

CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS DE LEVEDURAS COMERCIAIS EM MOSTO DE UVA

A. GAVA¹, E. FICAGNA¹, S. B. ROSSATO¹

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Bento Gonçalves

E-mail para contato: gava.angelogava@gmail.com

RESUMO – Na elaboração de vinhos as leveduras possuem papel fundamental na obtenção do produto final, sendo a inoculação de leveduras uma prática comumente utilizada na enologia. O objetivo deste estudo foi avaliar a cinética fermentativa, o grau alcoólico e a acidez volátil na fermentação de um mosto de uvas tintas *V. americanas* (Isabel e Bordô) por leveduras comerciais. Foram empregadas, *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus*, *Torulaspora delbrueckii*, e três *Saccharomyces c. r.f. cerevisiae*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições em cada ponto. As leveduras foram hidratadas, aclimatadas e adicionadas na dose de 30 g/hL. A cinética fermentativa foi monitorada pela liberação de CO₂. Após cessada atividade fermentativa, foram avaliados grau alcoólico e acidez volátil. A maior diferenciação entre os tratamentos foi observada na duração da fase Lag, tendo a *T. delbrueckii* aproximadamente 100h, e *S. cerevisiae* X5 destacando-se positivamente pelo menor período, cerca de 12h. A velocidade máxima de fermentação (1,0 a 1,2 g/L/h), o grau alcoólico (11,2 a 11,3%) e a perda máxima de CO₂ (21,7 a 22,8 g/L) não apresentaram diferenças significativas, entretanto, o momento onde ocorre a Taxa Máxima (h) foi o segundo fator com maior variância entre os tratamentos, variando de 50 h (*S. c. X5*) até 130 h (*Torulaspora d.*). Quanto à acidez volátil, a levedura *Torulaspora delbrueckii* destacou-se negativamente apresentando a mais elevada concentração no meio (0,8 g/L).

PALAVRAS-CHAVE: *Torulaspora delbrueckii*, fermentação alcoólica, acidez volátil, parâmetros cinéticos.

DOI: 10.5965/24473650312017001

1. INTRODUÇÃO

O setor enológico brasileiro encontra-se em constante expansão, sendo que atualmente existem cerca de 80 mil hectares de vinhedos, entre uvas de mesa e vinífera, no Brasil. A produção brasileira de vinhos em 2015 totalizou cerca de 350 milhões de litros (IBRAVIN, 2016), sendo que a Serra Gaúcha produziu no último ano cerca de 700 milhões de kg de uva para processamento, respondendo por 85% dos vinhos elaborados no país (IBRAVIN, 2016). Um dos pilares desta produção é a fermentação alcoólica conduzida por leveduras secas ativas

comerciais, que desde o início dos anos 80 vem sendo utilizadas como principais responsáveis da transformação do mosto de uva em vinho (SALMON; JULIEN-ORTIZ, 2008).

O fenômeno do processo fermentativo, que incide na conversão do mosto em bebida alcóolica (FLEET, 2007), pode ser conduzido de duas maneiras: fermentação espontânea, onde a fermentação ocorre naturalmente a partir da atividade de leveduras autóctones ou fermentação induzida, inoculando no mosto de uva leveduras enológicas para que inicie a fermentação (BISSON E JOSEPH, 2009). As leveduras possuem papel fundamental no processo até o produto final, dominantes na fermentação, produzindo o etanol e sendo responsáveis diretas pela qualidade sensorial da bebida (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000).

Deste modo, para que ocorra uma melhor conversão do mosto em vinho, é recomendado uma fermentação induzida, adicionando leveduras enológicas em quantidades ideais para o início adequado do processo fermentativo. Atualmente, sabe-se que o gênero *Saccharomyces* é o principal responsável pela dominância e término da fermentação alcoólica (PRETORIUS, 2000), sendo *Saccharomyces cerevisiae* a mais utilizada em fermentações. Para mostos com alta concentração de açúcares a *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* tornou-se comumente utilizada, dada que esta variedade possui maior resistência a concentrações de álcool ao fim da fermentação, mesmo com baixas quantidades de açúcares fermentescíveis no meio (HORNSEY, 2007).

No entanto, estudos quantitativos sobre a ecologia da vinificação demonstraram que níveis significativos de certas espécies não *Saccharomyces* podem sobreviver por períodos mais longos do que se pensava (ZOTT et al., 2008).

Atualmente, constata-se que leveduras secas ativas comercializadas possuem, ou devem possuir, uma curta fase de latência, garantindo uma boa fermentação inicial, constituindo um importante parâmetro na questão enológica (RENAULT, 2010), uma vez que há uma variada gama de microrganismos competindo no mosto e podem causar alguns malefícios à qualidade final da bebida, como a produção de ácido acético, entre outros. Além disso, a otimização dos fatores cinéticos pode levar a uma maior taxa fermentativa resultando em uma maior quantidade de etanol produzida, produto mais importante desta transformação.

A acidez volátil em vinhos pode ser responsável por muitos efeitos negativos na qualidade sensorial da bebida, visto que 95% desta corresponde ao ácido acético (LAMBRECHTS E PRETORIUS, 2000). Sabe-se que variadas cepas de leveduras em condições desfavoráveis de fermentação possuem capacidade de formá-lo, fazendo-se necessário a utilização de microrganismos que possuem menor taxa de produção deste composto.

Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a cinética fermentativa, o grau alcóolico e a acidez volátil, a partir da fermentação de um mosto de uva por cinco diferentes leveduras comerciais, quatro *Saccharomyces* e uma não *Saccharomyces*, *Torulasporea delbrueckii*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação do Mosto

O mosto utilizado para o experimento foi proveniente de uvas *Vitis americana*, sendo 85% Isabel e 15% Bordô, oriundas da estação experimental do IFRS – Campus Bento Gonçalves, cujos tratamentos fitossanitários são controlados e conhecidos. O processo de obtenção do mosto constituiu-se de desengace, esmagamento, pasteurização (85 °C/2 min), enzimação (pectinase comercial 20 mg/L, 2 horas em torno de 45 °C), filtração, pasteurização (85 °C/1 min) e envase em embalagens de vidro.

Optou-se por utilizar estas variedades por serem amplamente difundidas e adaptadas ao clima e solo da Serra Gaúcha, representando parcela expressiva das uvas processadas na região (DEBASTIANI et al., 2016). Além disso, são variedades rústicas, cujas necessidades de tratamentos fitossanitários são menores que nas variedades *Vitis viníferas*, diminuindo riscos de substâncias interferentes na fermentação alcoólica.

Todo o processo foi realizado na Vinícola-Escola da instituição na safra 2015, sendo que o mosto antes da adição dos tratamentos apresentava: Acidez Total de 7,46 g/L em Ácido Tartárico, Acidez Volátil de 0,16 g/L em Ác. Acético, 140,8 g/L de Açúcares Totais, Densidade Relativa de 1,065 g/mL, pH de 3,37, 16,4 °Brix e 0,13% de Etanol, sendo todas análises realizadas sobre metodologias regulamentadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005) e realizadas em laboratório contratado pelo IFRS-BG.

No momento da estruturação do experimento foram utilizados 15 L de mosto homogeneizado, se fazendo a adição de sacarose de cana (50 g/L), dióxido de enxofre [SO₂] (50 mg/L), por meio de metabissulfito de potássio, e a inoculação de levedura (30 g/hL). A correção de açúcares e de SO₂ foi realizada no volume total de mosto utilizado. Quanto à adição de leveduras, se deu a distribuição dos tratamentos em recipientes contendo 250 mL de mosto, de modo a haver 5 tratamentos, em triplicata.

2.2. Microrganismos

Para o estudo foram empregadas cinco leveduras comerciais, apresentadas na Tabela 1. As leveduras foram aclimatadas e hidratadas, com água destilada a 35 °C por 15 minutos, exceto *Torulaspóra d.* a 32 °C, conforme recomendação dos fornecedores. Após aclimação foram adicionadas ao mosto utilizando a mesma dose para todas as leveduras (30 g/hL).

Tabela 1 - Relação das leveduras secas ativas comerciais utilizadas no experimento.

Nome Comercial	Empresa	Nome científico	Doses Recomendadas
La Claire SP665	Perdomini IOC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> r.f. bayanus	25 a 50 g/hL
Zymaflore Alpha	Laffort	<i>Torulaspóra delbrueckii</i>	30 g/hL
Fermento biológico	Fleischmann	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> r.f. cerevisiae	Sem recomendação
Zymaflore X5	Laffort	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> r.f. cerevisiae	20 a 30 g/hL
Zymaflore X16	Laffort	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> r.f. cerevisiae	20 a 30 g/hL

2.3. Fermentação

A cinética fermentativa foi avaliada e representada graficamente pela perda de massa diária devido à produção de dióxido de carbono (CO₂) em função do tempo, cada ponto do tratamento foi monitorado em balança eletrônica, a cada 12 h, durante 15 dias. Os dados foram analisados de acordo com o ajuste sigmoidal não linear da equação de Gompertz modificada (ZWIETERING et al., 1990), conforme Equação 1, a qual sua importância dentro de pesquisas enológicas tem sido relatada, por Rinaldi et al. (2006) e O’neill e Muhlack (2011).

$$y = A \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m \cdot \epsilon}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Sendo assim, foram obtidos os seguintes parâmetros cinéticos: perda de massa máxima (g/L), a velocidade máxima de produção de CO₂ (g/L/h), o tempo da fase de latência (Fase Lag) para a produção de CO₂ (h) e o tempo para ocorrer a taxa máxima de produção de CO₂ (CHAVES LÓPEZ et al., 2004). Utilizou-se o Software Livre “Integrated Predictive Modeling Program Tools” da USDA (HUANG, 2013) para avaliação do modelo e obtenção dos parâmetros. O fim da fermentação foi constatado quando não foi mais observada perda de massa em um intervalo de 24 horas.

2.4. Análises Químicas Realizadas

Uma semana após cessada a atividade fermentativa, foram avaliados grau alcoólico, por meio de destilação eletrônica e posterior medida da densidade do destilado em balança hidrostática Gibertini®, e acidez volátil, medida por titulação de neutralização, após arraste de vapor, ambas de acordo com metodologias descritas pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2009).

2.5. Análise Estatística

Para a realização do experimento o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 5 tratamentos com três repetições, totalizando 15 pontos. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey (5%) pelo software Assistat versão 7.6 (SILVA, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os parâmetros avaliados as maiores variações foram observadas na fase lag (Tabela 2). Os tempos encontrados ficaram entre um intervalo de 12 e 100 h. A levedura *S. cerevisiae* X5 destacou-se positivamente pela menor fase de latência, parâmetro desejado principalmente

em fermentações de mosto de variedades tintas, uma vez que há uma maior quantidade de microrganismos competindo e as leveduras *Saccharomyces* comerciais devem dominar este meio (ARNEBORG et al., 2005).

A fermentação obtida com *Torulaspora delbrueckii* se destacou negativamente, com uma longa fase lag (≈ 100 h), valor indesejado em uma fermentação de mostos, uma vez que outros microrganismos podem intervir, consumindo nutrientes e produzindo compostos indesejados (CIANI e PEPE, 2002), em trabalhos anteriores foi constatado que ensaios onde a *Torulaspora delbrueckii* foi conduzida isoladamente tiveram uma cinética fermentativa mais lenta (BELDA et al., 2015).

Notou-se que as diferenciações entre as fases de latência ficaram perceptíveis também nas curvas de representação de produção de CO₂, conforme a Figura 1, uma vez que há 4 comportamentos de curva distintos.

Tabela 2 - Parâmetros avaliados estatisticamente

Levedura	Lag (h)	V _{max} (g/L/h)	Tempo V _{max} (h)	Etanol % (v/v)	Y _{max} (g/L)	A.V. (g/L)
<i>S. cerevisiae r.f. bayanus</i>	48,36 b	1,23 *ns	75,96 b	11,3 *ns	22,82 *ns	0,37 b
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	103,5 a	1,09	133,2 a	11,2	21,88	0,84 a
<i>S. c. r.f. cerevisiae panificio</i>	46,56 b	1,09	78,44 b	11,3	22,54	0,35 b
<i>S. c. r.f. cerevisiae X5</i>	12,18 d	1,02	49,59 c	11,3	21,73	0,47 b
<i>S. c. r.f. cerevisiae X16</i>	29,76 c	1,13	61,12 c	11,2	22,75	0,28 b

Lag = Tempo de Fase de Latência (Horas); V_{max} = Velocidade (Taxa) Máxima de Fermentação (g/L/h); Tempo V_{max} = Tempo, em horas, que ocorre a taxa máxima de fermentação; Etanol = Teor de etanol produzido, expresso em % (v/v); Y_{max} = Produção Máxima de Dióxido de Carbono (CO₂), em g/L; A.V. = Acidez Volátil expressa em g/L de Ácido Acético; Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes segundo teste de Tukey (P < 0,05); *ns = não significativo.

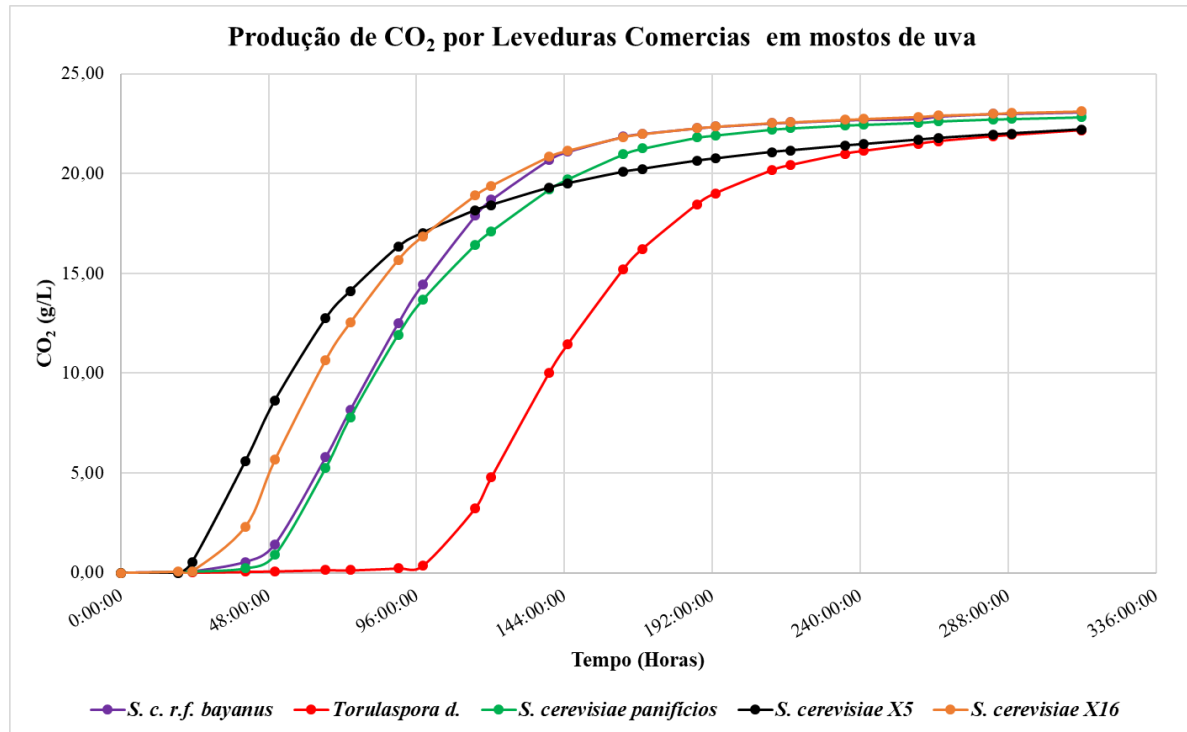


Figura 1 -Comportamento da Fermentação de Mosto de Uva em leveduras comerciais.

Não houve diferenciação entre os tratamentos quanto a Velocidade Máxima de Produção de CO₂ (V_{max}), porém o tempo transcorrido da fermentação para ela ocorrer (Tempo V_{max}) foi diferente entre as leveduras testadas. A *Torulaspora d.* demorou aproximadamente o dobro do tempo que as demais leveduras para atingir a Velocidade Máxima de Fermentação (aproximadamente 130 h). As leveduras X5 e X16 alcançaram a taxa máxima antes das demais leveduras, 49,6 e 61,1 h, respectivamente.

Quanto ao teor alcóolico final (% Etanol), não houve diferença significativa (<5%), assim do mesmo modo que não houve diferença entre a produção máxima de CO₂ (Y_{max}), uma vez que estes obedecem a proporção de aproximadamente 50% para cada composto. Autores relatam para a redução de 1% de Etanol quando a Fermentação é realizada pela levedura *Torulaspora delbrueckii* (CONTRERAS et al., 2014; KUTYNA et al., 2010), no entanto os valores encontrados para a produção de etanol variam em aproximadamente 0,1%, Belda et al. (2015) encontraram variações inferiores a 0,2%.

A acidez volátil (A.V.) analisada nos tratamentos, diferenciou apenas a levedura não *Saccharomyces*. Os demais tratamentos não diferenciaram entre si. Este resultado pode ser explicado porque a *T. delbrueckii* é uma levedura indicada para uma fermentação alcoólica em parceria com uma levedura *Saccharomyces* (co-inoculação sequencial), onde sua ação deve ser no início do processo e a outra levedura sequencialmente finalizaria a fermentação, ou ainda, devido a longa fase de latência desta levedura, fator este que pode proporcionar a formação de compostos indesejados (RENAULT, 2010).

BELDA et al. (2015) relatam pequenas diferenças entre a acidez volátil produzida em seus ensaios, sendo que a produção de ácido acético pela *Torulaspora delbrueckii* se diferenciou das demais com uma maior produção.

Além disto, leveduras não *Saccharomyces* possuem pouca tolerância ao SO₂ (FLEET, 1992), sendo que a dose utilizada neste experimento (50mg/L) é acima do recomendado pelo fornecedor para a condução da fermentação alcoólica com estas estirpes. Destaca-se que diante dos parâmetros avaliados a *S. cerevisiae* específica para panificios (Fleischmann) obteve resultados satisfatórios diante das demais leveduras comerciais enológicas. Porém é preciso citar que testes sensoriais são fundamentais para avaliar as características no momento da comercialização de um micro-organismo para a indústria vitivinícola.

4. CONCLUSÕES

A maior diferenciação entre os tratamentos foi observada na duração da fase de latência, sendo que a levedura Zymaflore X5 destacou-se positivamente pela curta fase lag com cerca de 12 horas, e *Torulaspora delbrueckii* destacando-se negativamente, tendo aproximadamente 100 h de fase de latência e gerando maior acidez volátil no meio. As leveduras não promoveram diferenças significativas nas quantidades de etanol e de dióxido de carbono produzidas e na taxa máxima de fermentação.

5. REFERÊNCIAS

- ARNEBORG, N., SIEGUMFELDT, H., ANDERSEN, G.H., NISSEN, P., DARIA, V.R., RODRIGO, P.J., e GLÜCKSTAD, J. Interactive optical trapping shows that confinement is a determinant of growth in a mixed yeast culture. FEMS microbiology letters, v. 245, n. 1, p. 155-159, 2005.
- BELDA, I., NAVASCUÉS, E., MARQUINA, D., SANTOS, A., CALDERON, F., e BENITO, S. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. Applied microbiology and biotechnology, v. 99, n. 4, p. 1911-1922, 2015.
- BISSON, Linda F.; JOSEPH, CM Lucy; DOMIZIO, Paola. Yeasts. In: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer, Cham, 2017. p. 65-101.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. (2005) - Instrução Normativa nº24, de 8 de setembro de 2005. Brasília. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acesso em 12/11/2017.
- CHAVES LÓPEZ, C., BOSELLI, E., PIVA, A., NDAGHIJIMANA, M., PAPARELLA, A., SUZZI, G., e MASTROCOLA, D. Influence of quinoxifen residues on *Saccharomyces cerevisiae* fermentation of grape musts. Food Technology and Biotechnology, v. 42, n. 2, p. 89-97, 2004.

- CIANI, Maurizio; PEPE, Vincenzo. The influence of pre - fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 82, n. 5, p. 573-578, 2002.
- CONTRERAS, A., HIDALGO, C., HENSCHKE, P. A., CHAMBERS, P. J., CURTIN, C., e VARELA, C. Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, n. 5, p. 1670-1678, 2014.
- DEBASTIANI, G., LEITE, A.C., WEIBER JUNIOR, C.A. e BOELHOUWER, D.I. Cultura da Uva, Produção e Comercialização de Vinhos no Brasil: Origem, Realidades e Desafios. *Revista Cesumar– Ciências Humanas e Sociais Aplicadas*, v. 20, n. 2, 2016.
- FLEET, Graham H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current opinion in biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 170-175, 2007.
- FLEET, Graham. Spoilage yeasts. *Critical reviews in biotechnology*, v. 12, n. 1-2, p. 1-44, 1992.
- HORNSEY, Ian Spencer. *The chemistry and biology of winemaking*. Royal Society of Chemistry, 2007.
- HUANG, L. The USDA Integrated Pathogen Modeling Program. 2014. INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO (IBRAVIN), 2016.
- INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE (OIV). *Compendium of international methods of wine and must analysis*, 2009.
- JULIEN, Anne Ortiz; SALMON, Jean-Michel. *Mejora de la fermentación alcohólica en condiciones extremas*. 2008.
- KUTYNA, D. R., VARELA, C., HENSCHKE, P. A., CHAMBERS, P. J., e STANLEY, G. A. Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, n. 6, p. 293-302, 2010.
- LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. *Yeast and its importance to wine aroma*. 2000.
- O'NEILL, B., VAN HEESWIJCK, T., e MUHLACK, R. Models for predicting wine fermentation kinetics. *Chemeca 2011: Engineering a Better World: Sydney Hilton Hotel, NSW, Australia, 18-21 September 2011*, p. 1956, 2011.
- PRETORIUS, Isak S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.
- RENAULT, Philippe-Emmanuel. *Caractérisation phénotypique de l'espèce Torulaspora*

delbrueckii en conditions œnologiques. Application à la co-inoculation avec l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. 2010. Tese de Doutorado. Bordeaux 2.

RINALDI, S., TIANO, A., SERBAN, S., PITTSON, R., LAJIC, Z., POLITI, H., EL MURR, N., ARMANI, A. e CAVAZZA, A. Monitoring wine quality and fermentation kinetics with innovative technologies. In: XXIX Congreso mundial de la viña y el vino: 4a asamblea general de la OIV. Madrid: Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. 2006. p. 10.

SILVA, F. A. S. ASSISTAT-Assistência Estatística, versão 7.6. Universidade Federal de Campina Grande-PB. 2013.

ZOTT, K., MIOT-SERTIER, C., CLAISSE, O., LONVAUD-FUNEL, A., e MASNEUF-POMAREDE, I. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International journal of food microbiology*, v. 125, n. 2, p. 197-203, 2008.

ZWIETERING, M. H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F. M., e VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.