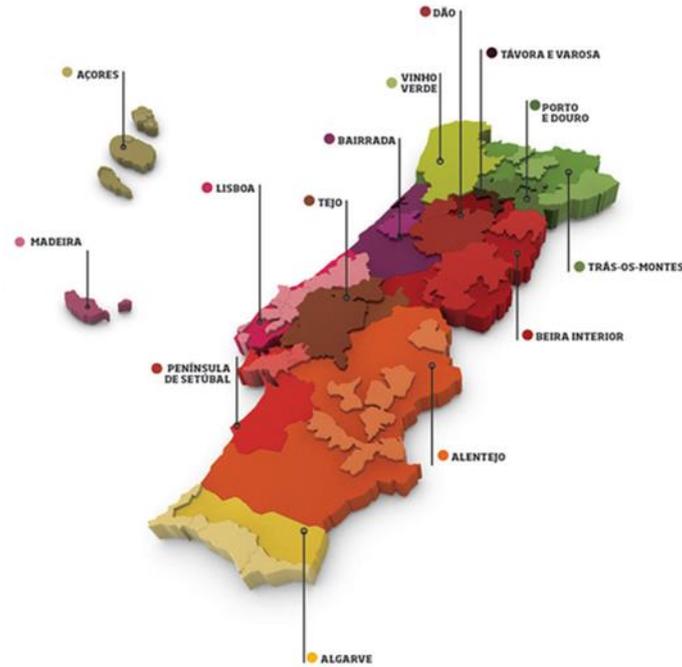


Figura 3- Regiões Vitivinícolas em Portugal (retirado de <http://www.winesofportugal.com/br/vinhos-e-turismo/wine-regions/>)

2.1.3. ALENTEJO

O Alentejo é uma das maiores regiões vitivinícolas Nacionais. Em 2016, a região contava com aproximadamente 23.000ha de vinha plantada, representado 17% da área total no País. A produção de vinho nesta região tem aumentado gradualmente desde o início do século, e nas últimas quatro campanhas foi superior a um milhão de hectolitros (Figura 4).

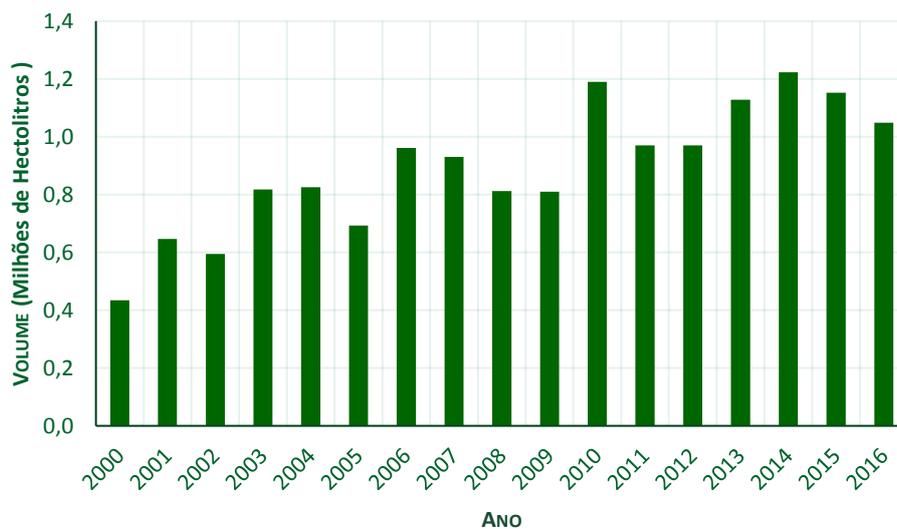


Figura 4- Evolução da Produção de vinho no Alentejo (Retirado de IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2017)



O Alentejo é composto por extensos horizontes planos ou quase planos, com alguns incidentes orográficos, sendo os mais importantes a Serra de Portel (421m), Ossa (649m) e São Mamede (1049m). É, no entanto, nas elevações isoladas que se geram os microclimas propícios ao plantio da vinha. As vinhas estão situadas, maioritariamente, em substrato geológico de rochas plutónicas, destacando-se uma diversidade de manchas pedológicas onde estas estão inseridas (xistosas e argilo-calcárias) (Magalhães, 2015; IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2017). A região é composta por oito sub-regiões vitivinícolas, as quais estão representadas na Figura 5.

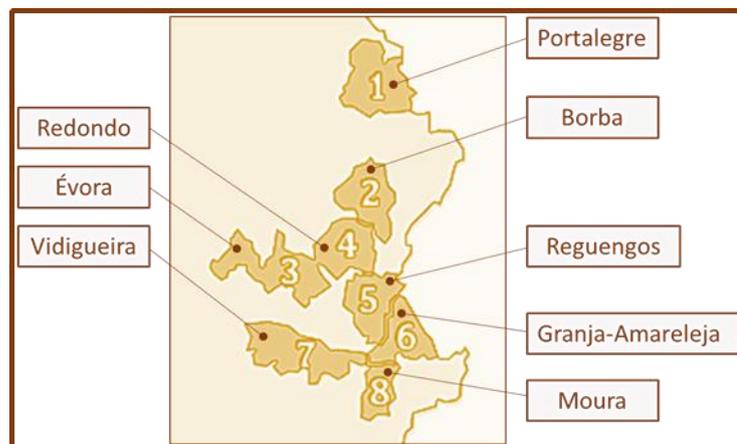


Figura 5- Representação das sub-regiões Vitivinícolas existentes no Alentejo (Infovini, 2017).

2.2. CASTAS

Mundialmente estão identificadas e registadas mais de 4000 variedades de uvas. A espécie *Vitis Vinífera* L. pertence do género *Vitis*, sendo uma das culturas mais cultivadas em todo o mundo (Lima *et al.*, 2016). Portugal é um país extremamente rico a nível ampelográfico, com o segundo maior número de castas nativas, as quais são variedades únicas e exclusivas, que não se encontram em mais nenhuma parte do Mundo (Vinhos do Alentejo, 2017). No entanto, segundo a Portaria nº380/2012, estão autorizadas para plantação mais de 340 castas para vinho. Na região do Alentejo, destacam-se as castas tintas Alicante-Bouschet, Aragonez, Castelão e Trincadeira. No caso das brancas, sobressaem as castas Antão Vaz, Arinto e Síria (ou Roupeiro) (Infovini, 2017). No entanto, existem outras castas que incorporam também os vinhos desta região. A Tabela 2 apresenta as castas mais plantadas na região do Alentejo.

Tabela 2-Principais castas plantadas na Região do Alentejo (ATEVA- Associação Técnica de Viticultores do Alentejo, 2014)

Tintas	Área (ha)	Branças	Área (ha)
Aragonez	4215	Antão Vaz	1076
Trincadeira	3437	Síria (Roupeiro)	1055
Alicante-Bouschet	1861	Arinto	615
Syrah	1348	Rabo-de-Ovelha	398
Castelão	1258	Fernão-Pires	212
Touriga Nacional	975	Verdelho	171
Cabernet Sauvignon	804	Manteúdo	161
Alfrocheiro	464	Gouveio	118
Moreto	442	Perrum	105
Touriga Franca	198	Diagalves	104
Tinta Caiada	176	Alvarinho	93

2.2.1. ANTÃO VAZ

A Figura 6 apresenta as zonas de maior incidência da casta Antão Vaz e alguns aspetos da morfologia do cacho, do bago e da folha. Pouco se sabe da sua origem, mas pensa-se ter ascendência alentejana, pois é nas zonas da Vidigueira e Évora que esta se apresenta com maior predominância.

Esta casta possui uma folha adulta de tamanho médio, pentalobada, lisa e ondulada; o seu seio peculiar é muito aberto, em chaveta, e os seios laterais pouco abertos e em V; o seu pedúnculo é comprido. O seu cacho apresenta um tamanho médio, cilindro-cónico, compacto, com pedúnculo curto e muito lenhificado. Em relação ao bago, varia de pequeno a grande, uniforme, verde-amarelado ou amarelo-torrado, possui uma película fina e uma polpa sumarenta (Magalhães, 2015; Vine to Wine Circle, 2017).

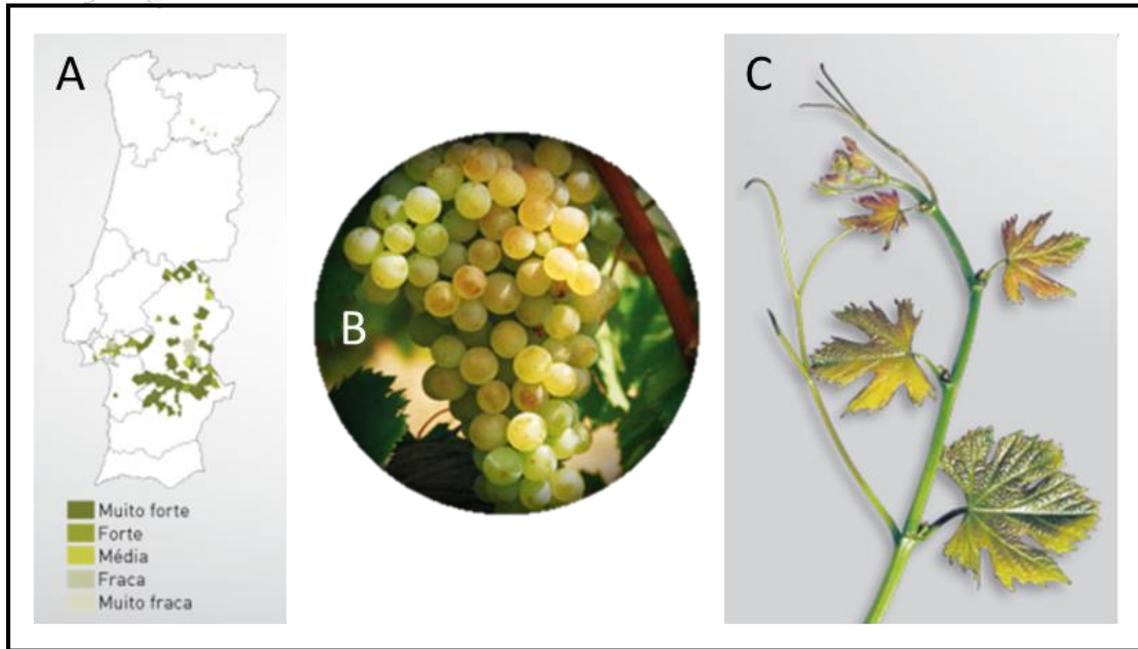


Figura 6- Representação da casta Antão Vaz. A- Zona de maior incidência; B- morfologia do cacho e bago; C- morfologia da folha (Vine to Wine Circle, 2017)

É uma casta com elevada sensibilidade à carência de magnésio e boro, sensível ao míldio, oídio e à cigarrinha verde. É uma casta que produz um vinho de elevada qualidade. Os vinhos Antão Vaz são pouco sensíveis à oxidação, terpénicos, estruturados, possuem uma cor citrina e no seu aroma é frutado, têm uma boa longevidade por isso têm uma boa capacidade tanto para vinhos monovarietais como para lote. É uma ótima casta para zonas com temperaturas elevadas (Magalhães, 2015; Vine to Wine Circle, 2017).

2.2.2. ROUPEIRO OU SÍRIA

A casta Roupeiro ou Síria é conhecida no Alentejo como Roupeiro, mas conforme a região diversos são os nomes pelos quais é conhecida, tais como Códega ou Malvasia Grossa (Douro), Alvadurão (Dão), Síria (Pinhel), Alva (Cova da Beira e Portalegre) e Crato Branco (Algarve) (Magalhães, 2015). As suas origens não são conhecidas, no entanto é uma casta que se apresenta em terras portuguesas há alguns anos. Apresenta uma distribuição geográfica de Norte a Sul do país, mas sempre no interior e encontra-se com maior predominância nas regiões do Douro e Alentejo, onde é utilizada com frequência na produção de vinhos brancos. A Figura 7 apresenta as zonas de maior incidência desta casta e os aspetos da morfologia do cacho e bago; e da morfologia da folha. Possui um cacho médio e cónico alado, compacto e com pedúnculo curto e de média lenhificação. O seu bago é médio, uniforme e ovóide, possui uma cor verde-amarelada; a sua película é espessa, a polpa rija, não corada e succulenta. Possui

uma folha adulta de tamanho médio, pentagonal, quinquelobada, com perfil irregular e fraco empolamento, o seu limbo é ligeiramente ondulado junto ao ponto peciolar. É uma casta sensível ao Oídio, a ácaros (aranhão amarelo) e à podridão cinzenta dos cachos (Magalhães, 2015; Vine to Wine Circle, 2017).

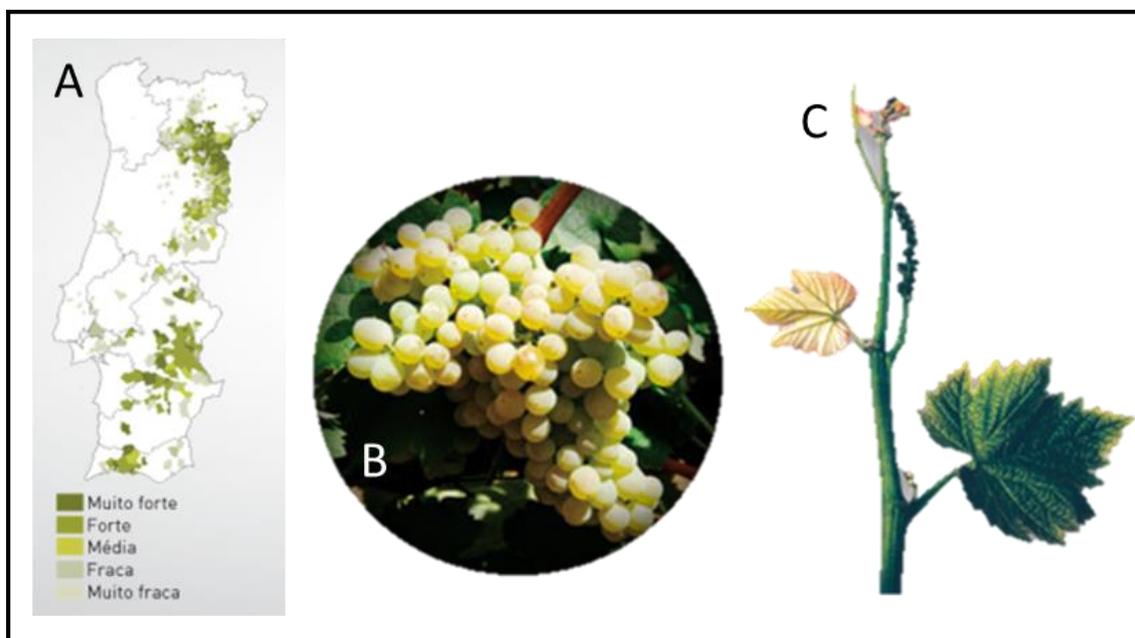


Figura 7- Representação da casta Roupeiro ou Síria. A- Zona de maior incidência; B- morfologia do cacho e bago; C- morfologia da folha (Vine to Wine Circle, 2017)

Relativamente ao seu potencial enológico esta é uma casta capaz de produzir vinhos de mesa e aguardente. Dependendo da região, é sensível à oxidação e tem pouca capacidade para envelhecimento. O vinho jovem produzido por esta casta é fresco, agradável e apresenta aromas frutados intensos de frutos tropicais e citrinos, com o envelhecimento. O vinho pode apresentar uma quebra na composição aromática devido à sua rápida oxidação, daí, requerer cuidados enológicos específicos (Magalhães, 2015; Vine to Wine Circle, 2017).

2.2.3. CABERNET SAUVIGNON

A casta *Cabernet Sauvignon* é a casta mais plantada em todo o mundo (Kym, 2013). É oriunda de França, da região de Bordéus (Giscours *et al.*, 2011) sendo a casta a mais importante nesta zona. As folhas adultas são de tamanho pequeno, de forma pentagonal com 7 lóbulos. Apresenta um cacho de tamanho pequeno a médio, medianamente compacto, com um bago de tamanho pequeno e arredondado (Figura 8). A sua polpa mostra consistência média, a película é medianamente espessa e de cor azul escura. Origina vinhos com grande

persistência na boca, pela riqueza que contem em termos de taninos, e uma grande intensidade de cor devido à boa quantidade de antocianinas da casta (Magalhães, 2015) .

No Alentejo é muito utilizada de forma minimalista em lotes de vinhos regionais de porque é uma variedade melhorada, capaz de apimentar os lotes, dando corpo e consistência a vinhos bem compostos e perfumados, frutados e especiados (Vinhos do Alentejo, 2017).

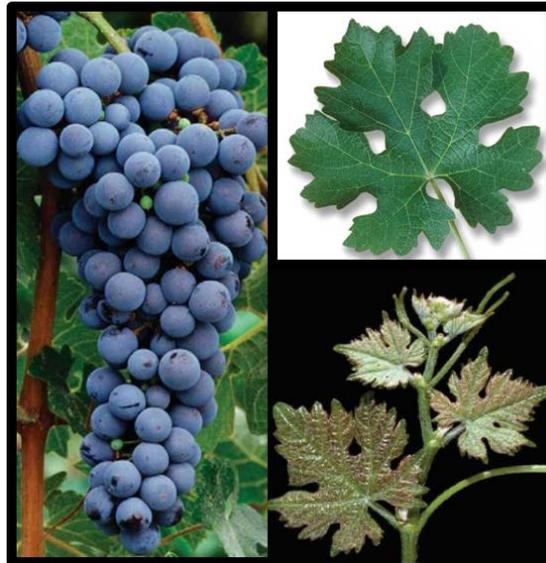


Figura 8- Casta *Cabernet Sauvignon*. A- Cacho e Bago; B- Folha adulta; C- Folha jovem (Adaptado de Giscours et al., 2011)

2.2.4. TOURIGA NACIONAL

A casta Touriga Nacional é originária do norte do país, precisamente nas regiões do Douro e Dão, tem uma origem muito antiga e pode ser conhecida como Preto Mortágua ou Tourigo, na região do Dão, Touriga Fina, no Douro (Magalhães, 2015). Inicialmente era apenas cultivada nas regiões demarcadas do Douro, Dão e na região de Pinhel, no entanto com o passar dos anos, devido à seleção clonal, que impediu a extinção desta casta, passou a ser muito utilizada na maioria das regiões vitícolas de Portugal, como se pode observar na Figura 9, sendo também já cultivada em regiões vitícolas da Austrália, Espanha, Califórnia e África do Sul. Esta seleção clonal permitiu escolher os clones mais produtivos e pouco sensíveis ao desavinho, permitindo assim o aumento do cultivo desta casta (Magalhães, 2015; Vine to Wine Circle, 2017).

Esta casta possui uma folha adulta pequena, pentagonal, por vezes com sub-lóbulos superiores, plana e ligeiramente rugosa, o seio peciolar aberto, em V, e os seios laterais abertos, com base em U. O seu cacho é pequeno, cilindro-cónico, por vezes compacto (em função do grau de sensibilidade e condições para ocorrência do desavinho), o seu pedúnculo é

de comprimento médio. Em relação ao bago, este é ligeiramente achatado, pequeno arredondado, negro-azulado, com uma película medianamente espessa e uma polpa não corada e suculenta (Magalhães, 2015; Vine to Wine Circle, 2017).



Figura 9- Representação da casta Touriga Nacional. A- Zona de maior incidência; B- morfologia do cacho e bago; C- morfologia da folha

É uma casta com elevada sensibilidade ao desavinho e bagoinha, devido aos materiais policlonais o seu comportamento é hoje em dia aceitável. Tem baixa sensibilidade à cigarrinha verde, à Traça, ao Míldio e Oídio, no entanto é altamente sensível à Escoriose, em determinadas situações pode ter carência de magnésio e em caso de *stress* híbrido excessivo pode sofrer escaldão. É uma casta com elevado valor enológico, considerada casta-piloto em zonas quentes. O vinho, em que esteja presente esta casta, é pouco sensível à oxidação e tem uma capacidade de envelhecimento muito elevada, principalmente em envelhecimento em madeira. Por possuir uma grande complexidade aromática, estrutura e a sua qualidade dos compostos fenólicos é uma casta com grande aptidão para produzir vinhos monovarietais (Magalhães, 2015; Vine to Wine Circle, 2017). É considerada uma variedade-chave em vinhos especiais, nomeadamente em Vinhos do Porto (Zarrouk *et al.*, 2016).



2.3. VINHO

O vinho é um produto que resulta da atividade de vários microrganismos no mosto de uva (Drozd et al., 2013; Ocón et al., 2013). Aos olhos da legislação, é o produto resultante da fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas ou do seu mosto, produzido segundo os processos tecnológicos admitidos por lei (Artigo nº2 do Decreto-Lei nº 35846/46 de 02/09/1946). Em termos bioquímicos, é definido como bebida resultante da fermentação alcoólica dos glúcidos redutores do sumo de uva pelas leveduras, e nalguns casos pelas bactérias lácticas (Maturano et al., 2012).

A qualidade do vinho é o resultado de muitos fatores, dos quais fazem parte a casta da uva, as condições edafo-climáticas, os sistemas de condução e as técnicas enológicas utilizadas (Sturm et al., 2006). O produto resulta de um conjunto de reações bioquímicas, que começam desde cedo na vinha, com o amadurecimento do bago, prolongando-se até ao período de colheita, continuando durante a fermentação alcoólica e estendem-se até ao engarrafamento (Romano et al., 2003).

2.3.1. TIPOS DE VINHO

Em Portugal, conforme mostra a Figura 10, produzem-se vinhos comuns e vinhos especiais. Os primeiros resultam da fermentação alcoólica dos mostos de uva. Os segundos abrangem uma série de subtipos:

- Licorosos: possuem um teor alcoólico superior aos vinhos comuns, onde a sua fermentação alcoólica foi interrompida pela adição de aguardente vínica ou álcool vínico;
- Doces de Mesa: vinhos com um teor alcoólico máximo de 14% (v/v) os quais apresentam um teor de glúcidos bastante elevado;
- Espumantes Naturais: vinhos efervescência resulta de uma segunda refermentação em garrafa ou em recipiente fechado;
- Espumosos gaseificados: a efervescência é induzida pela introdução de gás carbónico puro.

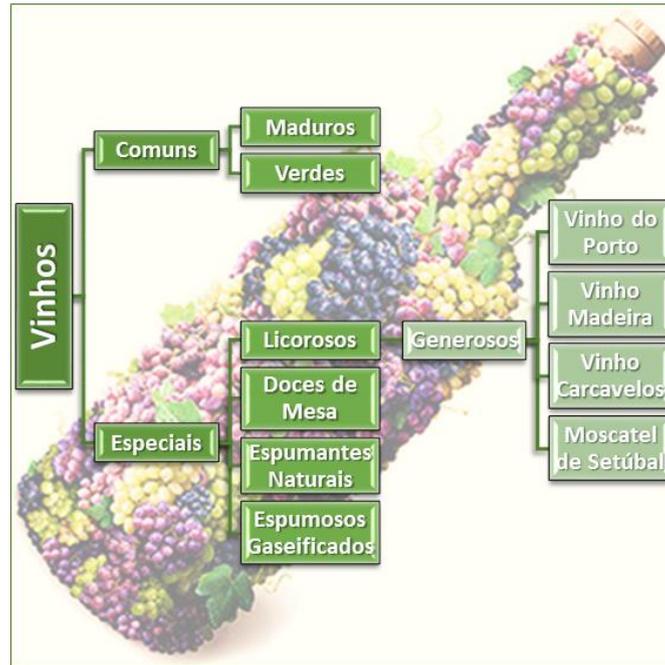


Figura 10- Tipos de vinhos existentes em Portugal (Adaptado do Artigo nº2 do Decreto-Lei nº 35846/46 de 02/09/1946)

2.3.2. GLICÓLISE E FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A transformação do mosto resultante das uvas em vinho envolve dois processos, a glicólise e a fermentação alcoólica. O primeiro é um processo metabólico, que envolve uma série de reações bioquímicas que catabolizam as hexoses (glucose e frutose), formando piruvato e libertando energia na forma de ATP (Barnett, 2003). Ocorre, também durante este processo, formação de glicerol. Concluído este processo, em condições anaeróbias, o piruvato é canalizado para a via fermentativa, que vai levar à síntese de etanol e CO_2 , processo designado por fermentação alcoólica. Nesta fase ocorre também produção de ácido láctico e acético, mas em quantidades bastante reduzidas. Na figura 11 apresenta um esquema geral da via glicolítica, seguida da fermentação alcoólica.

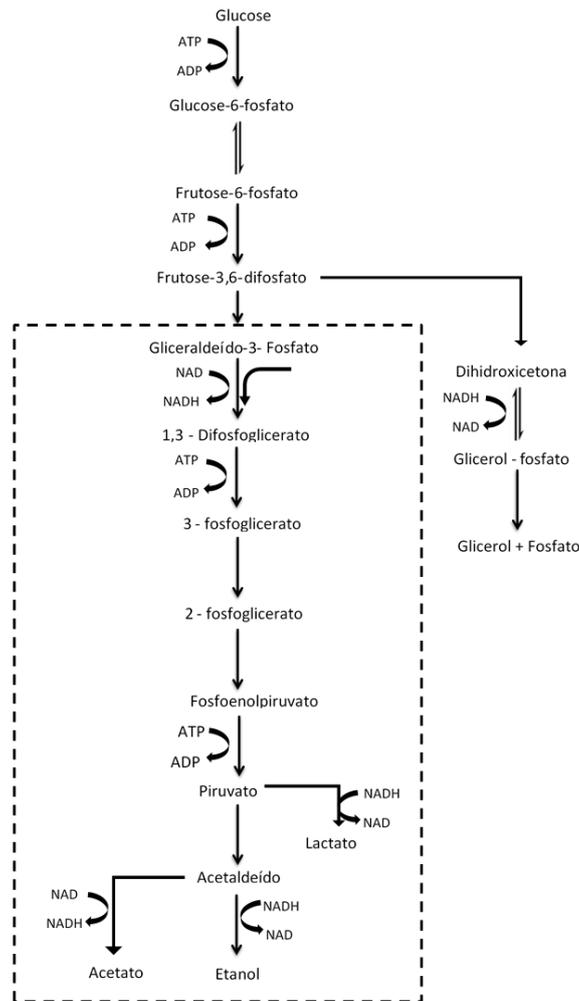


Figura 11- Esquema da glicólise e da fermentação alcoólica. Nota: cada passo dentro do tracejado ocorre duas vezes por cada mole de glucose (Wansbrough, 2000)

Ao mesmo tempo que este processo ocorre, paralelamente existe também uma série de outros processos bioquímicos e físico-químicos, o que torna possível a transformação do sumo de uva em vinho. Na Figura 12 podemos observar os principais subprodutos que resultam da fermentação alcoólica e que conferem uma série de características sensoriais ao vinho. Para além do etanol outros compostos são produzidos ao longo desta via, tal como álcoois superiores, ésteres, glicerol, ácido succínico, diacetilo, entre outros. Ao mesmo tempo alguns compostos presentes no mosto de uva são também metabolizados pelas leveduras. Se não ocorresse a produção destas substâncias, o vinho seria uma bebida sem interesse organolético (Moreno-Arribas & Carmen Polo, 2009).

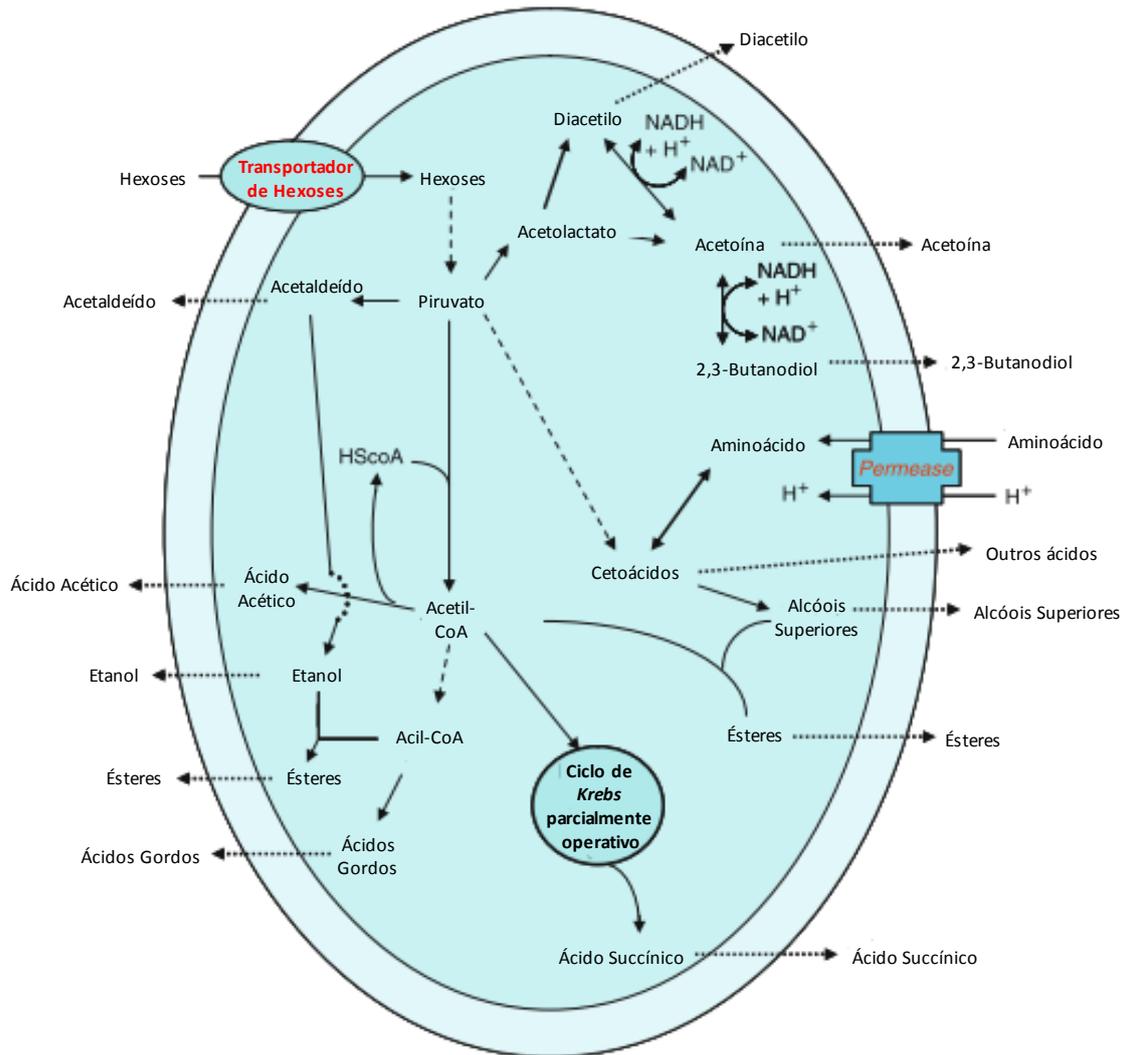


Figura 12- Síntese de metabolitos secundários longo da fermentação alcoólica(Adaptado de Moreno-Arribas & Carmen Polo, 2009)

2.3.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O vinho é maioritariamente composto por água e tem na sua constituição uma série de compostos nomeadamente etanol, glicerol, álcoois superiores, ácidos orgânicos, polissacáridos, diacetilo, ésteres, aldeídos, compostos fenólicos, compostos azotados, vitaminas, e minerais(Ozturk & Anli, 2014; Unkee, 2016; Genc *et al.*, 2017). A sua composição pode variar devido a inúmeras condicionantes, tais como as variedades da uva, condições edafo-climáticas, transporte, e tecnologias de vinificação(Villamor, 2012; Roullier-Gall *et al.*, 2014).



O etanol juntamente com a água e o glicerol são os componentes majoritários do vinho. Os principais ácidos orgânicos encontrados são o D-tartárico, L-málico e L-cítrico, que são responsáveis pela acidez fixa de um vinho, contudo o ácido tartárico existe geralmente em maior quantidade (Villamor, 2012; Roullier-Gall *et al.*, 2014). O ácido acético é o principal componente da acidez volátil do vinho (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Os compostos fenólicos assumem fundamental importância nas características dos vinhos (Cabrita *et al.*, 1999). São responsáveis pela cor, corpo e adstringência dos vinhos e são os grandes responsáveis pelas diferenças entre vinhos tintos e brancos ou pela presença ou ausência de antocianinas. São encontrados majoritariamente na película das uvas, mas também nas grainhas (taninos). Os álcoois superiores, aldeídos e ésteres são responsáveis pelos aromas que um vinho contém (Rapp, 1991). O aroma do vinho pode ser dividido em 3 grupos: primários, os quais são provenientes das uvas e das operações de extração do mosto, os aromas secundários, originados pela ação das leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica e malolática e os aromas terciários, os quais resultam do processo de envelhecimento em barrica e/ou garrafa através de reações físico-químicas e enzimáticas (Lambrechts & Pretorius, 2000).

2.4. MICRORGANISMOS NO VINHO

Os microrganismos têm capacidade para sobreviver nas mais variadas condições ambientais. São essenciais e responsáveis por inúmeros papéis nas mais variadas áreas: em processos fermentativos, ao nível digestivo (ajudam na digestão de frutos e vegetais), na saúde (síntese de vitaminas), no solo (produção de matéria orgânica) entre outras (Fsis, 2012). Contudo, a sua presença também pode ter impacto negativo, uma vez que são responsáveis por inúmeras doenças que afetam humanos, animais e plantas. A nível alimentar, alguns são benéficos, porém outros têm efeito negativo, causando alterações prejudiciais na qualidade dos produtos (Huang, 2017). Os principais microrganismos encontrados em vinhos são leveduras, fungos filamentosos e bactérias.

Os microrganismos desempenham um papel muito importante a nível enológico, nomeadamente as leveduras e as bactérias (Hutkins, 2008). As leveduras presentes, tanto na vinha como no vinho, integram uma comunidade microbiana, que promove alteração no sabor e aroma do produto final (Avbelj *et al.*, 2016).

O início da fermentação alcoólica nos processos de vinificação é levado a cabo por leveduras não-*Saccharomyces* (Andorra *et al.*, 2011), que são posteriormente sucedidas por leveduras do género *Saccharomyces* que vão dominar o meio, quando as concentrações de

etanol se tornam mais. Contudo tem um papel muito importante, uma vez que os seus metabolitos, libertados para o meio contribuem para a complexidade do vinho (Mateo & Maicas, 2016). Num mosto obtido de uvas sãs e maduras, esmagadas asépticamente, a população microbiana corresponde a cerca de 10³-10⁵ UFC/mL e os microrganismos dominantes são espécies de leveduras não *Saccharomyces* particularmente as dos géneros *Hanseniaspora/Kloeckera* e *Candida*. Em menor número, aparecem também espécies dos géneros *Metschnikowia*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces* e *Rhodotorula* (Fleet, 2003).

Na Figura 13 estão representadas esquematicamente alguns géneros e espécies de leveduras presentes na microflora enológica.

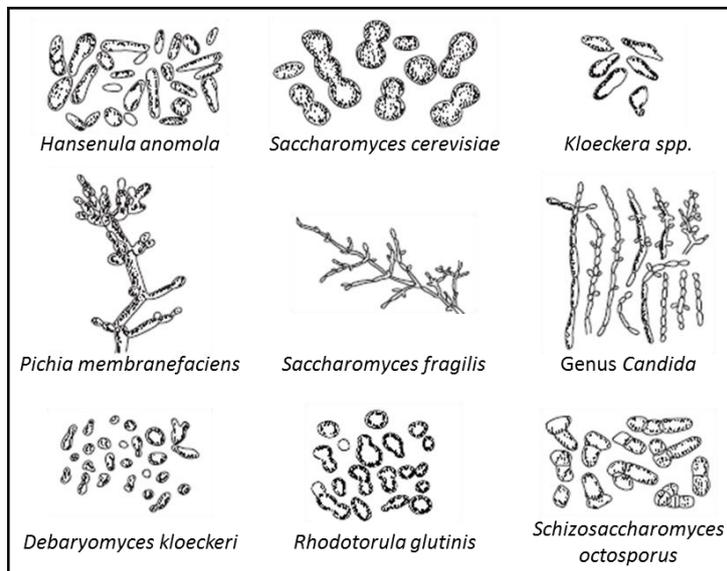


Figura 13-Exemplo de leveduras presentes em mostos e vinhos (Joshi *et al.*, 2016)

Existem leveduras mais relacionadas com a complexidade aromática dos vinhos, as leveduras apiculadas, ou com a fermentação alcoólica, como *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto que outras são indesejáveis porque levam a processos de deterioração (Joshi *et al.*, 2016), como as leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*, sintetizam 4-etilfenol e 4-etilguaicol que são responsáveis por conferir um sabor desagradável no vinho (Chatonnet *et al.*, 1992) ou dos géneros *Kluyveromyces*, *Torulospora*, *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* que podem também estar presentes durante a fermentação ou durante o envelhecimento do vinho (Romano *et al.*, 2003).



Outro grupo importante de microrganismos no ecossistema dos vinhos são as bactérias (Bartowsky, 2009; Longin *et al.*, 2017). A sua influência na redução da acidez ocorre através da fermentação malolática, que consiste na conversão do ácido málico em ácido láctico e CO₂. Este processo vai conferir maior estabilização microbiológica nos vinhos e melhora a complexidade organoléptica do produto (García-Ruiz *et al.*, 2015; Gammacurta *et al.*, 2018). Esta fermentação é levada a cabo por bactérias lácticas tais como *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*, contudo a espécie *Oenococcus oeni* é apontada como a principal responsável (García-Ruiz *et al.*, 2014; Cappello *et al.*, 2017) pela fermentação malolática em vinhos tintos.

Estes microrganismos, se crescerem de forma não controlada, podem levar à produção de aromas desagradáveis e/ou aminas biogénicas (Smit *et al.*, 2012; García-Ruiz *et al.*, 2015). Existem, também bactérias acéticas, as quais estão relacionadas com os processos de degradação do vinho uma vez que produzem ácido acético excessivamente, principalmente as bactérias *Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp. e *Gluconacetobacter* spp., pelo que a sua presença nos vinhos deve ser controlada de forma severa (Guillamón & Mas, 2011). Na Figura 14 é possível observar algumas espécies de bactérias acéticas.

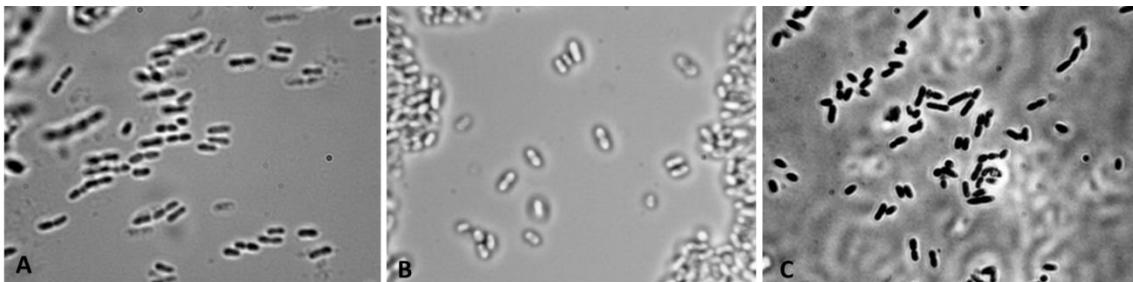


Figura 14- Exemplo de leveduras acéticas. A- *Acetobacter aceti*; B- *Gluconobacter oxydans*; C- *Gluconacetobacter liquefaciens* (UCDAVIS- Viticulture and Enology, 2017)

Com efeito a produção de vinho é um processo que envolve uma dinâmica de comunidades microbianas complexa onde o papel dos microrganismos envolvidos está diretamente ligado à qualidade do produto final.

2.5. IMOBILIZAÇÃO CELULAR

Uma das alternativas aos sistemas de culturas de células livres consiste no uso de sistemas com microrganismos imobilizados, que são cada vez mais utilizados na área da biotecnologia devido às vantagens que apresentam, nomeadamente na redução de número de

operações unitárias nos processos finais de recuperação de produto e na possibilidade de reutilização (Champagne *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2015; Iurciuc (Tincu) *et al.*, 2016, 2017; Zhao *et al.*, 2016; Mohd Azhar *et al.*, 2017).

As células imobilizadas estão retidas, confinadas, num determinado espaço físico (Nussinovitch *et al.*, 1994), o que confere aos sistemas de imobilização celular, vantagens tecnológicas e económicas relativamente aos processos tradicionais. Permite o aumento da eficácia dos processos devido à elevada concentração de células que se podem utilizar (Ogbonna *et al.*, 1997; Covizzi *et al.*, 2007), e confere proteção às células relativamente a substâncias tóxicas (Vilela *et al.*, 2013). A Tabela 3 sistematiza algumas das Vantagens e desvantagens dos sistemas de imobilização celular.

Tabela 3- Vantagens e desvantagens dos sistemas de imobilização celular (Shuler & Kargi, 2002; Brena *et al.*, 2013; Elakkiya *et al.*, 2016).

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Elevada concentração celular que resulta num aumento de produtividade • Possibilidade de reutilização da biomassa • Facilidade de recuperação das células e reutilização do biocatalisador • Aumento do período de tempo de atividade e estabilidade do biocatalisador • Melhor capacidade de adaptação ao meio • Menor risco de contaminação microbiológica devido à elevada concentração de células • Difusão de metabolitos secundários 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitações difusionais à transferência de massa de produtos e substratos • Limitações das funções metabólicas • Possível diminuição da viabilidade celular devido à matriz de imobilização • Diminuição da atividade catalítica durante a etapa de imobilização • Ocorrência de libertação de células para o exterior dependendo da matriz utilizada

Existem vários modos para a imobilização de microrganismos, nomeadamente a ligação em suporte sólido e o aprisionamento em matriz polimérica (A. Abdelmajeed, 2012; Elakkiya *et al.*, 2016; Iurciuc (Tincu) *et al.*, 2016).

A ligação em suporte sólido pode ser realizada de forma espontânea ocorrendo adsorção física, ou de forma artificial através de ligação iónica e/ou covalente com o auxílio de agentes ligantes, obtendo-se a imobilização das células na superfície destes suportes (Akin, 1987), que poderão ser sintéticos ou naturais.



Relativamente ao aprisionamento em matriz polimérica, o método baseado na inclusão artificial das células numa malha rígida ou semirrígida que impede que estas se difundam no meio. Este é o mecanismo mais utilizado ao nível da imobilização celular (Alessandrello *et al.*, 2017), que consiste na mistura das células microbianas com um composto polimérico com carga negativa (Ex: alginato), sendo esta mistura adicionada numa solução com iões Ca^{2+} , o que promove a formação de um gel consistente e insolúvel, o qual imobiliza os microrganismos.

A imobilização pode ainda ser feita por contenção em membranas, neste caso, as células podem ser colocadas em microcápsulas, em membranas filtrantes ou na superfície de dois líquidos imiscíveis. Este método tem por base a limitação das células entre duas membranas que possuem permeabilidade entre si (Kargupta *et al.*, 1998).

A floculação também pode ser utilizada na imobilização de células. Consiste na formação de agregados celulares em suspensão, associada uma rápida sedimentação (Woodward, 1988), a qual pode ser natural ou induzida por agentes floculantes ou ligantes. É uma técnica bastante utilizada na indústria da cerveja, uma vez que a floculação das células de *Saccharomyces cerevisiae* afeta de forma positiva o tempo de fermentação devido à supressão do período de latência destas, o que facilita a remoção das células, contribuindo para a qualidade do produto final (Covizzi *et al.*, 2007)

Na Figura 15 estão ilustrados os métodos de imobilização mais utilizados para células microbianas.

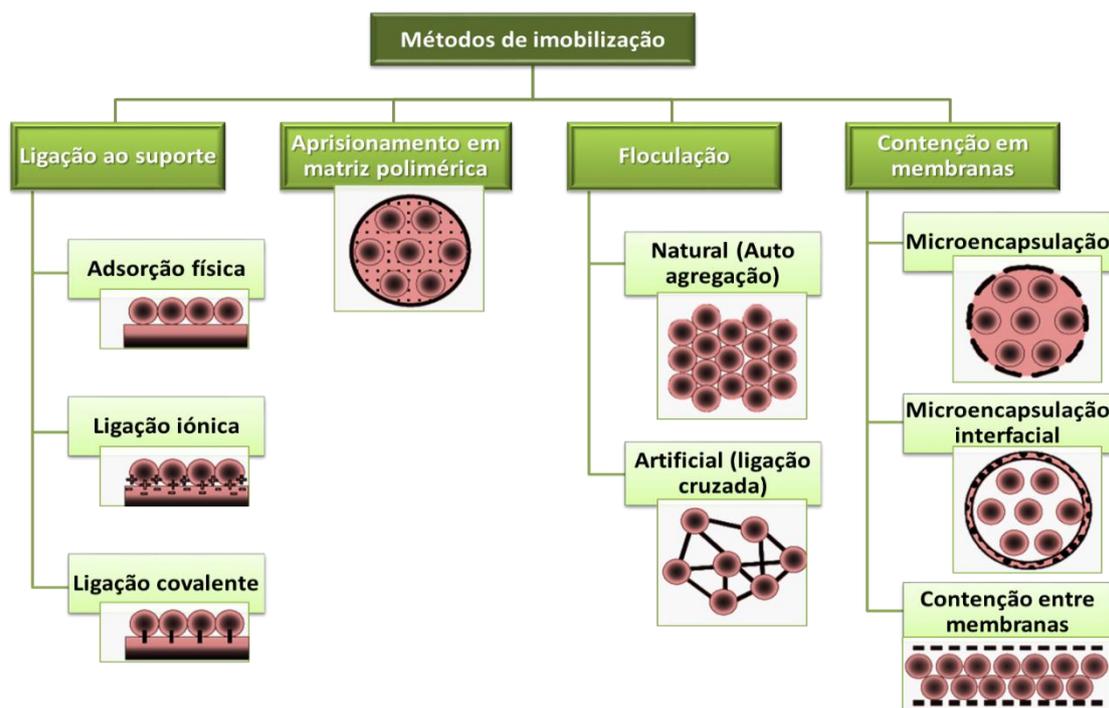


Figura 15- Métodos de imobilização celular (Adaptado de Covizzi *et al.*, 2007)

*3. Isolamento, identificação e
caracterização de microrganismos*



3.1. INTRODUÇÃO

A identificação e classificação dos microrganismos desempenham funções relevantes a nível industrial, agrícola e na ecologia microbiana (Shahnewaj *et al.*, 2013). Os métodos usados na discriminação de géneros, espécies e estirpes de microrganismos baseiam-se em características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas e em técnicas moleculares que detetam polimorfismos ao nível dos ácidos nucleicos, ou variação alélica ao nível de enzimas ou por análise de alguns genes, utilizados especialmente na caracterização de comunidades microbianas (Dahllöf, 2002; Alves *et al.*, 2003; Foschino *et al.*, 2004).

Alguns estudos referem que a maioria das espécies de leveduras podem ser identificadas a partir de divergência nas sequências do domínio D1/D2. Estudos sobre mais de 500 espécies de leveduras *Ascomycetes* mostraram que estirpes coespecíficas normalmente apresentam menos de 1% de substituições nucleotídicas neste domínio, e diferentes espécies biológicas são separadas por mais do que este número de substituições (Kurtzman & Robnett, 1991). O domínio D1/D2 é um domínio de 600 nucleótidos na extremidade 5' da subunidade 26S do rDNA (Figura 16). Os *primers* NL-1/NL-4 são a escolha de grande parte dos investigadores que trabalham com leveduras na indústria alimentar, permitindo uma identificação eficiente das espécies (Nwaiwu, 2016).

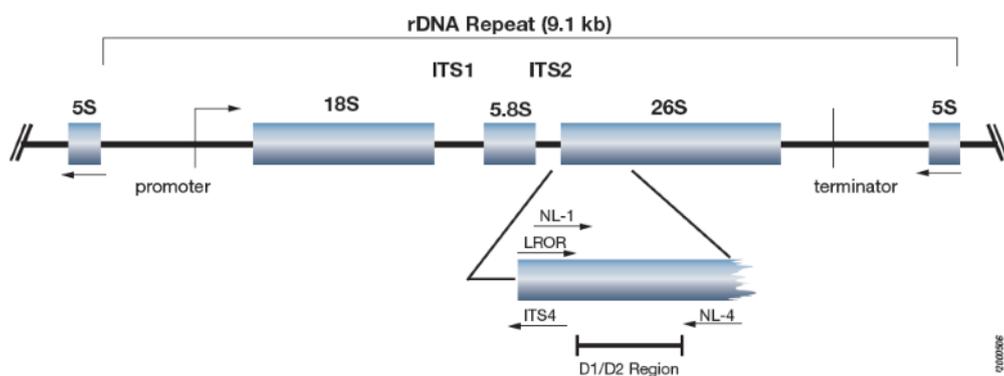


Figura 16- Região D1/D2 do gene do RNA ribossômico da subunidade 26S (Jarvis *et al.*, 2014)

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Para o isolamento dos microrganismos utilizaram-se amostras de mostos de diferentes castas (*Cabernet Sauvignon*, Touriga Nacional, e *blend* de Antão Vaz e Sória) em várias fases: mosto não fermentado, parcialmente fermentado e totalmente fermentado.

As amostras (100 µL) de mostos foram aplicadas recorrendo à técnica do espalhamento em placas de Petri contendo quatro meios de cultura diferentes YPD, MEA, NA e CRB (Tabelas 15-18, Anexo 1), tendo sido os ensaios efetuados em duplicado. Após 24h incubação a 30°C para o caso dos ensaios em meio YPD e NA e 27°C para os ensaios em meio MEA e CRB, procedeu-se à contagem das colónias nas placas com os diversos meios, com objetivo de calcular o número de unidades formadoras de colónias.

3.2.2. OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS E CARATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

As colónias obtidas após isolamento nos diferentes meios de cultura que apresentaram características morfológicas diferentes foram repicadas para novas placas com meio YPD. Todos os microrganismos diferentes foram repicados várias vezes até à obtenção de culturas puras.

A identificação dos isolados microbianos foi efetuado com base na observação das características macroscópicas e microscópicas, tais como textura e coloração das colónias, morfologia das hifas e estruturas reprodutoras. As preparações efetuadas para os isolados de leveduras foram coradas com azul de metileno e foram observados com objetiva de 100x em microscópio ótico (Motic BA40010E). As imagens foram adquiridas em camara fotográfica (MoticCamPRO 282B).

3.2.3. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE

Recorreu-se ao protocolo adaptado de (González-Pérez *et al.*, 2017) para aplicar a técnica referida às amostras:

Teste da autofluorescência das amostras

De modo a avaliar a autofluorescência das amostras em cada fase do processo de vinificação, foram colocadas alíquotas em lâminas de microscópio e estas foram analisadas através de microscopia de epifluorescência com vários filtros. O microscópio utilizado foi um microscópio biológico BA410E Motic equipado com uma unidade de alimentação (MOTIC MXH-100) com um equipamento de Episcopisa de Fluorescência (EF-UPR-III). As observações



foram realizadas com um filtro de fluorescência TRITC –set Motic TRITC (Rhodamine)/DII/Cy3: excitação D540/25x, espelho dicroico 565DCLP, emissão D605/55m. FITC/6-FAM (excitação D480/30x, espelho dicroico 505DCLP, emissão D535/40m).

Fixação celular

As amostras foram centrifugadas, descartou-se o sobrenadante de cada um dos tubos *falcon*, adicionaram-se 25 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline – 130mM NaCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2) e ressuspenderam-se as células. Centrifugou-se de novo nas mesmas condições e descartou-se novamente o sobrenadante. Depois da lavagem, as células foram fixadas com 25 mL de etanol absoluto durante 1 h à temperatura ambiente. Por último, as células foram lavadas com PBS e preservadas a -20°C em EtOH:PBS 50:50 (v/v).

Hibridação

Uma vez descongeladas, procedeu-se à centrifugação das células, de seguida descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado com 25 mL de PBS. Foram realizados três ensaios independentes em triplicado com cada uma das amostras: sem adição de sonda (branco), com adição da sonda específica para eucariotas (EUK516-6-FAM) e para bactérias (EUB338-Cy3). De modo a preparar cada uma das amostras, em microtubos de 1,5 mL foi adicionado, para cada ensaio, 1 mL da suspensão celular, o tampão de hibridação (80,0 µL) e o volume correspondente da solução stock das sondas em estudo (1,0 µL). A concentração das soluções stock das sondas foi 120 ng/µL. As sondas utilizadas foram sondas universais comerciais formadas por *primers* universais ligados a diferentes fluorocromos: EUB338-Cy3, (5'Cy3-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') para bactérias e EUK516-6-FAM (5' 6-FAM-ACCAGACTTGCCCTCC-3') para eucariotas, respetivamente.

As células foram incubadas a 46°C durante 2 h em banho-maria.

Lavagem

Após centrifugar as amostras e descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 100 µL de HB previamente aquecido. As amostras foram incubadas a 46°C durante 30 min em banho-maria. Centrifugaram-se as amostras e foram adicionados 500 µL de PBS.

Detecção e análise

A análise mediante microscopia de epifluorescência foi realizada utilizando o mesmo microscópio e filtros descritos anteriormente.

As centrifugações foram sempre realizadas sob as mesmas condições: 13000 rpm durante 15 min.

3.2.4. EXTRAÇÃO DE DNA

As leveduras foram previamente repicadas para novas rampas com meio YPD e incubadas a 30°C durante 48h. Para além das estirpes isoladas nas amostras de mostos, utilizou-se ainda uma estirpe pertencente à coleção de leveduras do laboratório de Biotecnologia (estirpe de leveduras catalogada como o número 396). A extração do DNA das leveduras seguiu um processo de extração previamente otimizado baseado na extração de DNA de amostras naturais (Rinta-Kanto *et al.*, 2005). As células (aproximadamente 10 mg de amostra) foram ressuspensas em 200 µL de tampão TE (Tris - 10 mM, EDTA - 1 mM, pH 8), com a adição de 30 µL de lisozima na concentração de 2 mg/mL e agitação suave no vórtex com posterior incubação a 37°C durante 40 min.

Seguidamente, foram adicionados 30 µL de α -quimiotripsina com concentração de 4 mg/mL em 10% SDS, com agitação e incubação a 50°C durante 60 min. Foram adicionados 200 µL da solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, em volume igual ao da fase aquosa, com suave agitação e posterior centrifugação a 1000 rpm durante 1 min. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo microtubo (medindo-se o volume retirado), tendo-se de seguida adicionado 1 volume da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), com suave agitação e centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente recolhido e medido e foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto (aproximadamente 400 µL) e 0,3 volumes de tampão acetato de sódio 3 M (aproximadamente 60 µL). Os microtubos foram então colocados a -20°C *overnight* de forma a promover a precipitação do DNA. Posteriormente foi efetuada uma centrifugação a 11900g durante 25 min. Novamente o sobrenadante foi descartado e o DNA seco ao ar, em câmara de fluxo laminar. O mesmo foi então ressuspensado com 100 µL de TE estéril e armazenado a -20°C até posterior análise (Rinta-Kanto *et al.*, 2005; Alcoba-flórez *et al.*, 2007; Salvador *et al.*, 2014).

3.2.5. QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR ESPETROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR

O DNA extraído foi quantificado por espectrometria de absorção molecular num espectrofotómetro *Thermo Scientific µDrop Plate MultiScan Go* acoplada a um software



SkantY for MultiScan 3.2, onde foram aplicados 2 μL de cada amostra de DNA e uma amostra de tampão TE que foi utilizado como branco, efetuando-se leituras de absorvâncias a 230, 260 e 280 nm. A concentração de DNA foi calculada pela expressão:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\text{mL}) = \text{Abs}_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g}/\text{mL}/\text{cm} \times (10/0,51) \text{ cm},$$

Sendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{cm}$ o inverso do coeficiente de absorvidade molar para DNA de cadeia dupla e 10/0,51 cm o inverso do percurso ótico característico do equipamento. Foram ainda calculadas as razões que nos indicam o grau de pureza das amostras:

$$\frac{\text{Abs}_{260}}{\text{Abs}_{280}} \text{ e } \frac{\text{Abs}_{260}}{\text{Abs}_{230}}$$

3.2.6. AMPLIFICAÇÃO DO DNA DAS ESTIRPES DE LEVEDURAS NO DOMÍNIO D₁/D₂

As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de *polymerase chain reaction* (PCR), no qual se utilizou um conjunto de *primers* (NL-1/NL-4) que codificam o domínio D1/D2 da região 26S rRNA (Nwaiwu, 2016), observado na figura 14.

Foram preparadas misturas reacionais para a amplificação do DNA com a seguinte composição: 2,5 μL de tampão de reação (10X) + MgCl_2 (25 mM), 2,5 μL de dNTPs (2 mM), 0,1 μL de cada *primer*, *forward* NL-1 (GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG, 10 μM) e *reverse* NL-4 (GGT CCG TGT TTC AAG ACG G, 10 μM) e 0,2 μL de Taq DNA polimerase (1U), 1 μL de DNA das amostras (100 ng), para um volume final de 25 μL de H_2O livre de RNase. Foi preparado um microtubo substituindo-se o DNA por 1 μL de H_2O , sendo utilizado como controlo negativo. Foi efetuado um spin das amostras e posteriormente colocadas no termociclador MJ Mini Bio-Rad, com o programa de amplificação de PCR, de acordo com o seguinte procedimento (Rintakanto *et al.*, 2005; Alcoba-flórez *et al.*, 2007; Siti Hajar *et al.*, 2012):

- Desnaturação: 1 ciclo de 2 min a 94°C
- 36 ciclos com a seguinte estrutura:
 - Desnaturação: 30s a 94°C
 - Annealing*: 2 min a 52°C
 - Extensão: 2 min a 72°C
- Finalizar com:
 - Extensão: 1 ciclo de 7 min a 72°C

As amostras foram guardadas a 4°C até posterior análise.

3.2.7. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A análise dos produtos de PCR foi efetuada por eletroforese em gel de agarose a 1%, que permite confirmar a amplificação, integridade do DNA bem como a presença de contaminantes.

Foi preparado um gel de agarose a 1% em solução TBE 0,5x, ao qual se adicionou 5 µL de *GreenSafe Premium* (MB13201, NZYTech), deixando polimerizar durante 15 min à temperatura ambiente. O gel foi colocado na tina da eletroforese, que continha o tampão TBE 0,5x. As amostras foram aplicadas em cada poço do gel, aplicando um volume de 6 µL de amostra com 2 µL de *Loading buffer* 6x (15081, NZYTech) e o marcador de DNA NZYDNA *Ladder V* (0,5 µg.µL⁻¹, MB06101 NZYTech) foi aplicado no primeiro poço do gel com o corante *Loading buffer* 1x, nos volumes de 2 µL e 6 µL respetivamente. Procedeu-se à separação eletroforética aplicando uma diferença de potencial de 90 V e posteriormente à revelação das bandas numa câmara de Ultravioleta (*Molecular Imager, Gel Doc - XR+ Imaging System*, Bio-Rad), tendo sido a análise dos resultados obtidos efetuada com o auxílio do software *Image Lab 5.0* (Copyright 2013, Bio-Rad Laboratories) (Alcoba-flórez *et al.*, 2007; Caldeira *et al.*, 2009; Siti Hajar *et al.*, 2012; Salvador *et al.*, 2014).

3.2.8. QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR POR FLUORIMETRIA

Os produtos de PCR foram quantificados por espectralfluorimetria com o auxílio do equipamento *Quantus Fluorometer* (E6150, Promega). Utilizou-se o kit para quantificação de DNA, *QuantiFluor One dsDNA* (E487, Promega).

As amostras foram preparadas com 199 µL *QuantiFluor One dsDNA* e 1 µL de amostra e incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente no escuro. A concentração das amostras foi determinada por calibração com Lambda DNA (Bustin *et al.*, 2010).

3.2.9. SEQUENCIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

Os produtos de PCR foram sequenciados (serviço externo) por eletroforese capilar com o sequenciador ABI PRISM 3730 xl (*Applied Biosystems*) usando o Kit BDT v1.1 (*Applied Biosystems*).

As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas com as sequências depositadas no *GenBank* (NCBI) para análise de homologia através do motor de busca BLAST.

A construção de dendogramas efetuou-se através do *software* MEGA (Versão 7.0.25), pelo método de agrupamento *Neighbor-Joining*.

3.2.10. M13 - PCR FINGERPRINTING DE LEVEDURAS

O DNA das amostras das leveduras foi amplificado por PCR com a utilização do *primer* M13 (5' - GAG GGT GGC GGT TCT - 3').



Foram preparadas misturas reacionais para a amplificação do DNA com a seguinte composição: 2,5 μL de tampão de reação (10X) + MgCl_2 (25 mM), 2,5 μL de dNTPs (2 mM), 0 e 0,2 μL de Taq DNA polimerase (1U), 1 μL de DNA das amostras (100 ng), e de 1 μL do *primer* M13, na concentração de 50 mM, para um volume final de 25 μL da mistura reacional (Salvador *et al.*, 2014). Neste ensaio foram utilizados 40 ciclos:

- Desnaturação: 1 ciclo de 5 min a 9 C
- Amplia o: 40 ciclos com a seguinte estrutura:
 - Desnatura o: 1 min a 94 C
 - *Annealing*: 1 min a 50 C
 - Extensão: 2 min a 72 C
- Finalizar com:
 - Extensão: 1 ciclo de 6 min a 72 C

As amostras de produto de PCR foram guardadas a 4 C até a realiza o da eletroforese em gel, onde os produtos foram separados de acordo com o descrito no ponto 3.2.6. Para as análises de M13 - PCR, os dendrogramas foram gerados pelo método de agrupamento não ponderado de pares com média aritmética (UPGMA - *unweighted pair group method with arithmetic average*), através da aplica o do coeficiente de similaridade de Dice, utilizando o *software BioNumerics*  versão 7.6 (APPLIED MATHS: A BIOMÉRIEUX COMPANY).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. DINÂMICA POPULACIONAL DO PROCESSO ENOLÓGICO

Com intuito de compreender a carga microbiana presente nas amostras de mostos em estudo em diferentes fases da fermenta o, efetuou-se a determina o do número de col nias cultiváveis em cada amostra. Os valores de unidades formadoras de col nia obtidos estão sistematizados na Tabela 4.

Tabela 4- Contagem das col nias microbianas nas amostras em estudo

	Col�nias (UFC/mL)		
	Antão Vaz e S�ria	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Touriga Nacional
Mosto	$2,82 \times 10^4$	$1,80 \times 10^3$	$2,43 \times 10^2$
Mosto parcialmente fermentado	$5,50 \times 10^3$	$2,30 \times 10^4$	$1,02 \times 10^7$
Final da fermenta�o	$3,88 \times 10^5$	$6,38 \times 10^5$	$1,24 \times 10^5$

Os resultados mostram que o mosto composto pelas castas brancas (Antão Vaz e S ria) possui maior carga microbiana relativamente ao mosto das castas tintas, sendo o mosto de Touriga Nacional o que possui o menor valor de unidades formadoras de col nias.

Nos ensaios efetuados com as amostras de mosto das castas brancas em fermentação, observou-se um valor bastante mais baixo de carga microbiana, o qual pode ser explicado pelo fato destes mostos terem sido clarificados antes da etapa da fermentação, levando a uma grande remoção da carga microbiana em suspensão, bem como a nutrientes essenciais ao desenvolvimento celular (Ferrando *et al.*, 1998). Em relação aos ensaios com amostras de castas tintas em fermentação, ambas apresentaram um valor mais elevado relativamente às amostras de mosto, mostrando que durante a fermentação alcoólica também ocorre divisão celular, e no caso da vinificação de tintos não houve processo de clarificação antes da fermentação (Hutkins, 2008).

Relativamente aos ensaios efetuados com as amostras no final da fermentação, as provenientes da casta *Cabernet Sauvignon* apresentaram maior valor de unidades formadoras de colónias, sendo o vinho proveniente da casta Touriga Nacional as que apresentaram valores mais baixos.

As amostras das diferentes castas em estudo apresentaram diferenças em termos de diversidade e carga microbiana ao longo das diferentes fases do processo de vinificação. As principais observaram-se nas amostras de Antão Vaz e Síria.

A evolução da população microbiana resulta numa sucessão de processos enzimáticos que contribuem, positivamente e negativamente, para a complexidade e diversidade aromática do vinho e podem chegar a danificar o produto final. No presente trabalho, pretende-se estudar a potencial aplicação da técnica FISH no estudo da dinâmica das populações microbianas (leveduras e bactérias) nas diferentes fases da produção de vinho, com vista a uma possível monitorização do processo. Para este efeito, pretende-se:

- Estudar a autofluorescência de amostras das diferentes fases de produção do vinho através de microscopia de epifluorescência.
- Investigar a aplicabilidade de um protocolo já desenvolvido para deteção de leveduras e bactérias através da técnica FISH para estudar a evolução das comunidades microbianas em processos de vinificação.

A técnica de Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH) permite detetar e identificar, de forma específica, microrganismos numa amostra, sem necessidade de isolamento em cultura. Esta técnica é amplamente utilizada na análise clínica e tem sido adaptada ao estudo de comunidades microbianas nas áreas ambientais e alimentares e na monitorização de



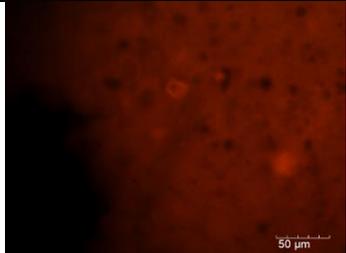
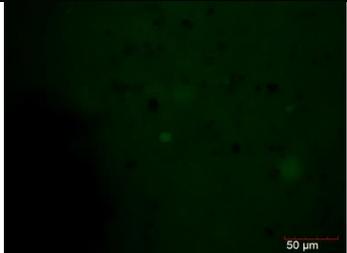
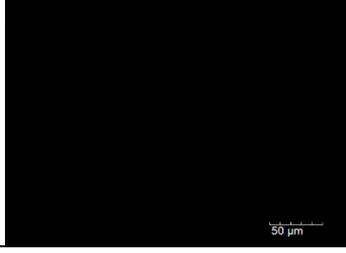
bioprocessos industriais mostrando bons resultados. A técnica é baseada no uso de sondas RNA-FISH, que são constituídas por oligonucleótidos sintéticos ligados a um ou mais marcadores fluorescentes que hibridam com uma região específica do RNA do microrganismo alvo, tornando assim, as células fluorescentes sob a luz adequada (Moter & Göbel, 2000; Amann *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2016). Uma das principais vantagens que apresenta é que permite detetar/identificar os microrganismos desde o reino até a espécie, consoante as sondas utilizadas.

Realizaram-se uma série de ensaios com sondas universais que permitem monitorizar a presença de leveduras e de bactérias, utilizando amostras recolhidas em diferentes fases do processo de vinificação do vinho branco com as castas Antão Vaz e Síria. Para investigar a aplicabilidade da técnica FISH no estudo da dinâmica das populações de leveduras e bactérias foi inicialmente estudada a autofluorescência das amostras em diferentes fases do processo de vinificação (mosto inicial, mosto após tratamento com SO₂, fermentação e produto final) e posteriormente foi aplicado o protocolo FISH descrito previamente. Os resultados da análise mediante microscopia de epifluorescência (Tabela 5) permitiram observar:

- i) Intensa autofluorescência do mosto inicial, devido provavelmente aos restos de uva e componentes orgânicos, mascarando a deteção dos microrganismos nesta fase.
- ii) Ausência de autofluorescência nas amostras associadas a fases que vão desde a aplicação de dióxido de enxofre até a obtenção do vinho.

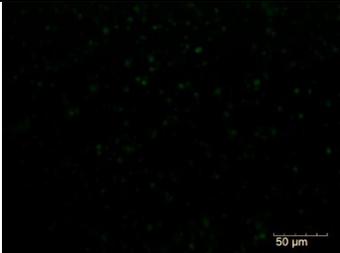
Estes resultados mostraram que a técnica FISH poderá vir a ser uma possível alternativa para a monitorização dos processos de vinificação, com possibilidade de deteção/identificação e seguimento das populações microbianas utilizando sondas que sejam detetáveis através dos filtros estudados 6-FAM e Cy3.

Tabela 5- Fotografias da autofluorescência das amostras em diferentes fases do processo de vinificação observada com o microscópio de epifluorescência nos filtros FITC e TRITC.

	Filtro do microscópio epifluorescência	
	Filtro Cy3	Filtro 6-FAM
Mosto		
Mosto tratado com SO ₂		
Fermentação		
Produto final (vinho)		

Considerando os resultados obtidos, foi aplicado o protocolo FISH para a detecção de leveduras e bactérias em amostras na fase de fermentação e no vinho. Para cada ensaio obtiveram-se as microfotografias correspondentes utilizando os filtros 6-FAM e Cy3 (Tabela 6). Os resultados revelaram a presença de uma grande concentração de leveduras e pequena concentração de bactérias na amostra correspondente à fase de fermentação e ausência dos microrganismos no produto final (vinho). Embora seja ainda necessário completar estes resultados com outras sondas específicas, estes dados evidenciam o potencial da técnica FISH para estudar a dinâmica de populações de bactérias e leveduras no processo de vinificação e consequentemente o seu potencial para monitorizar o processo.

Tabela 6- Fotografias dos sinais fluorescentes obtidos após a aplicação da técnica FISH em amostras em diferentes fases do processo de vinificação observada com o microscópio de epifluorescência nos filtros FITC e TRITC.

		Filtro do microscópio epifluorescência	
Sonda		Filtro Cy3	Filtro 6-FAM
Fermentação	EUK516-6-FAM		
	EUB338-CY3		
Produto final (vinho)	EUK516-6-FAM		
	EUB338-CY3		

Durante os ensaios foi possível constatar uma dinâmica populacional das amostras das diferentes castas, nas diferentes fases do processo de vinificação. A monitorização da evolução das populações poderá ser feita ao longo do processo de vinificação por RNA-FISH.

Foram isolados diversos microrganismos pertencentes à flora microbiana destas amostras enológicas, com o objetivo de estudar as suas potencialidades na produção de vinho e de imobilizar os microrganismos de interesse. Os diferentes isolados foram selecionados de acordo com as suas características macroscópicas e microscópicas diferentes, tendo sido efetuadas repicagens sucessivas de forma a obter culturas puras dessas colónias.

3.3.2. CARATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Nas amostras em estudo isolaram-se dezasseis estirpes de leveduras diferentes. As estirpes de leveduras foram isoladas a partir de amostras de mostos provenientes das castas Touriga Nacional, *Cabernet Sauvignon*, Antão Vaz e Roupeiro. A Tabela 7 apresenta alguns aspetos morfológicos macroscópicos e microscópicos desses isolados.

Tabela 7- Características macroscópicas e microscópicas das estirpes de leveduras isoladas

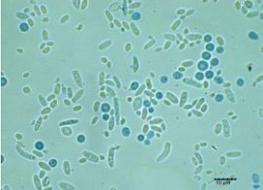
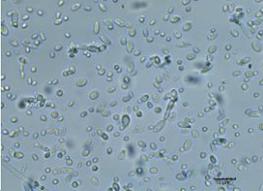
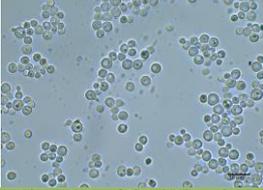
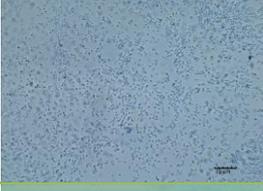
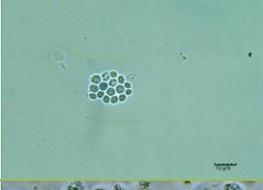
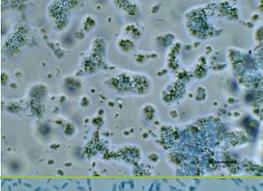
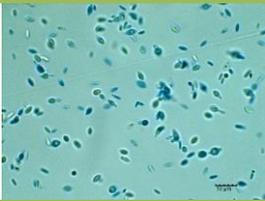
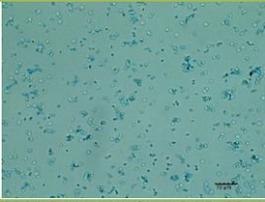
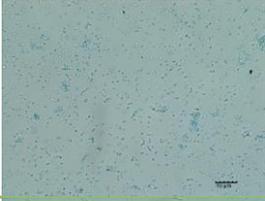
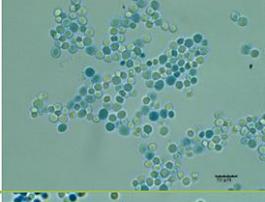
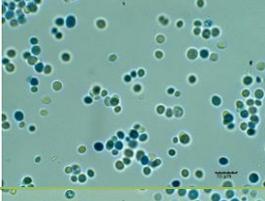
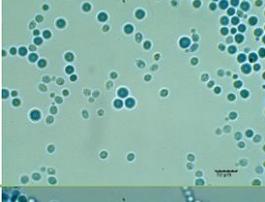
Levedura	Observação Macroscópica	Observação Microscópica (100x)	Origem
I			Mosto de Touriga Nacional
II			Mosto de Touriga Nacional
III			Mosto de Touriga Nacional
IV ₁			Mosto de Touriga Nacional
IV ₂			Mosto de Touriga Nacional sem SO ₂
V ₁			Mosto de Touriga Nacional; Mosto de <i>Cabernet Sauvignon</i>
V ₂			Vinho final de <i>Cabernet Sauvignon</i>
VI			Mosto de <i>Cabernet Sauvignon</i> ; Mosto de Touriga Nacional

Tabela 7-(Continuação) Características macroscópicas e microscópicas das estirpes de leveduras isoladas

Levedura	Fotografia	Microscópio (100x)	Observações
VII			Mosto de Touriga Nacional
VIII			Mosto de <i>Cabernet Sauvignon</i>
IX			Mosto de Touriga Nacional
X			Mosto de <i>Cabernet Sauvignon</i>
XI			Vinho final de Touriga Nacional.
XII			Vinho final de <i>Cabernet Sauvignon</i> .
XIII			Mosto de Antão Vaz e Roupeiro.
XIV			Vinho final de Antão Vaz e Roupeiro.



A maior parte das estirpes isoladas provém das amostras de mosto da fase pré-fermentativa (12 estirpes num total de 16 isolados). Destas 12 estirpes, 7 têm proveniência das amostras sem adição de SO_2 , o que demonstra o efeito antissético deste composto (Toniolo *et al.*, 2010; Guerrero & Cantos-Villar, 2015; Giménez-Gómez *et al.*, 2017).

No que toca ao crescimento das colónias, as estirpes de leveduras I, III, VI, VII, VIII, X, XI, XII e XIV apresentaram um crescimento mais rápido, observando-se crescimento celular ao fim de 24 h de incubação enquanto para a estirpes de levedura a IV_1 , IV_2 , V_1 , V_2 , IX e XIII apenas ao fim de 48 h se conseguem observar colónias bem desenvolvidas.

Foi também possível observar, por análise microscópica, que as estirpes de levedura I tem células alongadas e grandes. As leveduras II, III, V_1 , V_2 , XI, XII, XIII, XIV apresentam células esféricas a ovaladas. As leveduras IV_1 , IV_2 apresentam morfologia esférica com células de dimensões muito inferiores. As leveduras VI e X apresentam forma de bastonete. As leveduras VII, VIII e IX apresentam células de morfologia apiculada, esférica a ovalada de menores dimensões.

3.3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Com a finalidade de proceder à identificação e caracterização molecular de todas as estirpes de leveduras em estudo, foi efetuada, numa fase inicial a extração de DNA. Os resultados relativamente às concentrações obtidas, tal como os respetivos graus de pureza das amostras estão apresentados na Tabela 21 (Anexo 2).

No sentido de efetuar a identificação das estirpes de leveduras isoladas as amostras de DNA extraído foram amplificadas utilizando *primers* que codificaram o domínio D1/D2.

O resultado da amplificação do DNA (Figura 17), apresenta as bandas respetivas aos fragmentos de DNA amplificado visualizados em câmara de Ultravioleta e analisada através do *software* Image Lab 5.0. Os picos apresentados correspondem às intensidades de fluorescência detetada.

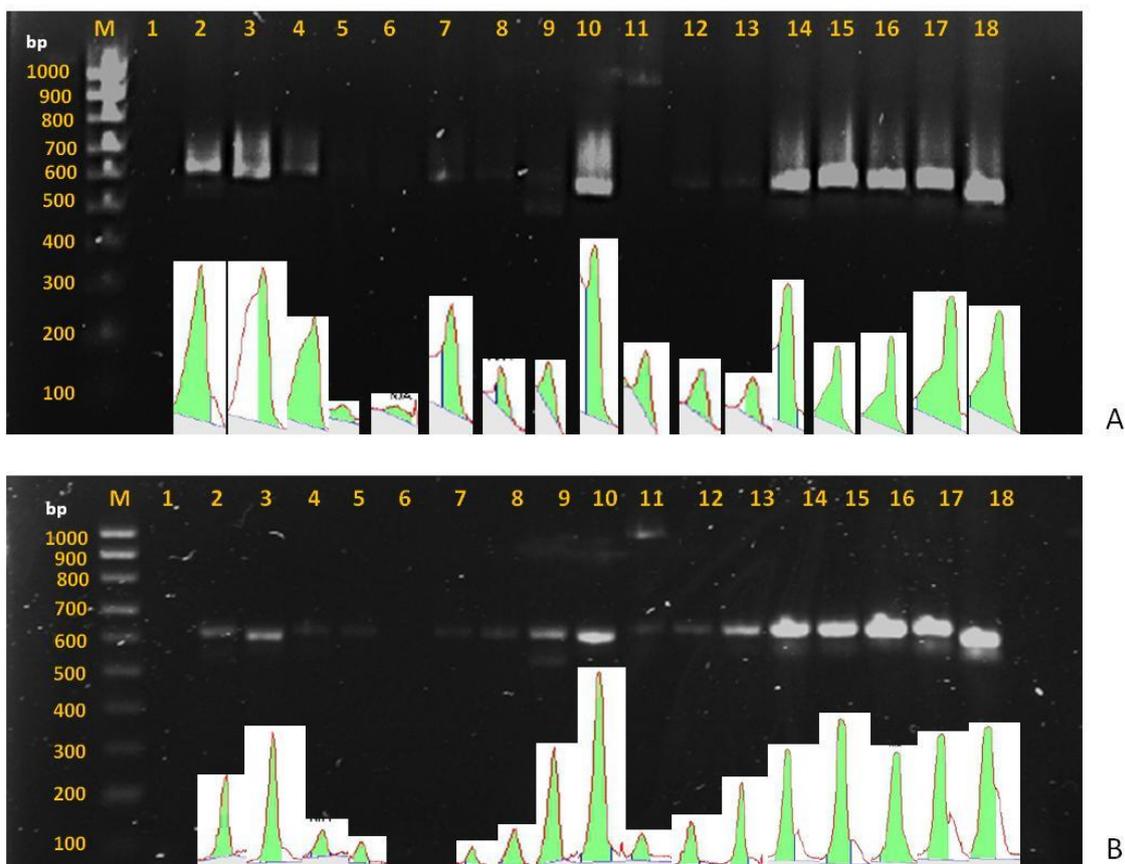


Figura 17- Eletroforetograma obtido através de PCR, com amplificação do domínio D1/D2, correspondente às amostras de DNA extraídas das estirpes de leveduras isoladas dos mostos de uva. M - Marcador de DNA (*NZYDNA Ladder V*, NZYTech); 1 - controlo negativo; 2 - levedura I; 3 - levedura II; 4 - levedura III; 5 - levedura IV₁; 6 - levedura IV₂; 7 - levedura V₁; 8 - levedura V₂; 9 - levedura VI; 10 - levedura VII; 11 - levedura VIII; 12 - levedura IX; 13 - levedura X; 14 - levedura XI; 15 - levedura XII; 16 - levedura XIII; 17 - levedura XIV; 18 - 396. (A) corresponde às réplicas A e (B) às réplicas B.

Estes eletroforetogramas apresentam bandas com cerca de 600 bp correspondentes à amplificação das regiões do Domínio D1/D2 do 26S referente às diferentes estirpes de leveduras isoladas. Os produtos de PCR foram quantificados por espectralfluorimetria (Tabela 22, Anexo 2) e sequenciados. Após comparação das sequências nucleotídicas obtidas para as diferentes estirpes de leveduras isoladas, com as depositadas no *GenBank*, foi possível proceder à identificação ao nível da espécie ou identificação ao nível do género. Os resultados obtidos para as diferentes estirpes isoladas estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8- Identificação das estirpes isoladas após sequenciação

Estirpe Isolada	Identificação	Similaridade	Nº de acesso do GenBank	Referência
I _B	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100%	KU167717	(Rosu & Stefan, 2015)
II _B	<i>Zygoascus meyeriae</i>	100%	JF749214.1	(Barata <i>et al.</i> , 2012)
III _A	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100%	EU020097.1	(Csoma & Sipiczki, 2008)
IV _{1.A}	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100%	XR_002431971.1	(Gordon <i>et al.</i> , 2011)
IV _{2.A}	--			
V _{1A}	<i>Saccharomyces</i> sp.1	87%	EU884435.1	(Zhao & Chen, 2008)
		87%	KY109363.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
		87%	KF810044.1	(Lu <i>et al.</i> , 2014)
V _{2A}	<i>Saccharomyces</i> sp.2	94%	KX984147.1	(Yaniv <i>et al.</i> , 2017)
		93%	EU884435.1	(Zhao & Chen, 2008)
		93%	KY109399.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
VI _A	<i>Saccharomyces</i> sp.3	100%	KY471391.1	(Anu-Appiah & Deepak, 2017)
		100%	KY109409.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
		100%	KY109220.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
VII _A	<i>Hanseniaspora</i> sp.1	99%	KY107803.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
		99%	KC870065.1	(Karunakara & Gurusamy, 2013)
		99%	KY107811.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
		99%	KT922392.1	(Belda <i>et al.</i> , 2016)
		99%	KY107795.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
		99%	KY107805.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
VIII _A	<i>Saccharomyces</i> sp.4	100%	KY471391.1	(Anu-Appiah & Deepak, 2017)
		100%	KY816856.1	(Buckova <i>et al.</i> , 2017)
		100%	KY109465.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
		100%	NG_055028.1	(Kurtzman & Robnett, 2003)
IX _B	<i>Hanseniaspora</i> sp.2	99%	KY107803.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
		99%	KC111446.1	(Eddouzi <i>et al.</i> , 2013)
		99%	KY107811.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
		99%	KY107853.1	(Vu <i>et al.</i> , 2016)
X _B	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99%	XR_002431972.1	(Gordon <i>et al.</i> , 2011)
XI _B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	KY471391.1	(Anu-Appiah & Deepak, 2017)
XII _B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	KX380570.1	(Qiao, 2016)
XIII _B	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%	HM988694.1	(Guzzon <i>et al.</i> , 2011)
XIV _A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	CP011558.1	(Chan <i>et al.</i> , 2012)

No caso das estirpes de leveduras VII e IX apenas foi possível realizar a identificação ao nível do género. As estirpes V₁ e V₂ apresentaram valores de homologia mais baixos, com diferentes espécies do género *Saccharomyces*. Os restantes isolados foram classificados à espécie.

A partir das sequências obtidas construiu-se a árvore filogenética que está representada na Figura 18, mostrando a relação de proximidade genética entre as estirpes de leveduras isoladas.

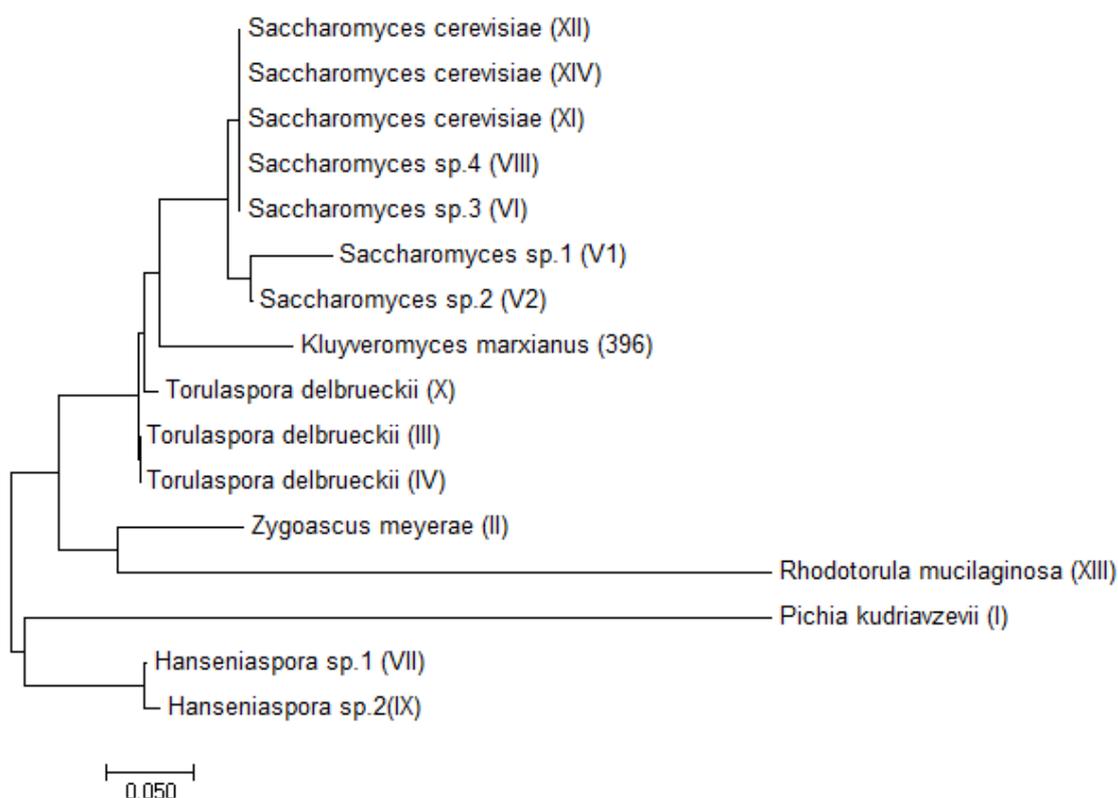


Figura 18- Dendrograma obtido por alinhamento das sequências genéticas para as estirpes de leveduras com amplificação do domínio D1/D2.

As leveduras identificadas como pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* (XI, XII e XIV) foram agrupadas no mesmo *cluster* das estirpes de *Saccharomyces* sp.4 e sp.3 (VIII e VI, respetivamente). As estirpes de *Saccharomyces* sp.1 e sp.2 (V₁ e V₂) apresentam-se mais próximas entre si, no entanto formam um *subcluster* com as restantes estirpes do mesmo género. A estirpe identificada com *Kluveromyces marxianus* surge um pouco mais afastada filogeneticamente das estirpes de *Saccharomyces*. As leveduras do género *Torulaspora* (X, III e IV₁) apresentam-se agrupadas dentro do mesmo grupo, com 100% de homologia. As restantes estirpes de leveduras apresentam-se mais distantes em relação ao género *Saccharomyces*,

sendo *Pichia kudriavzevii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e as estirpes do género *Hanseniaspora* as mais afastadas filogeneticamente.

3.3.4. ANÁLISE DO DNA DE LEVEDURAS POR M13-PCR *FINGERPRINTING*

De forma a proceder à caracterização da proximidade das estirpes de leveduras em estudo efetuou-se também uma abordagem com amplificação do DNA por M13-PCR *fingerprinting*.

A utilização do *primer* M13 gerou diferentes perfis moleculares para as amostras de DNA das estirpes de leveduras isoladas, estando o eletroforetograma resultante desta análise apresentado na Figura 19.

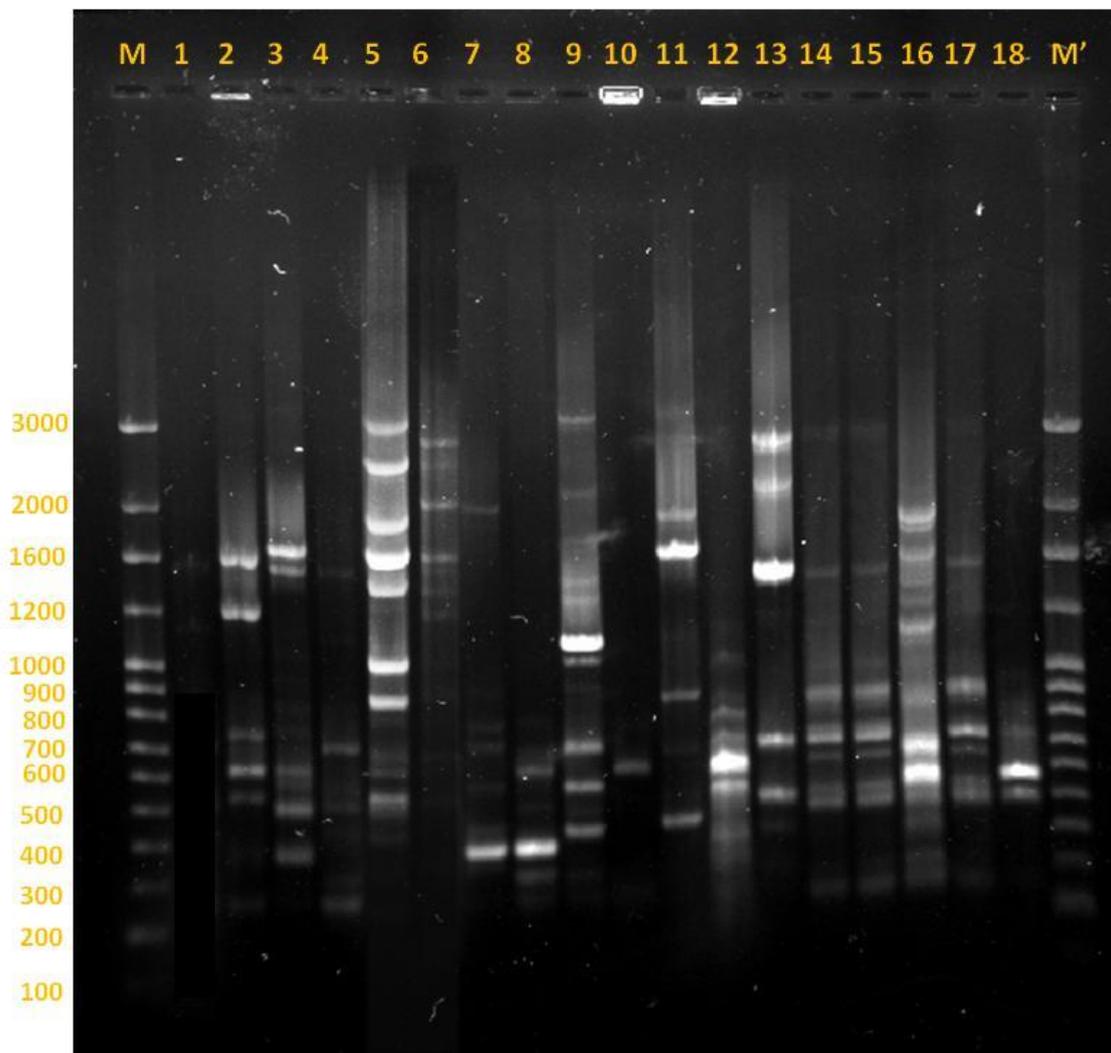


Figura 19- Eletroforetograma obtido através de M13 - PCR, correspondente às amostras de DNA extraídas das estirpes de leveduras isoladas dos mostos. M, M' - marcador de DNA (NZYDNA Ladder VII, NZYTech); 1 - controlo negativo; 2 - levedura I; 3 - levedura II; 4 - levedura III; 5 - levedura IV₁; 6 - levedura IV₂; 7 - levedura V₁; 8 - levedura V₂; 9 - levedura VI; 10 - levedura VII; 11 - levedura VIII; 12 - levedura IX; 13 - levedura X; 14 - levedura XI; 15 - levedura XII; 16 - levedura XIII; 17 - levedura XIV; 18 - levedura 396.

Os ensaios de M13-PCR produziram polimorfismos para todas as espécies diferentes testadas, resultando em padrões de bandas entre 1 - 11 que apresentaram uma variação de tamanho de 256,9 a 3000 bp. Com base na análise de perfis moleculares de M13-PCR foi possível obter perfis semelhantes para as amostras de leveduras isoladas na fase final do processo fermentativo, as leveduras XI, XII e XIV, com 9 fragmentos de tamanho entre 300 a 2969,4 bp. O que corrobora os resultados da sequenciação, tendo sido identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*.

A amplificação do DNA genómico das diferentes amostras por PCR com a utilização do *primer* M13 permitiu a distinção das estirpes leveduriformes isoladas.

A figura 20 mostra o dendograma obtido neste estudo e permitiu efetuar uma análise de similaridade mais detalhada entre as diferentes estirpes de leveduras isoladas.

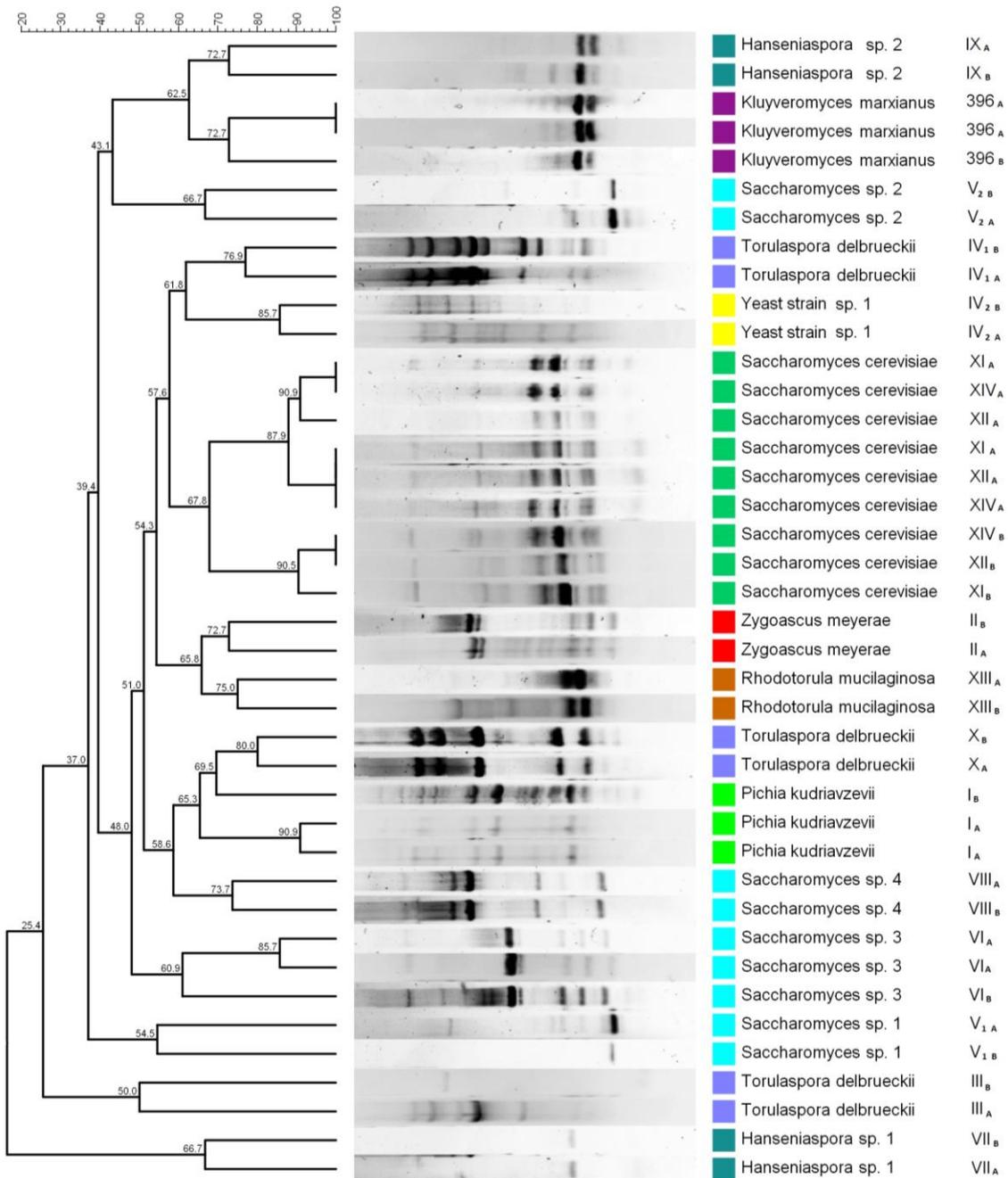


Figura 20- Dendrograma baseado na análise dos perfis genéticos obtidos após M13-PCR fingerprinting para as estirpes de leveduras isoladas. Os valores de distância entre os clusters são expressos como percentagem de similaridade (0-100%).

A análise dos resultados de M13-PCR *fingerprinting* mostrou que todas as amostras de leveduras identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* analisadas formaram um *cluster* com grau de similaridade bastante elevado de 67,8%. Estas estirpes formam um agrupamento com a estirpe IV₁ identificada como *Torulaspora delbrueckii* e com estirpe IV₂ não identificada, com 57,6% de similaridade, sendo que estas duas últimas foram agrupadas num *cluster* com 61, 8%

de aproximação. A estirpe identificada como *Zygoascus meyeræ* (II) forma um cluster com *Rhodotorula mucilaginosa* (XIII) com uma similaridade de 65,8%. As estirpes classificadas como *Hanseniaspora* sp. 2 formam um agrupamento com 62,5% de similaridade com a estirpe *Kluyveromyces marxianus*. A estirpe IX identificada como *Torulaspota delbrueckii* apresenta alguma proximidade com leveduras da espécie *Pichia kudriavzevii* formando estas um cluster com 65,3% de similaridade. Estas duas leveduras estão ainda agrupadas com levedura *Saccharomyces* sp. 4 com 58,6% de similaridade. *Hanseniaspora* sp. 1 e *Torulaspota delbrueckii* são as estirpes mais afastadas filogeneticamente com similaridades inferiores a 40% com todas as restantes estirpes.

Os resultados desta análise filogenética permitem a amplificação aleatória de diferentes regiões do DNA, possibilitando uma diferenciação ao nível da espécie e entre estirpes da mesma espécie (Caldeira *et al.*, 2009; Salvador *et al.*, 2014), evidenciando as diferentes características dos isolados.

3.4. CONCLUSÃO

Foram isoladas dezasseis estirpes de leveduras pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygoascus meyeræ*, *Rhodotorula mucilaginosa* e a estirpe pertencente à coleção de culturas do laboratório HERCULES foi identificada como pertencente à espécie *Kluyveromyces marxianus*.

A análise molecular por M13-PCR, permitiu efetuar uma caracterização dos perfis genéticos para todas as estirpes em estudo, tendo-se observado diferenças que permitiram o agrupamento de acordo com a proximidade filogenética, quer entre espécies diferentes, quer entre estirpes da mesma espécie.

4. Caracterização fisiológica de leveduras



4.1. INTRODUÇÃO

A utilização de estirpes de microrganismos em processos industriais requer um estudo prévio do seu comportamento em condições que mimetizem as condições reais dos processos onde poderão ser utilizados (Ex: produção de etanol, ácido láctico, ácido acético, enzimas, etc.).

No caso das leveduras para futuras aplicações em processos enológicos, antes de serem utilizadas como culturas de arranque é importante um estudo prévio e rigoroso do comportamento fisiológico das leveduras, nomeadamente em termos de crescimento celular, assimilação de nutrientes e aptidão para a realização de fermentação alcoólica.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. CULTURA AERÓBIAS

As leveduras foram previamente repicadas para rampas com meio de cultura YPD e incubadas a 30°C durante 48h, de modo a garantir um bom crescimento celular. As culturas livres foram preparadas por arrastamento da biomassa das rampas com 5mL de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%). O ensaio foi efetuado em erlenmeyers de 250mL contendo 100mL de mosto sintético líquido (Tabela 19, Anexo 1) ou mosto sintético modificado líquido (Tabela 20, Anexo 1). As culturas foram incubadas a 30°C num agitador orbital (IKA KS 4000) a 130 rpm (Mendes-Ferreira *et al.*, 2004) e para cada cultura foi efetuado um duplicado.

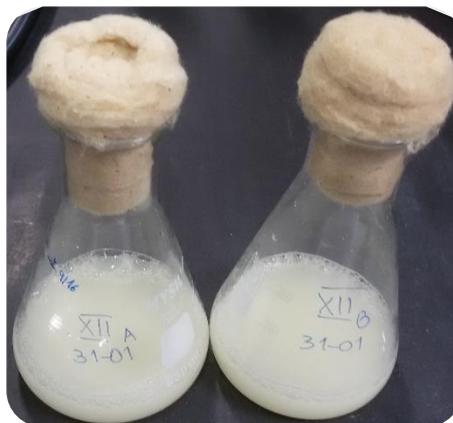


Figura 21- Culturas de células livres em condições aeróbias em meio de mosto sintético

4.2.2. CULTURAS SEM AREJAMENTO

As leveduras que mostraram maior potencial de crescimento foram utilizadas em culturas líquidas sem arejamento, de forma a mimetizar as condições de uma fermentação alcoólica. O ensaio foi efetuado em erlenmeyers de 250mL contendo 100mL de mosto sintético líquido e as culturas foram incubadas a 30°C sem agitação. Os erlenmeyers foram selados com *parafilm* de forma a garantir ausência de oxigénio nas culturas.



Figura 22- Cultura de células livres sem arejamento em meio de mosto sintético

4.2.3. RECOLHA E TRATAMENTO DE AMOSTRAS

Durante os ensaios foi monitorizado o crescimento celular, o consumo de glucose e produção de etanol ao longo do tempo. Para tal, foram recolhidas amostras de 500 μ L em duplicado para microtubos em intervalos de tempo periódicos. As amostras foram imediatamente colocadas em gelo para garantir a paragem da atividade celular. Um dos tubos foi centrifugado a 15000g durante 15min a 4°C (HERMLE Z 323 K), recolheu-se o sobrenadante e guardou-se a -20°C para posterior quantificação de glucose e etanol.

4.2.4. PERFIL DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS

A monitorização do perfil de crescimento, foi realizado pela leitura da absorvância a 600 nm, por espectrofotometria UV/Vis (HITACHI U-3010 *spectrophotometer*). A análise das curvas de crescimento celular, para as culturas aeróbias, foi efetuada no *software SigmaPlot 12.0* utilizando a seguinte equação (Zwietering *et al.*, 1990):

$$f = a \times e^{(-e^{(b-c \times x)})}, \text{ onde}$$

a é o logaritmo do número de ciclos de crescimento; **b** é a taxa de crescimento ao longo do tempo (h⁻¹), **c** é o tempo necessário para atingir a taxa de crescimento máxima (h) e **e** o número Neperiano (2,718).



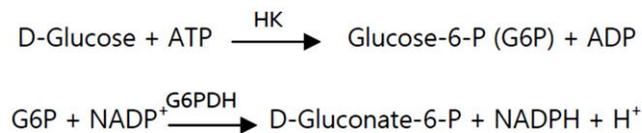
A partir da referida equação, procedeu-se à determinação do tempo de geração e da taxa específica de crescimento. Sendo,

$$\text{Taxa específica de crescimento} = \frac{c \times a}{e}$$

$$\text{Tempo de geração} = \frac{\ln(2)}{\text{Taxa de crescimento}}$$

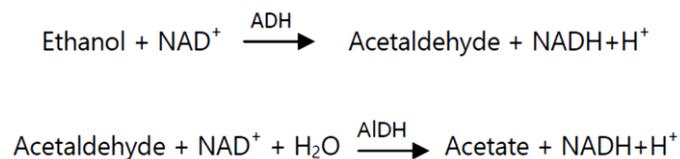
4.2.5. QUANTIFICAÇÃO DE GLUCOSE

A quantificação da glucose foi efetuada por kit enzimático (NZYTech, D-Glucose HK, UV method), (Anexo 3), através da determinação da concentração de NADPH formado, o qual é quantificado a 340 nm. A quantidade de NADPH formada pela ação combinada da hexocinase (HK) e da glucose-6-P desidrogenase (G6PDH), é estequiometricamente correspondente à quantidade de D-Glucose no volume de amostra,



4.2.6. QUANTIFICAÇÃO DE ETANOL

A quantificação do etanol foi realizada por intermédio de um kit enzimático (NZYTech, Ethanol, UV method), (Anexo 4). A quantidade de NADPH formada pela ação combinada de Álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (AIDH), medida a 340 nm é proporcional à quantidade de etanol no volume de amostra, obedecendo esta reação às seguintes equações:



4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS ESTIRPES ISOLADAS

Com intuito de compreender o metabolismo oxidativo das leveduras e verificar se têm boa aptidão para o catabolismo dos glúcidos e para a produção de biomassa, realizaram-se culturas livres de cada estirpe isolada em mosto sintético, com agitação, de forma a promover o arejamento do meio e permitir o crescimento celular. Os perfis de crescimento das estirpes e o consumo de glucose encontram-se na figura 23.

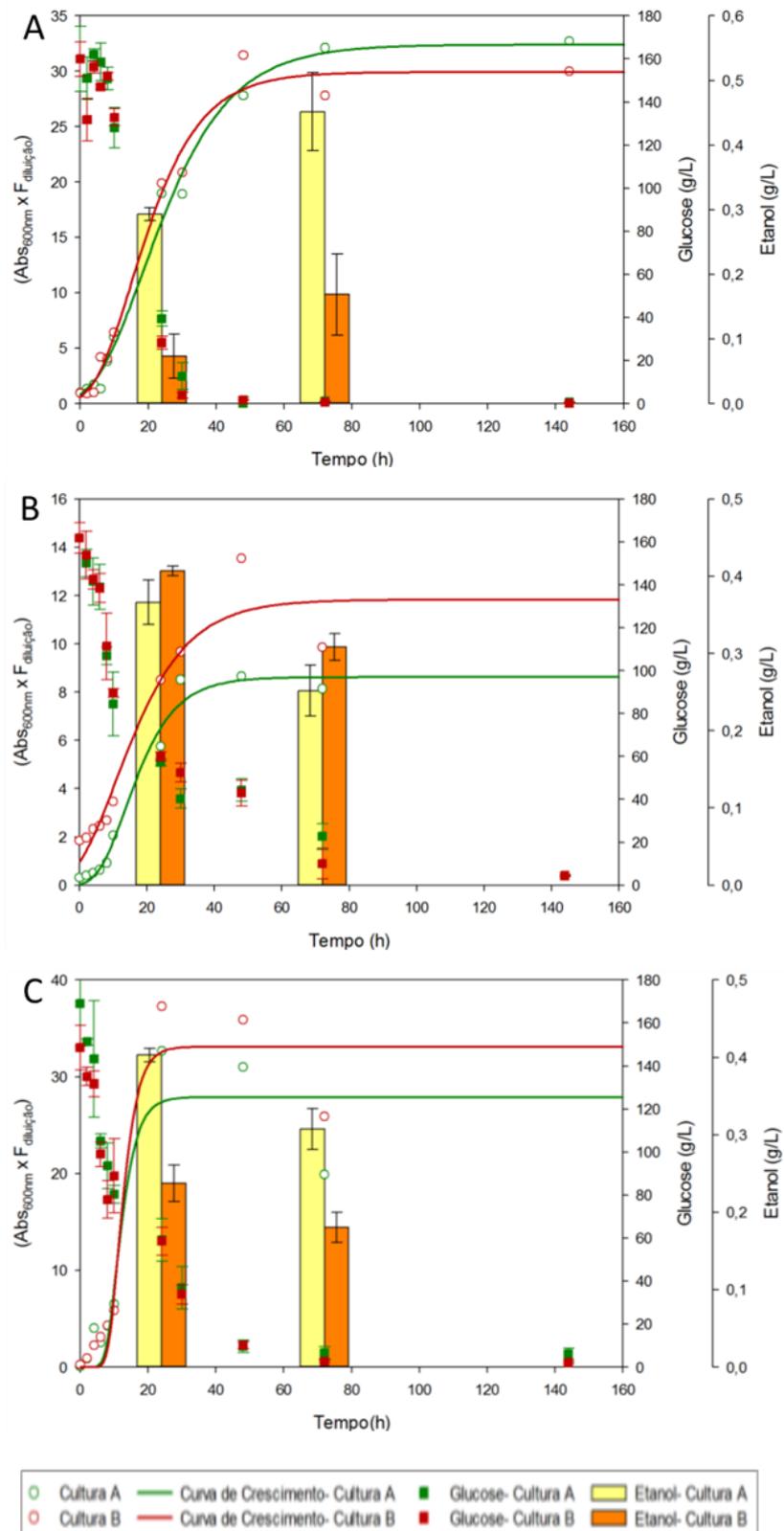


Figura 23- Curvas de crescimento das leveduras em cultura livre com arejamento em meio de mosto sintético obtidas pela monitorização da Abs a 600 nm e respetivos perfis de consumo de glucose. A- Levedura I; B- Levedura II; C- Levedura III. Os valores referentes ao perfil de consumo de glucose são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

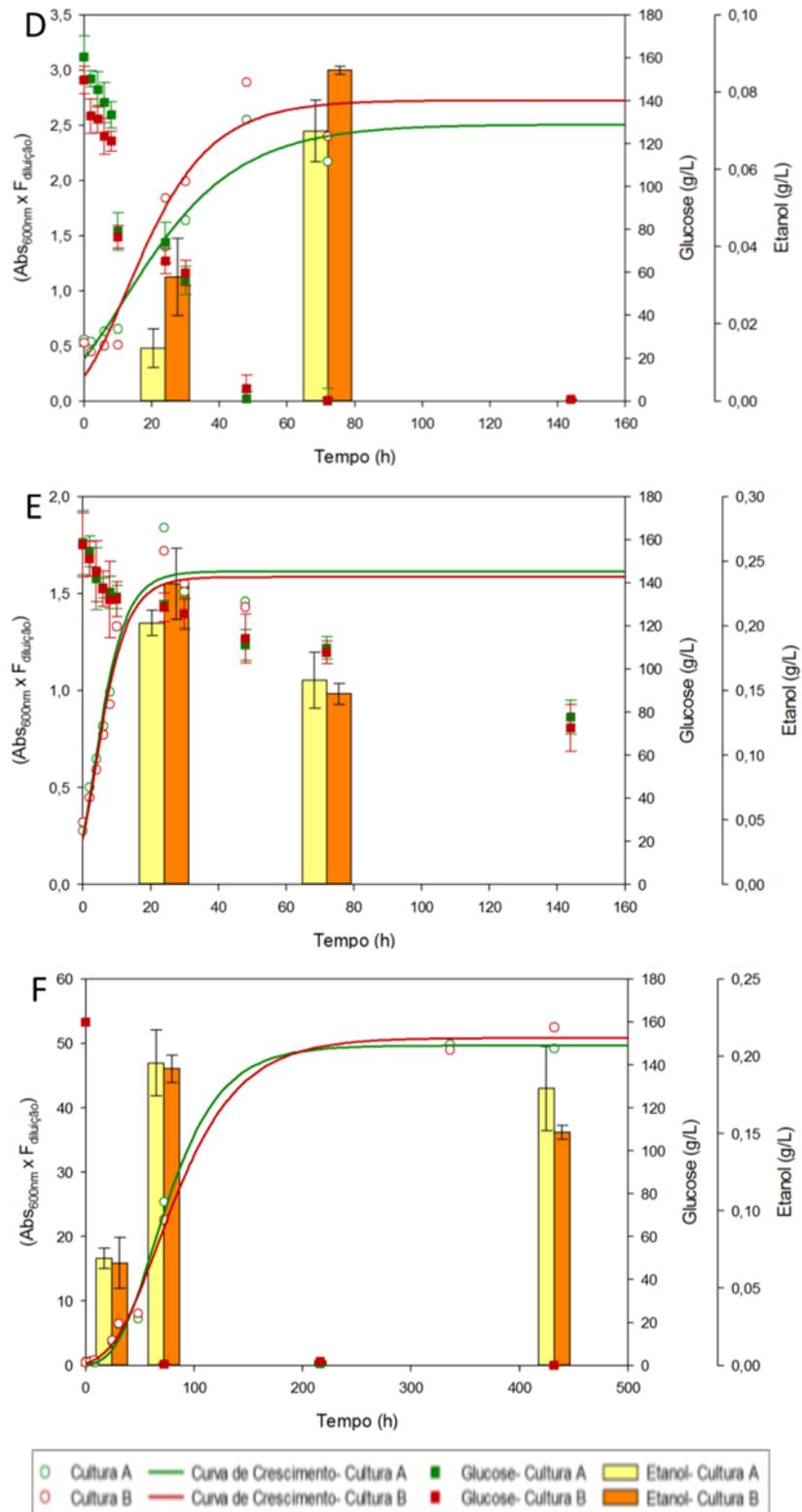


Figura 23 (Continuação)- Curvas de crescimento das leveduras em cultura livre com arejamento em meio de mosto sintético obtidas pela monitorização da Abs a 600 nm e respetivos perfis de consumo de glucose. D- Levedura VI; E- Levedura VII; F- Levedura X. Os valores referentes ao perfil de consumo de glucose são a média ± desvio-padrão de 3 réplicas.

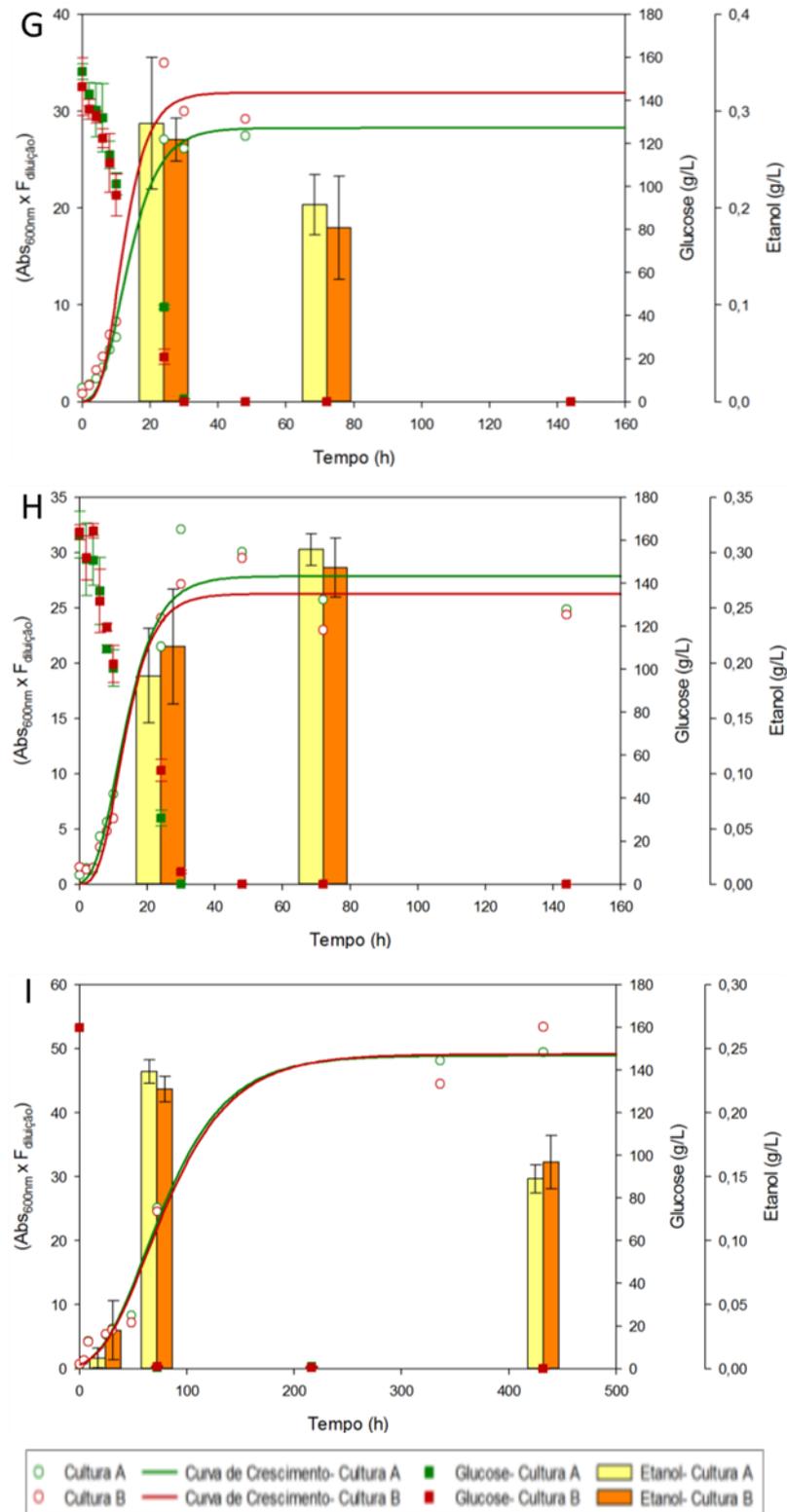


Figura 23 (Continuação)- Curvas de crescimento das leveduras em cultura livre com arejamento em meio de mosto sintético obtidas pela monitorização da Abs a 600 nm e respetivos perfis de consumo de glucose. G- Levedura XI; H- Levedura XII; I- Levedura XIII. Os valores referentes ao perfil de consumo de glucose são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

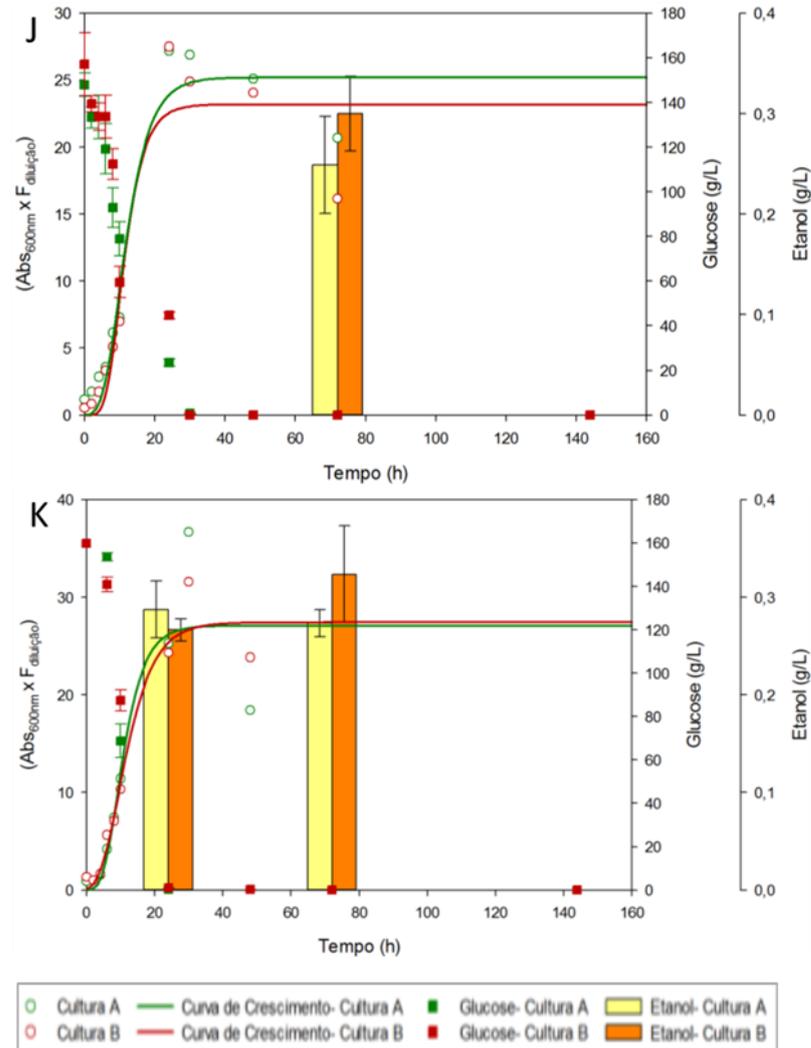
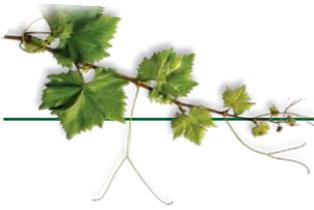


Figura 23 (continuação)- Curvas de crescimento das leveduras em cultura livre com arejamento em meio de mosto sintético obtidas pela monitorização da Abs a 600 nm e respetivos perfis de consumo de glucose. J- Levedura XIV; K- Levedura 396. Os valores referentes ao perfil de consumo de glucose são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

Para as culturas das leveduras I, II, III, VI, VII, X, XI, XII, XIII, XIV e 396 obteve-se, em mosto sintético, um perfil de crescimento celular que permitiu traçar as respetivas curvas de crescimento e calcular as taxas específicas de crescimento e os tempos de geração para cada estirpe (Tabela 9).

Tabela 9- Taxa específica de crescimento e tempo de geração de leveduras em mosto sintético

Estirpe	Taxa Específica de Crescimento (h ⁻¹)	Tempo de geração (h)
I	0,915	0,763
II	0,377	1,840
III	3,519	0,200
VI	0,061	11,887
VII	0,114	6,080
X	0,494	1,414
XI	2,035	0,351
XII	1,641	0,423
XIII	0,430	1,613
XIV	2,054	0,339
396	2,031	0,347

Através da análise dos perfis de crescimento e da taxa específica de crescimento, pode verificar-se que as leveduras III, XI, XIV e 396 são as que apresentam crescimento mais acentuado. Em relação ao consumo de glucose, consumiram a glucose disponível em menos de 30h, com exceção da estirpe III que metabolizou praticamente toda a glucose apenas ao fim 72h.

As estirpes II, VI e VII são as que apresentam uma taxa específica de crescimento mais baixa, a estirpe II apenas metabolizou a glucose disponível no meio ao final de 144h de cultura, e a cultura da estirpe VII, ao fim desse tempo ainda mantinha uma elevada concentração de glucose no meio (70 g/L).

Relativamente às estirpes das leveduras X e XIII, estas também demonstraram um crescimento celular razoável, porém a sua fase de latência é maior (quase 72h), no entanto toda a glucose foi metabolizada até às 96h de cultura.

Para as culturas das restantes estirpes, nomeadamente a levedura IV₁, IV₂, V₁, V₂, VIII e IX, o crescimento foi muito reduzido em mosto sintético. Efetuaram-se culturas destas estirpes em meio de mosto sintético modificado, o qual é mais rico em nutrientes, disponibilizando uma maior fonte de carbono, azoto e vitaminas. A Figura 24 apresenta os perfis de crescimento e consumo de glucose ao longo do tempo para estas culturas.

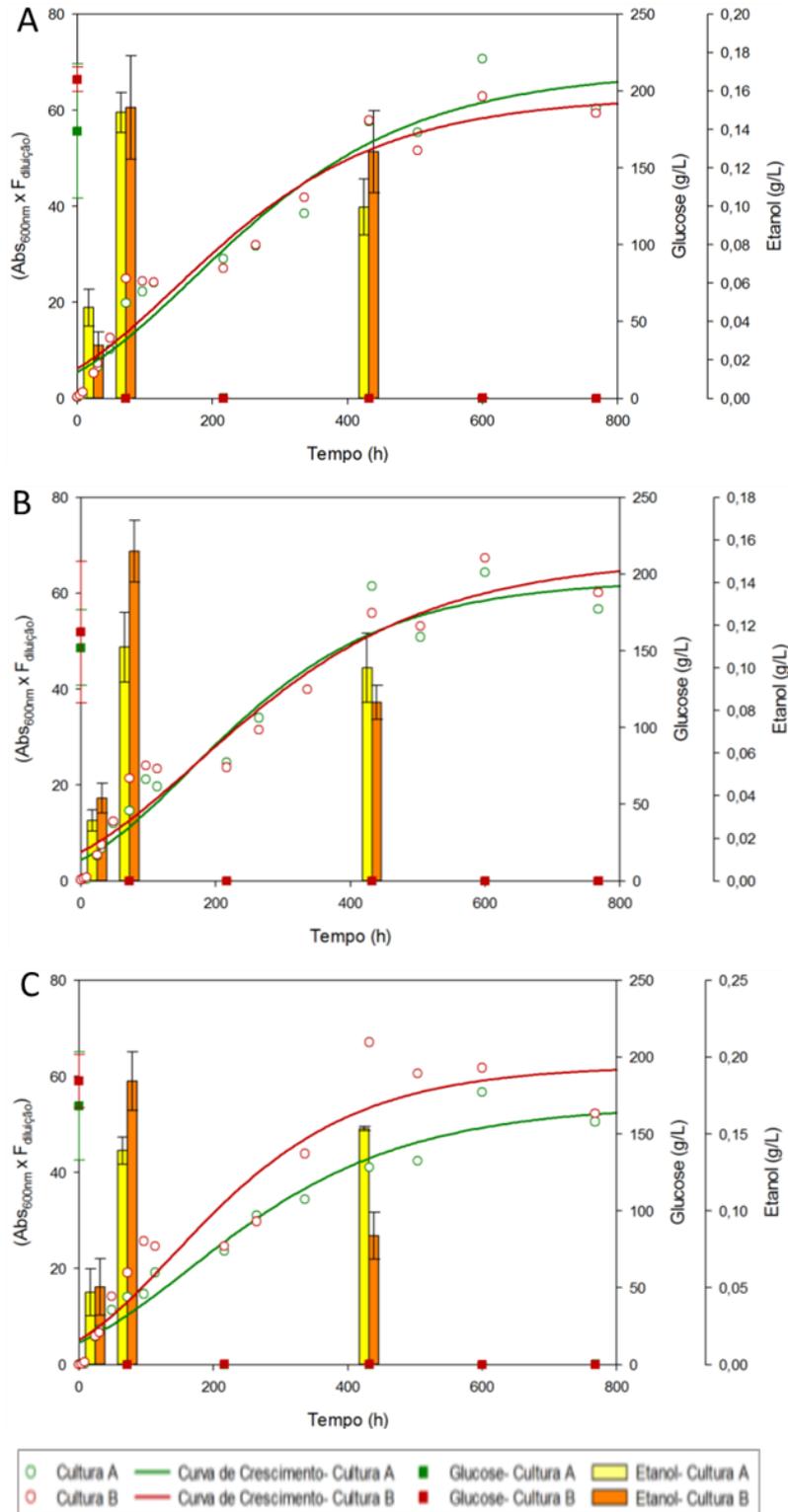


Figura 24- Curva de crescimento das leveduras sem cultura livre com arejamento em meio de mosto sintético modificada obtida pela da monitorização da Abs a 600 nm e respetivo perfil de consumo de glucose. A- Levedura IV₁; B- Levedura IV₂; C- Levedura V₁. Os valores referentes ao perfil de consumo de glucose são a média ± desvio-padrão de 3 réplicas.

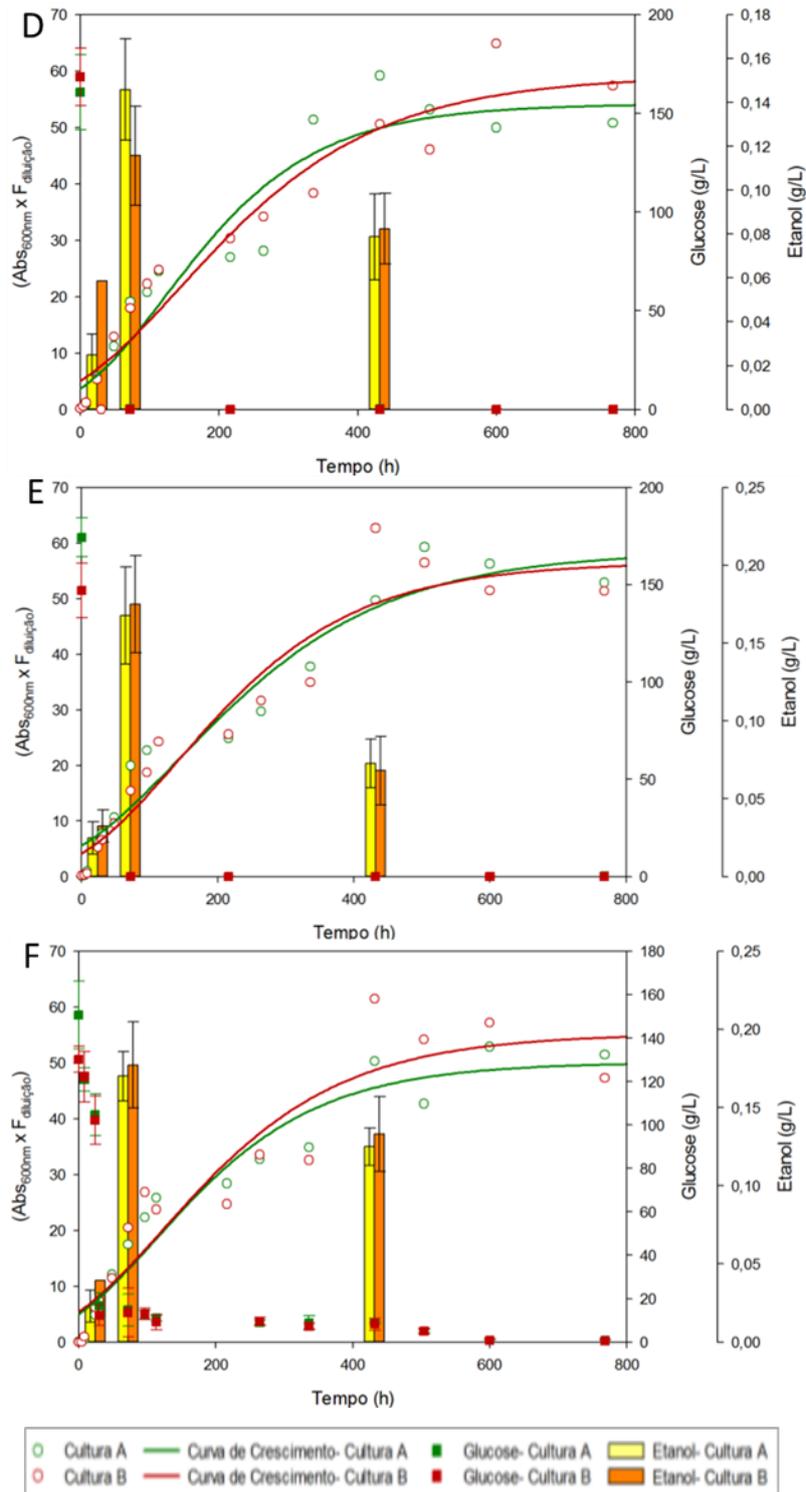


Figura 24 (Continuação)- Curva de crescimento das leveduras sem cultura livre com arejamento em meio de mosto sintético modificado obtida pela da monitorização da Abs a 600 nm e respetivo perfil de consumo de glucose. D- Levedura V₂; E- Levedura VIII; C- Levedura IX. Os valores referentes ao perfil de consumo de glucose são a média ± desvio-padrão de 3 réplicas.



As culturas das estirpes em mosto sintético modificado (Figura 24), mostram um crescimento bastante mais acentuado. As taxas específicas de crescimento e os tempos de geração correspondentes, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Taxa específica de crescimento e tempo de geração das culturas de leveduras em mosto sintético modificado

Estirpe	Taxa Específica de Crescimento (h^{-1})	Tempo de Geração (h)
IV ₁	0,133	5,232
IV ₂	0,133	5,223
V ₁	0,129	5,506
V ₂	0,148	4,720
VIII	0,133	5,231
IX	0,155	4,504

Todas as estirpes mostraram um crescimento significativo ao longo do tempo, no entanto o crescimento efetuou-se de forma muito mais lenta e as culturas requereram mais tempo para atingirem a fase estacionária. As taxas específicas de crescimento também foram mais baixas, quando comparadas com as da maior parte das leveduras das culturas anteriores. Relativamente ao consumo de glucose, todas as estirpes efetuaram a sua metabolização durante as primeiras 72h de cultura, com exceção da estirpe IX que esgotou a glucose apenas ao fim de 600h de cultura. Todas as estirpes produziram etanol conforme é possível observar nos gráficos (figura 19). Com efeito, a suplementação do meio com extrato de levedura parece ter potenciado o crescimento destas estirpes pela disponibilização nutricional que promoveu, nomeadamente em azoto, vitaminas e cofatores de enzimas do metabolismo oxidativo (Ramakrishna, 1999; Kidd, 2005; Lonsdale, 2006; Oldham & Ivkovic, 2012), necessário para o crescimento celular.

4.3.2. AVALIAÇÃO DAS POTENCIALIDADES FERMENTATIVAS DAS LEVEDURAS

Para tentar compreender o comportamento das estirpes mais promissoras a nível fermentativo, realizaram-se ensaios de culturas livres com mosto sintético na ausência de oxigénio. Os perfis para o consumo de glucose e produção de etanol ao longo do tempo encontram-se na Figura 25.

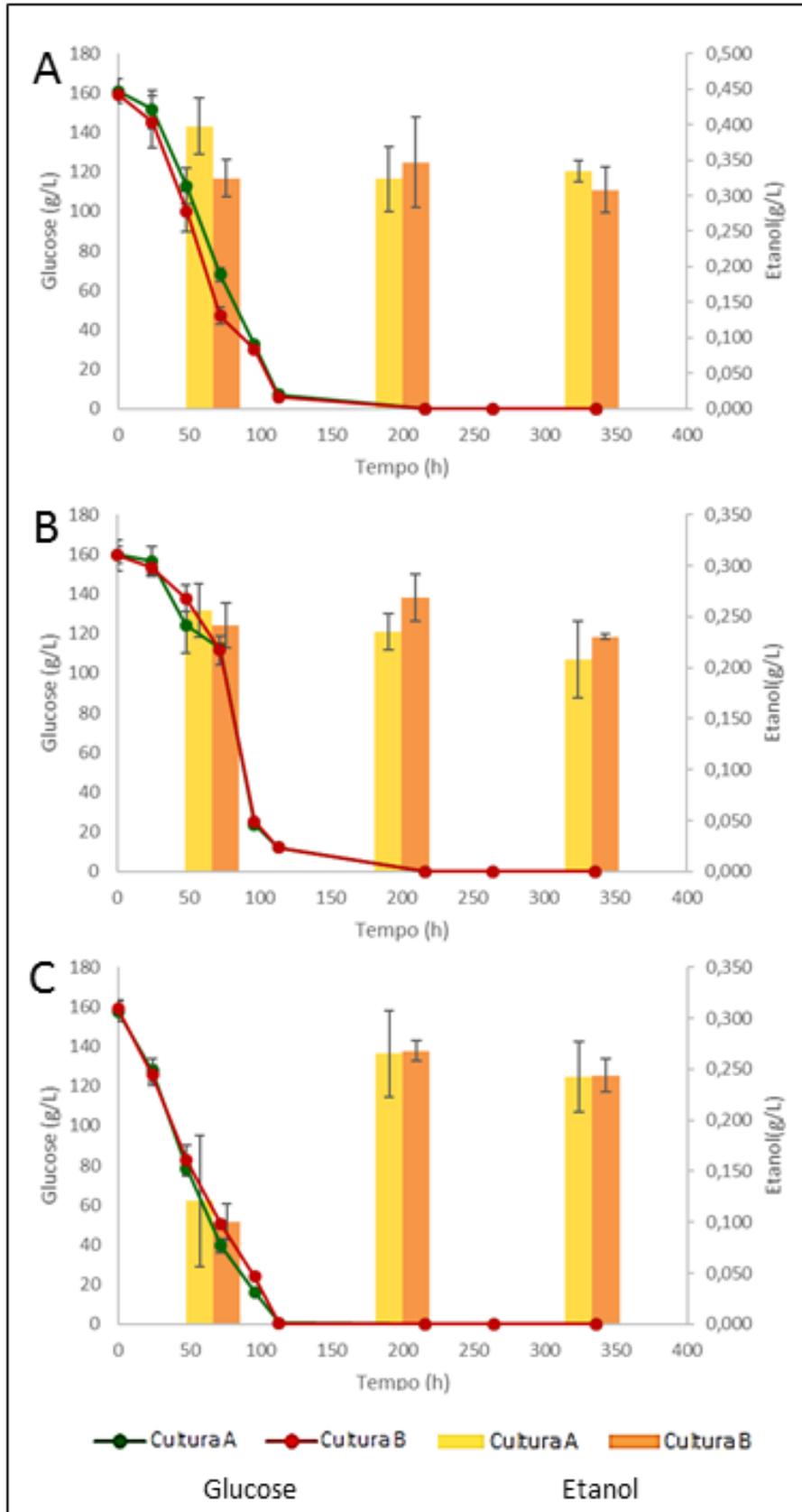


Figura 25- Perfil de consumo de glucose e produção de etanol referente às culturas de células livres em meio de mosto sintético sem arejamento. A- Levedura I; B- Levedura II; C- Levedura III. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

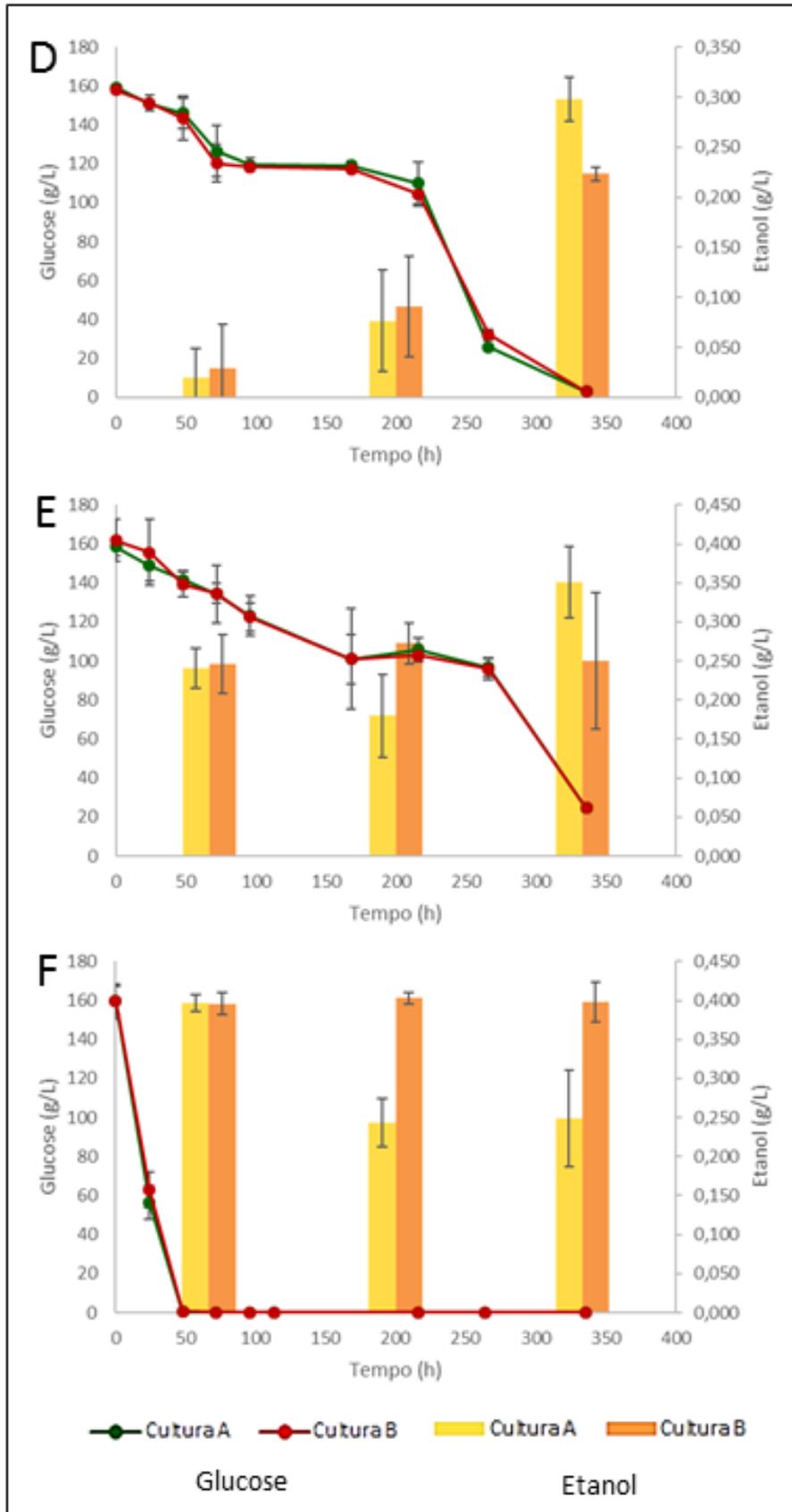


Figura 25 (Continuação)- Perfil de consumo de glucose e produção de etanol referente às culturas de células livres em meio de mosto sintético sem arejamento. D- Levedura VI; E- Levedura VII; F- Levedura XI. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

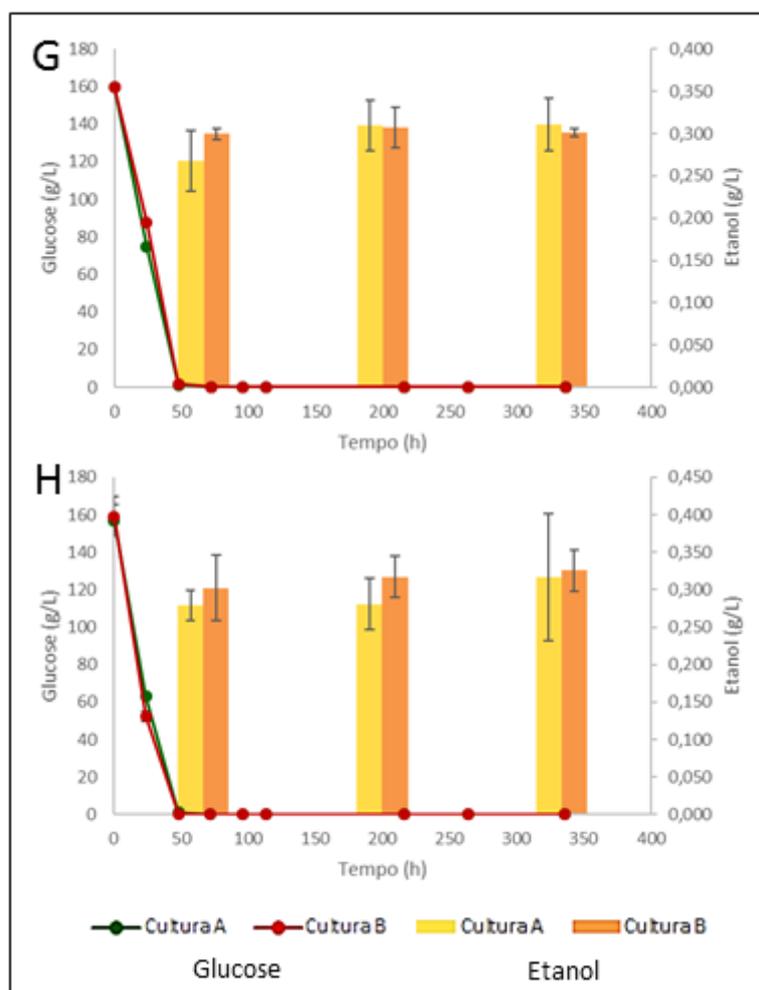


Figura 25 (Continuação)- Perfil de consumo de glucose e produção de etanol referente às culturas de células livres em meio de mosto sintético sem arejamento. G- Levedura XII; H- Levedura XIV. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

A partir da análise dos perfis de consumo de glucose é possível verificar que as leveduras XI, XII e XIV metabolizam a glucose mais rapidamente, tal como é comprovado pelos valores da taxa volumétrica de consumo de glucose mais elevados obtidos por estas estirpes (Tabela 11), observando-se valores inferiores a 1g/L desta fonte de carbono às 72h de cultura. As estirpes I, II e III apresentaram taxas volumétricas de consumo de glucose muito semelhantes, inferiores às anteriores. As leveduras VI e VII apresentaram um metabolismo fermentativo mais lento.



Tabela 11- Taxas volumétricas de consumo de glicose referentes às culturas de células livres em meio de mosto sintético sem arejamento

Estirpe	Taxa volumétrica de consumo de glicose (g.L ⁻¹ h ⁻¹)
I	1,450
II	1,476
III	1,438
VI	0,484
VII	0,400
XI	3,322
XII	3,305
XIV	3,318

Os resultados mostram que todas as estirpes têm capacidade para produzir etanol na ausência de O₂. Os valores de concentração de etanol são superiores quando comparados com os obtidos nas culturas aeróbias.

4.4. CONCLUSÃO

As estirpes isoladas têm uma boa capacidade de desenvolvimento celular em ambiente oxidativo, com potencialidade para a produção de biomassa.

As estirpes de levedura I, II, III, VI, VII, XI, XII e XIV demonstraram uma boa adaptação em ambiente fermentativo, revelando potencialidade para utilização em fermentação alcoólica e as estirpes XI, XII e XIV apresentaram um metabolismo mais rápido na conversão dos glúcidos redutores em etanol. Estes microrganismos apresentam propriedades promissoras para serem produzidos em cultura e testados em processos de imobilização, com vista a aplicações enológicas.

5. Imobilização de leveduras





5.1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos imobilizados pode constituir uma alternativa bastante vantajosa relativamente às inoculações tradicionais. Com efeito os sistemas de células microbianas imobilizadas permitem um aumento de tolerância a compostos que possam estar presentes no meio e que induzam toxicidade, diminui o tempo de adaptação dos microrganismos aos mostos, permite fermentações com valores de temperatura mais baixos, uma fácil separação dos microrganismos do mosto e uma redução do tempo de estabilização de alguns compostos (Stewart & Russell, 1986, Melzoch *et al.*, 1994; Jamai *et al.*, 2001; Kourkoutas *et al.*, 2001).

Existem referidos na bibliografia alguns estudos da aplicação de leveduras imobilizadas, em fermentação alcoólica de vinhos brancos (Genisheva *et al.*, 2012, 2014) e de vinhos espumantes (Gòdia *et al.*, 1991; Ntagas *et al.*, 2003; Puig-Pujol *et al.*, 2013). A degradação do ácido málico em vinhos tintos (Kosseva *et al.*, 1998; Maicas *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2010) ou a redução da acidez volátil (Vilela *et al.*, 2013) constituem outros exemplos das suas aplicações enológicas.

O sucesso destas soluções de imobilização está fortemente condicionado pelos custos de produção e pela durabilidade e eficácia dos sistemas. O tipo de suporte é um dos fatores mais decisivos na adequabilidade do processo de imobilização (Cha *et al.*, 2014). Como tal, é fundamental um estudo da seleção dos suportes mais promissoras para a imobilização dos microrganismos de interesse, tendo em conta não só a estabilidade do processo de imobilização, mas também a eficiência do sistema na biotransformação e a possibilidade da sua reutilização.

5.2. METODOLOGIA

5.2.1. IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO DE CÁLCIO

Para a imobilização de leveduras em alginato de cálcio, preparam-se suspensões celulares de cada estirpe de levedura em 5 mL de soro fisiológico estéril (células de uma rampa fresca de YPD), efetuando-se misturas com a seguinte composição: 4 mL de uma solução de alginato de sódio 2.5% (p/v) com 2 mL de suspensão celular. Em seguida, adicionou-se esta suspensão, gota a gota, com o auxílio de um micropipeta P1000, a 100 mL de uma solução de CaCl_2 2% (p/v), agitando-a suavemente. Deixou-se a mistura reacional em CaCl_2 durante 30 min até à polimerização do alginato de cálcio formando partículas esféricas contendo as células

imobilizadas. Posteriormente as partículas esféricas foram separadas por filtração com filtro *whatman*, e em seguida lavadas de H₂O destilada estéril (3x 10 mL).

5.2.2. IMOBILIZAÇÃO DAS LEVEDURAS EM SUPORTES INORGÂNICOS

Preparação da mistura de leveduras

Foram preparadas suspensões celulares com diferentes estirpes de leveduras, sendo estas agitadas suavemente por inversão e centrifugadas a 6000 rpm durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* celular recuperado pesado e dissolvido em H₂O estéril de forma a obter uma concentração final da suspensão celular de 9 g/L.

Foram preparados sistemas de matrizes de imobilização com dois tipos de consórcios, um para ser usado nas primeiras 48 h de fermentação, tendo sido retirado no final desse período e, substituído por outro até ao final da fermentação.

Imobilização das leveduras nos suportes

As leveduras foram imobilizadas em três matrizes: barro, pedra vulcânica e argila expandida.

Para os ensaios de imobilização efetuados em matrizes inorgânicas foram previamente selecionados fragmentos homogêneos de barro (18 g), pedra vulcânica (15 g) ou argila expandida (12 g) e esterilizados em autoclave a 115°C durante 20 min. Para cada material efetuou-se dois tipos distintos de imobilização: Sem Polimerização ou com Polimerização com alginato de Cálcio:

- Sem Polimerização
 - Nestes ensaios foram adicionados 12,5 mL da suspensão celular dos consórcios com 9 g/L aos diferentes suportes de imobilização, permanecendo em agitação durante 2 h de forma a promover a imobilização das células por adsorção física. Posteriormente, os imobilizados foram confinados numa bolsa de tela de algodão. Os ensaios foram efetuados em duplicado.
- Polimerização com alginato de Cálcio
 - Para estes ensaios foram preparadas misturas contendo 2,5 mL da suspensão celular de cada consórcio a 9 g/L e 10 mL de solução de alginato de sódio, as quais foram adicionadas a cada suporte, permanecendo em agitação durante



2h de forma a promover a adsorção das células nas matrizes. Posteriormente, os fragmentos de cada suporte contendo as células imobilizadas foram colocados numa bolsa de tela de algodão e imersos numa solução de CaCl_2 a 2% durante 30 min de forma a promover a polimerização a alginato. Os sistemas de imobilização foram posteriormente lavados com H_2O destilada estéril (3x 10 mL). Os ensaios foram efetuados em duplicado.

Preparação das fermentações com os sistemas de imobilização

Os sistemas de imobilização foram colocados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de mosto sintético. Estes foram incubados a 30°C, sem agitação, e selados com *parafilm*. Foram também efetuadas culturas em células livres e com imobilização em esferas de alginato de cálcio para estes dois consórcios.

5.2.3. RECOLHA E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Foi monitorizado, ao longo do tempo, o consumo de glucose e a produção de etanol. Para tal, foram recolhidas amostras de 500 μL para microtubos em intervalos de tempo periódicos. As amostras foram imediatamente colocadas em gelo para garantir a paragem da atividade celular e centrifugadas a 15000g durante 12 min a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante e guardou-se a -20°C para posterior quantificação de glucose e etanol.

5.2.4. QUANTIFICAÇÃO DA GLUCOSE

A quantificação dos glúcidos redutores efetuou-se pelo método do DNS, de acordo com um procedimento adaptado na literatura (Vasconcelos *et al.*, 2013) e utilizou-se uma curva de calibração (Anexo 5) com soluções padrão de D-glucose (100-1000 mg/L).

5.2.5. QUANTIFICAÇÃO DE ETANOL

A quantificação do etanol foi realizada por kit enzimático (NZYTech, *Ethanol, UV method*), tal como descrito no ponto 4.2.6.

5.2.6. ANÁLISE DOS SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO POR SEM-EDS

os diferentes imobilizados foram analisados por microscopia eletrónica de varrimento com espectroscopia de energia dispersiva de raios-x (SEM-EDS). Utilizou-se um microscópio

eletrónico (Hitachi S-3700N) acoplado a um detetor de espectrometria de raios-x Bruker Xflash 5010 SD. As amostras previamente secas durante 6 dias em estufa a 37°C, foram colocadas no porta amostras sobre fita de carbono e analisadas em alto vácuo a 20kV, no modo de eletrões secundários. As composições elementares foram obtidos através do *software* Bruker Esprit v-19. A análise de EDS foi usada para determinar e mapear a composição de elementos presentes (Salvador *et al.*, 2017).

5.2.7. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE REUTILIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO

A capacidade de reutilização dos sistemas desenvolvidos (alginato de cálcio, barro, tufo vulcânico e argila expandida) foi avaliada em culturas de mosto sintético com incubação a 30°C na ausência de arejamento. Os sistemas de matrizes produzidos com os dois consórcios de leveduras diferentes foram testados em separado, efetuando-se uma monitorização da capacidade fermentativa dos consórcios durante 7 dias. Executaram-se 5 ciclos sucessivas de reutilização, nas mesmas condições.

5.2.8. ENSAIO EM MOSTO DE UVAS BRANCAS DOS CONSÓRCIOS DE LEVEDURAS EM CULTURAS LIVRES E IMOBILIZADAS

Efetuaram-se culturas com mosto proveniente das castas Antão Vaz e Roupeiro (Figura 29). O mosto foi previamente clarificado por centrifugação a 12000 rpm durante 12min a 4°C e as microvinificações foram efetuadas em erlenmeyers de 250mL com os consórcios livres inoculados diretamente ou com os consórcios imobilizados. O sistema de imobilização escolhido foi a argila expandida e as culturas foram montadas através do procedimento descrito em 5.2.2. Para a monitorização do estado da cultura, foram recolhidas amostras de acordo com o procedimento escrito 5.2.3. e os parâmetros estudados foram a glucose e o etanol, os quais foram quantificados ao longo do ensaio de acordo com a metodologia definida nos pontos 5.2.4. e 5.2.5. A acidez total do mosto inicial e do vinho foi determinada em conformidade com a Norma Portuguesa 2139 de 1987 (Anexo 6), e o pH foi lido com um potenciómetro METROHM® 632 pH-Meter.



5.3. **RESULTADOS**

5.3.1. CAPACIDADE FERMENTATIVA DAS ESTIRPES DE LEVEDURAS IMOBILIZADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO

Após o estudo da capacidade fermentativa das leveduras em culturas livres, procedeu-se ao estudo de cada estirpe na forma imobilizada em alginato de cálcio, com intuito de perceber se estas tinham capacidade de adaptação ao processo de imobilização e se mantinham a capacidade fermentativa.

Os resultados obtidos para o consumo de glucose e produção de etanol ao longo do tempo estão apresentados na figura 26.

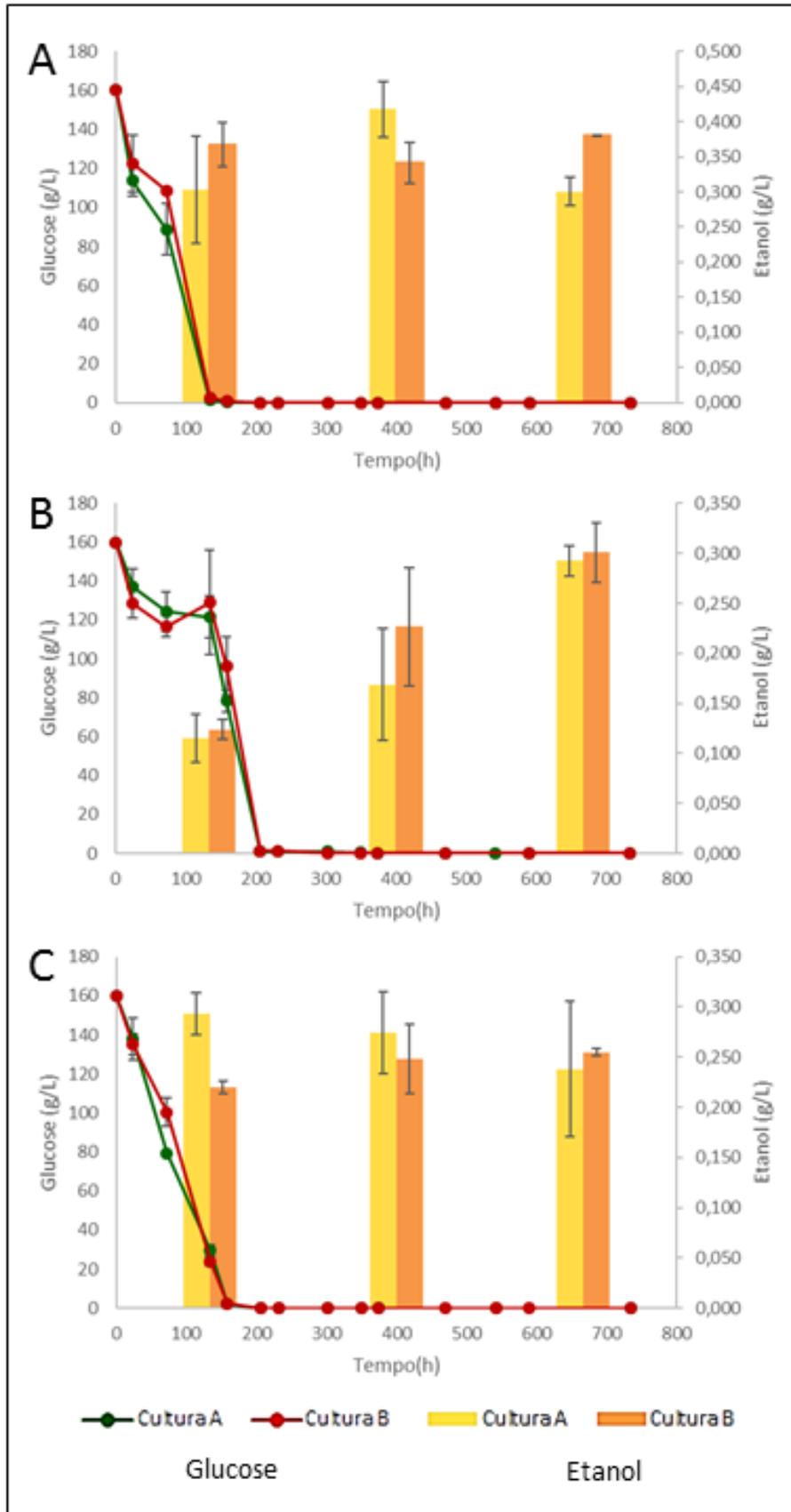


Figura 26- Perfis de consumo de glucose e produção de etanol para as leveduras imobilizadas na matriz de alginato de cálcio. A- Levedura I; B- Levedura II; C- Levedura III.

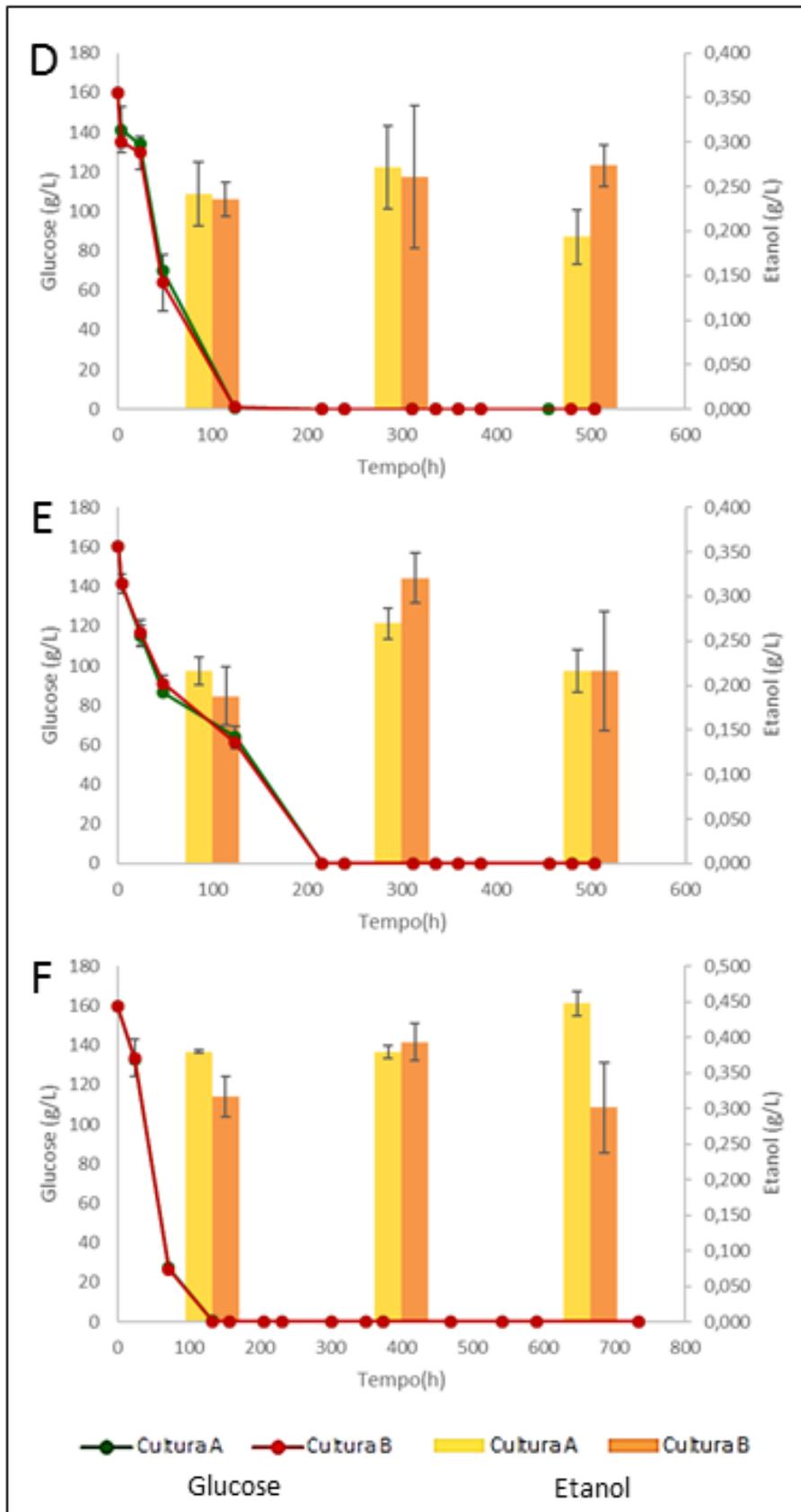


Figura 26 (Continuação)- Perfis de consumo de glucose e produção de etanol para as leveduras imobilizadas na matriz de alginato de cálcio. D- Levedura VI; E- Levedura VII; F- Levedura XI.

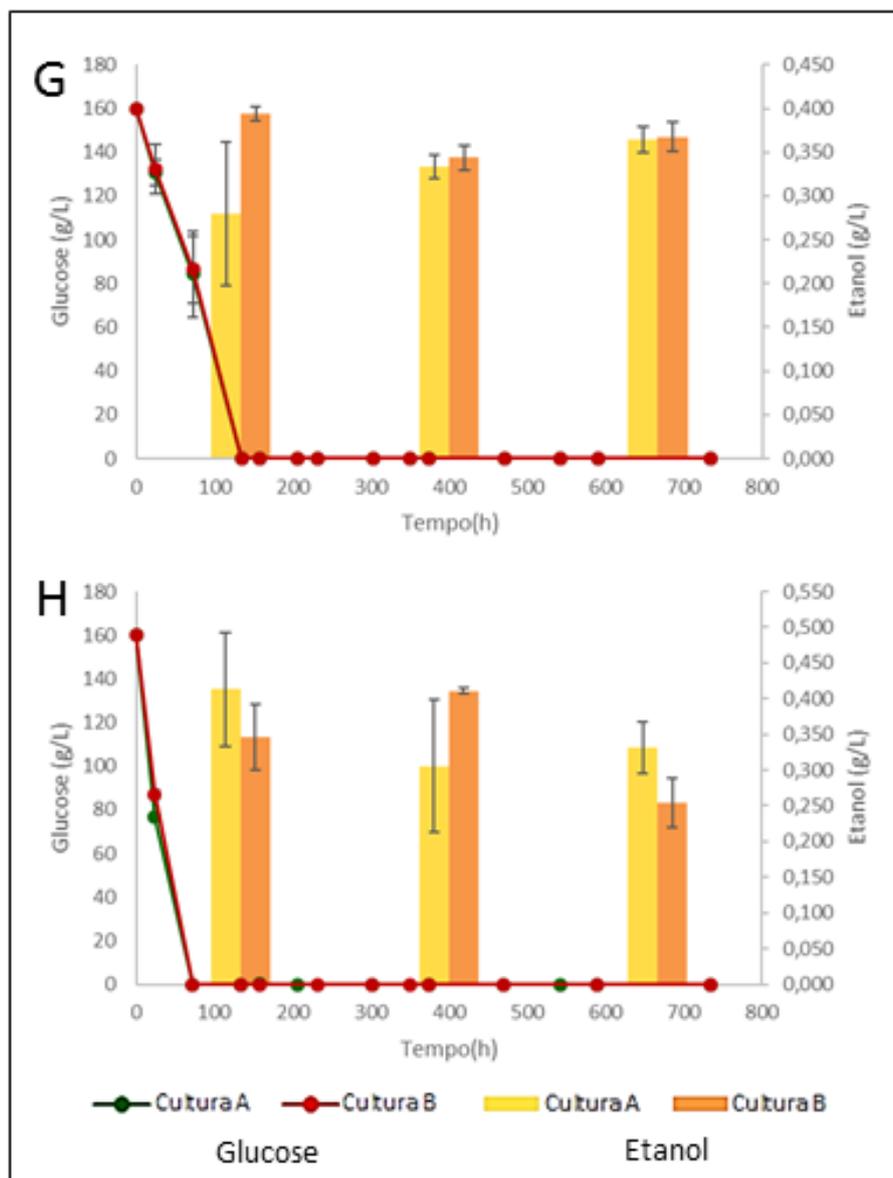


Figura 26 (Continuação)- Perfis de consumo de glucose e produção de etanol para as leveduras imobilizadas na matriz de alginato de cálcio. A- Levedura XII; B- Levedura XIV.

Os resultados obtidos com as células imobilizadas mostraram uma boa capacidade de metabolização da glucose existente no meio, com cinéticas de metabolização comparáveis às células livres.

A glucose disponível na cultura foi consumida durante as primeiras 100-200 horas de cultura, consoante as estirpes e as taxas volumétricas de consumo variaram entre 0,666 e 2,148 g.L⁻¹h⁻¹ (Tabela 12) A estirpe que apresentou maior capacidade de metabolização neste sistema de imobilização foi a XIV. A estirpes I, VI, XI e XII apresentaram taxas mais baixas bastante semelhantes entre elas. As restantes estirpes, II, III e VII apresentaram as taxas mais baixas.

Tabela 12- Taxas volumétricas de consumo de glucose para as culturas sem arejamento de leveduras imobilizadas em esferas de alginato de cálcio em meio de mosto sintético

Estirpe	Taxa volumétrica de consumo de glucose (g.L ⁻¹ h ⁻¹)
I	1,104
II	0,756
III	0,999
VI	1,253
VII	0,666
XI	1,198
XII	1,179
XIV	2,148

Em relação à produção de etanol todas as fermentações mantêm potencial de produção, o que demonstra que a imobilização das estirpes não condiciona a capacidade destas para a realização da fermentação alcoólica.

5.3.2. CAPACIDADE FERMENTATIVA DE CULTURAS MISTAS IMOBILIZADAS

Nas figuras 27-30 podem observar-se os perfis de consumo de glucose e produção de etanol em função do tempo para as culturas mistas imobilizadas em alginato de cálcio, barro, tufo vulcânico e argila expandida, respetivamente. As culturas foram efetuadas em duas fases, na primeira fase (até às 48h de cultura) foi utilizado um primeiro consórcio (C1) composto por leveduras com pequena capacidade de produção de etanol, numa segunda fase (após as 48h) este consórcio foi substituído por um segundo (C2), composto por leveduras de cariz fermentativo.

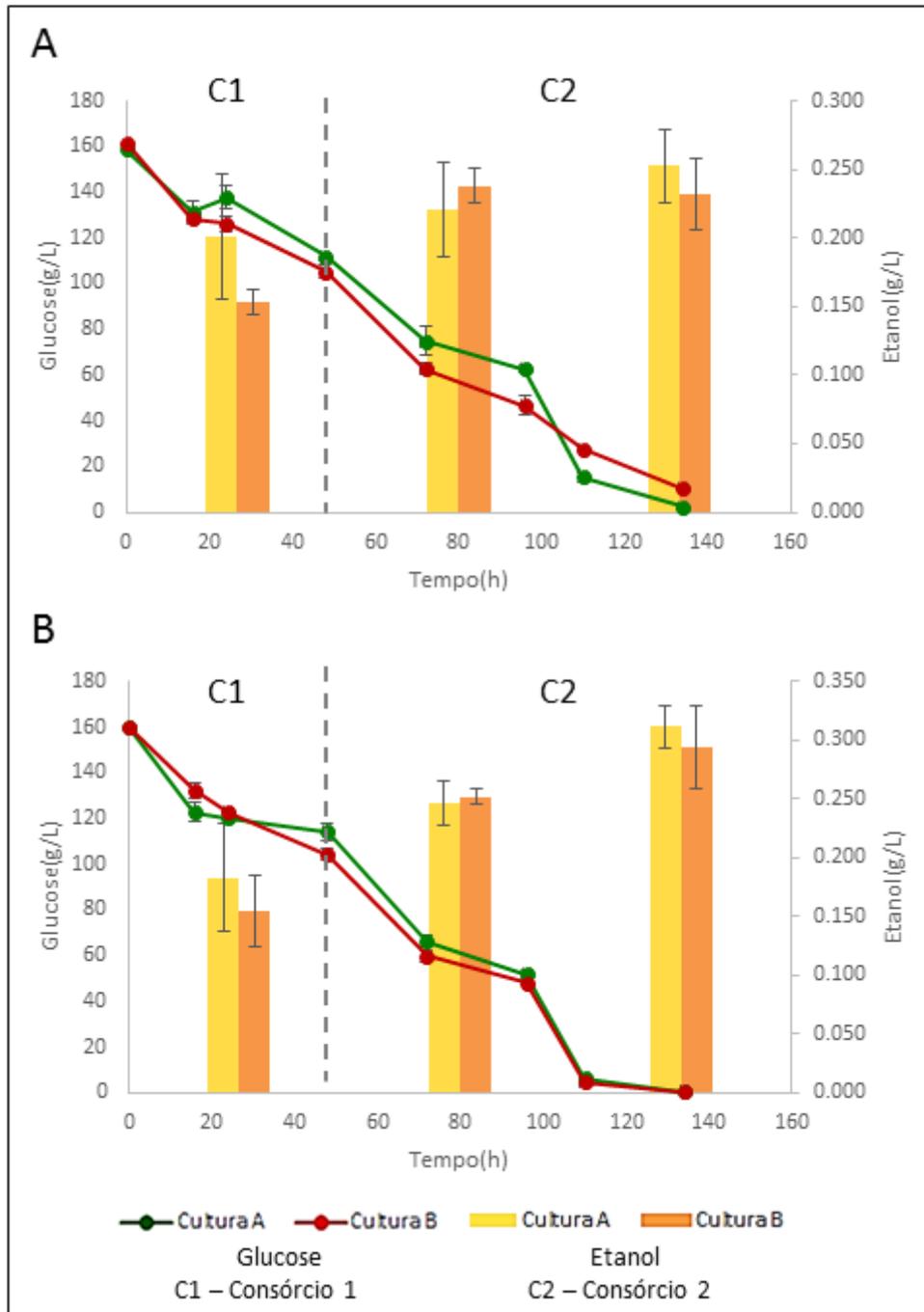


Figura 27- Perfis de consumo de glicose para os consórcios de leveduras 1 e 2. A- Cultura com os consórcios inoculados; B- Cultura com os consórcios imobilizados na matriz de alginato de cálcio.

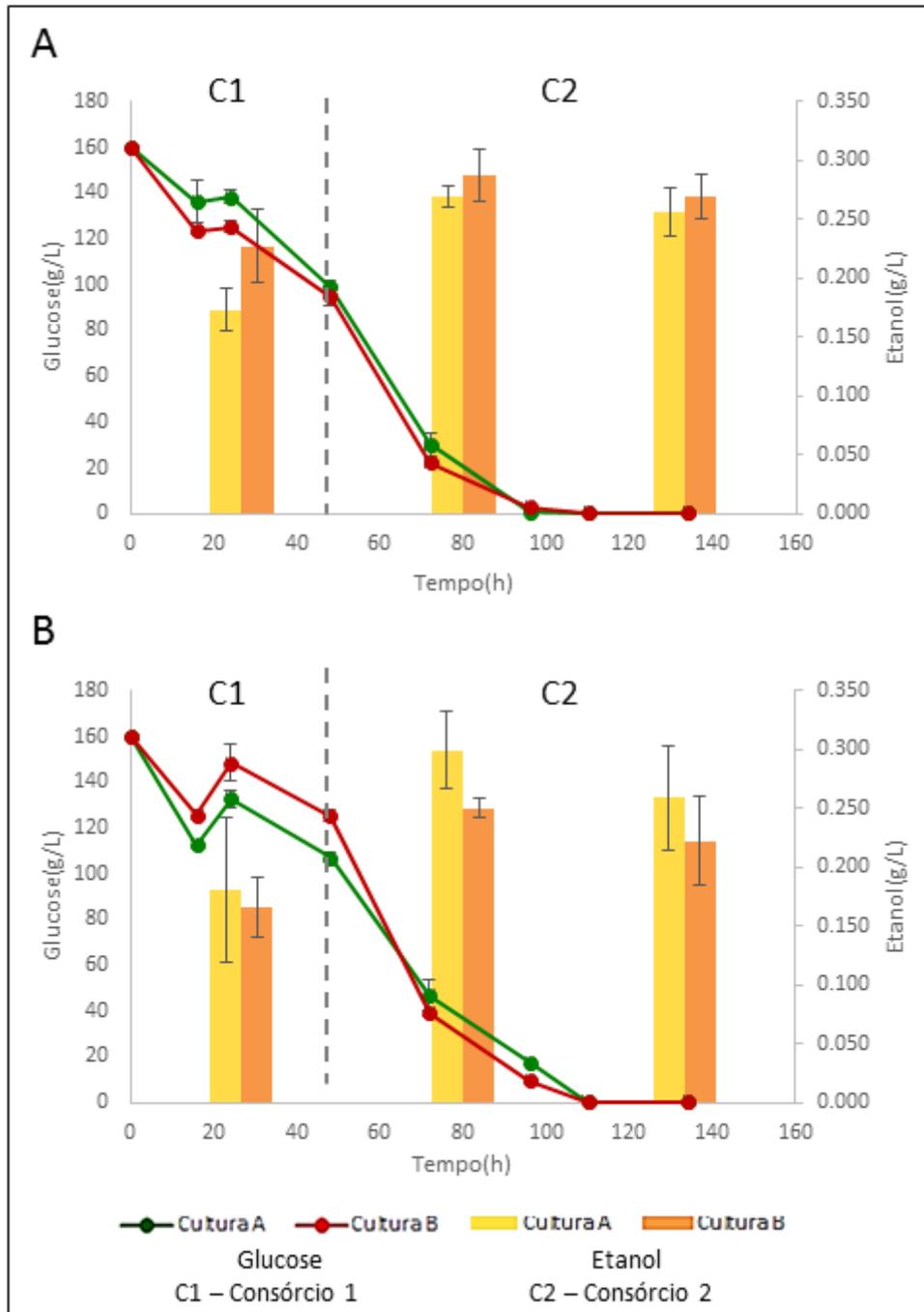


Figura 28- Perfis de consumo de glicose para os consórcios de leveduras 1 e 2. A- Culturas com os consórcios imobilizados em matriz de barro; B- Cultura com os consórcios imobilizados em matriz de barro com polimerização.

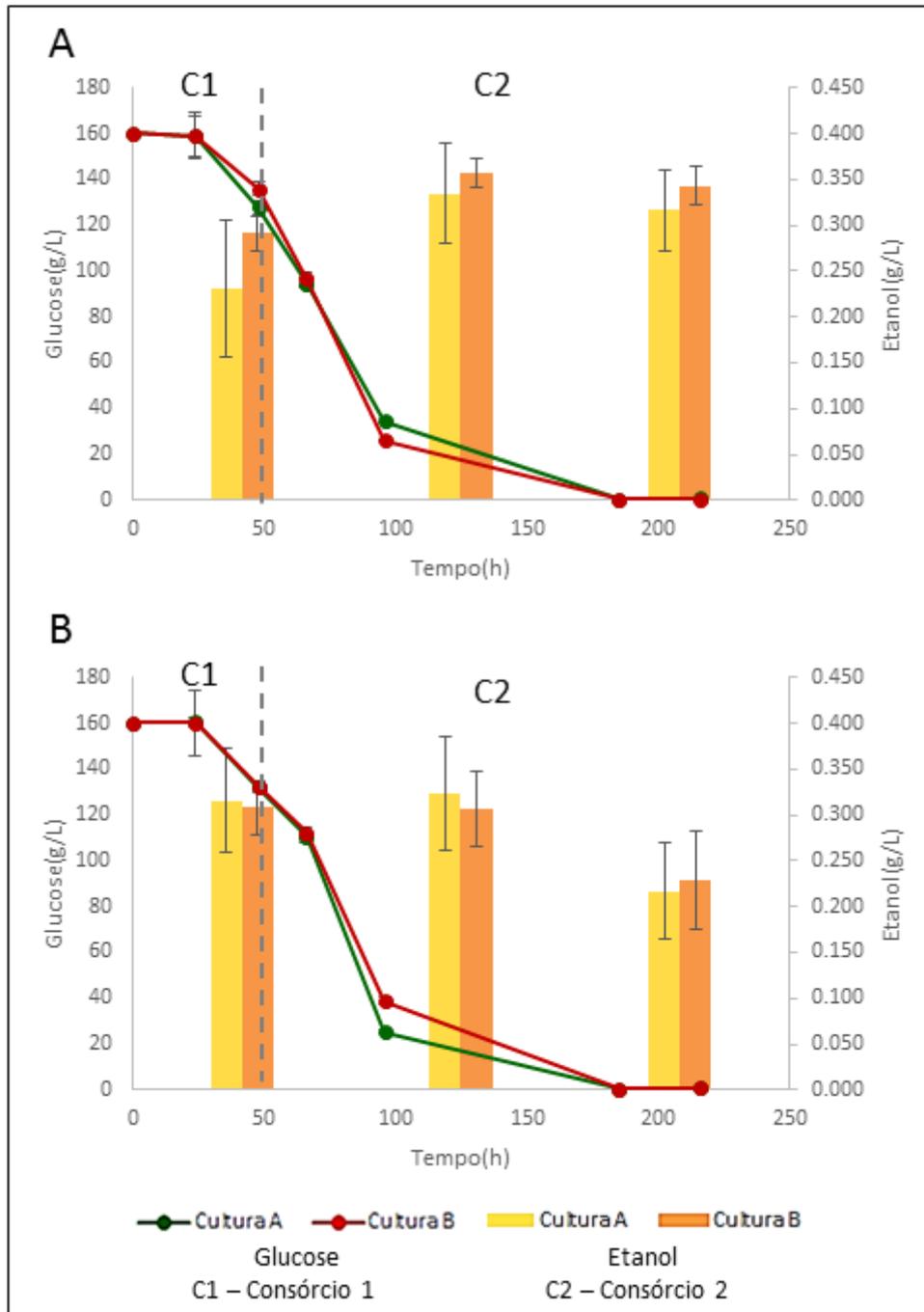


Figura 29- Perfis de consumo de glucose para os consórcios de leveduras 1 e 2. A- Culturas com os consórcios imobilizados em matriz de tufo vulcânico; B- Cultura com os consórcios imobilizados em matriz de tufo vulcânico com polimerização.

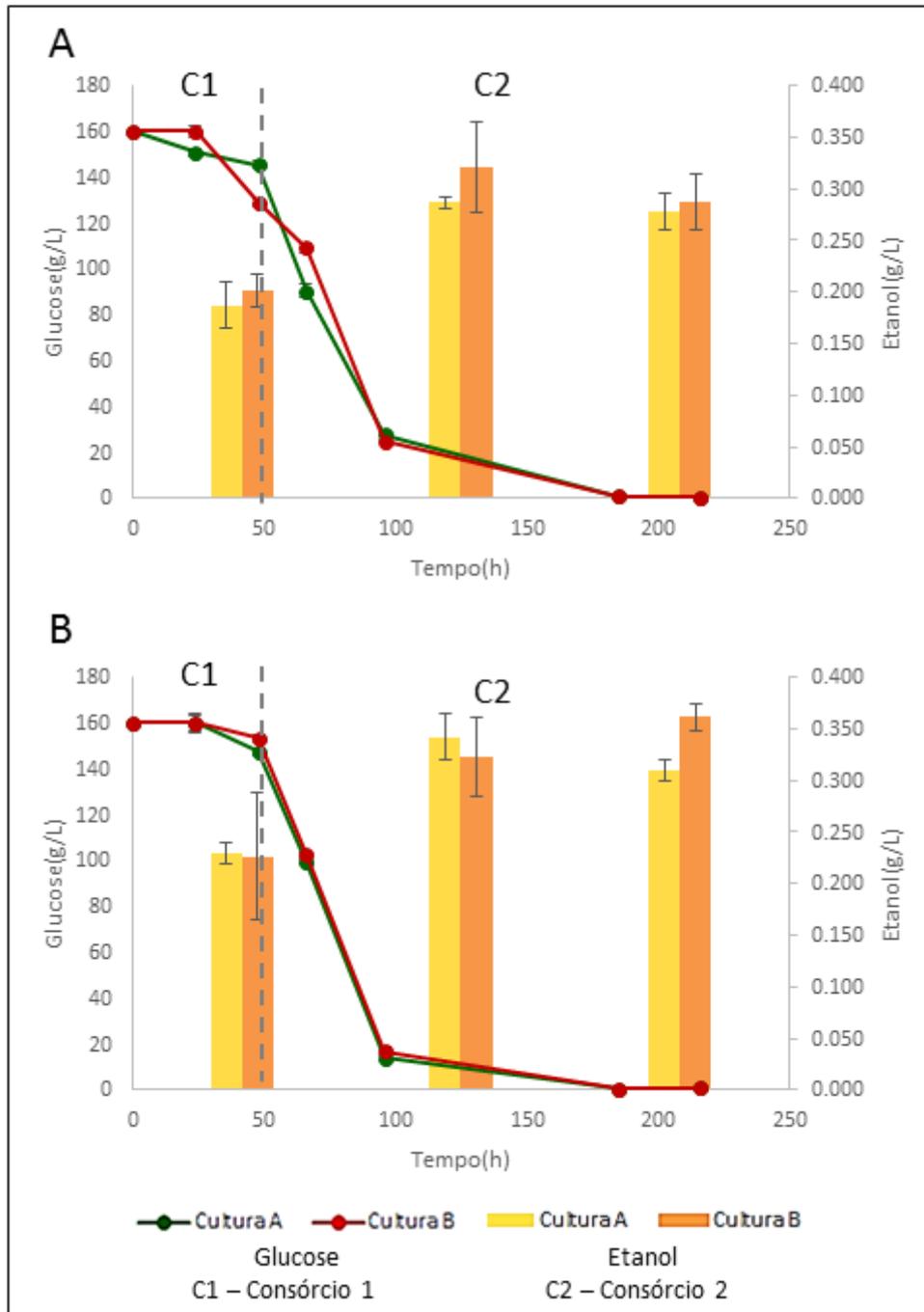


Figura 30- Perfis de consumo de glucose para os consórcios de leveduras 1 e 2. A- Culturas com os consórcios imobilizados em matriz de argila expandida; B- Cultura com os consórcios imobilizados em matriz de argila expandida com polimerização.

As figuras 28-30 mostram que os sistemas de imobilização dos consórcios de leveduras nas matrizes de barro, tufo vulcânico e argila expandida tem capacidade para converter toda a glucose existente no meio durante as primeiras 200h de cultura e produzir etanol.

Comparando as imobilizações com e sem polimerização, os valores da taxa volumétrica de utilização da glucose (Tabela 13) foram bastante semelhantes para todas as matrizes em estudo à exceção do suporte de argila expandida e do suporte de barro, aquando da utilização do consórcio C1.

As culturas efetuadas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e matriz de barro apresentam taxas volumétricas de consumo de glucose muito semelhantes às observadas nas culturas de células livres, contudo estes valores podem revelar também um crescimento de células em suspensão devido à libertação de células destes suportes para o meio de cultura. Este facto foi corroborado pela observação de uma maior turbidez nestas culturas ao final da fermentação. Relativamente às taxas volumétricas de consumo de glucose obtidas na utilização do consórcio 2, observa-se que estas são bastantes semelhantes para todos os sistemas de imobilização testados, comprovando o sucesso de imobilização do consórcio de leveduras nas diferentes matrizes.

Comparando os consórcios 1 e 2, o segundo demonstra taxas volumétricas de consumo de glucose superiores ao primeiro, o que comprova a maior capacidade fermentativa das leveduras que o compõem relativamente ao primeiro.

Tabela 13- Taxas volumétricas de consumo de glucose para as culturas livres e imobilizadas nas várias matrizes sem arejamento com os consórcios de leveduras 1 e 2 em meio de mosto sintético.

	Taxa volumétrica de consumo de glucose (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	
	Consórcio 1	Consórcio 2
Livres	1,081	1,370
Alginato de Cálcio	1,045	1,510
Barro	1,304	1,985
Barro com polimerização	0,915	1,903
Tufo Vulcânico	0,586	0,900
Tufo Vulcânico com polimerização	0,578	0,951
Argila Expandida	0,471	0,938
Argila Expandida com Polimerização	0,198	1,094

No que respeita à produção de etanol, todos os sistemas mostraram capacidade para produção. No final do período de utilização do consórcio C1 (entre as 0 e 48h), todas as culturas mostraram produção do etanol (Figuras 27-30). No final das 48h as culturas com imobilização mista apresentaram menor turbidez do mosto, evidenciando a maior



estabilidade. No final das fermentações as culturas apresentaram uma concentração de etanol produzido superior à obtida às 48h.

No final do ensaio as culturas efetuadas com imobilização mista foram as que apresentaram menor turbidez, em particular com a matriz de argila, evidenciando que os sistemas de imobilização mista podem constituir uma boa opção para este tipo de processos fermentativos. O suporte de argila expandida mostrou uma boa estabilidade mecânica aliada à melhor capacidade para retenção celular, constituindo um material bastante atrativo para estes processos de imobilização.

De forma a confirmar o sucesso e a estabilidade da imobilização dos consórcios de leveduras nos vários sistemas de imobilização testados, efetuaram-se análises das diversas matrizes de imobilização antes e no final da fermentação, por microscopia eletrônica de varrimento (SEM). As imagens obtidas referentes às diferentes amostras da matriz contendo as células imobilizadas nos suportes com e sem polimerização estão apresentadas nas figuras 31 a 33- C e D. As análises microscópicas foram acompanhadas de análises químicas efetuadas por SEM-EDS, realizadas tanto à matriz (Figuras 31 a 33- A, B) como a zonas de observação de células imobilizadas por adsorção física (Figuras 31 a 33- E, F) e por imobilização mista (figuras 31 a 33- G, H) permitido determinar e mapear as diferentes composições elementares.

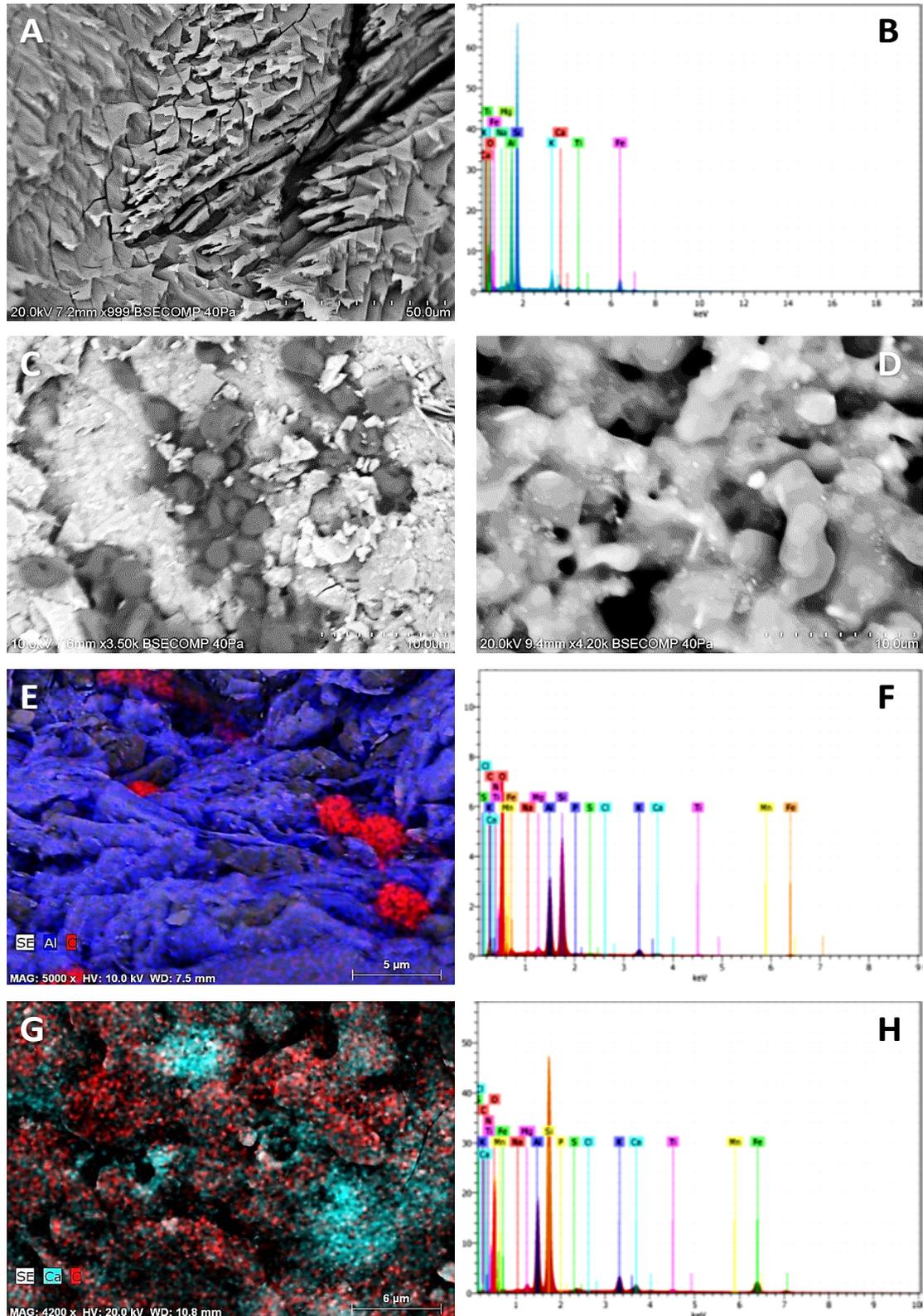


Figura 31- Análise SEM-EDS do sistema de imobilização em suporte de barro com células do consórcio 2 ao final da fermentação. A - Micrografia de SEM da matriz de barro; B – Análise química da matriz de barro; C- Micrografia de SEM de amostra do sistema de imobilização evidenciando células imobilizadas no suporte de barro; D - Micrografia de SEM de amostra evidenciando células imobilizadas no suporte de barro com polimerização; E e F - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos alumínio (Al) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com células imobilizadas; G e H - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos cálcio (Ca) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com polimerização com células imobilizadas.

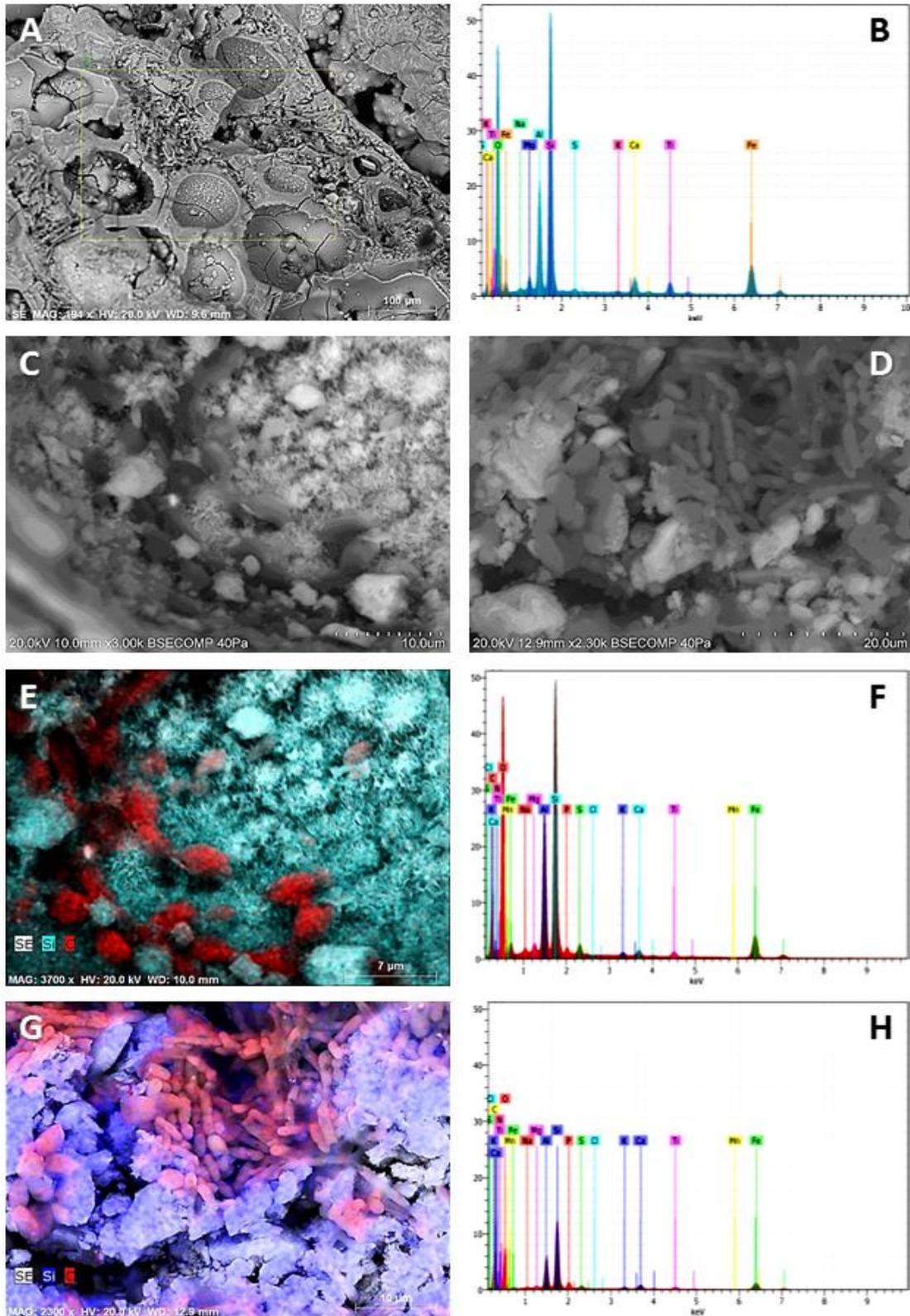


Figura 32- Análise SEM-EDS do sistema de imobilização em suporte de tufo vulcânico com células do consórcio 2 ao final da fermentação. A- Micrografia de SEM da matriz de tufo vulcânico; B – Análise química da matriz de tufo vulcânico; C- Micrografia de SEM de amostra do sistema de imobilização evidenciando células imobilizadas no suporte de tufo vulcânico; D - Micrografia de SEM de amostra evidenciando células imobilizadas no suporte de tufo vulcânico com polimerização; E e F - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos alumínio (Al) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com células imobilizadas; G e H - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos cálcio (Ca), silício(Si) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com polimerização com células imobilizadas.

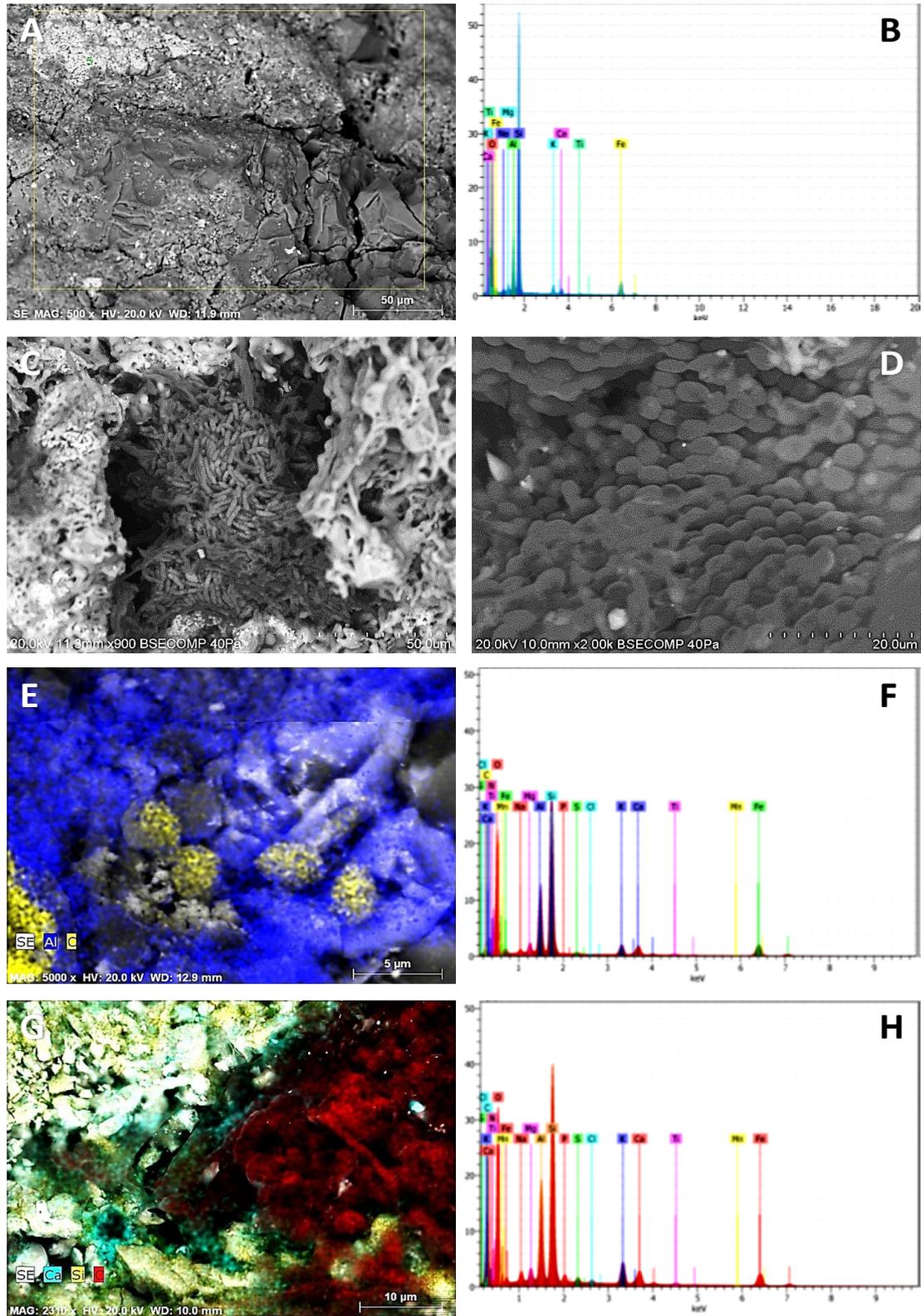


Figura 33- Análise SEM-EDS do sistema de imobilização em suporte de argila expandida com células do consórcio 2 ao final da fermentação. A- Micrografia de SEM da matriz de argila expandida; B – Análise química da matriz de argila expandida; C- Micrografia de SEM de amostra do sistema de imobilização evidenciando células imobilizadas no suporte de argila expandida; D - Micrografia de SEM de amostra evidenciando células imobilizadas no suporte de argila expandida com polimerização; E e F - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos silício (Si) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com células imobilizadas; G e H - Análise química com mapeamento 2D mostrando a distribuição dos elementos silício (Si) e carbono (C) de zona da matriz de imobilização com polimerização com células imobilizadas.



As microanálises químicas de EDS efetuada às diversas matrizes de imobilização permitiram efetuar a identificação e a distribuição espacial dos constituintes inorgânicos. As 3 matrizes utilizadas, barro (figura 31- A, B), tufo vulcânico (figura 32- A, B), e matriz de argila expandida (figura 33- A, B), são constituídas por silício (Si), oxigénio (O) e alumínio (Al) como elementos maioritários da sua composição, tendo o ferro (Fe) sobressaído no suporte de tufo vulcânico.

As micrografias de SEM efetuadas em diferentes amostras de cada matriz contendo as células imobilizadas (Figuras 31, 32 e 33- C, D) permitiram distinguir claramente os aspetos micromorfológicos das várias estirpes que constituem os consórcios, corroborando os resultados de caracterização da análise morfológica realizada por microscopia ótica. Relativamente à análise química podemos detetar a presença de constituintes orgânicos, carbono (C), azoto (N), oxigénio (O) e enxofre (S) (figuras 31, 32 e 33 – E, F, G e H), indicadores da presença microbiológica na matriz, confirmando a presença das células imobilizadas, o que revela uma grande estabilidade deste sistema de imobilização e da sua capacidade na retenção de células, evidenciando o seu potencial em processos enológicos.

As amostras dos diferentes sistemas de imobilização em estudo, do final da fermentação, permitiram detetar a presença das células imobilizadas, demonstrando a estabilidade dos sistemas após utilização.

5.3.3. CAPACIDADE DE REUTILIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO

Avaliou-se a capacidade de reutilização dos sistemas celulares em meio de mosto sintético. As Figuras 34-40 mostram os perfis de consumo de glucose obtidos para cinco reutilizações na matriz de alginato de cálcio e nos suportes de barro, tufo vulcânico e argila expandida com e sem polimerização, para os consórcios de leveduras C1 e C2.

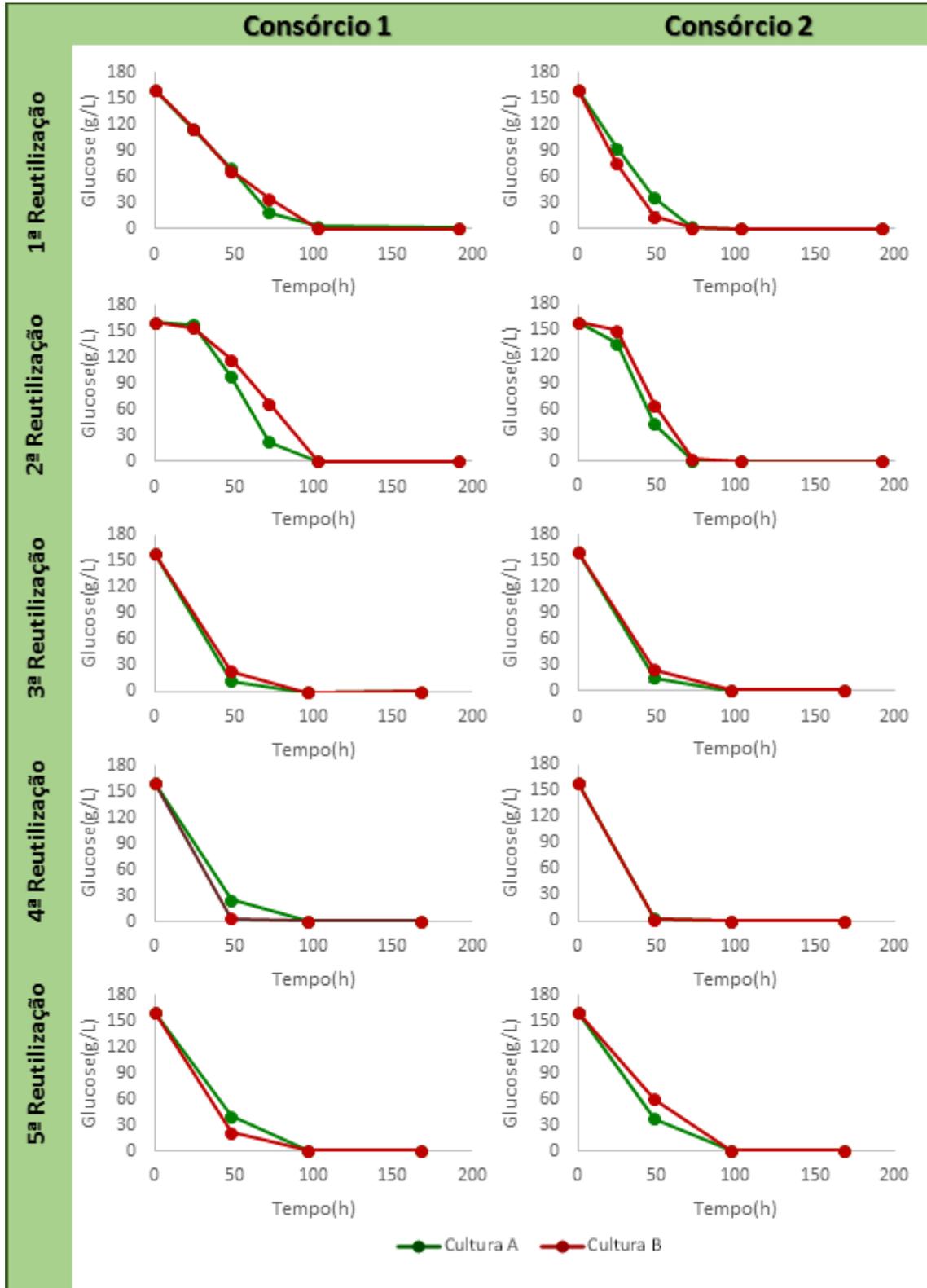


Figura 34- Perfis de consumo de glucose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de alginato de cálcio para os consórcios de leveduras C1 e C2.

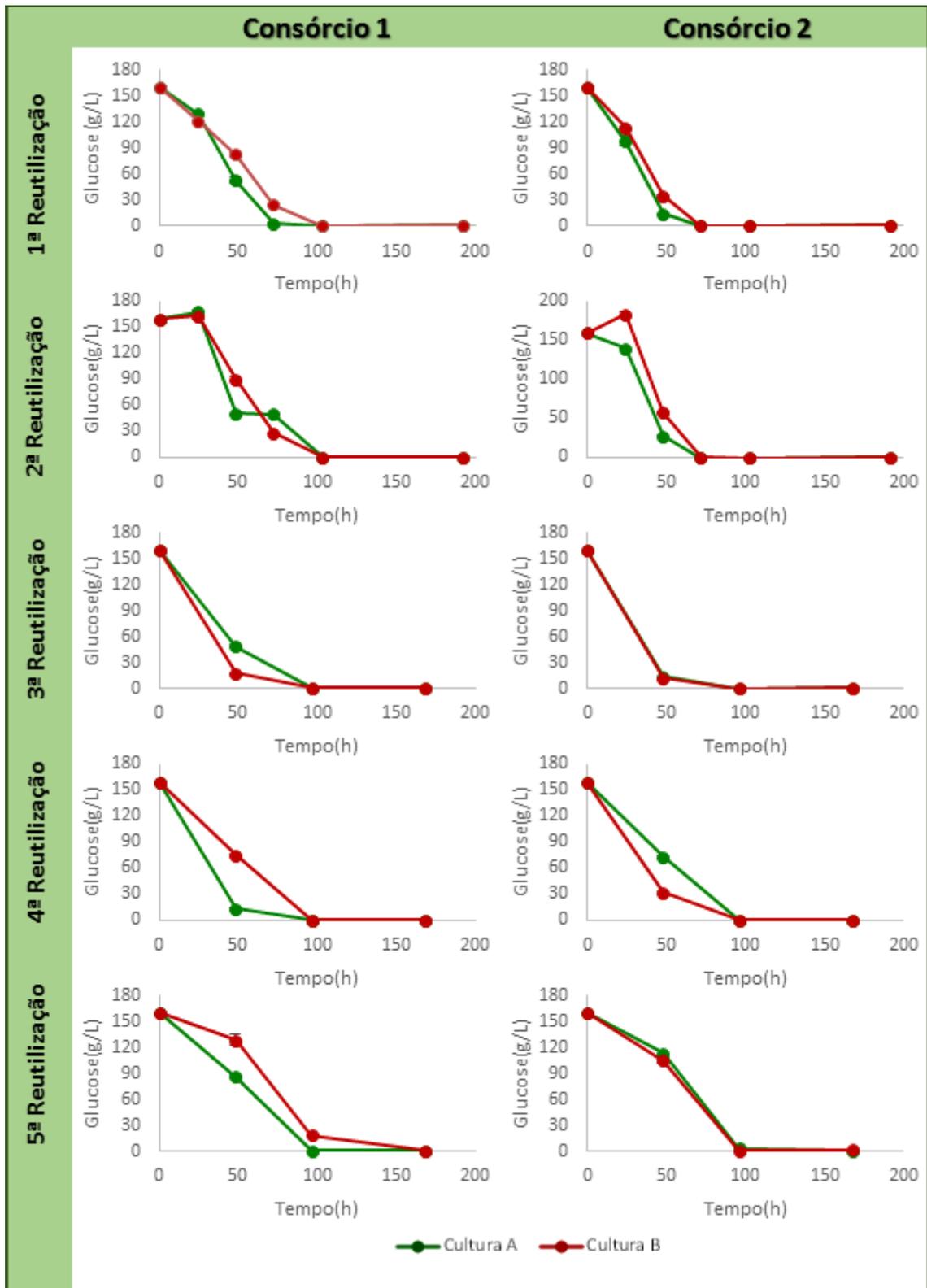


Figura 35- Perfis de consumo de glicose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de barro para os consórcios de leveduras C1 e C2.

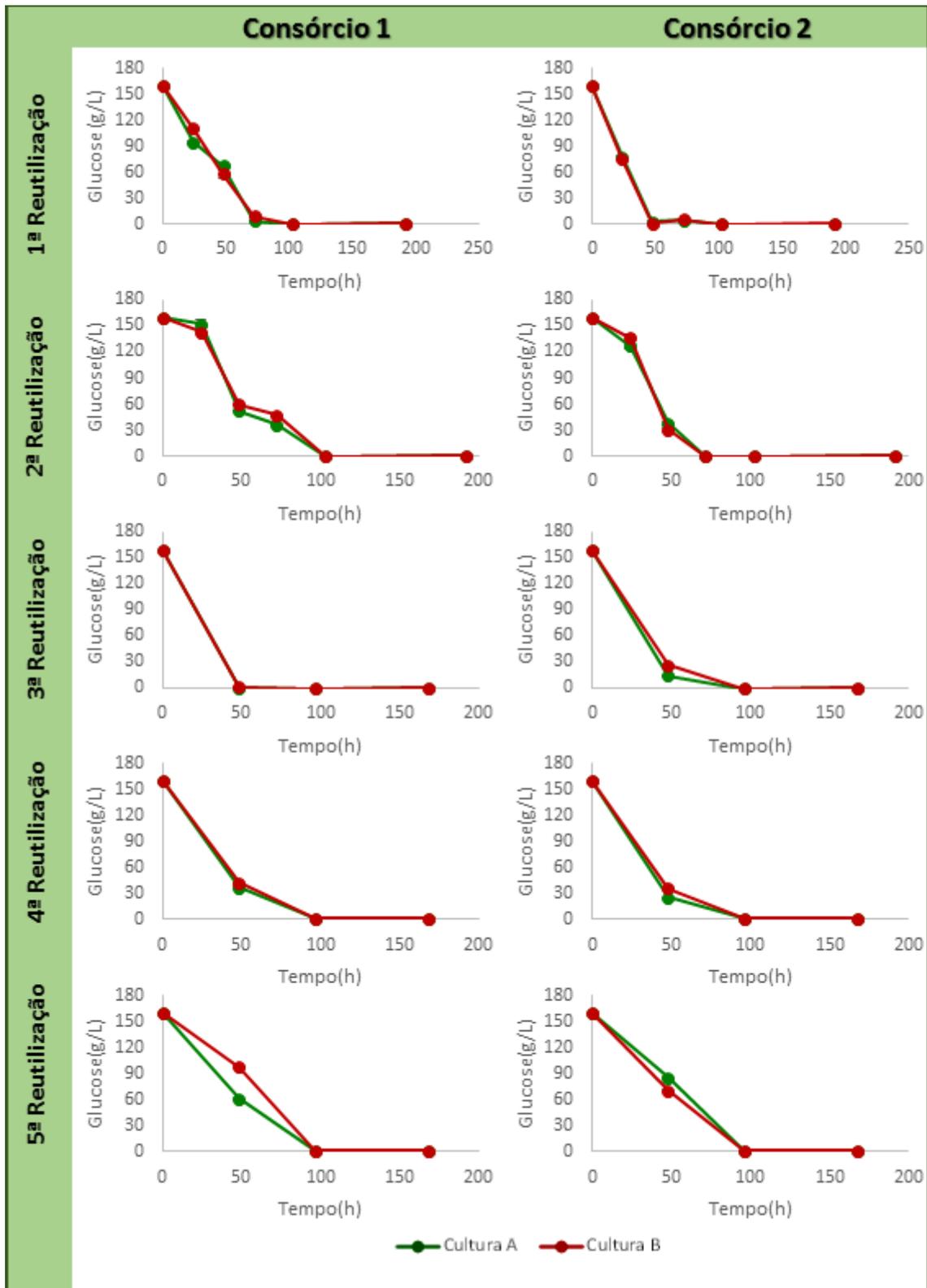


Figura 36- Perfis de consumo de glicose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de barro com polimerização para os consórcios de leveduras C1 e C2.

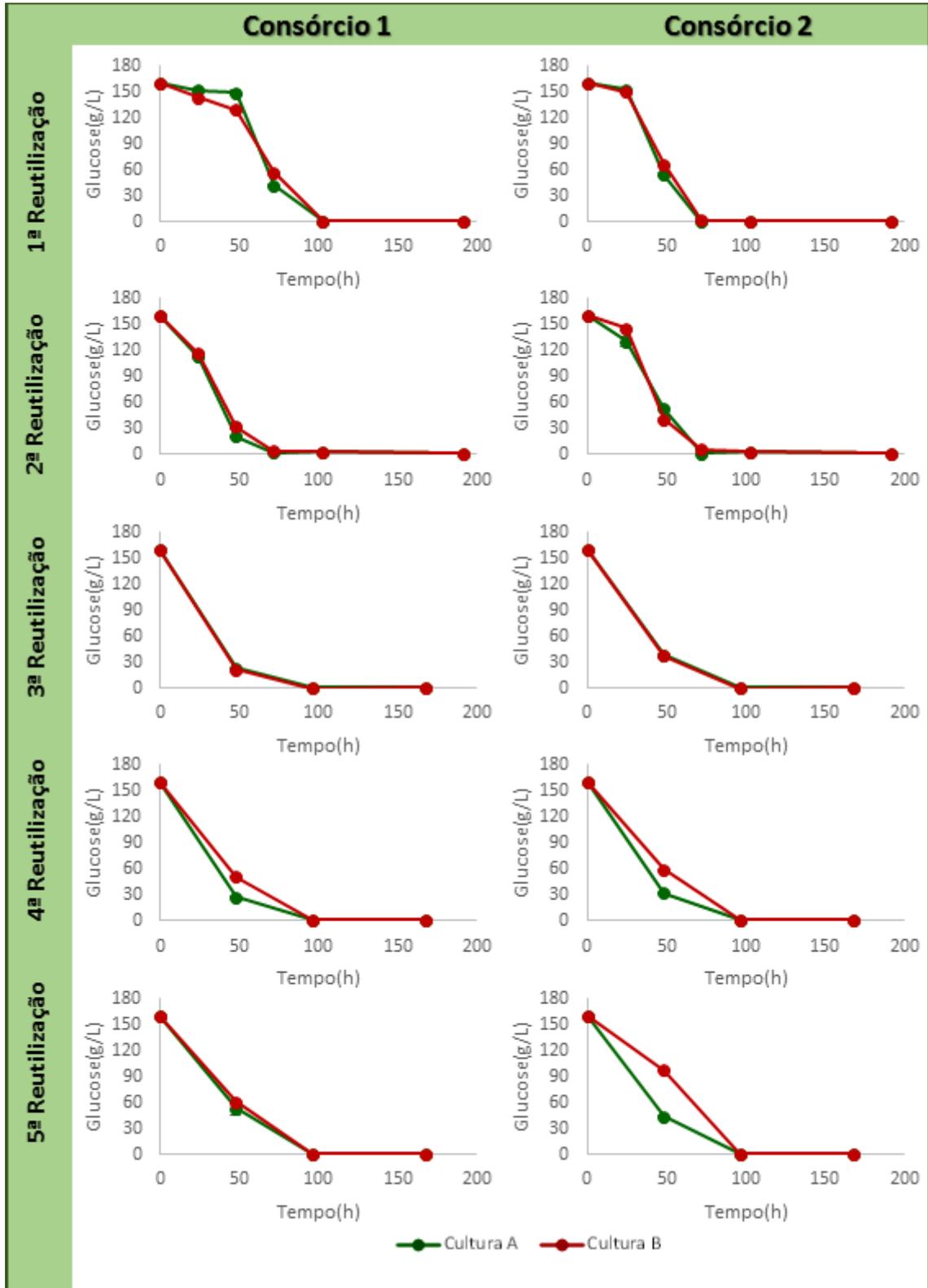


Figura 37- Perfis de consumo de glucose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de tufo vulcânico para os consórcios de leveduras C1 e C2.

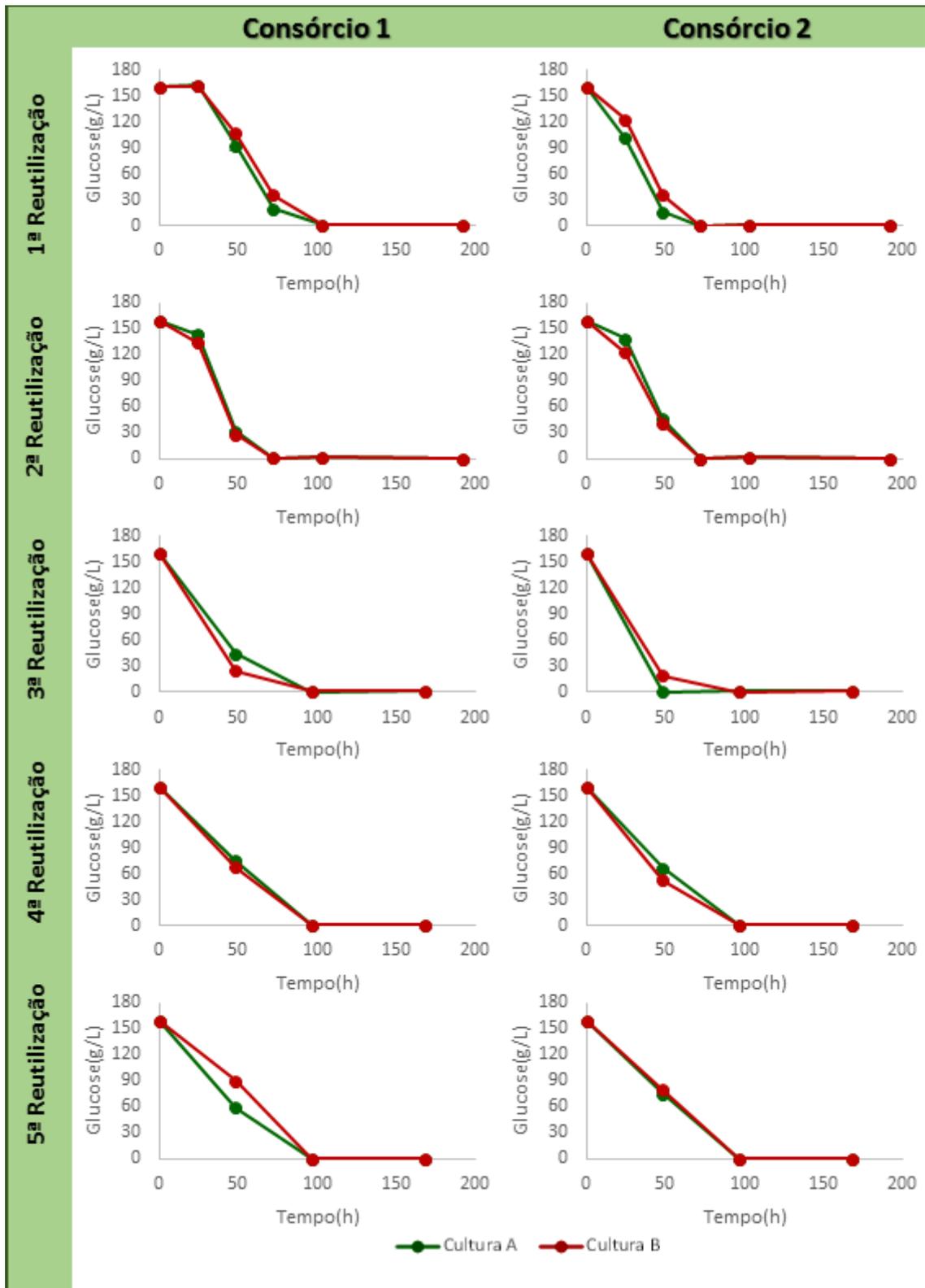


Figura 38- Perfis de consumo de glicose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de tufo vulcânico com polimerização para os consórcios de leveduras C1 e C2.

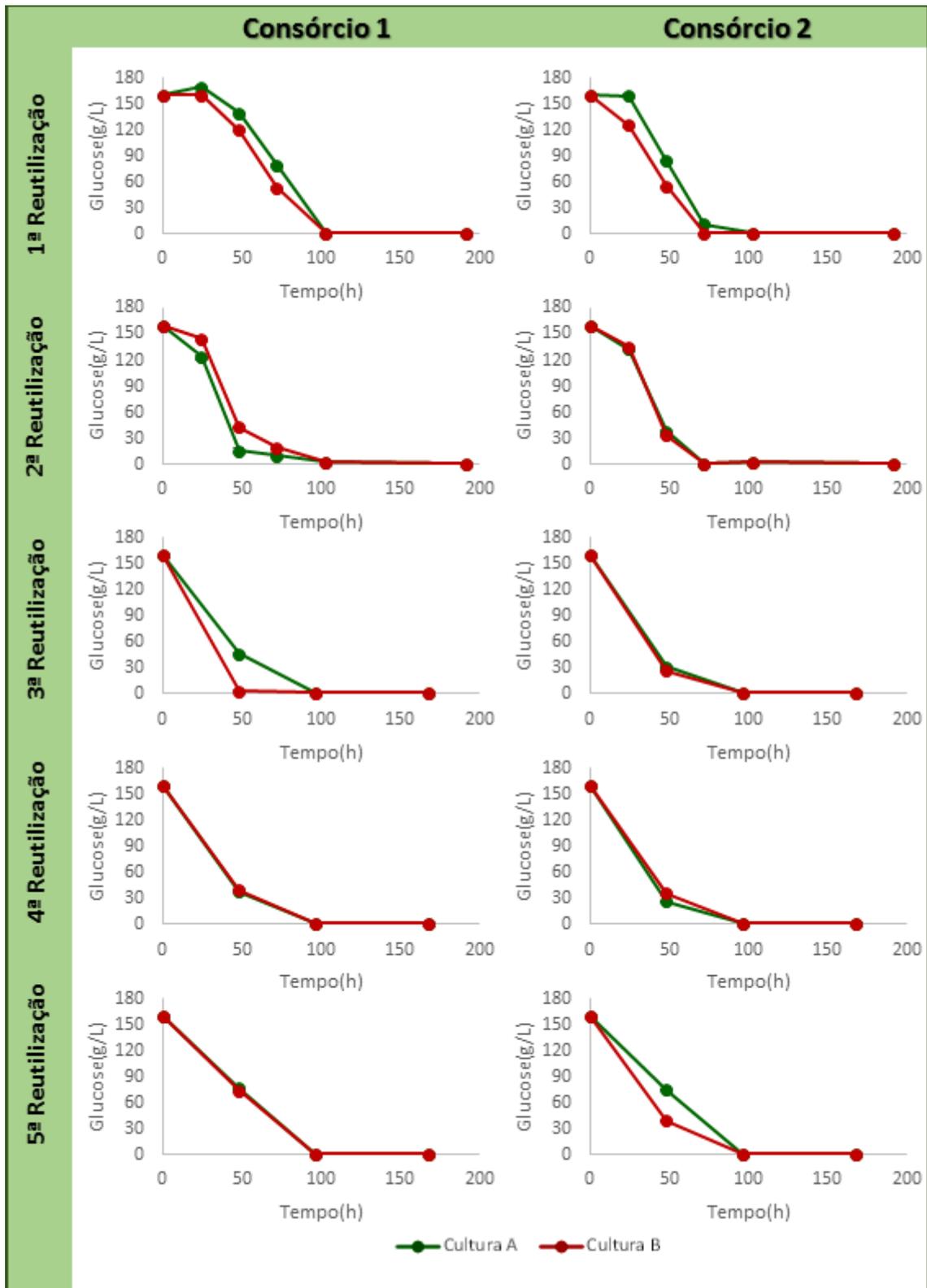


Figura 39- Perfis de consumo de glicose obtidos para cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de argila expandida para os consórcios de leveduras C1 e C2.

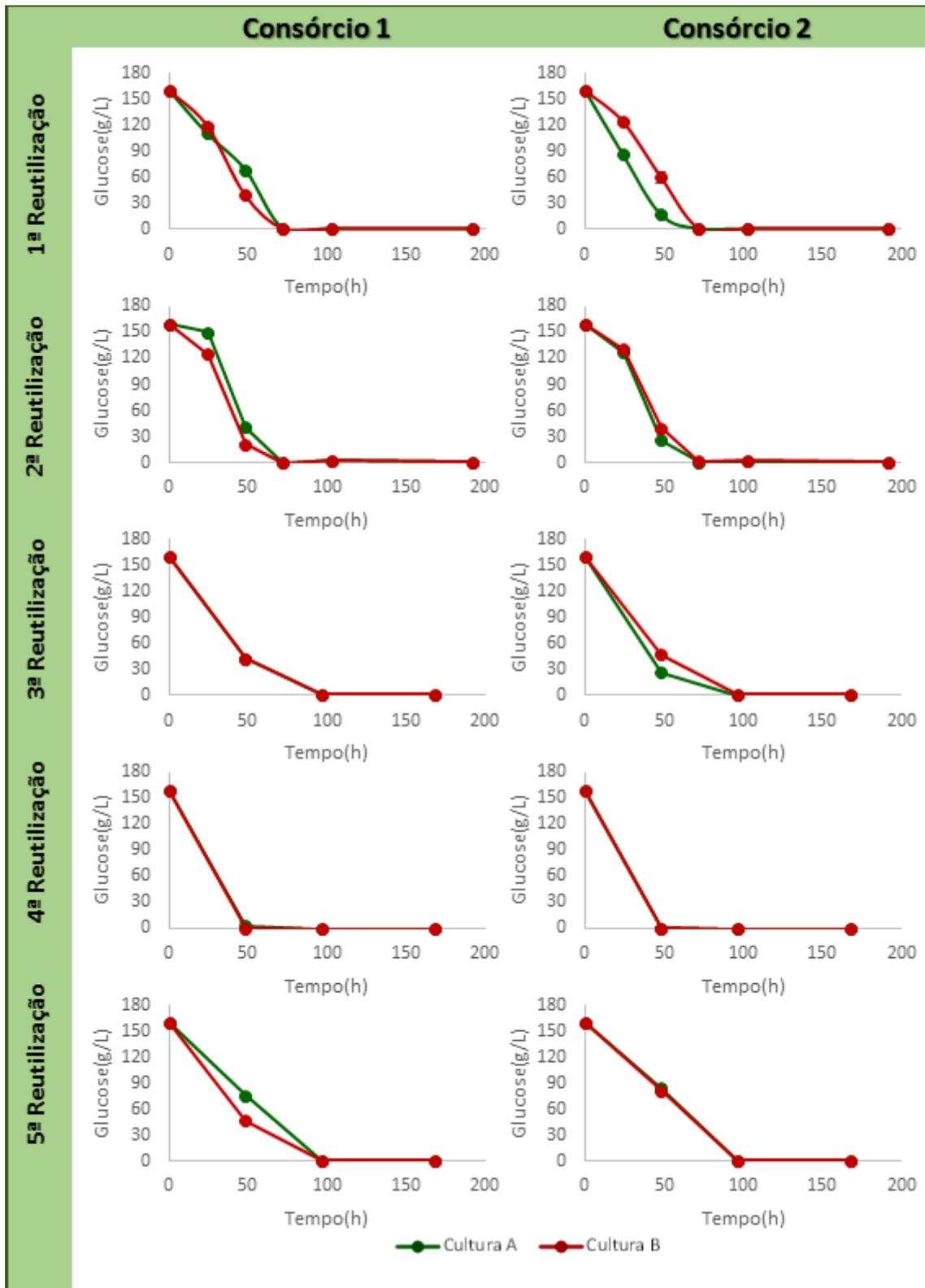


Figura 40- Perfis de consumo de glucose obtidos para a cinco reutilizações dos sistemas de imobilização em matriz de argila expandida com polimerização para os consórcios de leveduras C1 e C2.

Pela análise das figuras 34 a 40 verifica-se a capacidade de retenção celular dos vários sistemas de imobilização. Foi possível efetuar cinco ciclos sucessivos de fermentação com todos os sistemas, o que comprova a possibilidade de reutilização dos sistemas testados.

5.3.4. ENSAIO DOS SISTEMAS DE IMOBILIZAÇÃO EM MOSTO DE UVA BRANCA

De forma a comprovar o potencial enológico dos consórcios C1 e C2 imobilizados no suporte de argila expandida com polimerização, efetuaram-se microvinificações com mosto de uva branca, utilizando-se o sistema de imobilização e os mesmos consórcios com as células livres. As culturas foram inoculadas de forma sequencial com o consórcio C1 no início da fermentação e com o consórcio C2 após 48h de cultura. A Figura 41 apresenta os perfis de consumo de glucose e produção de etanol correspondentes a estes ensaios.

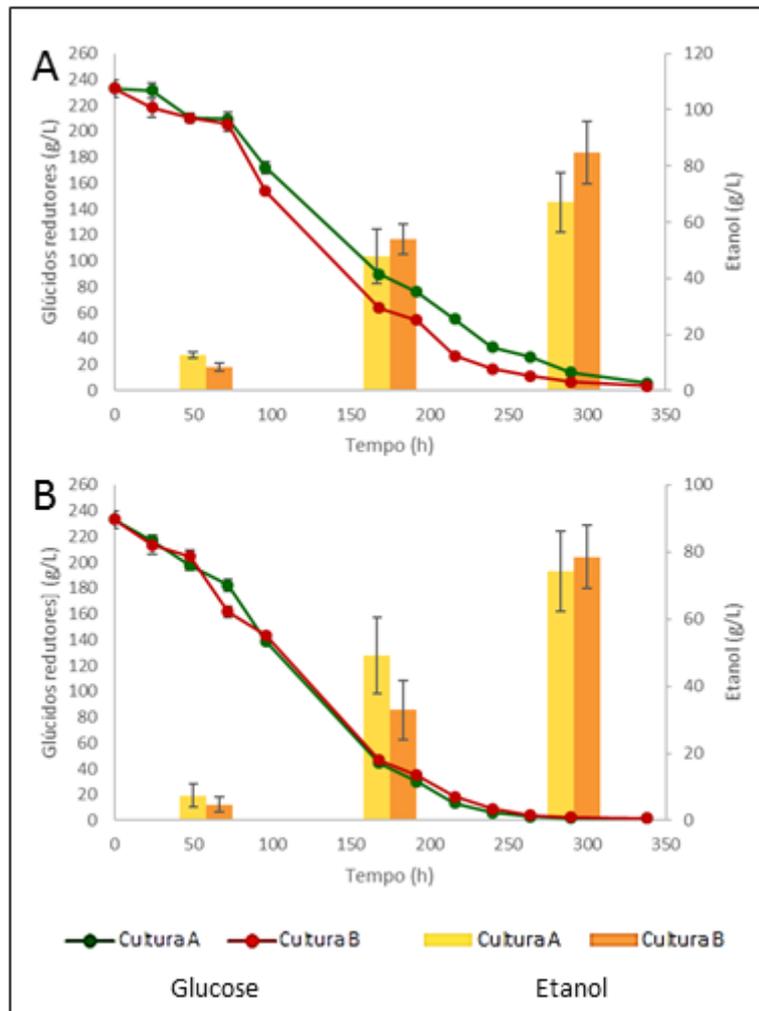


Figura 41- Perfis de consumo de glucose e produção de etanol nas culturas em mosto de uva branca. A- Consórcios na forma livre; B- Consórcios imobilizados em argila expandida com polimerização.

A figura 41 mostra que pode constatar-se que durante as primeiras 48h ocorre um consumo mais lento dos glúcidos redutores, uma vez que o consórcio C1 é composto por leveduras com um metabolismo fermentativo mais lento. Após a inserção do consórcio C2 às 48h do ensaio, a taxa volumétrica de consumo dos glúcidos (Tabela 14) aumentou e foi acompanhada por um aumento da concentração de etanol, demonstrando a mais elevada capacidade metabólica das leveduras do consórcio 2 (do género *Saccharomyces*) na fermentação alcoólica.

Tabela 14- Taxas volumétricas de consumo de glucose para as culturas sem arejamento na forma livre e imobilizada com os consórcios de leveduras C1 e C2 em mosto de uva branca.

	Taxa volumétrica de consumo dos glúcidos redutores (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	
	Consórcio 1	Consórcio 2
Livres	0,476	0,908
Argila Expandida com Polimerização	0,668	1,145

No final do ensaio, não houve diferenças significativas em relação à concentração de etanol entre as culturas livres e imobilizadas. Os valores de etanol obtidos em ambos os ensaios são inferiores ao que seria esperado numa vinificação, devido essencialmente ao baixo volume de cultura e possível evaporação durante os processos de recolha das amostras (amostras foram retiradas à chama para evitar contaminação do sistema).

Relativamente aos valores de acidez total e pH, comparou-se os valores obtidos para as culturas na fase inicial com os valores na fase final. Ocorreu uma diminuição da acidez total e o pH manteve próximo de 3 (Tabela 25, anexo 6).

5.4. CONCLUSÃO

Os sistemas de imobilização testados mostraram um bom potencial na conversão dos glúcidos redutores. Estes sistemas apresentaram possibilidade de reutilização e, potencial para aplicação em fermentação alcoólica em sistema de duas fases. As imobilizações em sistema misto (adsorção física e polimerização), são uma boa alternativa na estabilidade das leveduras neste tipo de matrizes inorgânicas, podendo ser utilizados com sucesso em processos enológicos.

6. Considerações Finais





O estudo da dinâmica populacional, na fase inicial deste trabalho, permitiu mostrar a diversidade microbiana nas várias etapas da fermentação vínica.

Foi possível o isolamento e a identificação de dezasseis estirpes de leveduras associadas à fase inicial e à fase fermentativa do processo de vinificação, com potencial interesse para imobilização.

Os microrganismos isolados foram agrupados por M13-PCR, de forma a definir relações de proximidade filogenética entre as estirpes e efetuou-se a caracterização dos isolados tendo em conta o crescimento celular e a sua capacidade fermentativa, de forma a selecionar as estirpes a imobilizar.

Foi possível produzir células em culturas líquidas de todas as leveduras isoladas e imobilizar essas células em suportes de alginato de cálcio, barro, tufo vulcânico e argila expandida.

As células de leveduras imobilizadas nestas matrizes mostraram uma boa estabilidade e capacidade de reutilização.

Produziram-se dois consórcios C1 e C2 com combinações destas leveduras imobilizadas, para serem usados de forma sequencial em processos enológicos

A imobilização mista (adsorção física e polimerização) dos consórcios C1 e C2 em argila expandida, usada de forma sequencial em ensaios de microvinificações constitui uma nova alternativa na produção de vinhos, com elevado potencial tecnológico.

No seguimento deste trabalho seria ainda interessante a determinação qualitativa e quantitativa dos aromas produzidos pelos consórcios de leveduras utilizados e avaliar química e sensorialmente as características organolépticas do vinho produzido com as leveduras imobilizadas neste sistema de produção em duas fases.

Referências bibliográficas





- A. Abdelmajeed, N., 2012. Immobilization technology for enhancing bio-products industry. *African J. Biotechnol.* 11, 13528–13539. doi:10.5897/AJB12.547
- Akin, C., 1987. *Biotechnology and genetic engineering reviews*. Volume 5. Enzyme Microb. Technol. doi:10.1016/0141-0229(85)90119-X
- Alcoba-flórez, J., Arévalo-morales, M.P., Pérez-roth, E., Rivero-pérez, B., Méndez-álvarez, S., 2007. Yeast molecular identification and typing. *Appl. Microbiol.* 535–546.
- Alessandrello, M.J., Juárez Tomás, M.S., Raimondo, E.E., Vullo, D.L., Ferrero, M.A., 2017. Petroleum oil removal by immobilized bacterial cells on polyurethane foam under different temperature conditions. *Mar. Pollut. Bull.* 122, 156–160. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.06.040
- Alves, A., Henriques, I., Santos, A., Tacão, M., Correia, A., *Microrganismos, T.G. De*, 2003. Tipagem Genética de Microrganismos.
- Amann, R., Fuschs, B.M., Behrens, S., 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 231–236.
- Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., Mas, A., 2011. Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiol.* 28, 1483–1491. doi:10.1016/j.fm.2011.08.009
- Anu-Appiah, K.A., Deepak, M.B., 2017. Deepak, Detection system for *Saccharomyces cerevisiae* with phenyl acrylic acid decarboxylase gene (PAD1) and sulphur efflux gene (SSU1) by multiplex PCR. *Microbiol. Ferment. Technol.* CSIR-Central Food Technol. Res. Institute, Near Mysuru Railw. Station. Mysuru, Karnataka 570 020, India, GenBank Direct Submiss.
- Artigo nº2 do Decreto-Lei nº 35846/46 de 02/09/1946, n.d.
- ATEVA- Associação Técnica de Viticultores do Alentejo, 2014. Boletim Informativo nº2 de Agosto de 2014.
- Avbelj, M., Zupan, J., Raspor, P., 2016. Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 7841–7852. doi:10.1007/s00253-016-7758-3
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 152–161. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.029
- Barnett, J.A., 2003. A history of research on yeasts 5: The fermentation pathway. *Yeast* 20, 509–543. doi:10.1002/yea.986
- Bartowsky, E.J., 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 149–156. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x
- Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., 2016.

- Unraveling the enzymatic basis of wine “Flavorome”: A phylo-functional study of wine related yeast species. *Front. Microbiol.* 7, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2016.00012
- Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F., 2013. Immobilization of enzymes: a literature survey. *Methods Mol. Biol.* 1051, 15–31. doi:10.1007/978-1-62703-550-7_2
- Buckova, M., Puskarova, A., Zenisova, K., Krakova, L., Pangallo, D., 2017. Fungal community in ice wine-related samples. *Lab. Environ. Food Microbiol. Inst. Mol. Biol. Slovak Acad. Sci. Dubravska cesta 21, Bratislava 84551, Slovakia, GenBank Direct Submiss.*
- Bustin, S. a, Beaulieu, J.-F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F.S.B., Olsvik, P. a, Penning, L.C., Toegel, S., 2010. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol. Biol.* 11, 74. doi:10.1186/1471-2199-11-74
- Cabrita, M.J., Ricardo-da-Silva, J., Laureano, O., 1999. Os Compostos Polifenólicos Das Uvas E Dos Vinhos. I Semin. Int. Vitivinic. 61–102.
- Caldeira, a T., Salvador, C., Pinto, F., Arteiro, J.M., Martins, M.R., 2009. Ponderosa Mushrooms 59, 629–634.
- Cappello, M.S., Zapparoli, G., Logrieco, A., Bartowsky, E.J., 2017. Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 243, 16–27. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.025
- Cha, H.-G., Kim, Y.-O., Choi, W.Y., Kang, D.-H., Lee, H.-Y., Jung, K.-H., 2014. Evaluating carriers for immobilizing *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production in a continuous column reactor. *Mycobiology* 42, 249. doi:10.5941/MYCO.2014.42.3.249
- Champagne, C.P., Gaudy, C., Poncelet, D., Neufeld, R.J., 1992. Lactococcus lactis release from calcium alginate beads. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1429–1434.
- Chan, K., Sterling, J.F., Roberts, S.A., Bhagwat, A.S., Resnick, M.A., Gordenin, D.A., 2012. Base Damage within Single-Strand DNA Underlies In Vivo Hypermutability Induced by a Ubiquitous Environmental Agent. *PLoS Genet.* 8. doi:10.1371/journal.pgen.1003149
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. -n, Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165–178. doi:10.1002/jsfa.2740600205
- Chen, C.C., Wu, C.H., Wu, J.J., Chiu, C.C., Wong, C.H., Tsai, M.L., Lin, H.T.V., 2015. Accelerated bioethanol fermentation by using a novel yeast immobilization technique: Microtube array membrane. *Process Biochem.* 50, 1509–1515. doi:10.1016/j.procbio.2015.06.006
- Covizzi, L.G., Giese, E.C., Gomes, E., Dekker, R.F.H., Silva, R. da, 2007. Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. *Semin. Ciências Exatas e Tecnológicas* 28, 143–160.



- Csoma, H., Sipiczki, M., 2008. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Res.* 8, 328–336. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00339.x
- Dahllöf, I., 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 213–217. doi:10.1016/S0958-1669(02)00314-2
- Drozd, I., Makarewicz, M., Tuszyński, T., 2013. Isolation and identification of microorganisms including lactic acid bacteria and their use in microbial deacidification of wines from domestic vineyards. *Polish J. Microbiol.* 62, 331–334.
- Eddouzi, J., Lohberger, A., Vogne, C., Manai, M., Sanglard, D., 2013. Identification and antifungal susceptibility of a large collection of yeast strains isolated in Tunisian hospitals. *Med. Mycol.* 51, 1–10. doi:10.3109/13693786.2013.800239
- Elakkiya, M., Prabhakaran, D., Thirumarimurugan, M., 2016. Methods of cell immobilization and its applications. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* 5, 5429–5433. doi:10.15680/IJIRSET.2016.0504175
- Ferrando, M., Güell, C., López, F., 1998. Industrial Wine Making: Comparison of Must Clarification Treatments. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1523–1528. doi:10.1021/jf9703866
- Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22. doi:10.1016/S0168-1605(03)00245-9
- Foschino, R., Gallina, S., Andrighetto, C., Rossetti, L., Galli, A., 2004. Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Res.* 4, 609–618. doi:10.1016/j.femsyr.2003.12.006
- Fsis, U., 2012. Introduction to the Microbiology of Food Processing.
- Gammacurta, M., Lytra, G., Marchal, A., Marchand, S., Christophe Barbe, J., Moine, V., de Revel, G., 2018. Influence of lactic acid bacteria strains on ester concentrations in red wines: Specific impact on branched hydroxylated compounds. *Food Chem.* 239, 252–259. doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.123
- García-Ruiz, A., Crespo, J., López-de-Luzuriaga, J.M., Olmos, M.E., Monge, M., Rodríguez-Álfaro, M.P., Martín-Álvarez, P.J., Bartolome, B., Moreno-Arribas, M. V., 2015. Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines. *Food Control* 50, 613–619. doi:10.1016/j.foodcont.2014.09.035
- García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V., 2014. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiol.* 44, 220–225. doi:10.1016/j.fm.2014.06.015

- Genc, M., Genc, S., Goksungur, Y., 2017. Exergy analysis of wine production: Red wine production process as a case study. *Appl. Therm. Eng.* 117, 511–521. doi:10.1016/j.applthermaleng.2017.02.009
- Genisheva, Z., Macedo, S., Mussatto, S.I., Teixeira, J.A., Oliveira, J.M., 2012. Production of white wine by *saccharomyces cerevisiae* immobilized on grape pomace. *J. Inst. Brew.* 118, 163–173. doi:10.1002/jib.29
- Genisheva, Z., Mota, A., Mussatto, S.I., Oliveira, J.M., Teixeira, J.A., 2014. Integrated continuous winemaking process involving sequential alcoholic and malolactic fermentations with immobilized cells. *Process Biochem.* 49, 1–9. doi:10.1016/j.procbio.2013.10.005
- Giménez-Gómez, P., Gutiérrez-Capitán, M., Puig-Pujol, A., Capdevila, F., Muñoz, S., Tobeña, A., Miró, A., Jiménez-Jorquera, C., 2017. Analysis of free and total sulfur dioxide in wine by using a gas-diffusion analytical system with pH detection. *Food Chem.* 228, 518–525. doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.026
- Giscours, C., Valley, A., Carr, J., 2011. Cabernet sauvignon 57–58.
- Gòdia, F., Casas, C., Solà, C., 1991. Application of Immobilized Yeast Cells to Sparkling Wine Fermentation. *Biotechnol. Prog.* 7, 468–470. doi:10.1021/bp00011a013
- González-Pérez, M., Brinco, C., Vieira, R., Rosado, T., Mauran, G., Pereira, A., Candeias, A., Caldeira, A.T., 2017. Dual phylogenetic staining protocol for simultaneous analysis of yeast and bacteria in artworks. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 123, 1–11. doi:10.1007/s00339-016-0725-0
- Gordon, J.L., Armisen, D., Proux-Wéra, E., ÓhÉigeartaigh, S.S., Byrne, K.P., Wolfe, K.H., 2011. Evolutionary erosion of yeast sex chromosomes by mating-type switching accidents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20024–9. doi:10.1073/pnas.1112808108
- Guerrero, R.F., Cantos-Villar, E., 2015. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends Food Sci. Technol.* 42, 27–43. doi:10.1016/j.tifs.2014.11.004
- Guillamón, J.M., Mas, A., 2011. Acetic Acid Bacteria. *Mol. Wine Microbiol.* 227–255. doi:10.1016/B978-0-12-375021-1.10009-8
- Guzzon, R., Widmann, G., Settanni, L., Malacarne, M., Francesca, N., Larcher, R., 2011. Evolution of yeast populations during different biodynamic winemaking processes. *South African J. Enol. Vitic.* 32, 242–250. doi:10.21548/32-2-1384
- Hong, S.K., Lee, H.J., Park, H.J., Hong, Y.A., Rhee, I.K., Lee, W.H., Choi, S.W., Lee, O.S., Park, H.D., 2010. Degradation of malic acid in wine by immobilized *Issatchenkia orientalis* cells



- with oriental oak charcoal and alginate. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 522–529. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02833.x
- Huang, L., 2017. Dynamic identification of growth and survival kinetic parameters of microorganisms in foods. *Curr. Opin. Food Sci.* 14, 85–92. doi:10.1016/j.cofs.2017.01.013
- Hutkins, R.W., 2008. Wine Fermentation. *Microbiol. Technol. Fermented Foods* 349–395. doi:10.1007/978-0-387-74520-6_6
- Infovini, 2017. Obtido em Junho de 2017, de www.infovini.com.
- Iurciuc (Tincu), C.E., Alupeii, L., Savin, A., Ibănescu, C., Martin, P., Popa, M., 2016. Yeast cells immobilized in spherical gellan particles cross-linked with magnesium acetate. *J. Biotechnol.* 236, 45–56. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.08.002
- Iurciuc (Tincu), C.E., Savin, A., Atanase, L.I., Martin, P., Popa, M., 2017. Physico-chemical characteristics and fermentative activity of the hydrogel particles based on polysaccharides mixture with yeast cells immobilized, obtained by ionotropic gelation. *Food Bioprod. Process.* 104, 104–123. doi:10.1016/j.fbp.2017.05.003
- IVV- Instituto da Vinha e do Vinho, 2017. Obtido em Junho de 2017, de www.ivv.gov.pt.
- Jamai, L., Sendide, K., Ettayebi, K., Errachidi, F., Ettayebi, M., 2001. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 204, 375–379.
- Jarvis, B., Wickes, B., Hoffman, L., 2014. Direct Genomic DNA Sequencing of the D1/D2 Region of 26S rDNA of Basidiomycota and Ascomycota: No DNA Amplification Necessary for Cultured Samples. *Tebu-Bio.Com* 8474.
- Joshi, V.K., Sharma, S., Thakur, A.D., 2016. Wines: White, Red, Sparkling, Fortified, and Cider, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-63666-9.00013-3
- Kargupta, K., Datta, S., Sanyal, S.K., 1998. Analysis of the performance of a continuous membrane bioreactor with cell recycling during ethanol fermentation. *Biochem. Eng. J.* 1, 31–37.
- Karunakara, S., Gurusamy, R., 2013. Extraction and enhancement of biofuel from seaweeds. *Dep. Biotechnol. Vivekanandha Coll. Eng. Women, Tiruchengode, Namakkal, Tamil Nadu* 637408, India, GenBank Direct Submiss.
- Kidd, P.M., 2005. Neurodegeneration from mitochondrial insufficiency: Nutrients, stem cells, growth factors, and prospects for brain rebuilding using integrative management. *Altern. Med. Rev.* 10, 268–293.
- Kosseva, M., Beschkov, V., Kennedy, J.F., Lloyd, L.L., 1998. Malolactic fermentation in Chardonnay wine by immobilised *Lactobacillus casei* cells. *Process Biochem.* 33, 793–797.

doi:10.1016/S0032-9592(98)00049-1

- Kourkoutas, Y., Komaitis, M., Koutinas, A.A., Kanellaki, M., 2001. Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1417–1425. doi:10.1021/jf000942n
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces complex*” determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3, 417–432. doi:10.1016/S1567-1356(03)00012-6
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1991. Phylogenetic Relationships Among Species of *Schwanniomyces* Determined from Partial Ribosomal RNA Sequences. *Yeast* 7, 61–72.
- Kym, A., 2013. Which Winegrape Varieties are Grown where? Adelaide 699.
- Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African J. Enol. Vitic.* 21, 97–129.
- Lima, A., Bento, A., Baraldi, I., Malheiro, R., 2016. Selection of grapevine leaf varieties for culinary process based on phytochemical composition and antioxidant properties. *Food Chem.* 212, 291–295. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.177
- Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., 2017. Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiol.* 62, 221–231. doi:10.1016/j.fm.2016.10.023
- Lonsdale, D., 2006. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 3, 49–59. doi:10.1093/ecam/nek009
- Lu, M., Wang, X., Sun, G., Qin, B., Xiao, J., Yan, S., Pan, Y., Wang, Y., 2014. Fine structure of Tibetan kefir grains and their yeast distribution, diversity, and shift. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0101387
- Magalhães, N., 2015. *Tratado de Viticultura, A Videira a Vinha e o Terroir*, 2^a. ed. Esfera Poética.
- Maicas, S., Pardo, I., Ferrer, S., 2001. The potential of positively-charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 415–419. doi:10.1016/S0141-0229(00)00339-2
- Mateo, J., Maicas, S., 2016. Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts to Wine-Making Process. *Fermentation* 2, 14. doi:10.3390/fermentation2030014
- Maturano, Y.P., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Nally, M.C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L.I., Combina, M., Vazquez, F., 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine



- fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 43–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015
- Melzoch, K., Rychtera, M., Hábová, V., 1994. Effect of immobilization upon the properties and behaviour of cells. *J. Biotechnol.* 32, 59–65.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., Leão, C., 2004. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *J. Appl. Microbiol.* 97, 540–545. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x
- Mohd Azhar, S.H., Abdulla, R., Jambo, S.A., Marbawi, H., Gansau, J.A., Mohd Faik, A.A., Rodrigues, K.F., 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem. Biophys. Reports* 10, 52–61. doi:10.1016/j.bbrep.2017.03.003
- Moreno-Arribas, M.V., Carmen Polo, M., 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer. doi:10.1007/978-0-387-74118-5
- Moter, A., Göbel, U.B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41, 85–112.
- Ntagas, P., Tataridis, P., Fandos, C., Justamante, L., Nerantzis, E., 2003. The use of immobilized yeast technology for the production of rose and white sparkling wine from grape varieties of the Zitsa region, in Greece. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 68(2 Pt B)515-9.
- Nussinovitch, A., Nussinovitch, M., Shapira, R., Gershon, Z., 1994. Influence of immobilization of bacteria, yeasts and fungal spores on the mechanical properties of agar and alginate gels. *Food Hydrocoll.* 8, 361–372. doi:10.1016/S0268-005X(09)80348-2
- Nwaiwu, O., 2016. Use of Fragments from D1/D2 Domain of 26S rRNA Gene to Select *Saccharomyces cerevisiae* from Palm Wine. *J. Appl. Life Sci. Int.* 5, 1–5. doi:10.9734/JALSI/2016/26373
- Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., 2013. Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination. *Food Control* 34, 261–267. doi:10.1016/j.foodcont.2013.04.044
- Ogbonna, J.C., Tomiyama, S., Liu, Y.C., Tanaka, H., 1997. Efficient production of ethanol by cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *J. Ferment. Bioeng.* 84, 271–274. doi:10.1016/S0922-338X(97)82069-7
- OIV- Organização Internacional da Vinha e do Vinho, 2017. Obtido em Junho de 2017, de www.oiv.int.
- Oldham, M. a, Ivkovic, A., 2012. Pellagrous encephalopathy presenting as alcohol withdrawal delirium: A case series and literature review. *Addict. Sci. Clin. Pract.* 7, 12. doi:10.1186/1940-0640-7-12
- Ozturk, B., Anli, E., 2014. Different techniques for reducing alcohol levels in wine: A review. *BIO*

- Web Conf. 3, 1–7. doi:10.1051/bioconf/20140302012
- Puig-Pujol, A., Bertran, E., García-Martínez, T., Capdevila, F., Mínguez, S., Mauricio, J.C., 2013. Application of a new organic yeast immobilization method for sparkling wine production. *Am. J. Enol. Vitic.* 64, 386–394. doi:10.5344/ajev.2013.13031
- Qiao, C.L., 2016. Isolation and identification of yeast in traditional yogurt of kazak area in xinjiang. Shi He Zi Univ. Inst. Food, North High Build. Shi He Zi, Xinjiang 832000, China, GenBank Direct Submiss.
- Ramakrishna, T., 1999. Vitamins and Brain Development. *Physiol. Res.* 48, 175–187.
- Rapp, A. e G.V., 1991. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In: RANTZ 1659–1694.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubordieu, D., 2006. *Handbook of enology*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd.
- Rinta-Kanto, J.M., Ouellette, A.J.A., Boyer, G.L., Twiss, M.R., Bridgeman, T.B., Wilhelm, S.W., 2005. Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4198–4205. doi:10.1021/es048249u
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169–180. doi:10.1016/S0168-1605(03)00290-3
- Rosu, C., Stefan, A., 2015. Biodegradation of azo dyes by ascomycete yeasts. *Exp. Appl. Biol.* GenBank Direct Submiss.
- Roullier-Gall, C., Boutegrabet, L., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., 2014. A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. *Food Chem.* 152, 100–107. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.056
- Salvador, C., Bordalo, R., Silva, M., Rosado, T., Candeias, A., Caldeira, A.T., 2017. On the conservation of easel paintings: evaluation of microbial contamination and artists materials. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 123. doi:10.1007/s00339-016-0704-5
- Salvador, C., Martins, M.R., Arteiro, J.M., Caldeira, A.T., 2014. Molecular evaluation of some *Amanita ponderosa* and the fungal strains living in association with these mushrooms in the southwestern Iberian Peninsula. *Ann. Microbiol.* 64, 1179–1187. doi:10.1007/s13213-013-0757-z
- Shahnewaj, K., Mannan, B., Mazumdar, R.M., Chowdhury, A., Hossain, N., 2013. Identification and characterization of microorganisms : DNA- - fingerprinting methods 35.
- Shuler, M.L., Kargi, F., 2002. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2nd ed. PrenticeHall PTR,



New Jersey.

- Siti Hajar, M.D., Noorhisham, T.K., Nurina, A., 2012. Yeast identification from domestic ragi for food fermentation by PCR method. *Int. Food Res. J.* 19, 775–777.
- Smit, A.Y., Engelbrecht, L., du Toit, M., 2012. Managing your wine fermentation to reduce the risk of biogenic amine formation. *Front. Microbiol.* 3, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2012.00076
- Sturm, J., Grossmann, M., Schnell, S., 2006. Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1241–1248. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03034.x
- Toniolo, R., Pizzariello, A., Susmel, S., Dossi, N., Bontempelli, G., 2010. A sensor based on electrodes supported on ion-exchange membranes for the flow-injection monitoring of sulphur dioxide in wines and grape juices. *Talanta* 80, 1809–1815. doi:10.1016/j.talanta.2009.10.024
- UCDAVIS- Viticulture and Enology, 2017. Obtido em Junho de 2017, de <http://wineserver.ucdavis.edu>.
- Unkee, R.A.E.K., 2016. Wine , 2 . Chemical and Physical Composition.
- Vasconcelos, N.M. de, Pinto, G.A.S., Aragão, F.A. de S., 2013. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. *Bol. Pesqui.* Número 9 - Embrapa 1–59. doi:1980-6841
- Vieira, R., González-Pérez, M., Pereira, A., Candeias, A., Caldeira, A.T., 2016. Novos desenvolvimentos para a deteção de leveduras e bactérias presentes em argamassas. *Conserv. Património* 23, 71–77. doi:10.14568/c2015047
- Vilela, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., C?rte-Real, M., 2013a. Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4991–5000. doi:10.1007/s00253-013-4719-y
- Vilela, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., C?rte-Real, M., 2013b. Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4991–5000. doi:10.1007/s00253-013-4719-y
- Villamor, R. ., 2012. the Impact of Wine Components on the Chemical. Washington State University.
- Vine to Wine Circle, 2017. Obtido em Junho de 2017, de www.vinetowinecircle.com.
- Vinhos do Alentejo, 2017. Obtido em Junho de 2017, de www.vinhosdoalentejo.pt.
- Vu, D., Groenewald, M., Szoke, S., Cardinali, G., Eberhardt, U., Stielow, B., de Vries, M., Verkleij, G., Crous, P., Boekhout, T., Robert, V., 2016. Bioinformatics Group, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalaan, Utrecht 3584CT, Netherlands, GenBank: Direct

- Submission. Bioinforma. Group, CBS-KNAW Fungal Biodivers. Centre, Uppsala, Utr. 3584CT, Netherlands, GenBank Direct Submiss.
- Wansbrough, H., 2000. Chemistry in winemaking. New Zeal. Inst. Chem. 1–12. doi:10.1039/JI9608400417
- Woodward, J., 1988. Methods of immobilization of microbial cells. J. Microbiol. Methods 8, 91–102. doi:10.1016/0167-7012(88)90041-3
- Yaniv, K., Golberg, K., Kramarsky-Winter, E., Marks, R., Pushkarev, A., Béjà, O., Kushmaro, A., 2017. Functional marine metagenomic screening for anti-quorum sensing and anti-biofilm activity. Biofouling 33, 1–13. doi:10.1080/08927014.2016.1253684
- Zarrouk, O., Garcia-Tejero, I., Pinto, C., Genebra, T., Sabir, F., Prista, C., David, T.S., Loureiro-Dias, M.C., Chave, M.M., 2016. Aquaporins isoforms in cv. Touriga Nacional grapevine under water stress and recovery-Regulation of expression in leaves and roots. Agric. Water Manag. 164, 167–175. doi:10.1016/j.agwat.2015.08.013
- Zhao, L., Chen, C., 2008. Molecular taxonomic study on *Saccharomyces cerevisiae*, Chemical and Environmental Engineering. Chem. Environ. Eng. Beijing Technol. Bus. Univ. Fucheng Road 11#, Haidian Dist. Beijing 100037, China, GenBank Direct Submiss.
- Zhao, Z., Xie, X., Wang, Z., Tao, Y., Niu, X., Huang, X., Liu, L., Li, Z., 2016. Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in mesoporous silica-based material: An efficiency continuous cell-recycle fermentation system for lactic acid production. J. Biosci. Bioeng. 121, 645–651. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.11.010
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van, K., VAN 'T Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Envir. Microbiol. 56, 1875–1881. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02537.x

Anexos



1. CONSTITUIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Tabela 15- Constituição do meio de cultura CRB

Reagentes	Quantidades (g L ⁻¹)
Agar	15,5
Glucose	10
Peptona	5
Agar	20
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄	0,5
<i>Rose Bengal</i>	0,05
Cloranfenicol	0,1

Tabela 16- Constituição do meio de cultura MEA

Reagentes	Quantidades (g L ⁻¹)
Extrato de malte	30
Glucose	20
Peptona micológica	5
Agar	15

Tabela 17- Constituição do meio de cultura NA

Reagentes	Quantidades (g L ⁻¹)
Extrato de Levedura	1,5
NaCl	5
<i>Peptic digest animals</i>	5
<i>Beef Extract</i>	1,5
Agar	15

Tabela 18- Constituição do meio de cultura YPD

Reagentes	Quantidades (g L ⁻¹)
<i>Yeast extract</i>	10
Glucose	20
Peptona	10
Agar	20

Tabela 19- Composição do mosto sintético líquido

Reagentes	Quantidades (g L⁻¹)
Glucose	160
Ácido tartárico	5
YNB	6,7
pH = 3,5	

Tabela 20- Composição do mosto sintético modificado líquido

Reagentes	Quantidades (g L⁻¹)
Glucose	160
Ácido tartárico	5
<i>Yeast extract</i>	10
Peptona	10
YNB	6,7
pH = 3,5	

2. CONCENTRAÇÃO E GRAUS DE PUREZA DO DNA EXTRAÍDO; QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR FLUORIMETRIA DOS PRODUTOS DE PCR

Tabela 21- Concentração e grau de pureza do DNA extraído das amostras de leveduras

Levedura	[DNA] ng/μL	Abs _{260/280}	Abs _{260/230}
I _A	1051,5 ± 242,6	1,64	1,90
I _B	882,3 ± 52	1,61	1,54
II _A	885,6 ± 114,5	1,72	1,65
II _B	3157,8 ± 216,3	1,71	1,89
III _A	1941,1 ± 112,3	1,72	1,77
III _B	4218,6 ± 302,3	1,64	2,00
IV _{1.A}	1972,4 ± 10,2	1,67	1,42
IV _{1.B}	3086,5 ± 43,3	1,75	1,87
IV _{2.1}	2767,6 ± 479,7	1,68	1,66
IV _{2.B}	1784,3 ± 43	1,65	1,78
V _{1.A}	642,9 ± 5,8	1,70	1,81
V _{1.B}	213,7 ± 7,5	1,65	1,42
V _{2.A}	925,3 ± 10,3	1,84	1,57
V _{2.B}	947,5 ± 1,2	1,74	1,53
VI _A	12120,1 ± 2048,5	1,76	1,67
VI _B	11745,1 ± 1171,6	1,64	1,61
VII _A	2349,5 ± 120,1	1,65	1,67
VII _B	2456,8 ± 86,5	1,66	1,68
VIII _A	1889,7 ± 707,1	1,69	1,69
VIII _B	1362,7 ± 31,2	1,71	1,64
IX _A	2523,8 ± 135,8	2,03	1,87
IX _B	792,6 ± 58,2	1,99	1,50
X _A	1178,4 ± 28,9	1,60	1,82
X _B	1132,6 ± 73,2	1,62	1,67
XI _A	2666,6 ± 197,6	1,60	1,57
XI _B	2409,3 ± 27,7	1,82	1,79
XII _A	1901,9 ± 121,3	1,79	1,62
XII _B	2129,90 ± 360,5	1,71	1,62
XIII _A	3452,1 ± 164,6	1,61	1,52
XIII _B	2241,2 ± 355,9	2,03	2,05
XIV _A	7982,8 ± 45,1	1,62	1,84
XIV _B	6350,4 ± 696,7	1,79	1,95
396 _A	5430,1 ± 172,1	1,75	1,85
396 _B	4893,8 ± 89,9	1,76	1,84

Tabela 22- Quantificação de DNA por fluorimetria dos produtos de PCR, com amplificação do domínio D1/D2, referentes aos diferentes tipos de leveduras

Levedura	[DNA] (ng/μL)
I_B	19,5
II_B	20,0
III_A	9,8
IV_{1.A}	9,9
IV_{2.A}	11,0
V_{1.A}	2,7
V_{2.A}	6,1
VI_A	15,5
VII_A	26,5
VIII_A	3,7
IX_B	6,5
X_B	10,0
XI_B	20,0
XII_B	20,0
XIII_B	19,0
XIV_A	19,5
396_B	22,0

3. KIT ENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE GLUCOSE (NZYTECH, D-GLUCOSE HK, UV METHOD)

Constituído por:

- Solução 1: Tampão imidazol (25mL, 2M, pH 7,6) mais MgCl₂ (0.5M), MgCl₂ (100mM) e azida de sódio (0.02% m/v) como conservante. Estável por 2 anos a 4°C.
- Solução 2: NADP⁺ (150mg) mais ATP (440mg). Estável por 5 anos a -20°C. Dissolver em 12 mL de água destilada, dividir em alíquotas e guardar a -20°C.
- Solução 3: Hexocinase (EC 2.7.1.1; 425 U/mL) e glucose-6-P desidrogenase (EC 1.1.1.49; 212 U/mL) em sulfato de amônio 3,2 M (2.25mL). Estável por 2 anos a 4°C.
- Solução 4: Solução padrão de D-glucose (6 mL, 0,40 mg/mL) em ácido benzoico a 0,02%. Estável por 2 anos à temperatura ambiente.

Princípio do Método:

Tabela 23- Princípio do método do kit enzimático para quantificação da glucose

Microplaca (µL)	Branco	Amostra
Água destilada (a 25°C)	210	200
Amostra	---	10
Solução 1	10	10
Solução 2	10	10
Agitar e registrar a absorvância das soluções (A1) após 3 min Iniciar a reação através da adição de:		
Suspensão 3	2	2
Agitar e medir a absorvância das soluções (A2) no final da reação (aprox. 5 min)		

Determina-se a diferença de absorvências para o branco e para a amostra (A2-A1). Subtrai-se a diferença de absorvência do branco à diferença de absorvência da amostra, obtendo-se $\Delta A_{D-glucose}$. A concentração de D-glucose, baseada no coeficiente de absorvidade molar do NADH a 340nm ($6300L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$) é calculada da seguinte forma:

$$[D-glucose] = 0,6634 \times \Delta A_{D-glucose} [g/L]$$

No caso de amostras de mostos, é necessário fazer um tratamento prévio: incubar 10 mL a 90-95°C para eliminar atividade enzimática. Centrifugar ou filtrar e usar apenas o sobrenadante ou o filtrado para o ensaio.

4. KIT ENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ETANOL (NZYTECH, ETHANOL, UV METHOD)

Constituído por:

- Solução 1: tampão fosfato de potássio (15mL, 1,5M, pH 9,0) e azida de sódio (0.02%) como conservante. Estável durante 2 anos a 4°C.
- Solução 2: NAD⁺ (155 mg). Estável por 5 anos a -20°C. Dissolver em 12,4 mL de água destilada, dividir em alíquotas e congelar a -20°C.
- Solução 3: Aldeído desidrogenase (AIDH, EC 1.2.1.3;25 U/mL) em sulfato de amônio 3,2M (1,3mL). Guardar a 4°C.
- Solução 4: Álcool desidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1; 167 U/mL) em sulfato de amônio 3,2M (1.3ml). Guardar a 4°C.
- Solução 5: Solução padrão de etanol (5 mL, 5.0 mg/mL). Diluir 0,5 mL para 50 mL de água destilada, com estabilidade para 2 dias a 4°C.

Princípio do Método:

Tabela 24- Princípio do método do kit enzimático para quantificação do etanol

Microplaca (µL)	Branco	Amostra
Água destilada (a 25°C)	210	200
Amostra	---	10
Solução 1	20	20
Solução 2	20	20
Suspensão 3	2	2
Agitar e registrar a absorvância das soluções (A1) após 2 min Iniciar a reação através da adição de:		
Suspensão 4	2	2
Agitar e medir a absorvância das soluções (A2) no final da reação (aprox. 5 min)		

Nota: se necessário ler a absorvância em intervalos de 2 min até que a reação termine

Determina-se a diferença de absorvância para o branco e para a amostra (A2-A1). Subtrai-se a diferença de absorvância do branco à diferença de absorvância da amostra, obtendo-se ΔA_{etanol} . A concentração de etanol, baseada no coeficiente de absorvidade molar do NADH a 340nm ($6300\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) é calculada da seguinte maneira:

$$[\text{etanol}] = 0,009287 \times \Delta A_{\text{etanol}} \text{ [g/L]}$$

$$[\text{etanol}] = 0,01176 \times \Delta A_{\text{etanol}} \text{ [% v/v]}$$

Para a determinação do etanol em vinhos brancos e tintos pode ser determinada sem qualquer tratamento da amostra.

5. PREPARAÇÃO DO REAGENTE DE DNS E CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA OS GLÚCIDOS REDUTORES PELO MÉTODO DO DNS

Preparou-se uma solução de NaOH 2M (16 g para 200 mL), pesou-se 1g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e dissolveu-se, num erlenmeyer de 100mL, em 20mL de NaOH em banho-maria com agitação. Posteriormente, pesou-se 30 g de tartarato de sódio e potássio e dissolveu-se em 50mL de H₂O destilada e misturou-se com a solução anterior, agitou-se e perpez-se o volume com H₂O destilada.

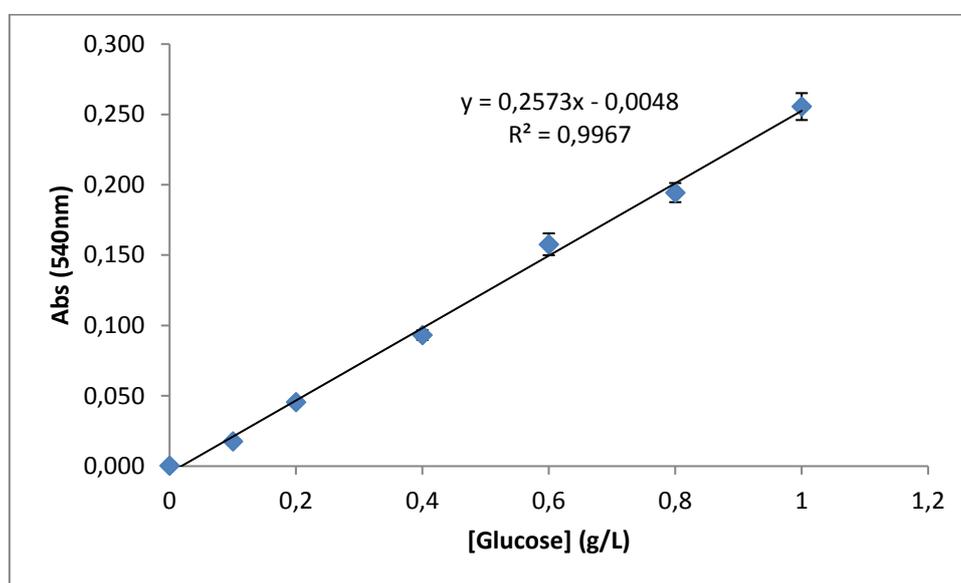


Figura 42- Curva de calibração dos glúcidos utilizada para determinação da glucose nas culturas efetuadas com os consórcios de leveduras nas diferentes matrizes de imobilização e para a determinação dos glúcidos redutores no ensaio de mosto de uva. Os valores apresentados são a média \pm DP de oito determinações.

6. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TOTAL EM MOSTOS E VINHOS PELO MÉTODO OFICIAL PORTUGUÊS (NP 2139)

a. ENSAIO PRÉVIO PARA ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE COLORAÇÃO

Medem-se, para a cápsula de vidro, por proveta, 25 cm³ de água recentemente fervida e 1 cm³ de indicador azul de bromotimol. Juntam-se, medidos por pipeta de precisão, 5 cm³ de mosto ou vinho e neutraliza-se com solução de hidróxido de sódio 0,05 N até atingir o ponto de viragem (coloração azul esverdeada). Juntam-se 5 cm³ de solução tampão de pH 7, para ficarmos com a cor exata no ponto de titulação.

b. TITULAÇÃO E RESULTADO

Introduzem-se, na cápsula de vidro, 30 cm³ de água e 1 cm³ de indicador azul de bromotimol. Juntam-se, medidos por pipeta de precisão, 5 cm³ de mosto ou vinho e titula-se com solução de hidróxido de sódio 0,05 N de modo a atingir coloração idêntica à do ensaio prévio e regista-se o volume gasto (V).

Sendo V- o volume, em centímetros cúbicos, da solução de hidróxido de sódio 0,05 N, então a acidez total expressa em gramas de ácido tartárico por decímetro cúbico, é dada por:

$$AT = 0,75 \times V \text{ (g/dm}^3 \text{ expresso em ácido tartárico)}$$

C. VALORES DE ACIDEZ TOTAL OBTIDOS

Tabela 25- Valores de acidez total e pH no mosto inicial e no final das culturas

	Mosto Inicial	Cultura com imobilização	
		A	B
Acidez Total (g/L)	5,63	5,33	5,40
pH	3,14	3,05	3,04