

PROCESSOS MICROBIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS (EM MOSTOS E VINHOS)

Prof. Vinícius Caliari

Curitiba 09-10 de Maio de 2014

Conteúdo programático

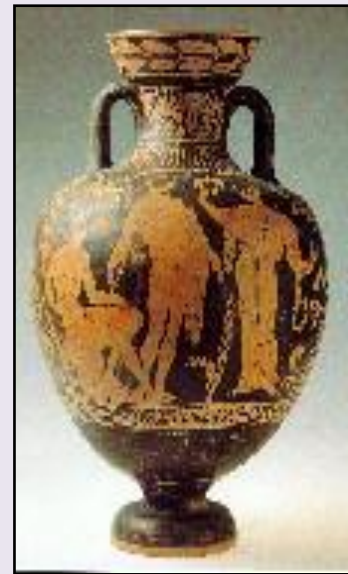
1. Citologia, Taxonomia e Ecologia da Uva e das leveduras
2. Bioquímica da fermentação alcoólica e Rotas metabólicas das leveduras
3. Condições para o desenvolvimento das leveduras
4. Bactérias ácido lácticas
5. Metabolismo das bactérias lácticas
6. Desenvolvimento de bactérias lácticas no vinho
7. Bactérias acéticas

Pão e Bebidas Fermentadas são relatados desde o início dos registros históricos

O homem reconhece que a elaboração cotidiana do vinho começa com os assentamentos das populações nômades e o nascimento da agricultura (7.000 a.C.)

1970 se encontrou em Godin Tepe, Irã, uma ânfora de 3.500 a.C

Sendo que o processo de fermentação tinha várias explicações:



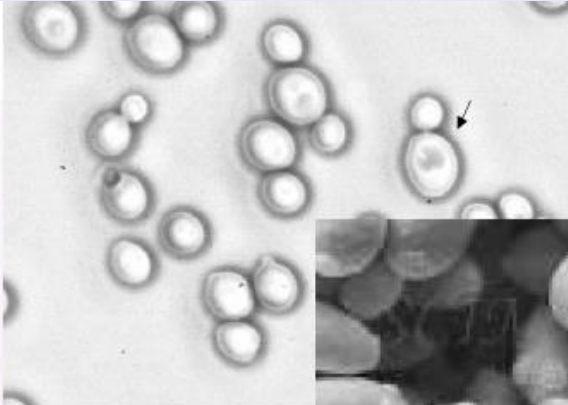
Vários trabalhos contribuíram para esse estudo sendo um dos principais o desenvolvido por Pasteur demonstrando que as leveduras encontravam-se na casca das uvas e transformavam espontaneamente o açúcar.



Desde Pasteur inúmeros trabalhos tem sido desenvolvidos no progresso da microbiologia, bioquímica, biologia genética e molecular de leveduras e de elaboração de vinhos.

ELABORAÇÃO DE UM VINHO
FERMENTAÇÃO TUMULTUOSA

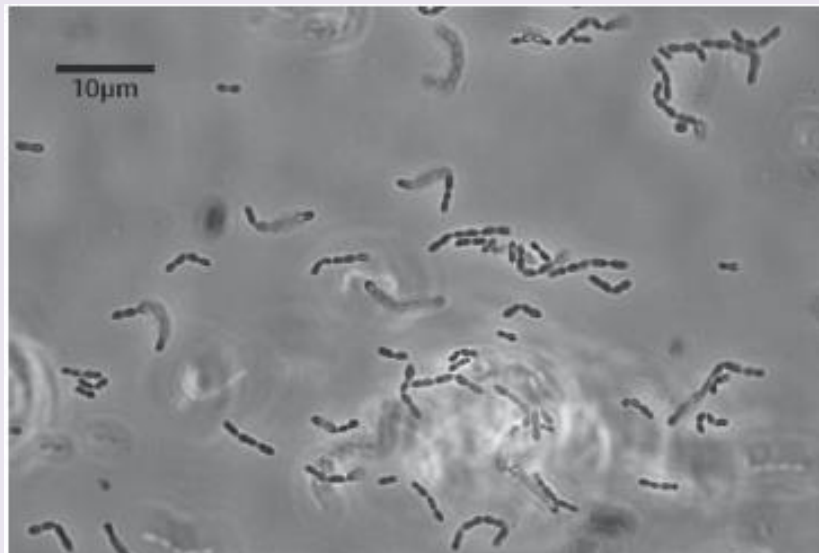
Leveduras



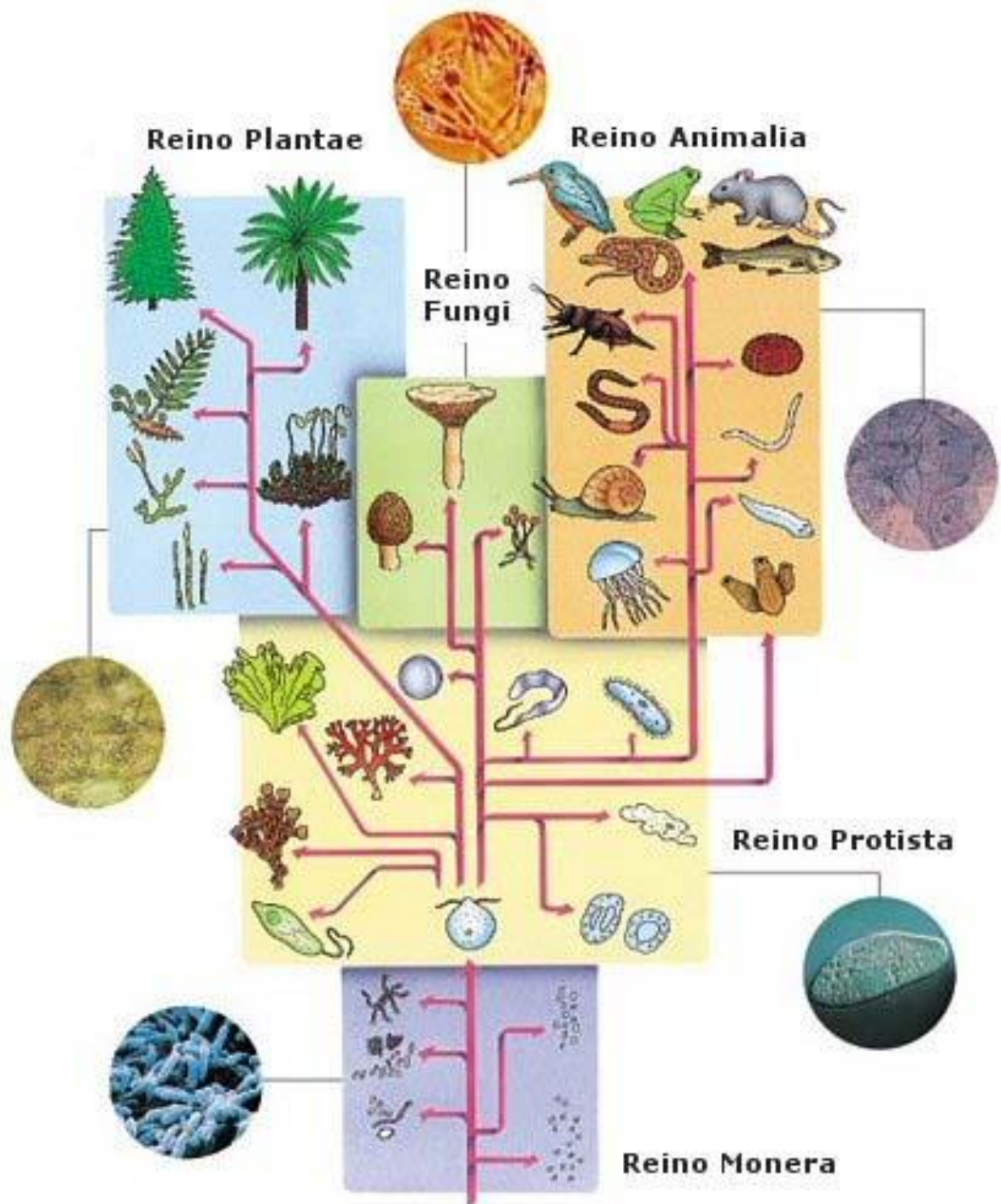
Saccharomyces



FERMENTAÇÃO LENTA



Bactérias



As leveduras, como os bolores, são fungos, mas deles se diferenciam por se apresentarem, usual e predominantemente, sob forma unicelular.

Uma levedura típica consta de células ovais, que se multiplicam assexuadamente comumente por brotamento ou gemulação.

Como células simples, as leveduras crescem e se reproduzem mais rapidamente do que os bolores.

Também são mais eficientes na realização de alterações químicas, por causa da sua maior relação área/volume.

A maioria das leveduras, não vive no solo mas adaptou-se a ambientes com alto teor de açúcares, tal como néctar das flores e a superfície de frutas (UVA).

As leveduras também diferem das algas, pois não efetuam a fotossíntese, e igualmente não são protozoários porque possuem uma parede celular rígida.

São facilmente diferenciadas das bactérias em virtude das suas dimensões maiores e de suas propriedades morfológicas.

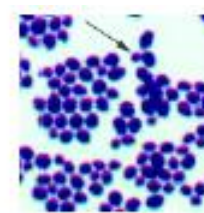
Redondas



Trigonopsis
Candida
Saccharomyces

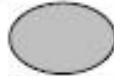


Saccharomyces cerevisiae



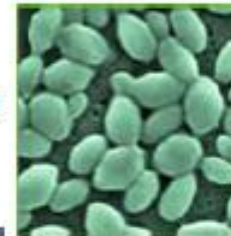
Candida albicans

Ovais



Hansenula
Saccharomyces
Trigonopsis

Hansenula



Cilíndricas



Hansenula
Saccharomyces
Kloëckera



Saccharomyces cerevisiae

Triangulares

→ *Trigonopsis*

Apiculares



→ *Kloëckera*

Ogivas

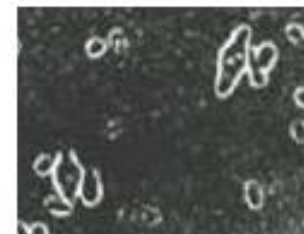
→ *Bretanomyces*



Trigonopsis variabilis



Bretanomyces dekkera



Embora apresentem uniformidade morfológica, ou melhor, são diferenciados de acordo com características morfológicas e mais de acordo com as características fisiológicas. Formam um grupo complexo e heterogêneo dividido em três classes caracterizadas pela forma de sua reprodução: Basidiomicetos, ascomicetos e deuteromicetos.



Domínio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Saccharomycetes

Ordem: Saccharomycetales

Família: Saccharomycetaceae

Género: Saccharomyces

Espécie: *S. cerevisiae*

REPRODUÇÃO

ASSEXUADAMENTE

Ascomicetos

Multiplicação vegetativa

(Brotação)

Mostos e uvas

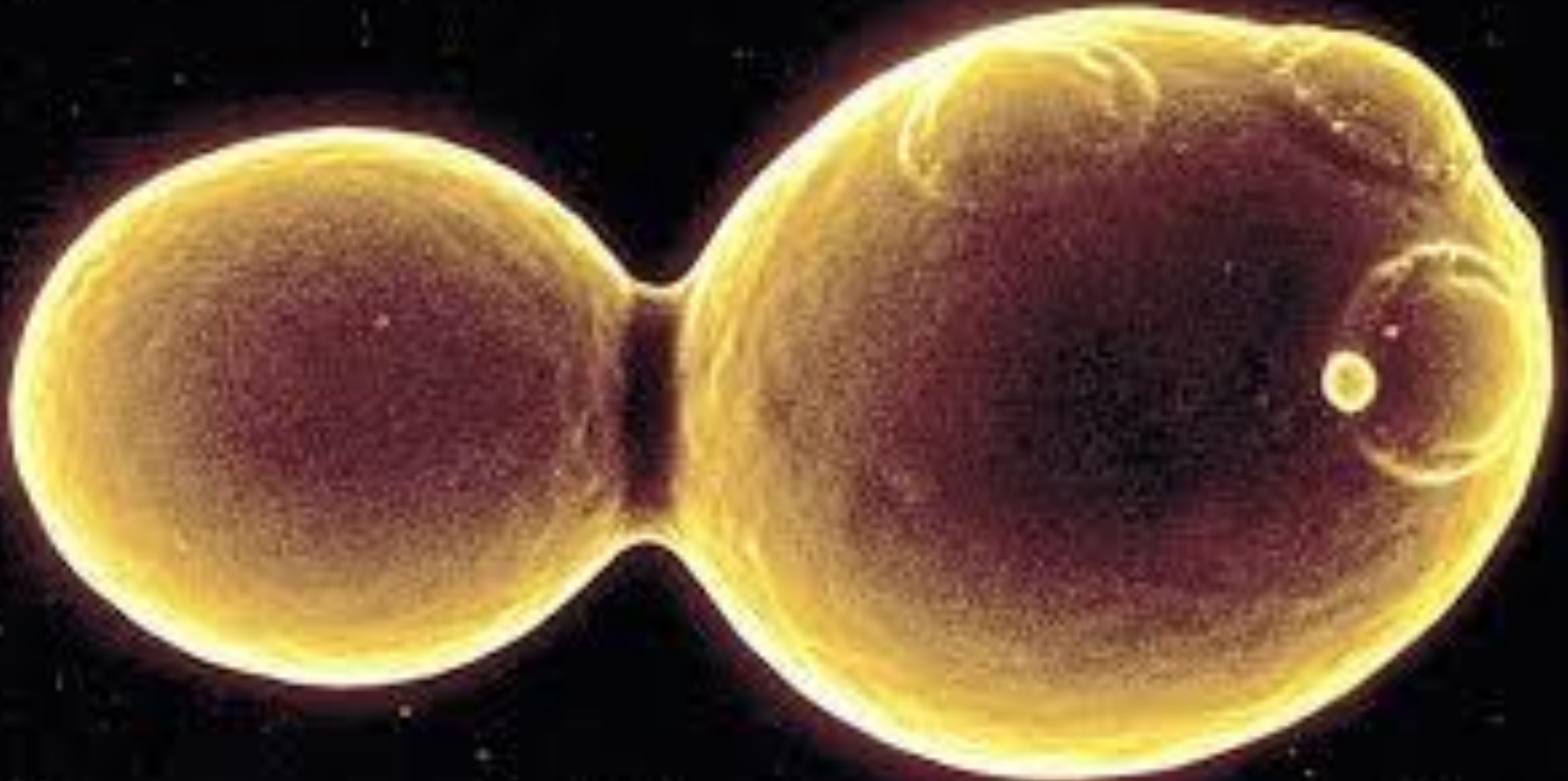
aproximadamente 1-2 Horas

SEXUADAMENTE

Meio hostil

Células diplóides

- Reprodução



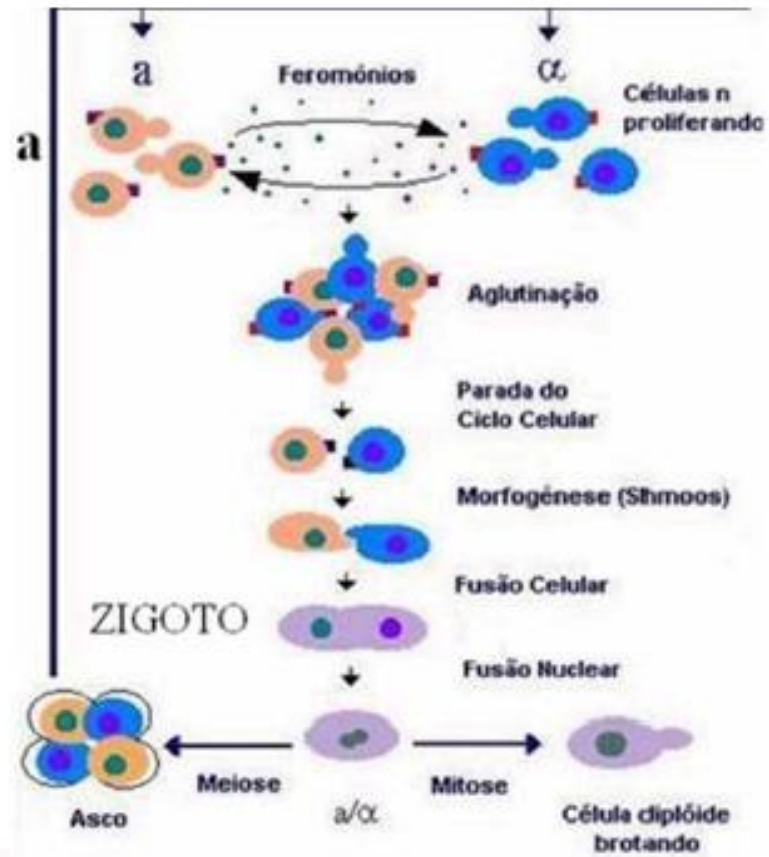
Cicatriz do broto



Célula mãe



- Reprodução



CITOLOGIA LEVEDURA

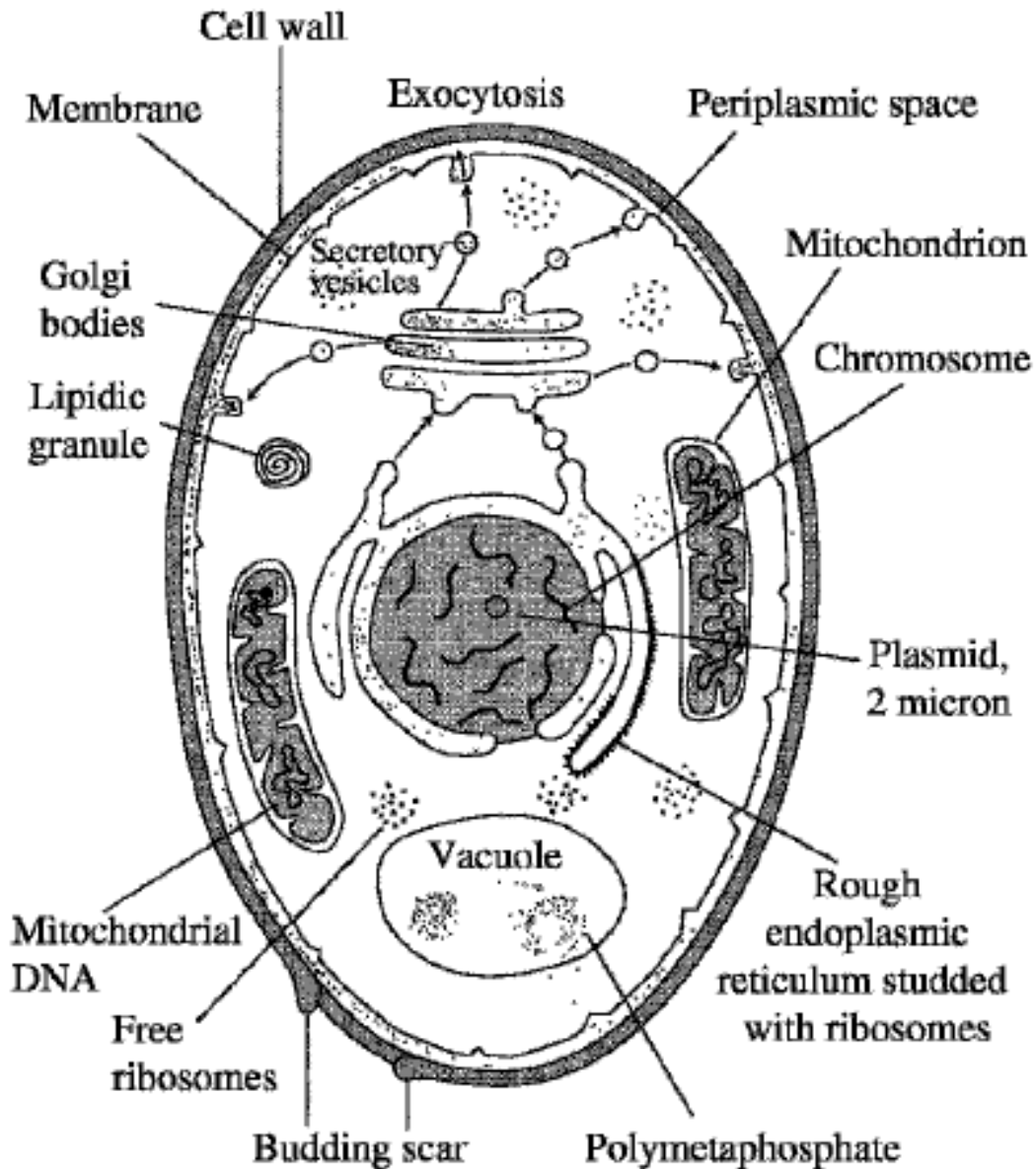
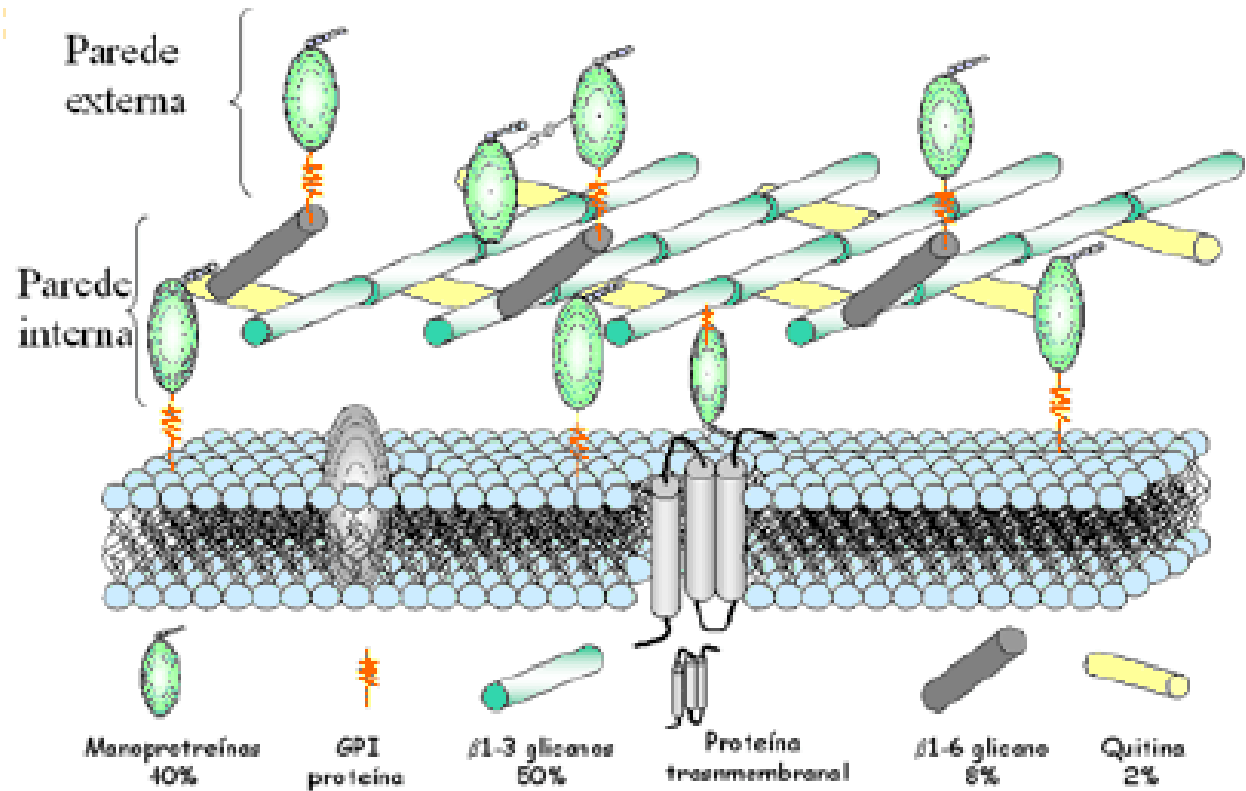


Fig. 1.1. A yeast cell (Gaillardin and Heslot, 1987)

PAREDE CELULAR

Superfície:

- Parede Celular



β -glucanas – 60 % do peso seco

Manoproteínas 25-50% 20-450 kDa

Quitina – 1-2%

- β 1-3 Fibrosa (rigidez e forma)
- β 1-3 Amorfa (elasticidade e ancoragem)
- β 1-6 Receptor de Fator Killer

MANOPROTEÍNAS

Melhor estabilização da coloração e melhoria nas características gustativas, pela complexação dos taninos, manoproteínas e antocianinas, tornando mais agradáveis ao paladar e também aumentando a estrutura e redondez do vinho.

Agem também sobre os compostos aromáticos mudando as características sensoriais dos vinhos elaborados de diferentes formas.

O uso de manoproteínas é uma ferramenta de vital importância na melhoria da qualidade dos vinhos, conferindo-lhes características de doçura aromática,

MEMBRANA PLASMÁTICA

Barreira altamente seletiva que controla as trocas entre o meio externo e a célula, sendo essencial para a vida da levedura.

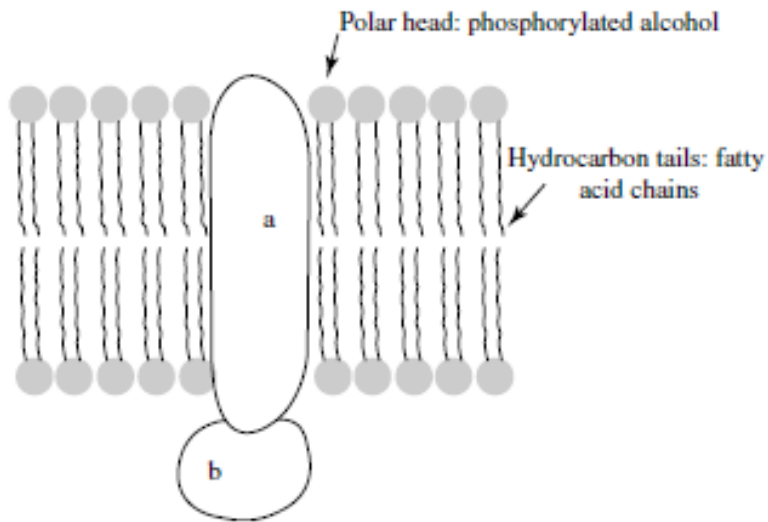
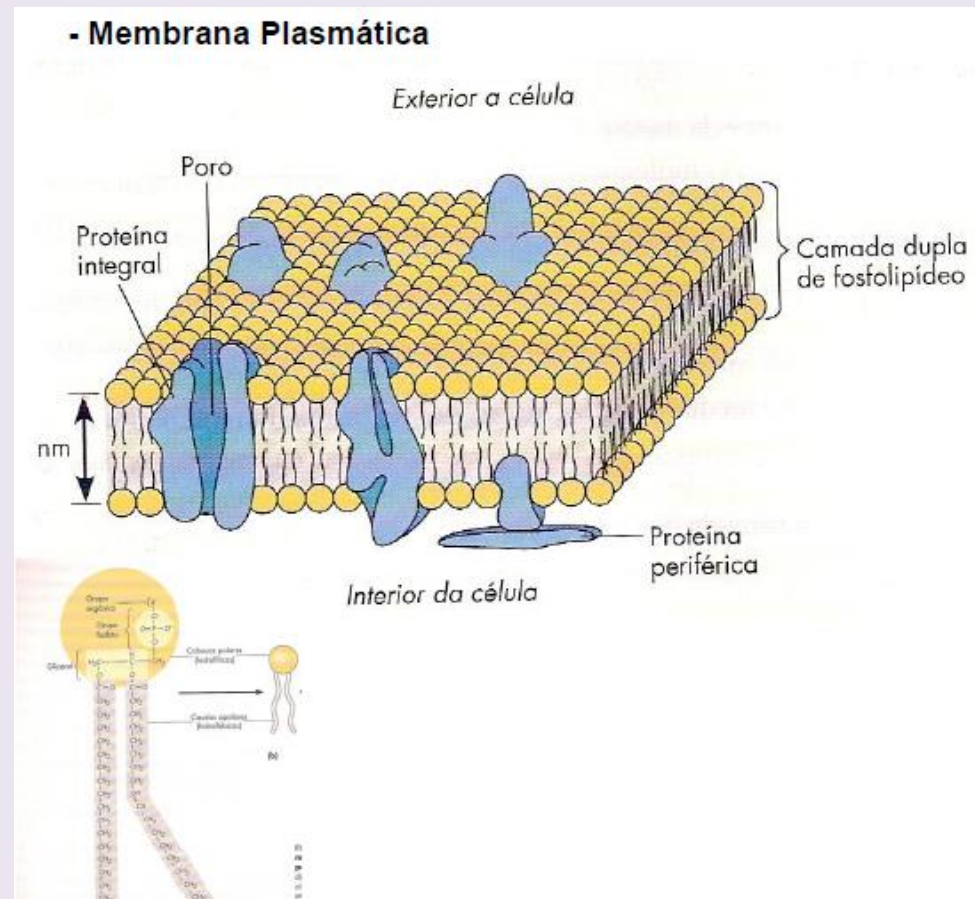
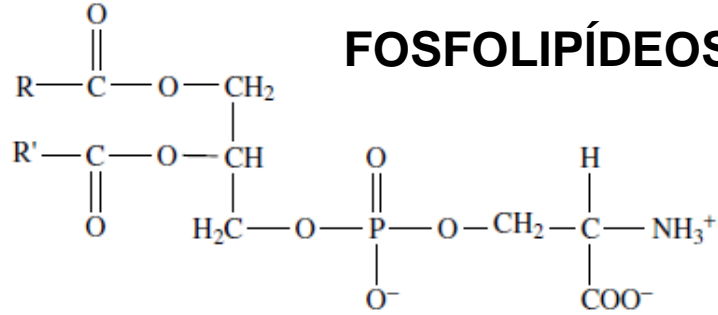


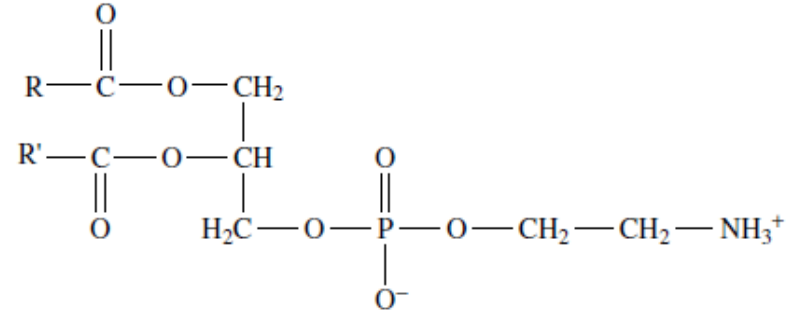
Fig. 1.6. A membrane lipid bilayer. The integral proteins (a) are strongly associated to the non-polar region of the bilayer. The peripheral proteins (b) are linked to the integral proteins



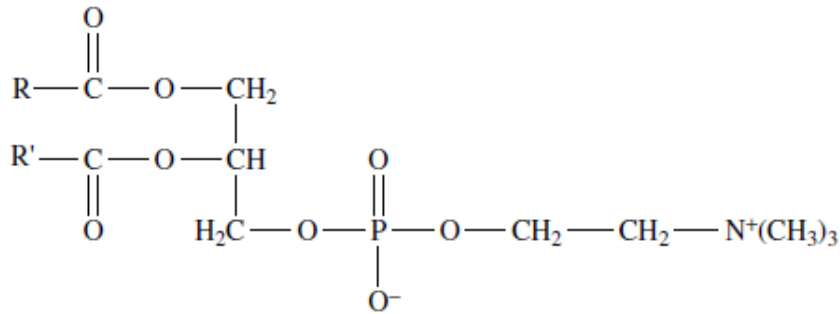
FOSFOLIPÍDEOS



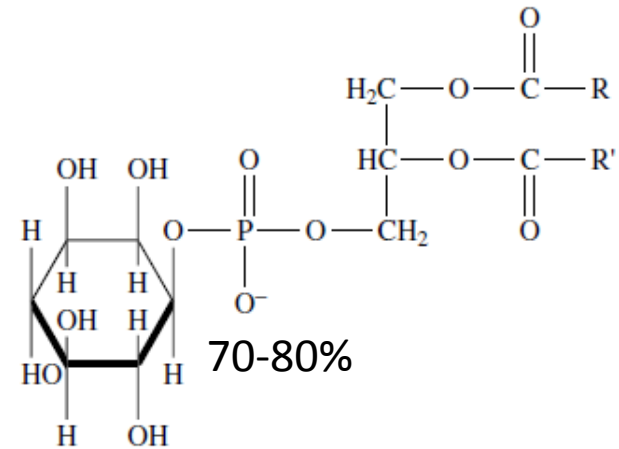
Phosphatidyl serine



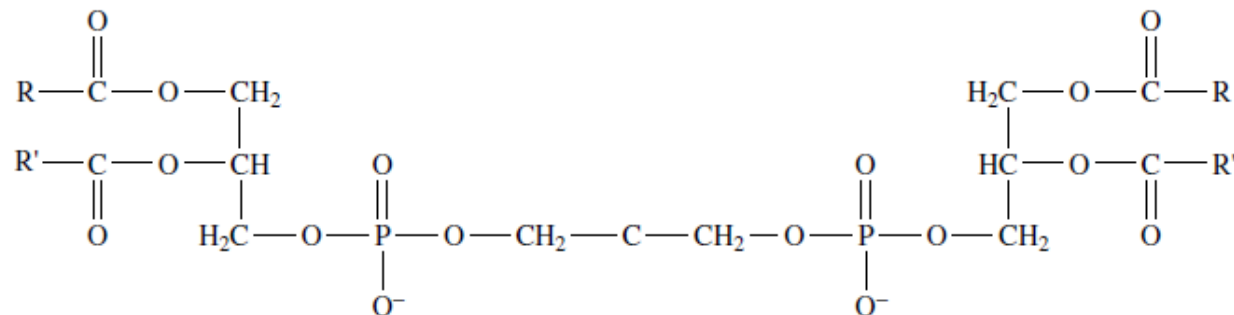
Phosphatidyl ethanolamine



Phosphatidyl choline



Phosphatidyl inositol



Diphosphatidyl glycerol (cardiolipin)

ESTERÓIS

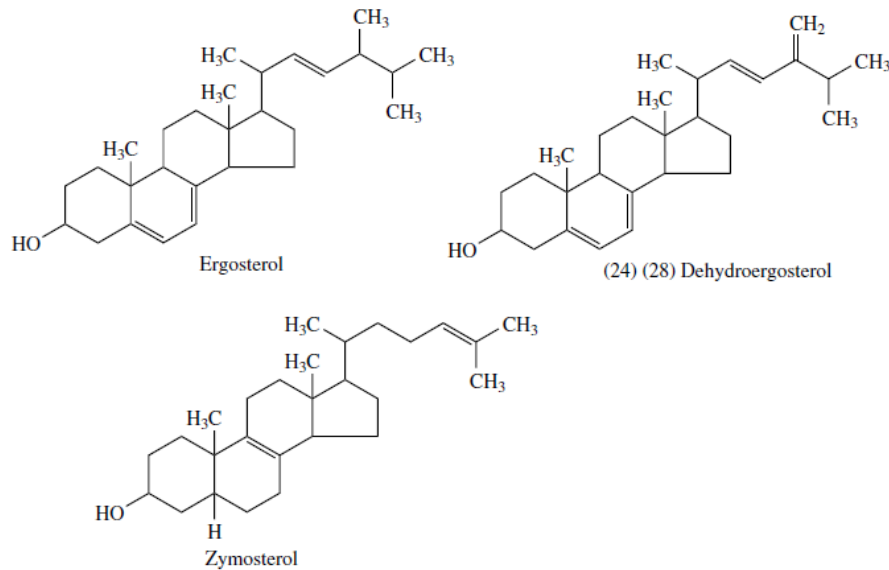


Fig. 1.7. Principal yeast membrane sterols

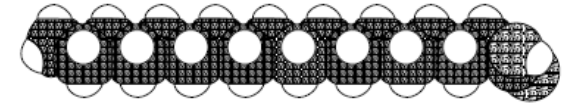
Etanol aumenta

Diminui penetração de arginina e glicose

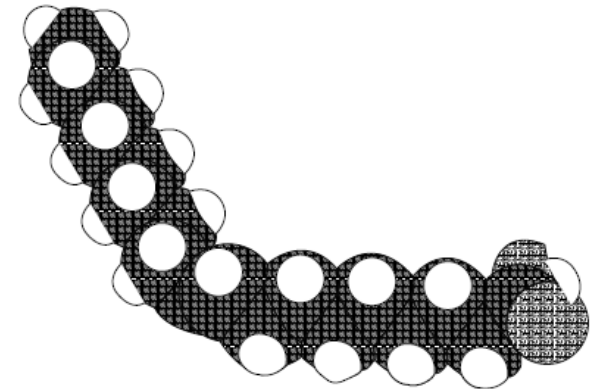
Aumenta síntese de fosfolípídeos e ácido oléico

**Inúmeras proteínas e glicoproteínas
10.000 a 120.000 kDa**

ÁCIDOS GRAXOS



Stearic acid (C₁₈, saturated)



Oleic acid (C₁₈, unsaturated)

Fig. 1.8. Molecular models representing the three-dimensional structure of stearic and oleic acid. The *cis* configuration of the double bond of oleic acid produces a curvature of the carbon chain

Transporte de açúcares para o interior da célula

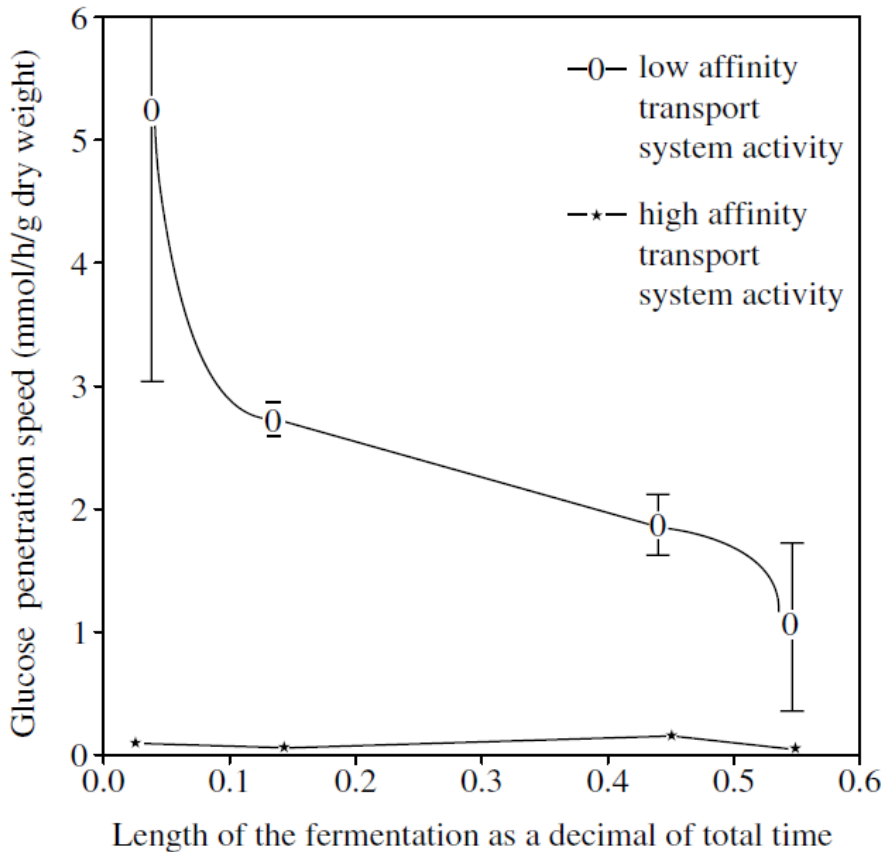


Fig. 1.9. Evolution of glucose transport system activity of *S. cerevisiae* fermenting a medium model (Salmon *et al.*, 1993). LF = Length of the fermentation as a decimal of total time GP = Glucose penetration speed (mmol/h/g of dry weight) 0 = Low affinity transport system activity * = High affinity transport system activity

Baixa afinidade

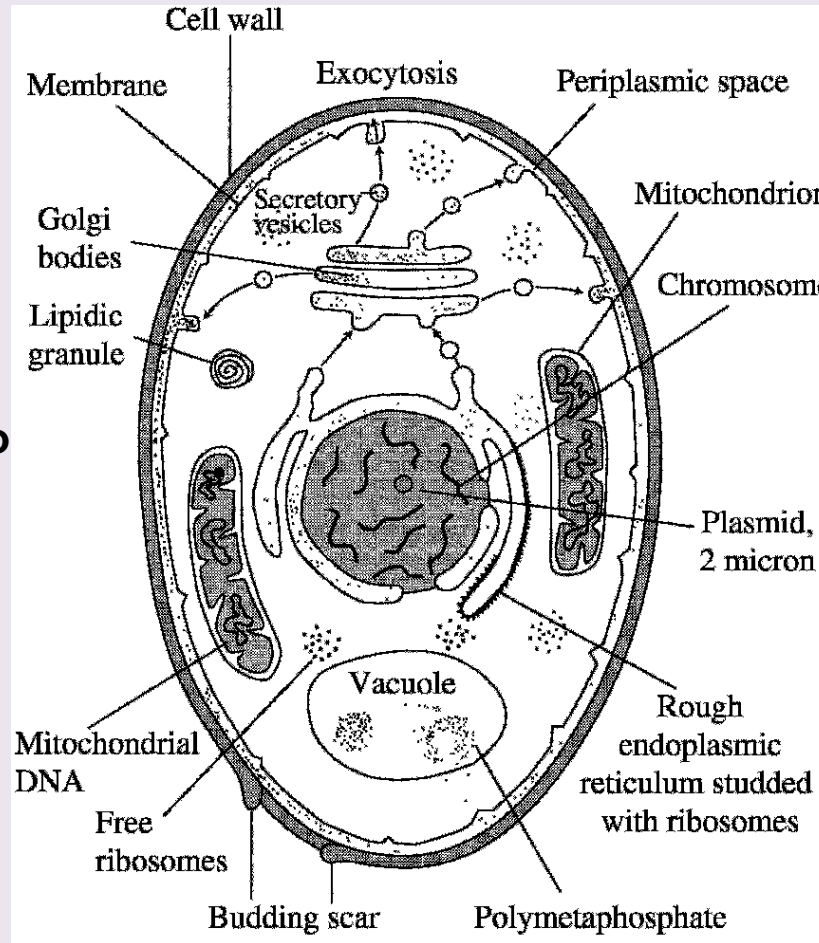
independe Hexoquinase

Alta afinidade depende

Hexoquinase e é

reprimido pela glicose

CITOPLASMA



Mitocôndria

Complexo de golgi

Retículo endoplasmático

Vácuolo

Núcleo

Citosol

Solução Tampão, pH 5-6

Enzimas solúveis

Glicogênios e

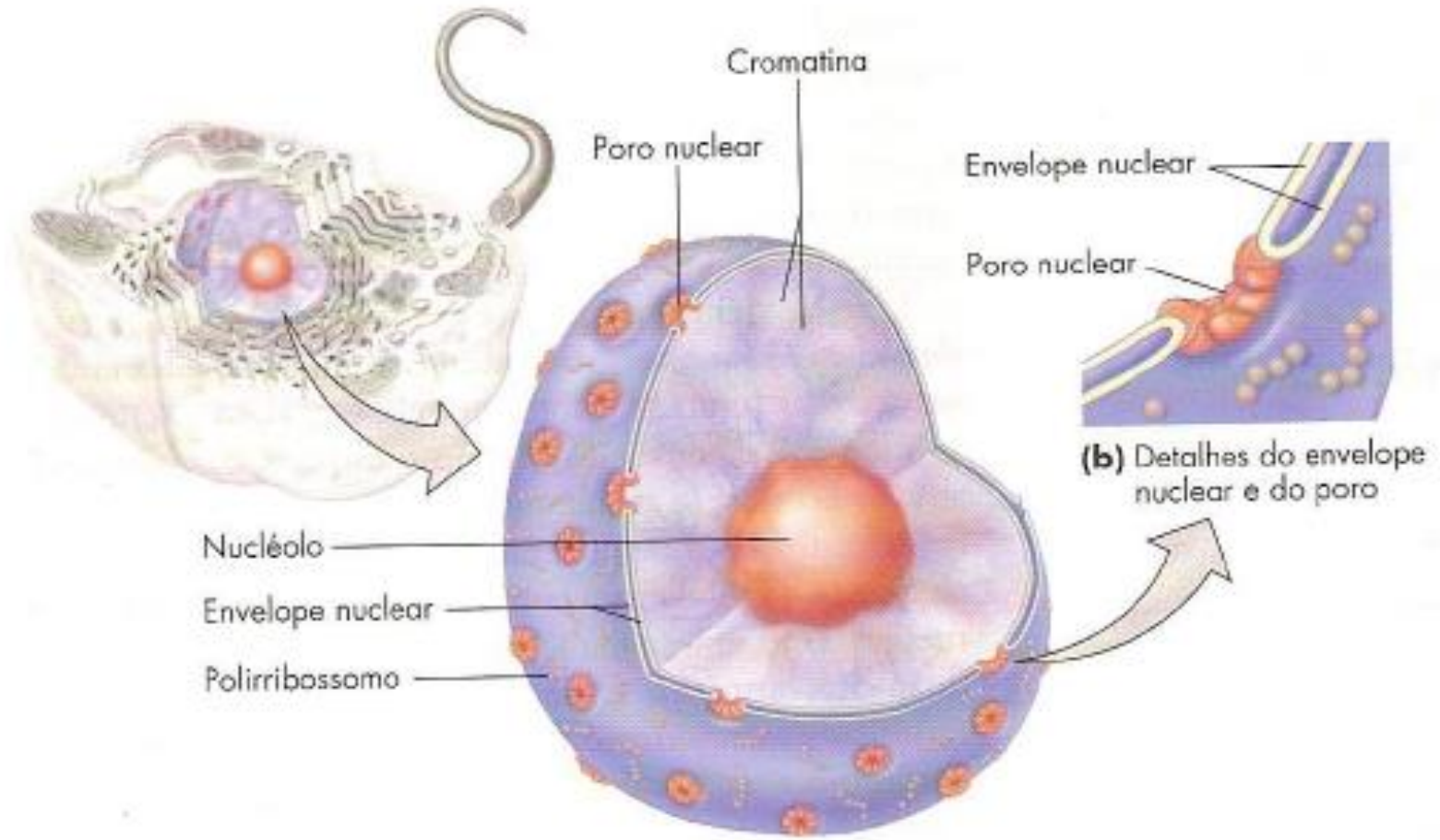
ribossomos

Trealose – reserva durante a desidratação

Organelas:

- O Núcleo

regular as reações químicas que ocorrem dentro da célula e armazenar suas informações genéticas.



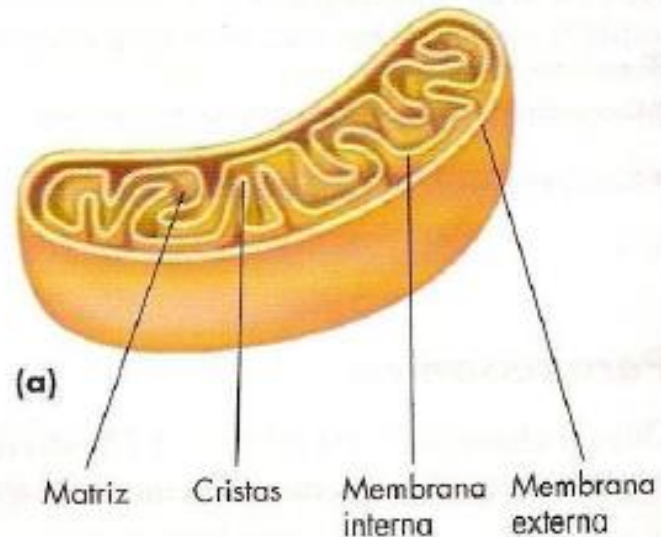
A CÉLULA EUCARIÓTICA

Organelas:

- Mitocôndria

Respiração celular

Produção de Energia

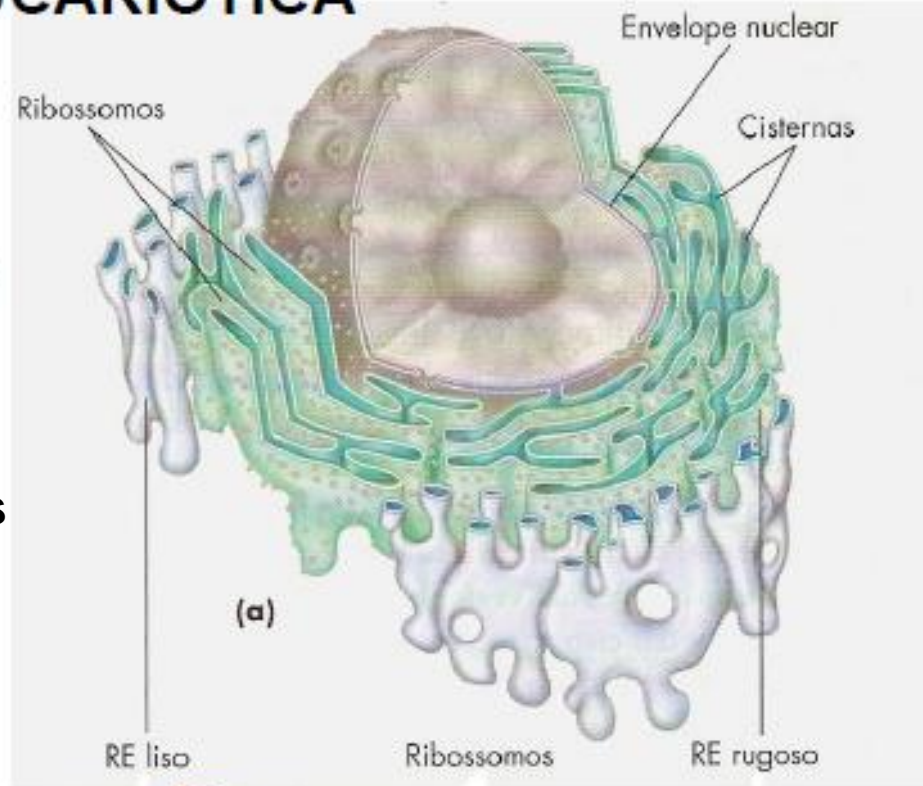


A CÉLULA EUCARIÓTICA

Organelas:

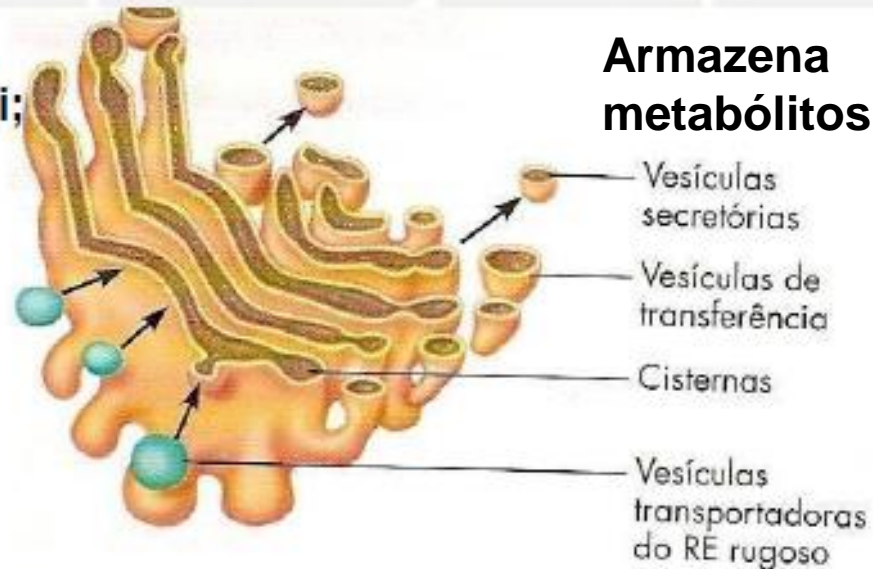
- **Retículo Endoplasmático;**
- **Ribossomos**

Encaminha enzimas



- **Complexo de Golgi;**
- **Vacúolo;**
- **Lisossomas**

Glicosilação de proteínas



Ecologia da Uva e das leveduras

No início de um processo de elaboração de vinhos, diversas espécies encontram-se presentes, sendo que a biodiversidade depende de inúmeros fatores como:

Variedade da uva, Estágio de colheita, tratamentos antifúngicos, condições climáticas da safra, desenvolvimento de pragas e de práticas culturais no vinhedo.

Contato das uvas e do mosto durante a colheita, transporte e em particular as operações durante a vinificação que influenciam significativamente na distribuição das leveduras no início da fermentação alcoólica

Diferentes espécies de leveduras participam da fermentação alcoólica espontânea

Usualmente:

Kloeckera, *Hanseniaspora* e *Candida* predominam no início da fermentação alcoólica

Pichia e *Metschnikowia* no meio da fermentação e

Saccharomyces cerevisiae predomina nas etapas finais devido a sua grande resistência a altas concentrações alcoólicas

Torulaspota, *Kluyveromyces*, *Schizosacchaomyces*, *Zygosaccharomyces* and

Brettanomyces

Problemáticas causam defeitos à qualidade do vinho

FATOR KILLER

Certas cepas de leveduras secretam proteínas tóxicas

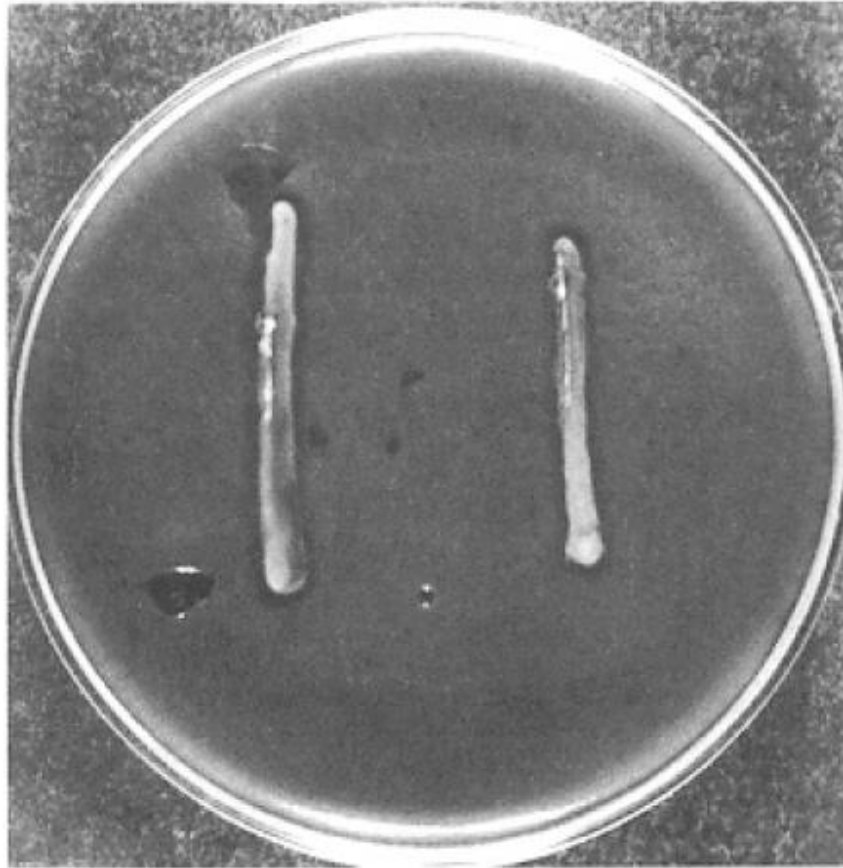


Fig. 1.17. Identification of the K2 killer phenotype in *S. cerevisiae*. The presence of a halo around the two streaks of the killer strain is due to the death of the sensitive strain cultivated on the medium

A característica killer é um fator importante para leveduras utilizadas na indústria de bebidas fermentadas, principalmente para a vinificação. No processo fermentativo, pode haver contaminação, causando possíveis limitações qualitativas.

Tal característica ocorre somente em alguns microrganismos, por isso, é fundamental encontrá-la em leveduras que atuam na fermentação alcoólica das uvas, no intuito de preservar a qualidade dos vinhos.

O fenômeno killer caracteriza-se por produzir exotoxinas com atividade antimicrobiana, que são mediadas por receptores de parede específicos da célula em microrganismos suscetíveis. Estas leveduras estão aptas a destruir células e atuam em organismos da mesma espécie ou espécies distintas, que são caracterizadas por estarem presentes em substratos com alta concentração de açúcar e baixo pH. (POLONELLI et al., 1991).

A atividade killer, de acordo com Somers e Bevan (1969), corresponde a produção de proteínas de baixo peso molecular que são letais às leveduras sensíveis. Suas toxinas killer possuem massa molecular que varia de 18 a 300 kDa, dependendo da espécie de levedura (SOARES; SATO, 2000).

A capacidade de produção de toxina killer pode representar uma vantagem seletiva entre espécies competidoras em um mesmo habitat (SATO et al., 1993). Esta característica foi descrita pela primeira vez em linhagens de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan e Makower, 1963. Foi proposto que certas cepas de *S. cerevisiae* podiam ser classificadas em três fenótipos: killer, sensível e neutra.

Quando células killer e sensíveis crescem em um mesmo meio de cultura, uma grande proporção das células sensíveis era destruída. As células neutras não matavam células sensíveis, nem eram mortas por células killers (BRITES, 2003). Contudo, as toxinas produzidas pelas leveduras killer são sensíveis ao calor e a protease e dependentes das condições do pH e oxigênio (WOODS; BEVAN, 1968; VAZ et al., 2002).

De acordo com (VAZ et al., 2002), a obtenção de uma levedura que reúna as características de boa fermentadora e atividade killer, é de grande importância para a indústria de bebidas alcoólicas, pois estas leveduras têm a vantagem adicional de eliminar leveduras contaminantes sensíveis durante o processo fermentativo.

Assim, proporcionariam melhor qualidade aos produtos originados da fermentação, como o vinho.

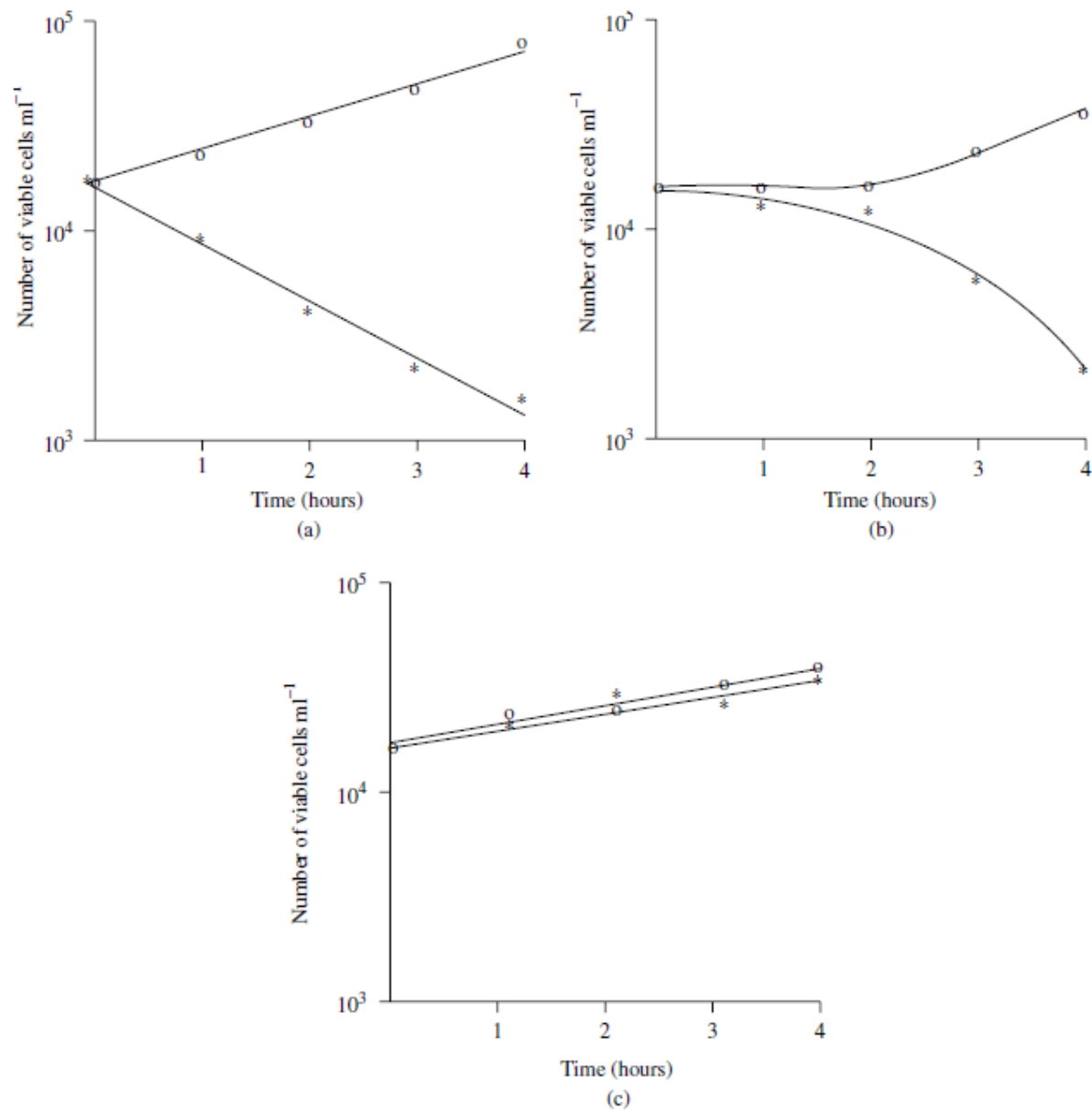


Fig. 1.18. Yeast growth and survival curves in a grape juice medium containing killer toxin (Barre, 1992): *, 10% K2 strain active culture supernatant; O, 10% supernatant inactivated by heat treatment. (a) White juice, pH 3.4; cells in exponential phase introduced at time = 0. (b) Same juice, cells in stationary phase introduced at time = 0. (c) Red juice extracted by heated maceration, pH 3.4; cells in exponential phase introduced at time = 0

Table 1.2. Physiological characteristics of the principal grape and wine yeasts (Barnett *et al.*, 1990)

	C30 Calceitrol growth	C31 <i>myo</i> -Inositol growth	C32 <i>D</i> -Glucosyl-5-lactone growth	C33 2-Ket-D-glucuronate growth	C34 5-Ket-D-glucuronate growth	C35 <i>D</i> -Glucuronate growth	C38 <i>D</i> -Lactate growth	C39 Succinate growth	C40 Citrate growth	C42 Ethanol growth	N1 Nitrate growth	N2 Nitrite growth	N3 Ethylamine growth	N4 <i>L</i> -Lysine growth	N5 Cadaverine growth	N6 Creatine growth	N7 Creatinine growth	N8 Glucosamine growth	V1 Growth W/O vitamins	V2 Growth W/O <i>myo</i> -Inositol	V3 Growth W/O Pantothenate	V4 Growth W/O Biotin	V5 Growth W/O Thiamin	V6 Growth W/O Biotin & Thiamin	V7 Growth W/O Pyridoxine	V8 Growth W/O Pyridoxine & Thiamin	V9 Growth W/O Niacin	T2 Growth at 30°C	T3 Growth W/O at 35°C	T4 Growth W/O at 37°C	T5 Growth W/O at 40°C	O1 0.01% Cyt dheximide growth	O3 1% Acetic acid growth	O4 50% <i>D</i> -Glucose growth	M2 Acetic acid production	M3 Urea hydrolysis		
<i>Candida stellata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida vini</i>	-	-	-	v	-	-	v	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
<i>Candida famata</i>	v	-	v	+	v	-	v	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Dekkera anomala</i>	-	-	v	-	-	-	v	v	-	v	v	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Dekkera bruxellensis</i>	-	-	v	-	-	-	v	-	v	-	v	v	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	-	+	+	-	v	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	-	+	+	+	+	v	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia anomala</i>	-	-	+	+	+	-	v	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia fermentans</i>	-	-	+	+	+	-	v	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pichia membranefaciens</i>	-	-	+	+	+	-	v	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	+	+	+	-	v	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	-	-	+	+	+	-	v	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kluyveromyces thermolerens</i>	-	-	+	+	+	-	v	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-	+	+	+	-	v	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-	-	+	+	+	-	v	-	v	-	v	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

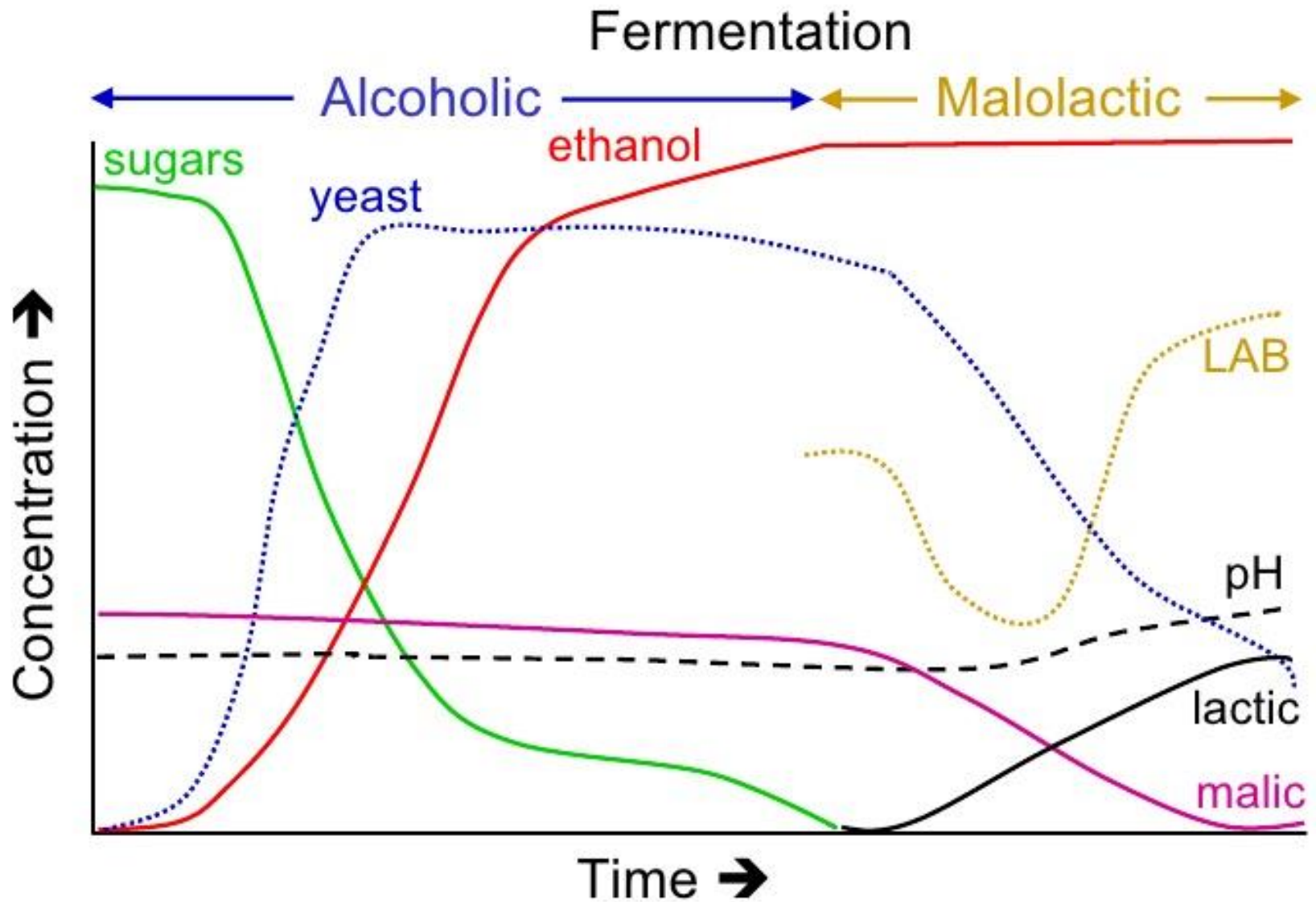
+: test positive; -: test negative; v: variable result.

*With these tests they cannot be differentiated from *S. bayanus*, *S. paradoxus* and *S. pastorianus*.

Table 1.3. Evolution of the nomenclature for the *Saccharomyces* genus, 1952–1990

1952: <i>The Yeasts, a Taxonomic Study</i> —I (Lodder and Kreger-Van Rij)	1970: <i>The Yeasts, a Taxonomic Study</i> —II (Lodder)	1984: <i>The Yeasts, a Taxonomic Study</i> —III (Yarrow)	2000: <i>Yeasts</i> (Barnett <i>et al.</i>)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ⇒	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		} Group I <i>Saccharomyces sensu stricto</i>
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Saccharomyces aceti</i>		
<i>Saccharomyces bayanus</i> ⇒	<i>Saccharomyces bayanus</i>		
<i>Saccharomyces oviformis</i>	<i>Saccharomyces capensis</i>		
<i>Saccharomyces logos</i>	<i>Saccharomyces prostoserdevii</i>		
<i>Saccharomyces chevalieri</i> ⇒	<i>Saccharomyces chevalieri</i>		
<i>Saccharomyces fructuum</i>	<i>Saccharomyces coenobius</i>		
<i>Saccharomyces lactis</i>	<i>Saccharomyces diastaticus</i>		
<i>Saccharomyces elegans</i>	<i>Saccharomyces globosus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Saccharomyces heterogenicus</i>	<i>Saccharomyces heterogenicus</i>		
<i>Saccharomyces fermentati</i>	<i>Saccharomyces hienpiensis</i>		
<i>Saccharomyces mellis</i>	<i>Saccharomyces inusitatus</i>		
<i>Saccharomyces italicus</i> ⇒	<i>Saccharomyces italicus</i>		
<i>Saccharomyces steineri</i>	<i>Saccharomyces norbensis</i>		
<i>Saccharomyces pastori</i>	<i>Saccharomyces oleaceus</i>		
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	<i>Saccharomyces oleaginosus</i>		
<i>Saccharomyces uvarum</i> ⇒	<i>Saccharomyces uvarum</i>		
	<i>Saccharomyces inconspicuus</i>		
<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	<i>Saccharomyces amurensis</i>		
<i>Saccharomyces baillii</i> ⇒	<i>Saccharomyces baillii</i>		
<i>Saccharomyces fragilis</i>	<i>Saccharomyces cidri</i>		
	<i>Saccharomyces dairensis</i> ⇒	<i>Saccharomyces dairensis</i>	} Group II <i>Saccharomyces sensu lato</i>
<i>Saccharomyces delbrueckii</i> ⇒	<i>Saccharomyces delbrueckii</i>		
<i>Saccharomyces marxianus</i>	<i>Saccharomyces euyugicus</i>		
<i>Saccharomyces exiguus</i> ⇒	<i>Saccharomyces exiguus</i> ⇒	<i>Saccharomyces exiguus</i>	
<i>Saccharomyces veronae</i>	<i>Saccharomyces fermentati</i>		
<i>Saccharomyces florentinus</i> ⇒	<i>Saccharomyces florentinus</i>		
<i>Saccharomyces bisporus</i> ⇒	<i>Saccharomyces bisporus</i>		
<i>Saccharomyces willianus</i>	<i>Saccharomyces klockerianus</i>		
	<i>Saccharomyces kluveri</i> ⇒	<i>Saccharomyces servazzi</i>	
<i>Saccharomyces microellipsoides</i> ⇒	<i>Saccharomyces microellipsoides</i>		
	<i>Saccharomyces montanus</i>		
	<i>Saccharomyces mrakii</i>		
	<i>Saccharomyces praetoricensis</i>		
<i>Saccharomyces rosei</i> ⇒	<i>Saccharomyces rosei</i>		
<i>Saccharomyces rouxii</i> ⇒	<i>Saccharomyces rouxii</i>		
	<i>Saccharomyces saitoanus</i>		
	<i>Saccharomyces telluris</i> ⇒	<i>Saccharomyces telluris</i>	
	<i>Saccharomyces transvaalensis</i>		
	<i>Saccharomyces unisporus</i> ⇒	<i>Saccharomyces unisporus</i>	
	<i>Saccharomyces vafieri</i>	<i>Saccharomyces servazzi</i>	
			} Group III

Key events in winemaking



Bioquímica da fermentação alcoólica e Rotas metabólicas das leveduras

Fermentação alcoólica é a transformação anaeróbica de açúcares, principalmente glicose e frutose pelas leveduras



Contudo é um processo muito mais complexo e muitas outras reações ocorrem simultaneamente e outros compostos são produzidos

Álcoois superiores, ésteres, glicerol, ácido succínico, diacetil, acetoina e 2,3-butanediol

Desenvolvimento das leveduras durante a fermentação alcoólica

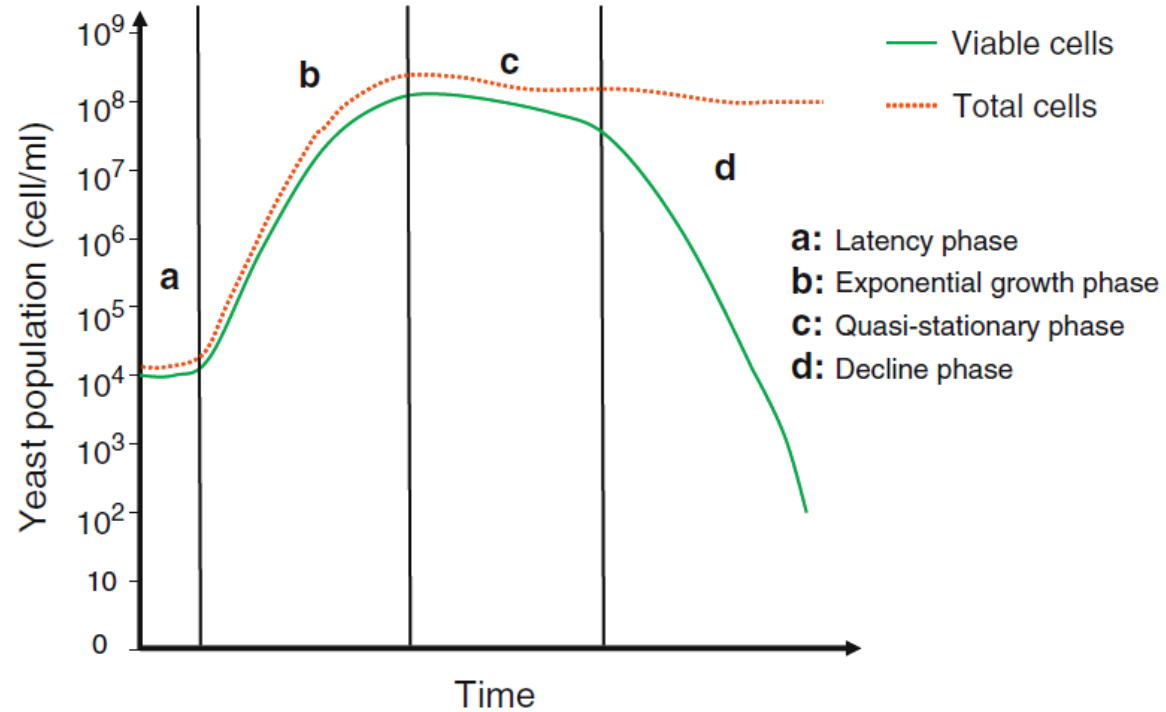


Fig. 1.1 Yeasts growth cycle

CATABOLISMO E ANABOLISMO

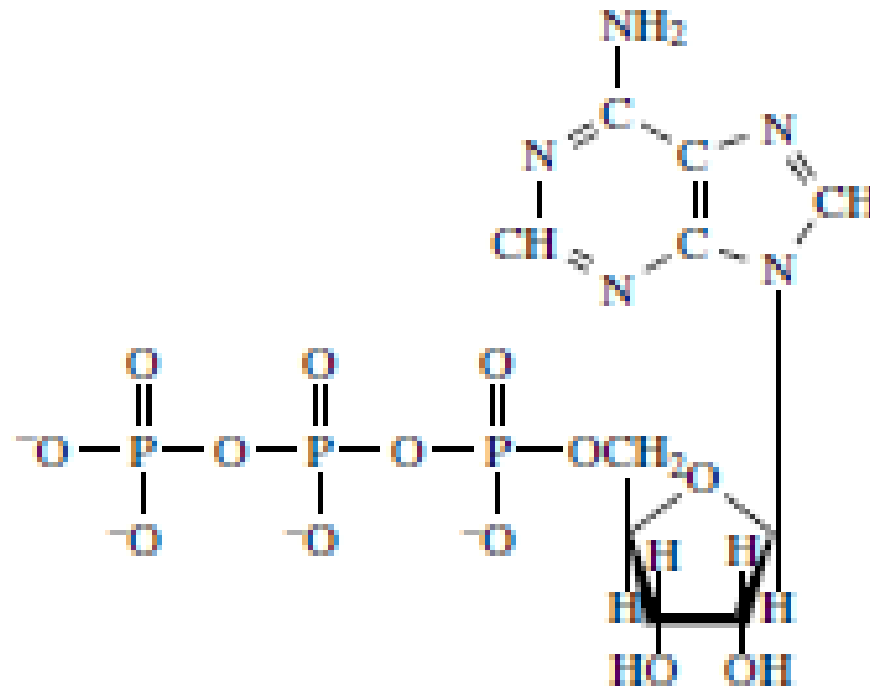
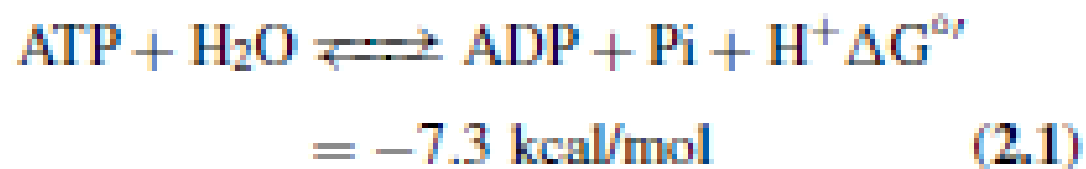


Fig. 2.1. Structure of adenosine triphosphate (ATP)



- Leveduras desidratadas
- Metabissulfito

Condições para o desenvolvimento de leveduras e fermentação alcoólica

1. Fontes de carbono: Glicose e frutose entre 170 e 220 gramas/Litro de mosto;
2. Fontes de Nitrogênio 0,1 – 1,0 g /L de mosto somente ¼ do que a uva contem e é dividido em (3–10% nitrogenio amoniacal), amino acidos (25–30%), polipeptideos (25–40%) e proteínas (5–10%).

Table 3.2. Available nitrogen content (NH_4^+ and free amino acids expressed in mg/l) in musts from Bordeaux vineyards (1996–1999 vintages) determined by the formol method (Masneuf *et al.*, 2000)

	White	Red	Rosé	Botrytized
Number of samples	32	55	48	9
Minimum value	36	46	42	22
Maximum value	270	354	294	157
Mean	181.9	157	119	82.8
Standard deviation	32	55	48	9
Deficient musts (%) <140 mg/l	22	49	60	89

3 - Minerais

K_2O	23–48
Na_2O	0.06–2.2
CaO	1.0–4.5
MgO	3.7–8.5
Fe_2O_3	0.06–7.3
P_2O_5	45–59
SO_3	0.4–6.3
SiO_2	0–1.8
Cl	0.03–1.0

E outros como traço : Al, Br, Cr, Cu, Pb, Mn, Ag, Sr, Ti, Sn, Zn, etc.

Ativantes de fermentação

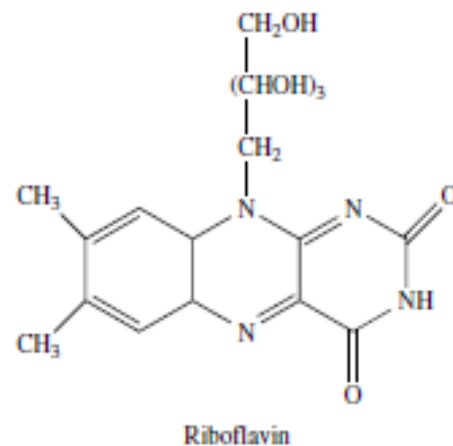
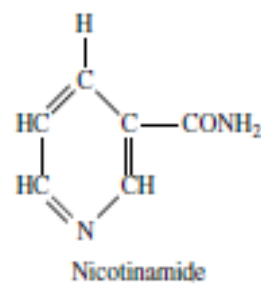
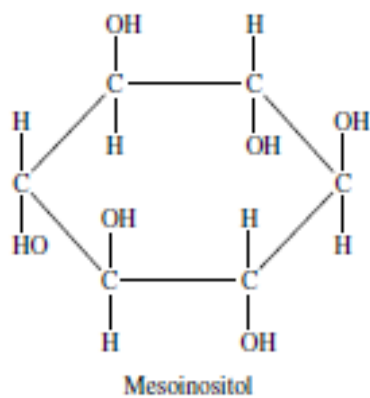
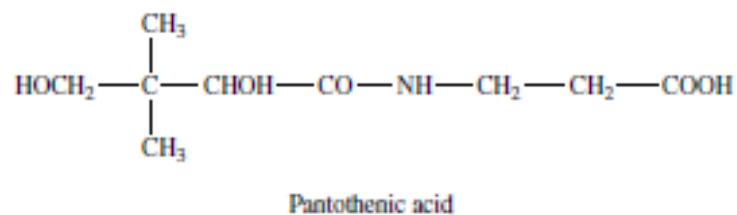
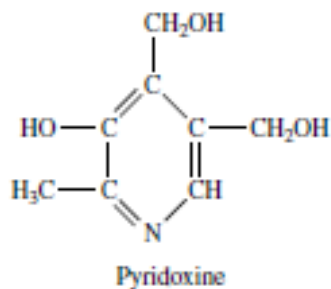
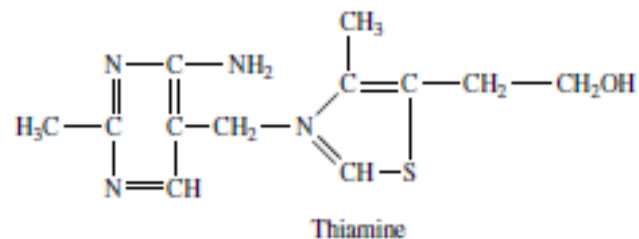
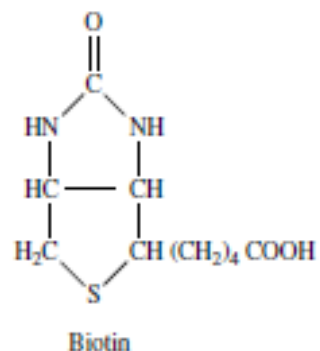


Fig. 3.4. Yeast growth factors

Table 3.3. Maximum and minimum growth factor concentrations ($\mu\text{g/l}$) in musts and wines (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975a)

Vitamins	Grape musts	Wines	
		Whites	Reds
Thiamine	160–450	2–58	103–245
Riboflavin	3–60	8–133	0.47–1.9
Pantothenic acid	0.5–1.4	0.55–1.2	0.13–0.68
Pyridoxine	0.16–0.5	0.12–0.67	0.13–0.68
Nicotinamide	0.68–2.6	0.44–1.3	0.79–1.7
Biotin	1.5–4.2	1–3.6	0.6–4.6
Mesoinositol (mg/l)	380–710	220–730	290–334
Cobalamine	0	0–0.16	0.04–0.10
Choline	19–39	19–27	20–43

Fatores de sobrevivência

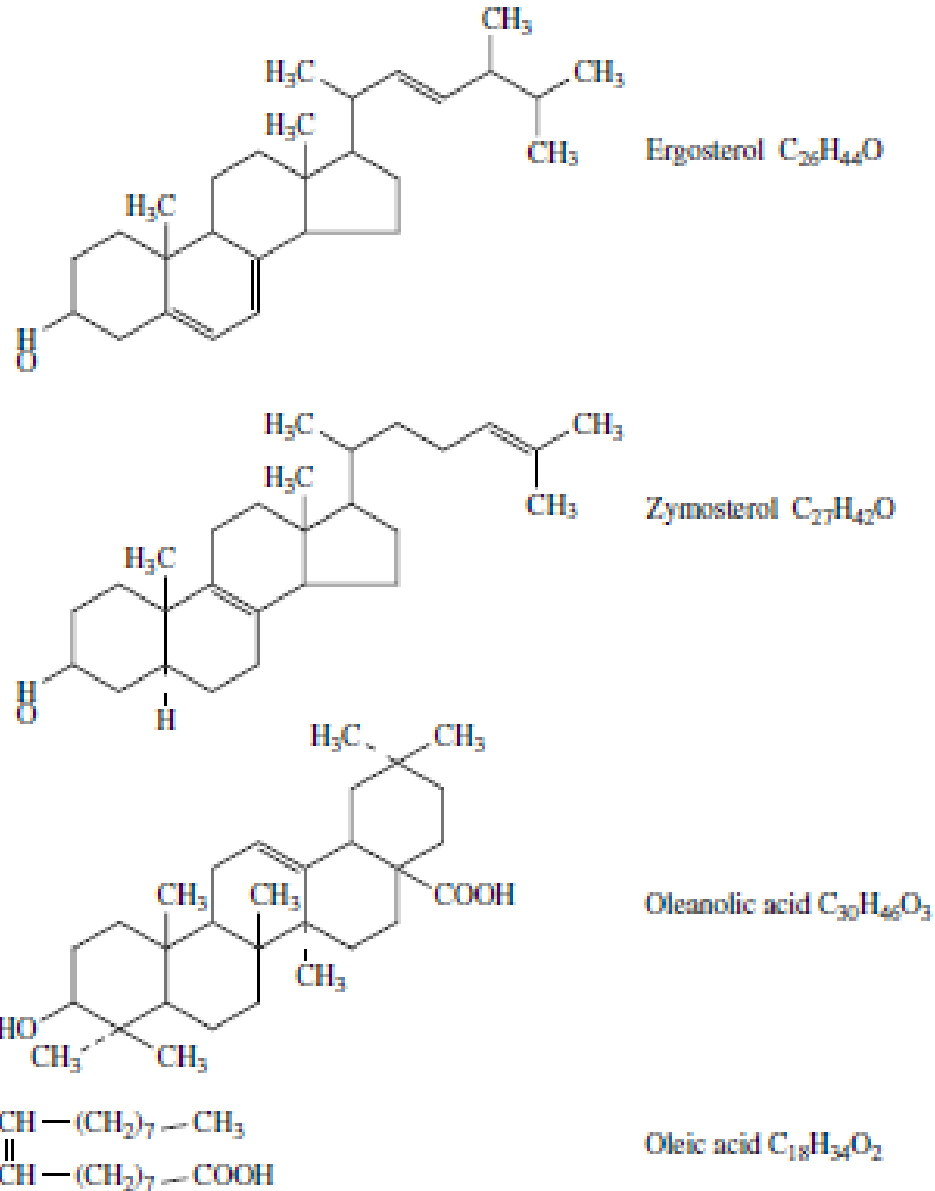


Fig. 3.5. Structure of some steroids and fatty acids playing a role in yeast growth

Table 3.4. Sterol concentrations in yeasts during alcoholic fermentation of grape must (Larue *et al.*, 1980)

Conditions	Constant aeration			Anaerobiosis		
	C	+E	+OA	C	+E	+OA
Day 2						
Fermented sugar (g/l)	30	27	24	37	36	23
Sterols (% of dry weight)	2.70	2.80	2.30	1.60	1.40	1.70
Viable cells (10^6 /ml)				22	20	17
Day 5						
Fermented sugar (g/l)	116	101	95	113	111	105
Sterols (% of dry weight)	1.90	1.90		0.60	1.10	0.40
Viable cells (10^6 /ml)				13	10	12
Day 9						
Fermented sugar (g/l)	187	175		164	169	154
Sterols (% of dry weight)	1.20	1.10	0.7	0.40	1.00	0.30
Viable cells (10^6 /ml)				5	7	5
End of fermentation						
Fermented sugar (g/l)	256	234	211	170	199	185
Sterols (% of dry weight)	1.00	0.80	0.40	0.30	0.60	0.20
Viable cells (10^6 /ml)				0.05	0.5	0.1

C = control must; +E = ergosterol (25 mg/l); +OA = oleanolic acid (50 mg/l).

Must sugar concentration after addition: 250 g/l; active dry yeast: *Saccharomyces cerevisiae*; initial sterol concentration: 1.5%; initial population: 2.2×10^6 cells/ml.

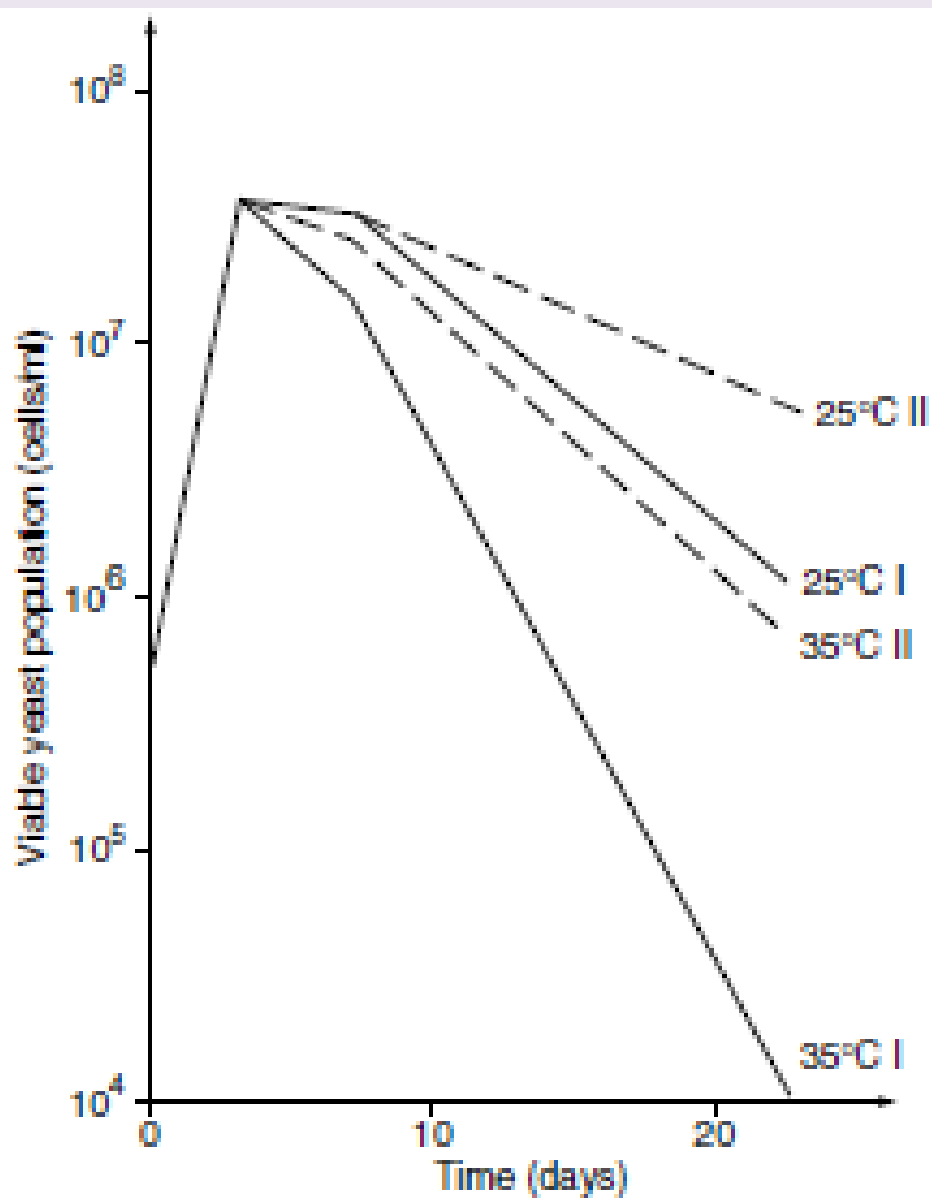
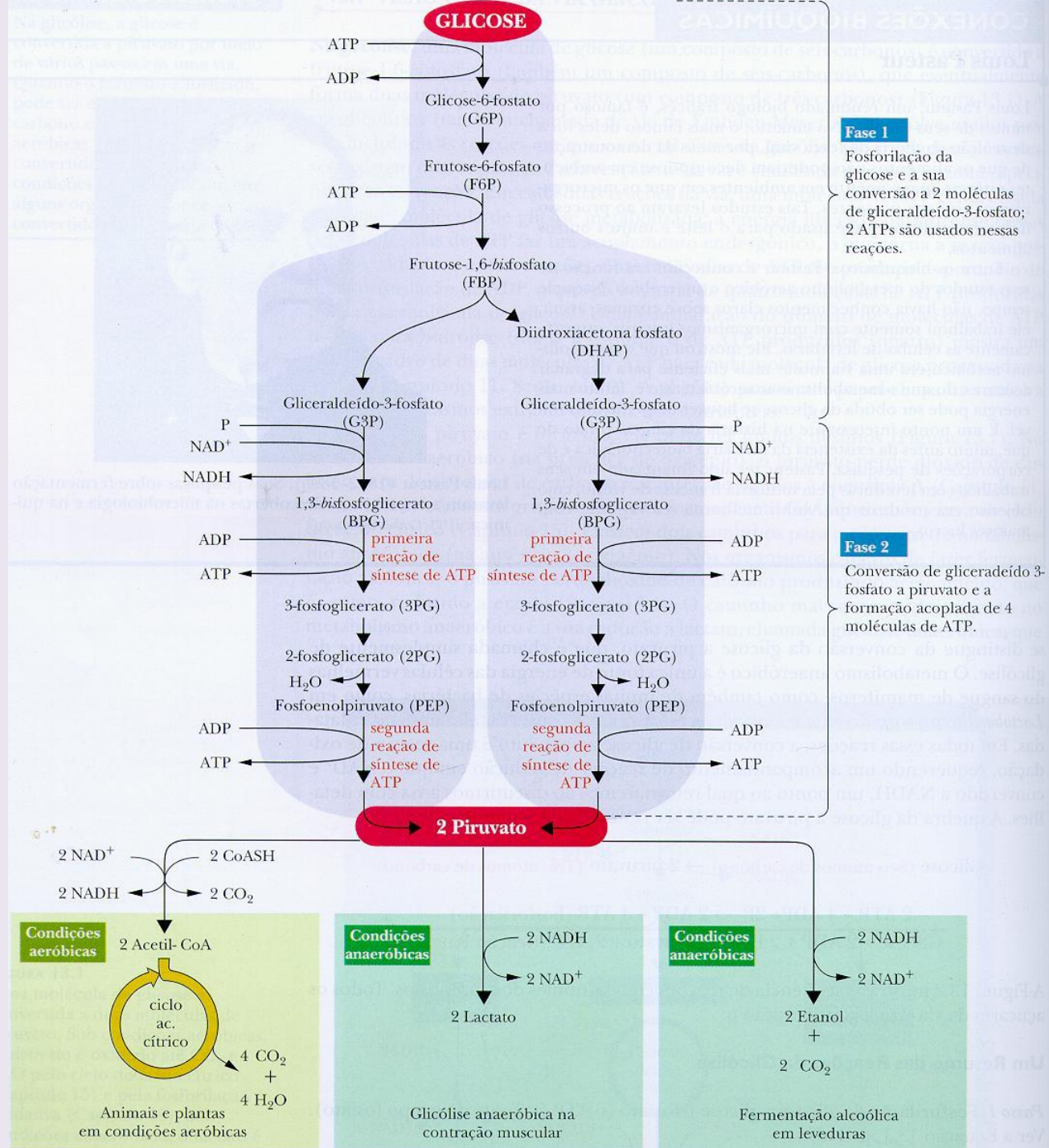


Fig. 3.6. Influence of sterols on yeast survival during their death phase at different temperatures (Lafon-Lafourcade, 1983). (I) Control. (II) Plus ergosterol

Rota da Glicólise



Rota da Fermentação e Respiração

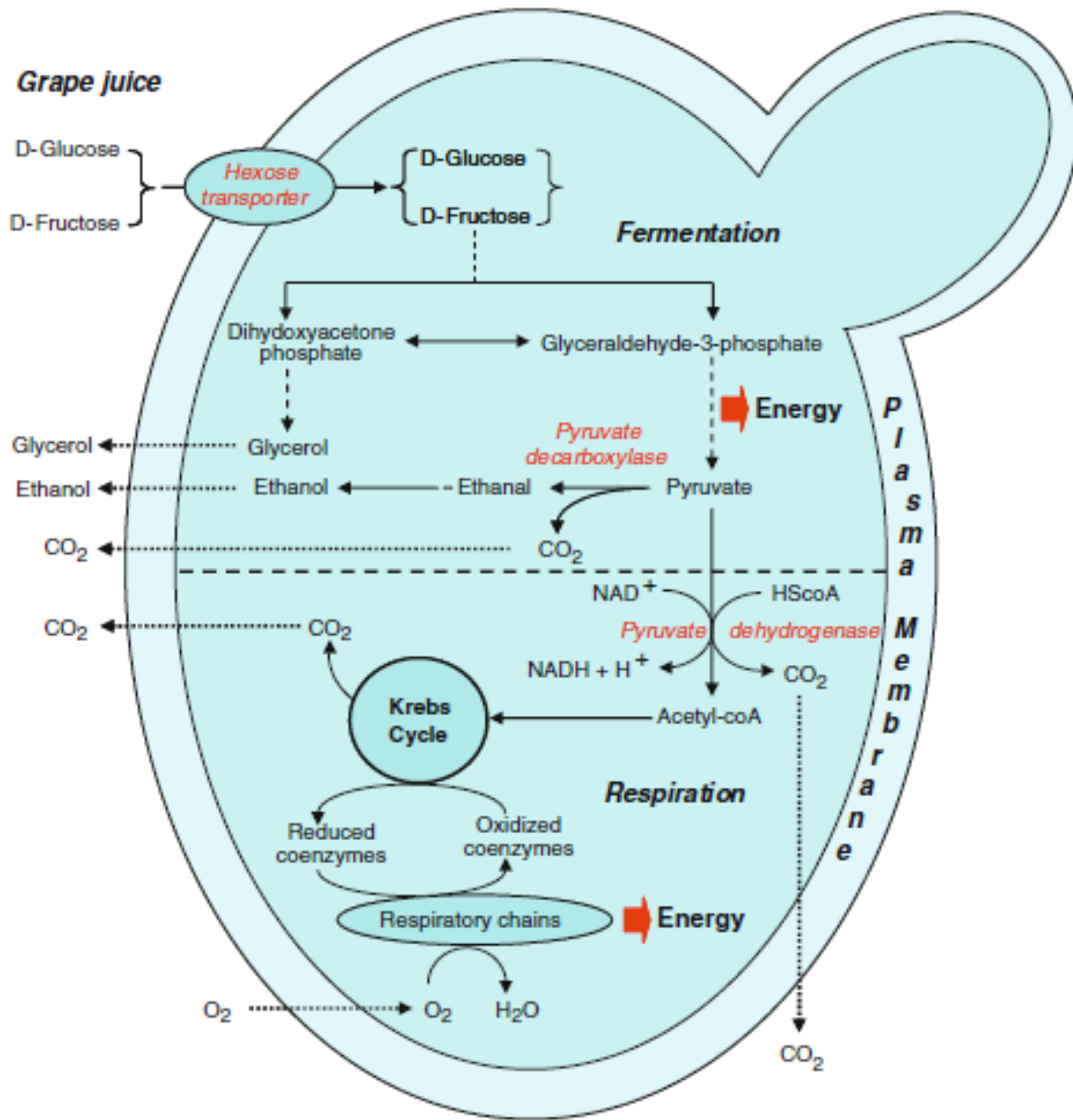


Fig. 1.3 Fermentation and respiration

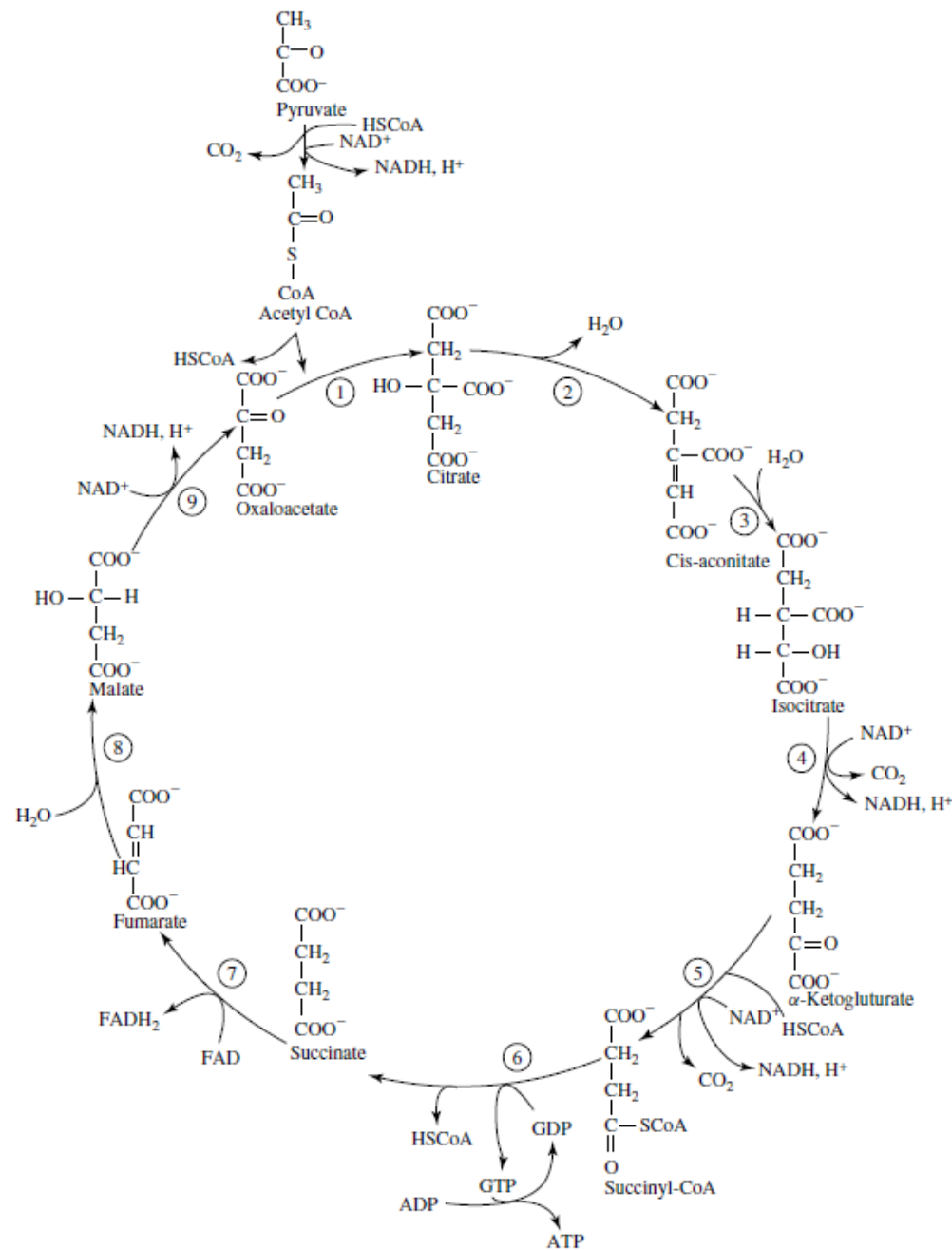


Fig. 2.7. Tricarboxylic acid or Krebs cycle. 1 = citrate synthase; 2-3 = aconitase; 4 = isocitrate dehydrogenase; 5 = complex α-ketoglutarate dehydrogenase; 6 = succinyl-CoA synthetase, 7 = succinate dehydrogenase; 8 = fumarase; 9 = malate dehydrogenase; GTP = guanosine triphosphate; GDP = guanosine diphosphate

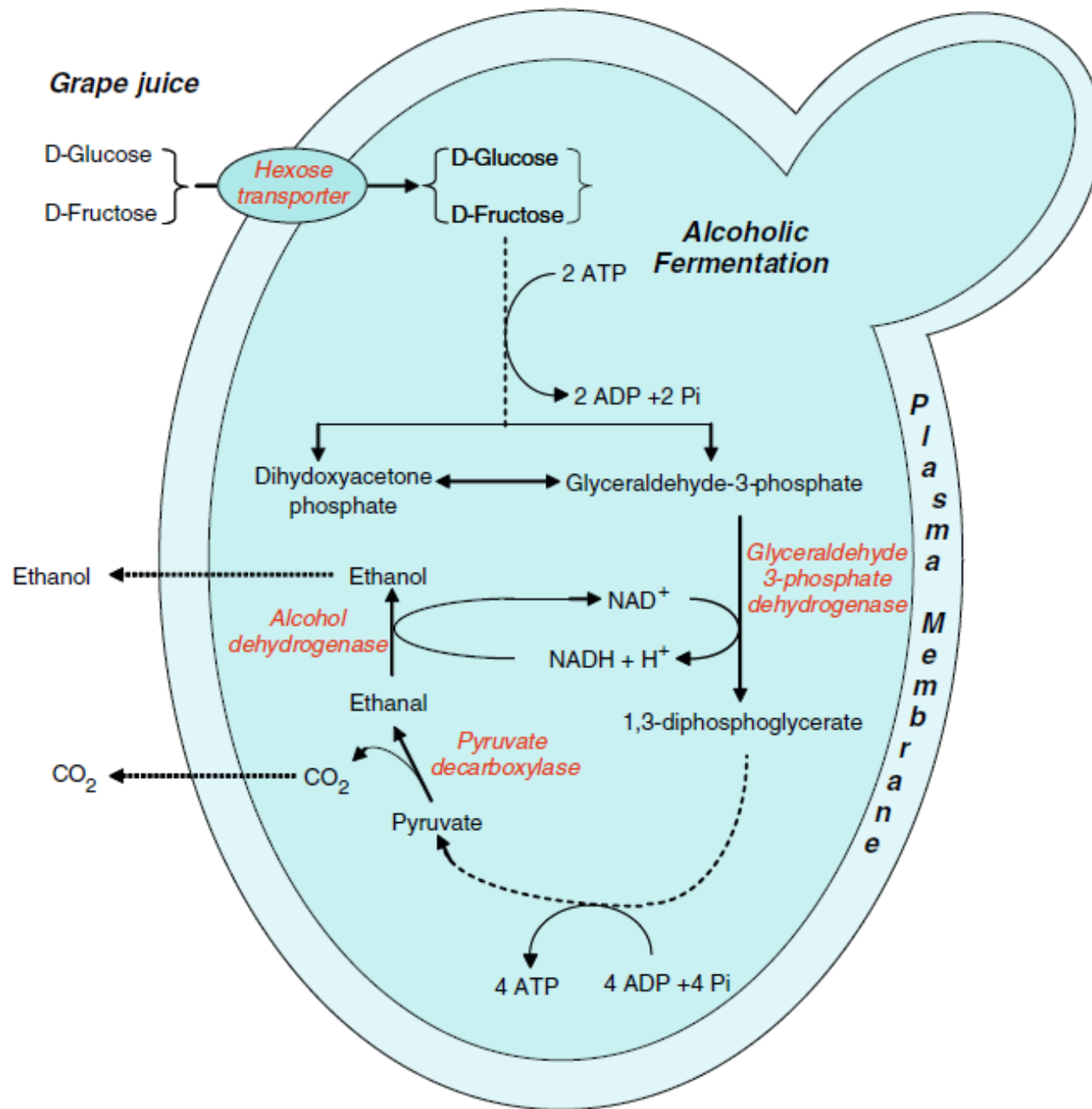


Fig. 1.4 Alcoholic fermentation

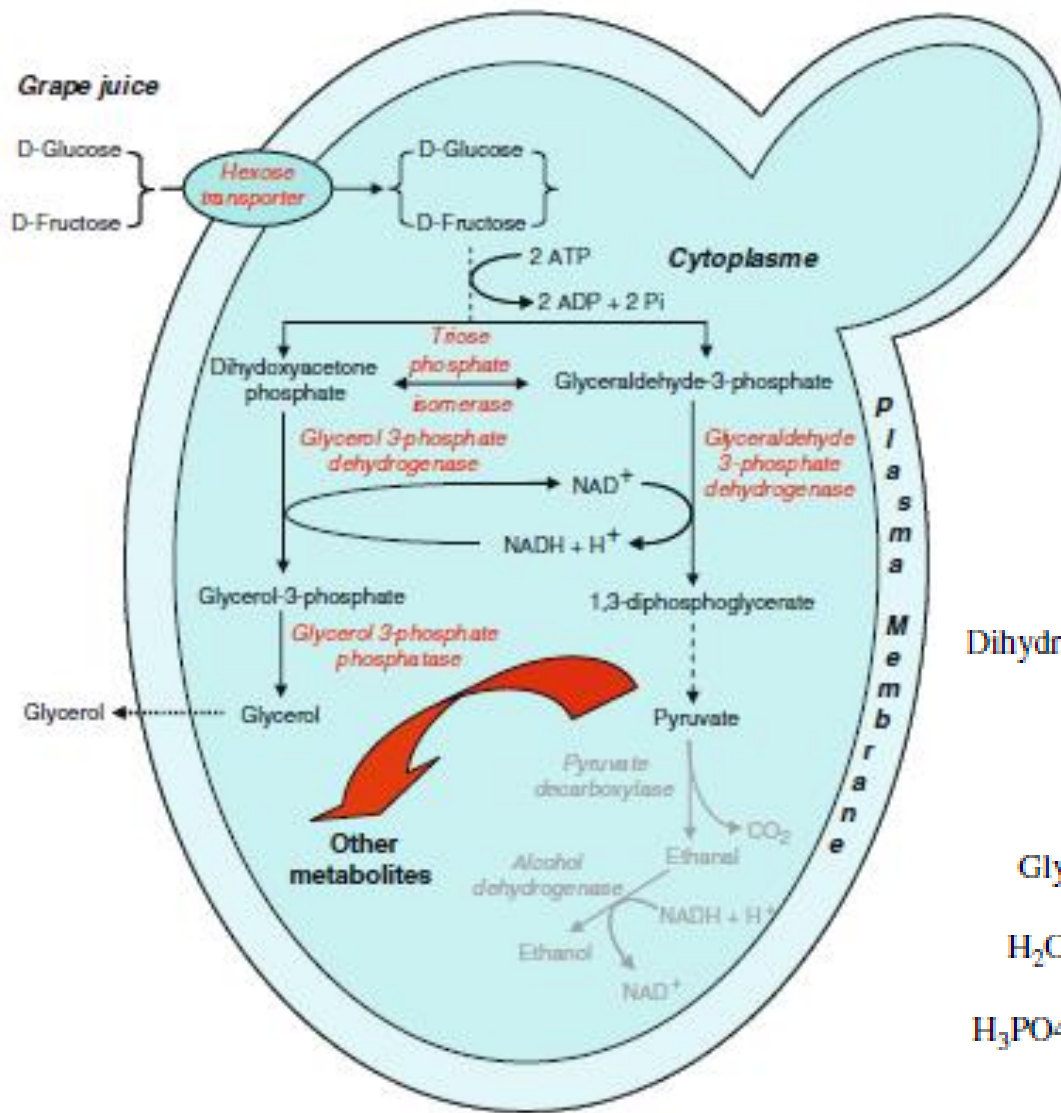
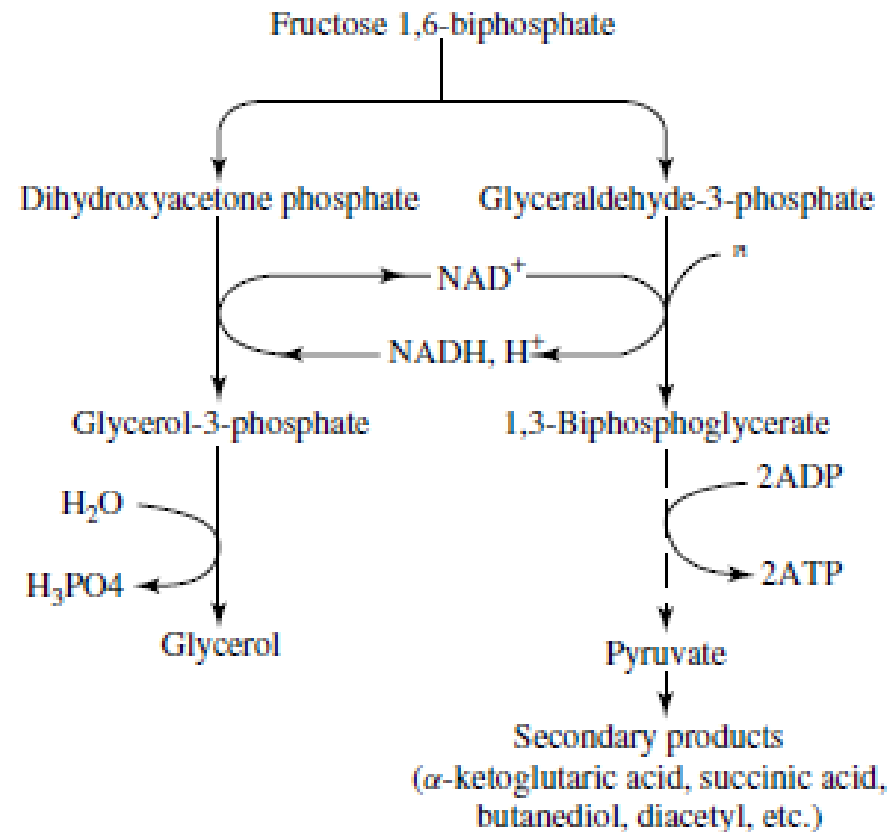


Fig. 1.5 Glyceropyruvic fermentation

Glicerol é produzido nas primeiras etapas da fermentação alcoólica 6-10 g/L



Acetaldeído combinado com sulfito não pode ser reduzido

Efeito Pasteur

Pequenas concentrações de açúcar a levedura ou respira ou fermenta

Efeito Crabtree

Altas concentrações de açúcar as enzimas da respiração são inibidas e a levedura somente faz fermentação alcoólica

Metabolismo de Compostos Nitrogenados

Íons amônio e aa suprem as leveduras

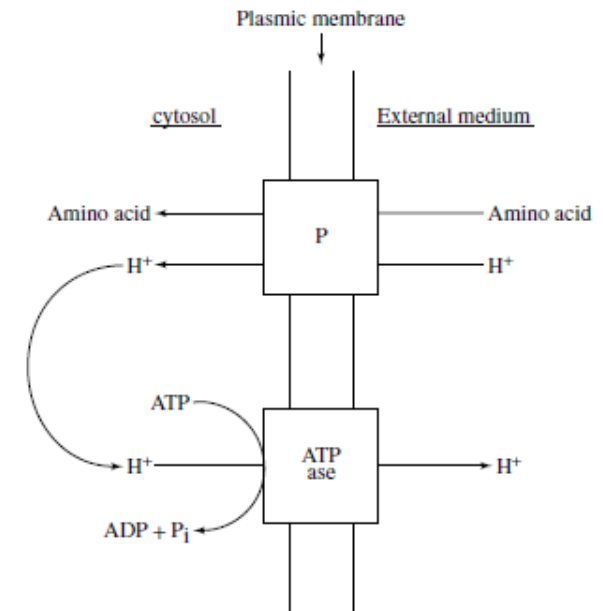
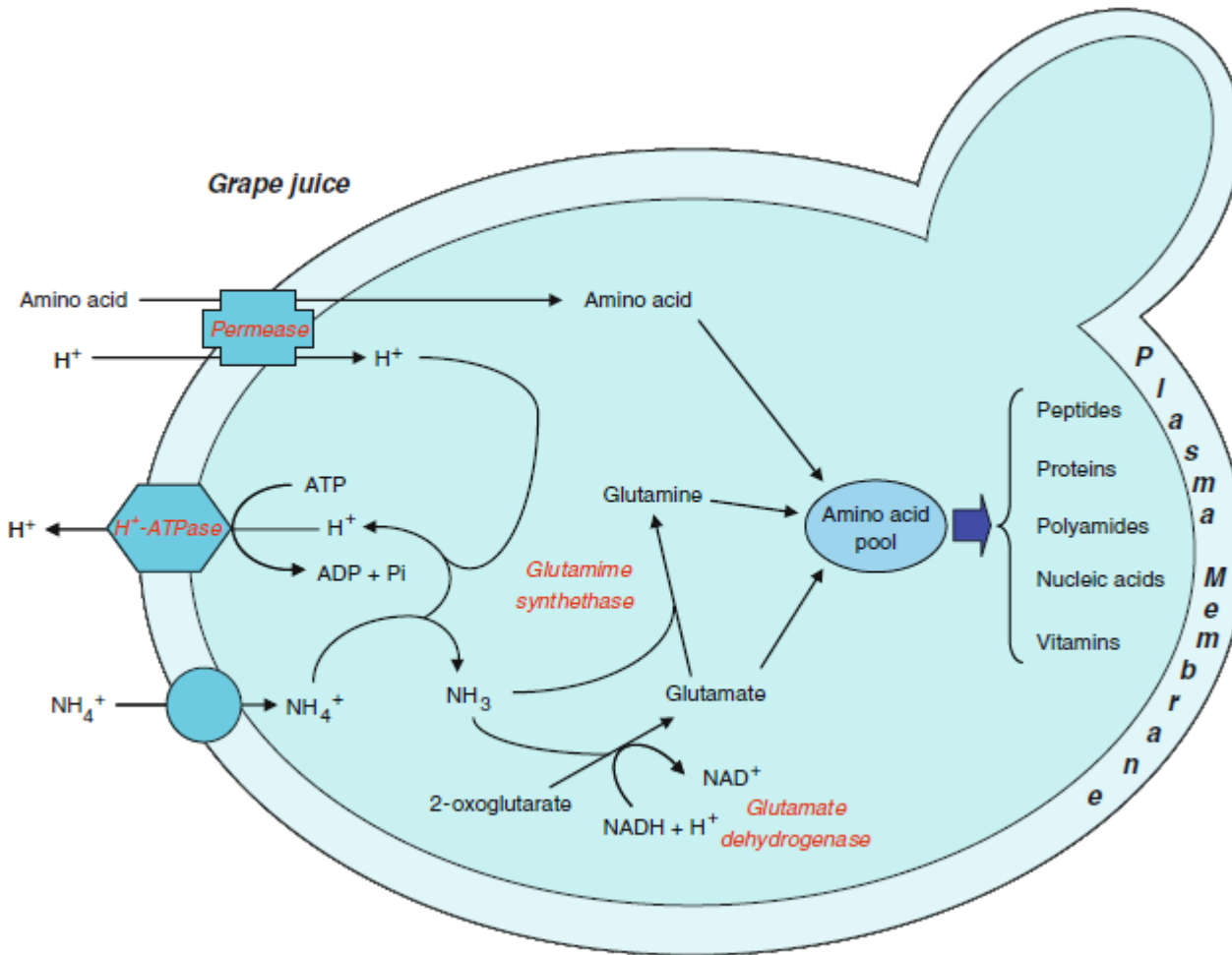


Fig. 2.24. Active amino acid transfer mechanisms in the yeast plasma membrane. P = protein playing the role of an amino acid 'symporter'

Fig. 1.6 Nitrogen metabolism

Existem dois tipos de transporte de amino-ácidos

1- Uma permease geral que transporta todos os aa e é reprimido pelo cátion amônio (após metade da fermentação)

2- Permeases específicas (11) e os cátions amônio não limitam sua atividade

A maior parte dos aa são consumidos do mosto na fermentação das primeiras

30 g de açúcar

Alanina e arginina são os principais aa encontrados no mosto

Leveduras não utilizam Prolina

Ao final da fermentação vários mg de aa são excretados

Catabolismo de Amino-ácidos

O cátion amônio é essencial para síntese de aa para construção de proteínas porém não há concentração suficiente no meio .

Afortunadamente elas conseguem obter através de aa disponíveis através de várias reações a mais comum é pela transferência de um grupamento α -amino em α -ketoglutaric acid para formar glutamato.

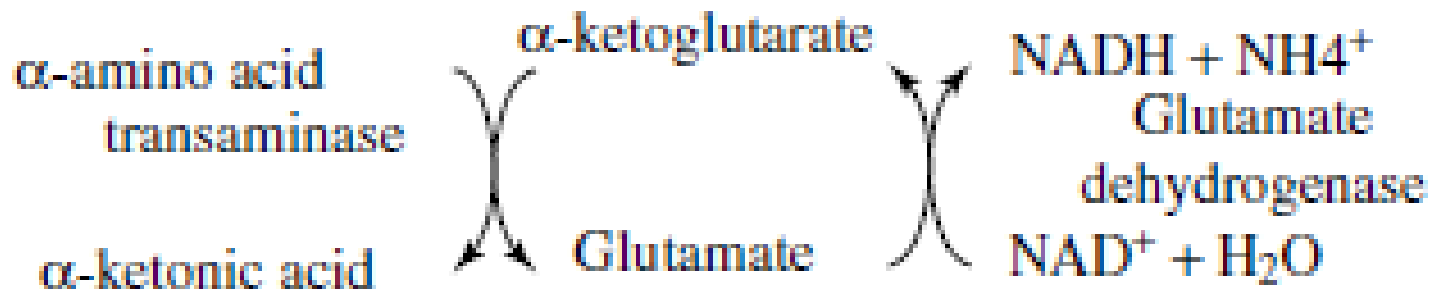


Fig. 2.25. Oxidative deamination of an amino acid, catalyzed by a transaminase and glutamate dehydrogenase

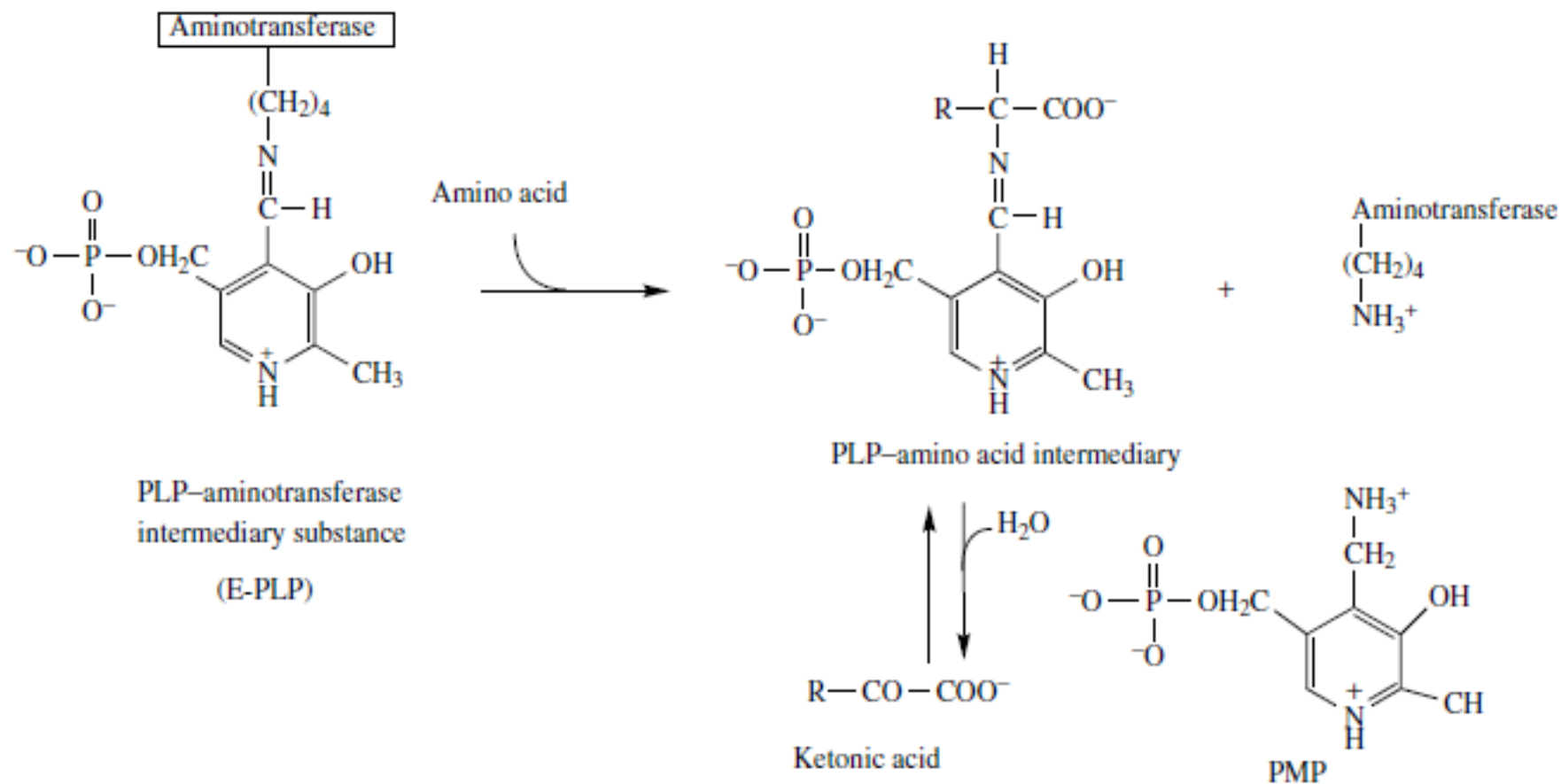


Fig. 2.26. Mode of action of pyridoxal phosphate (PLP) in transamination reactions. Formation of intermediary products between PLP and aminotransferase or the amino acid substrate

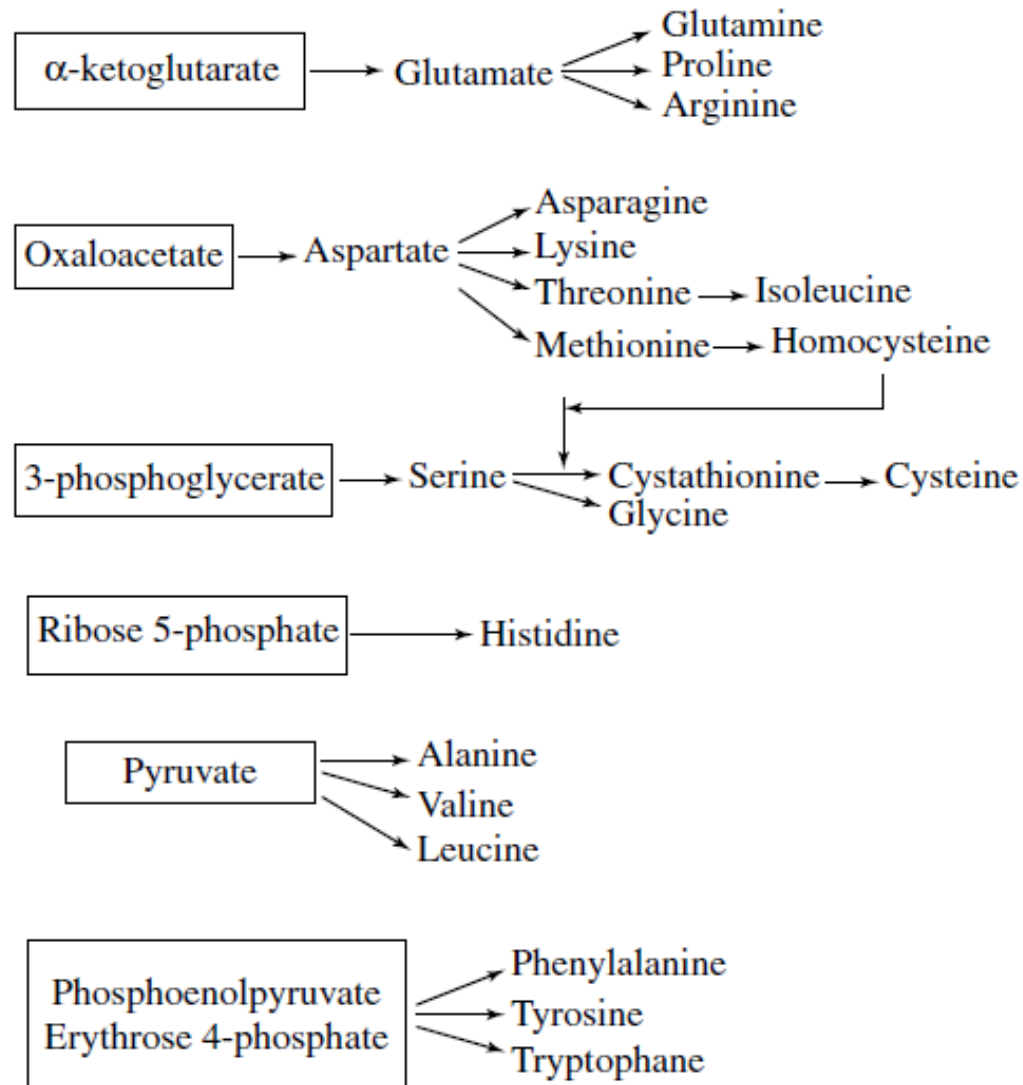


Fig. 2.23. General biosynthesis pathways of amino acids

A consequência desse metabolismo gera álcoois superiores e ésteres

correspondentes

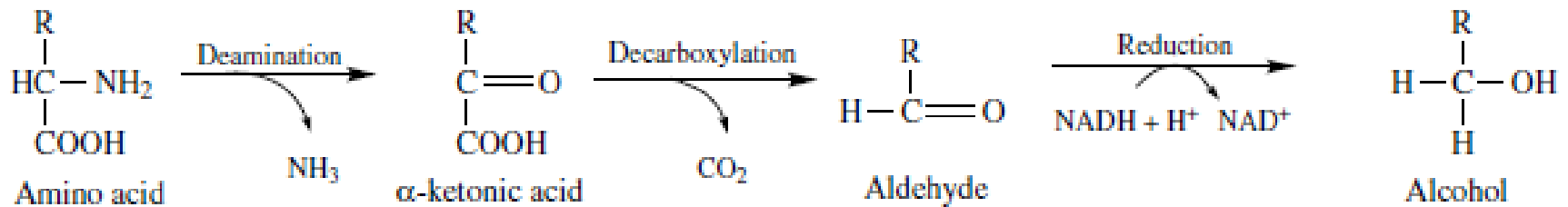


Fig. 2.28. Formation of higher alcohols from amino acids (Ehrlich reactions)

Álcoois superiores são produzidos pelo desvio do metabolismo dos aa. São produzidos quando os ceto-ácidos correspondentes são reduzidos por uma descarboxilação a aldeídos e depois ao álcool correspondente.

Em geral apresentam limite de detecção olfativo (OT) baixo.

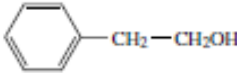
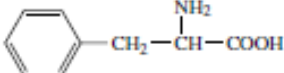
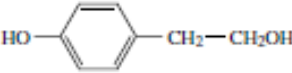
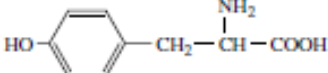
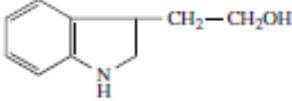
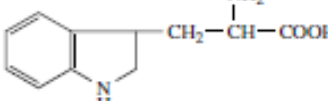
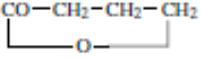
Mas são precursores de ésteres que apresentam grande impacto sensorial

A função fisiológica dos álcoois superiores produzidos pelas leveduras não está até o momento completamente elucidada, talvez seja somente uma excreção das mesmas. Ou um processo de desintoxicação do meio.

Com exceção do fenil-etanol que tem aroma de rosas, os demais em geral tem odores ruins que lembram solventes.

Os parâmetros que aumentam a concentração de álcoois superiores são bem conhecidos como elevado pH, temperatura de fermentação elevada, aeração e deficiência de aa e amônio, nessas condições as leveduras tentam recuperar o Nitrogênio assimilável pela transaminação.

Table 2.4. The principal alcohols found in wine and their amino acid precursors

Higher alcohol	Concentration in wine (mg/l)	Amino acid precursor
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p><i>3-methyl-butan-1-ol</i> <i>or isoamyl alcohol</i></p>	80-300	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Leucine</i></p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p><i>2-methyl-butan-2-ol</i> <i>or active amyl alcohol</i></p>	30-100	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Isoleucine</i></p>
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p><i>2-methyl-propan-1-ol</i> <i>or isobutyl alcohol</i></p>	50-150	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Valine</i></p>
 <p><i>Phenylethanol</i></p>	10-100	 <p><i>Phenylalanine</i></p>
 <p><i>Tyrosol</i></p>	20-50	 <p><i>Tyrosine</i></p>
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p><i>Propan-1-ol</i></p>	10-50	?
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p><i>Butan-1-ol</i></p>	1-10	?
 <p><i>Thymptophol</i></p>	0-1	 <p><i>Tryptophane</i></p>
 <p><i>γ-Butyrolactone</i></p>	0-5	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Glutamic acid</i></p>
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ <p><i>Methionol</i></p>	0-5	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$ <p><i>Methionine</i></p>

Ésteres são sintetizados a partir da acyl-coA e álcoois por enzimas álcool-acylcoA transferases (Barre et al. 1998).

Basicamente há dois tipos de ésteres nos vinhos:

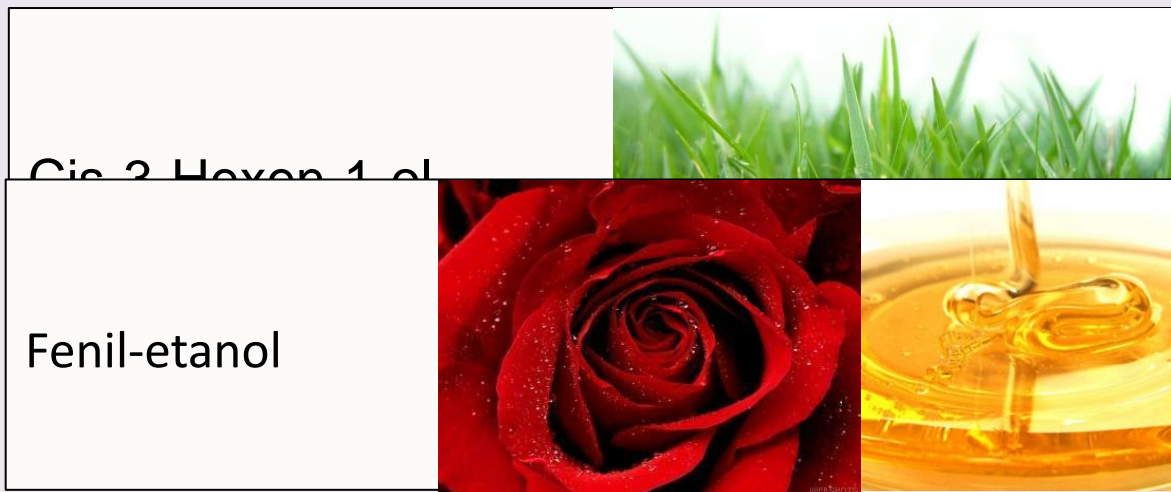
Os acetatos de álcoois superiores sintetizados a partir de acetil-coA e diferentes álcoois superiores apresentam aromas como cola (acetato de etila) banana (acetato de isoamila) ou rosas (acetato de fenil etanol)

Os ésteres de ácidos graxos e etanol em geral apresentam aromas frutados contribuindo positivamente para o aroma dos vinhos.

Outros ésteres como etil lactato e dietil succinato não apresentam impacto sensorial em concentrações normais

Álcoois superiores em espumantes

Álcool	Variação de concentração (mg.L ⁻¹)
1-Propanol	13,30 – 27,0 ^a
Iso-butanol	17,40 – 46,60 ^a 20,69 ^b 8,50-16,10 ^c
2-metil-1-Butanol	20,07 – 41,26 ^a
Cis-2-Hexen-1-ol	
Fenil-etanol	
Fenil-etanol	0,38-15,7 ^c 0,67-13,5 ^d

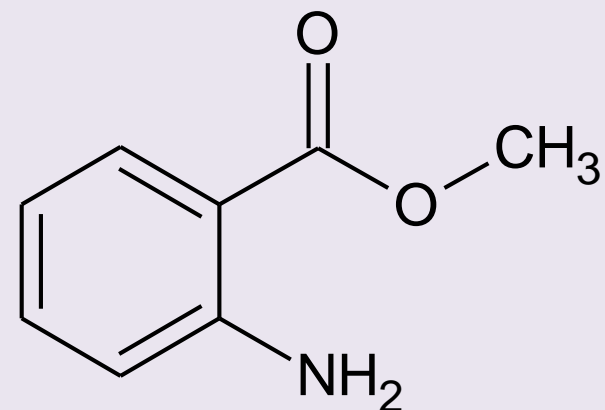


a. POZO-BAYÓN et al. 2010; b. CAMPO; CACHO; FERREIRA, 2008;
c. RIU-AUMATELL et al. 2006; d. COELHO et al. 2009.

Ésteres



- Oriundos do processo fermentativo responsáveis pelo aroma frutado;
- Baixas concentrações, mas o efeito sinérgico aumenta o impacto olfativo;
- Encontram-se poucos ésteres na uva e seu maior representante é o antranilato de metila, aroma *FOXY*;
- Podem ser classificados em dois grupos, os formados enzimaticamente e os formados durante o processo de envelhecimento pela reação de esterificação.



Ésteres em espumantes.

Composto	*CAS-RN	Aroma característico relatado ^e	Concentração (mg.L ⁻¹)
Acetato de etila	141-78-6	Frutado(<100 mg.L ⁻¹), solvente,	31,68 – 69,50 ^a

Isovaleriato de etila

97-64-3

Ab



Hexanoato de etila

Octanoato de etila

106-32-1

Do



Decanoato de etila

Acetato de hexila

142-92-7

He

Acetato de isoamila

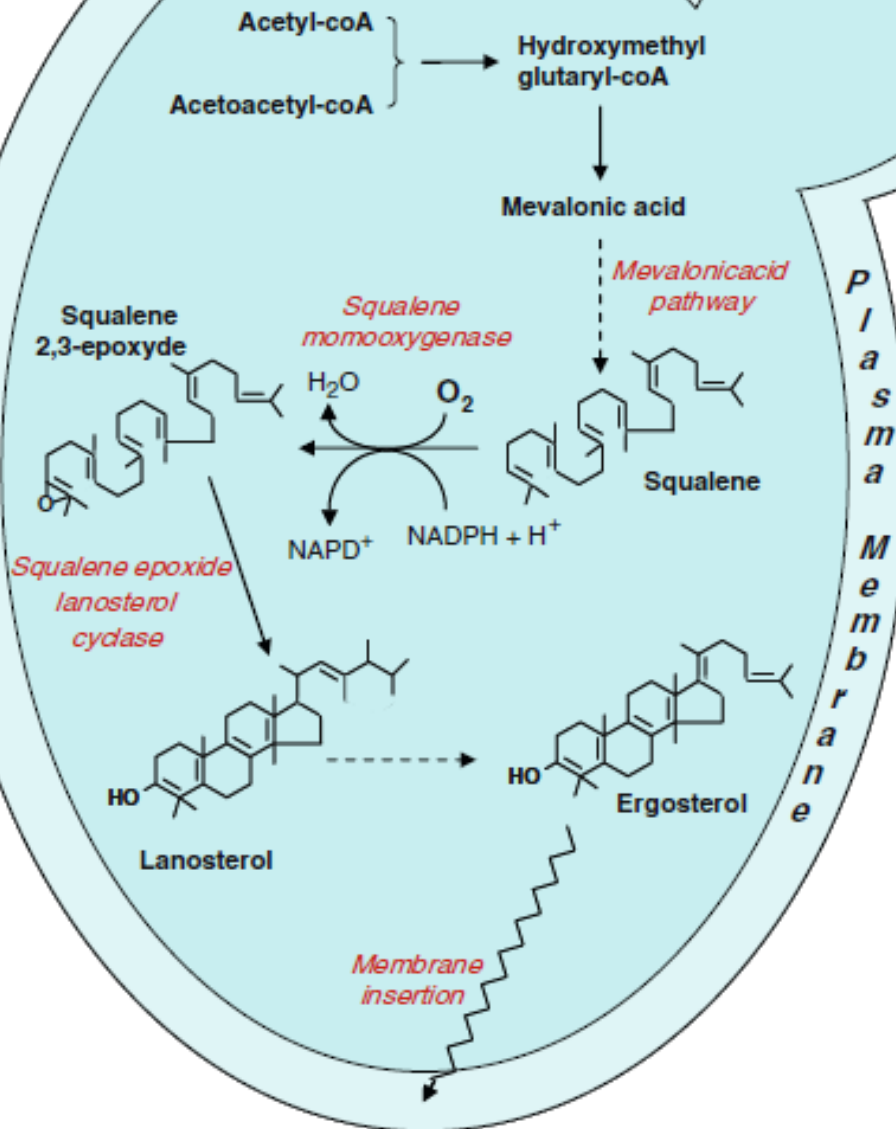
,55^a
,52^b
,87^c

a. POZO-BAYÓN et al. 2010; b. SUMBY et al. 2010; c. RIU-AUMATELL et al. 2006; d. CAMPO; CACHO; FERREIRA, 2008; e. AZNAR; ARROYO 2007; CLARKE; BAKKER 2004; GOMEZ-MIGUEL et al. 2007; f. GURBUZ et al. 2006. n.d. não detectado

*CAS-RN Número de identificação internacional de compostos químicos

Grape juice

Cytoplasme



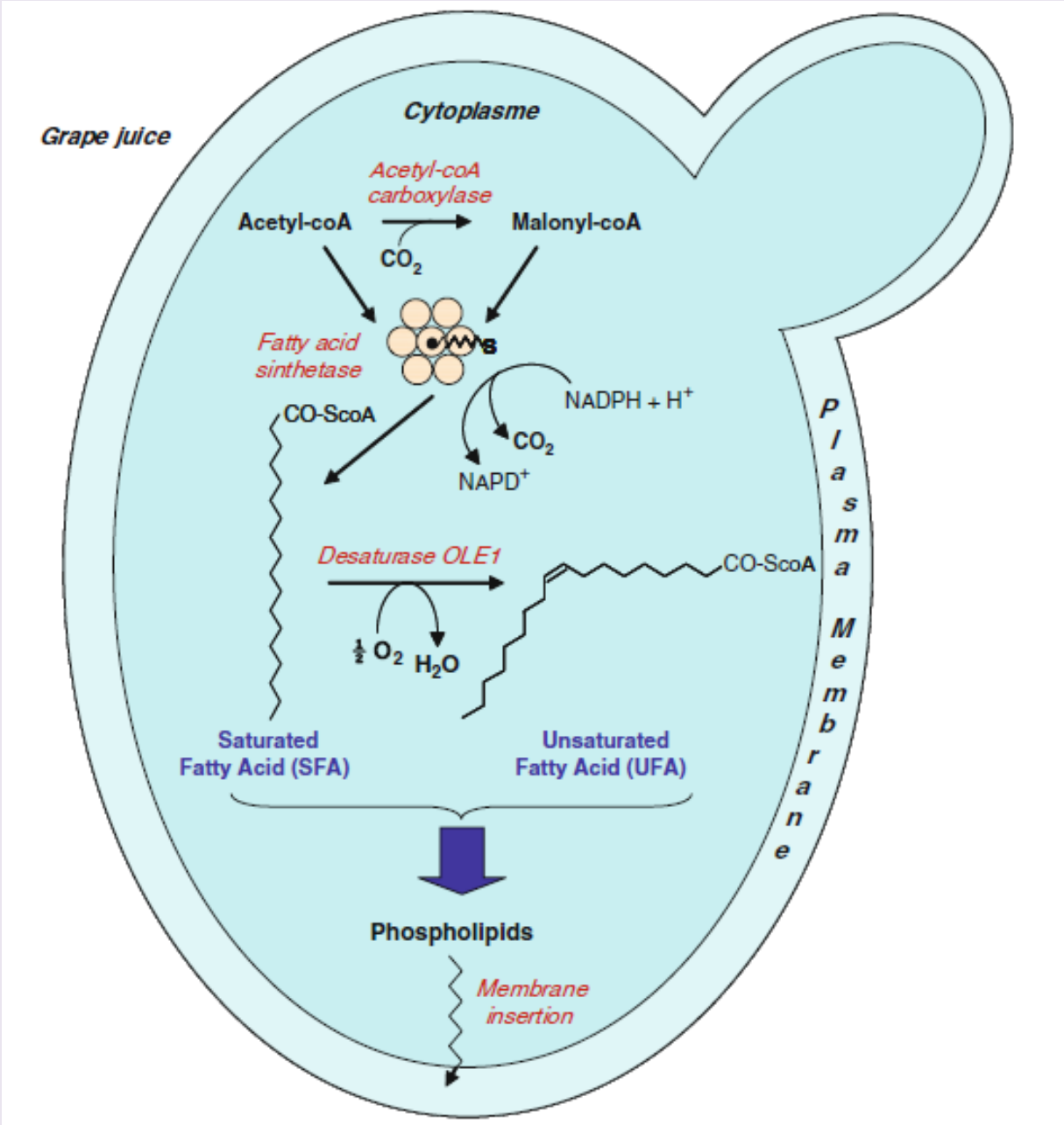
Ergosterol

Formação de novas células

Necessidade de oxigênio

Fig. 1.7 Synthesis of ergosterol in yeasts

Formação de Fósfolipídeos



Biossntese de outros subprodutos

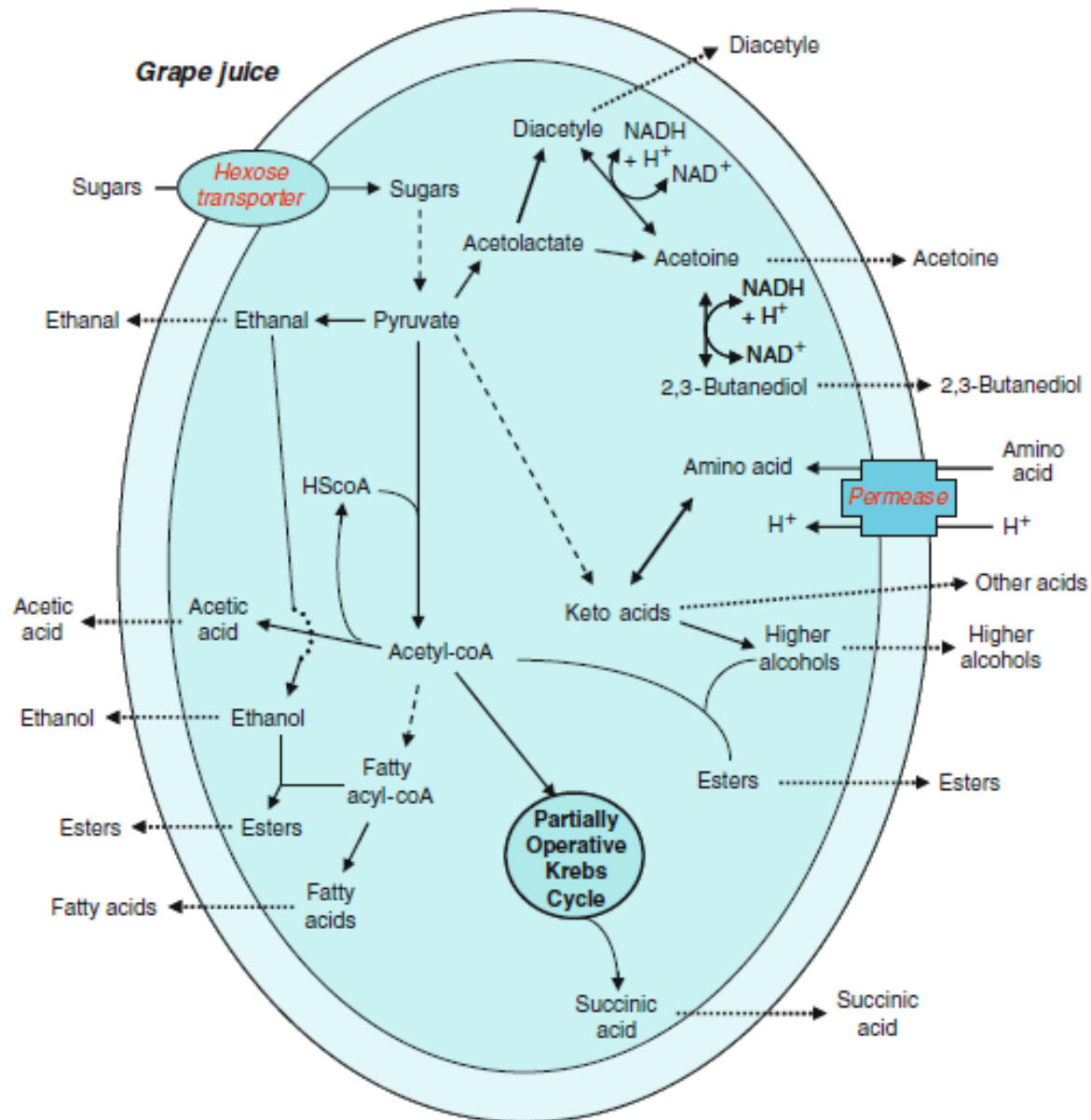
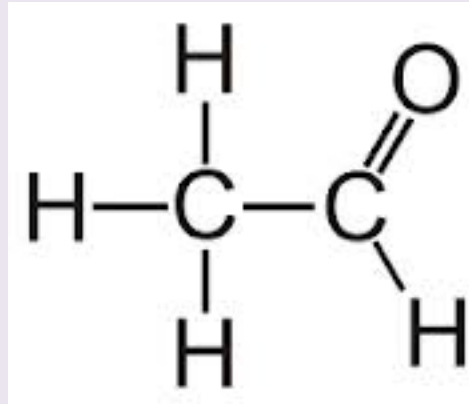


Fig. 1.9 Biosynthesis of the other subproducts

Etanal: também denominado acetaldeído, é um intermediário da fermentação alcoólica obtido da descarboxilação do piruvato é praticamente todo reduzido a etanol.

Tem aroma característico de vinho oxidado.

Também pode ser produzido a partir do etanol pela oxidação biológica ou química, alguns vinhos como Fino e Manzanilla de Jerez, apresentam altas concentrações de etanal.



Diacetyl, acetoína e 2,3-butanediol:

Produzidos pela condensação de etanal e piruvato produzindo acetolactato

Início da fermentação Diacetil

Final da fermentação acetoína e 2,3-butanediol (borras)

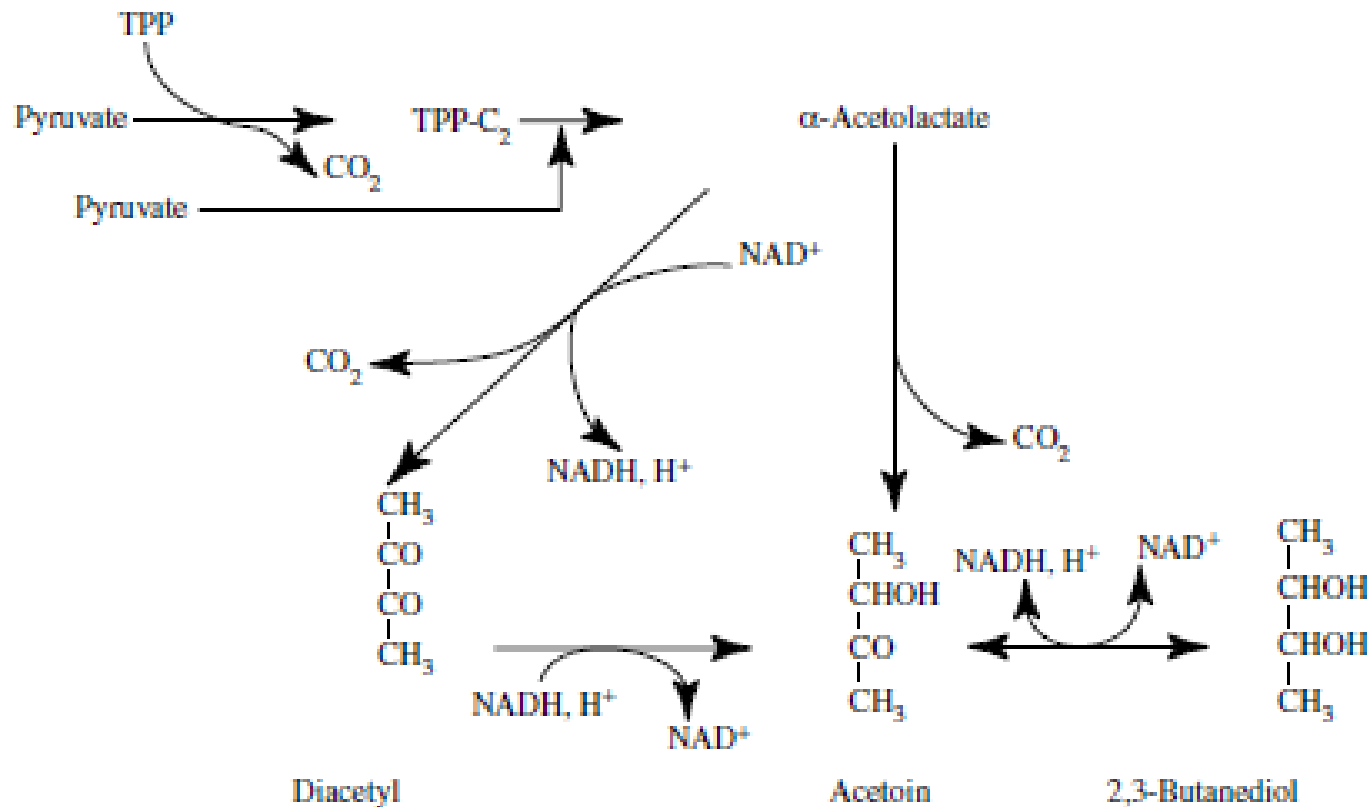


Fig. 2.17. Acetoin, diacetyl and 2,3-butanediol formation by yeasts in anaerobiosis. TPP = thiamine pyrophosphate; TPP-C₂ = active acetaldehyde

Condensação de Acetil CoA e ácido pirúvico

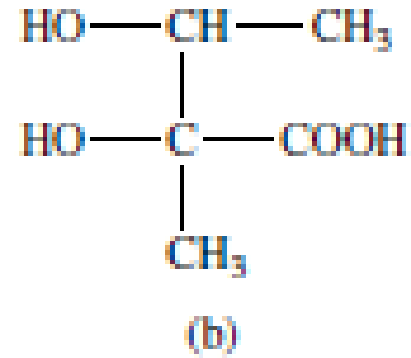
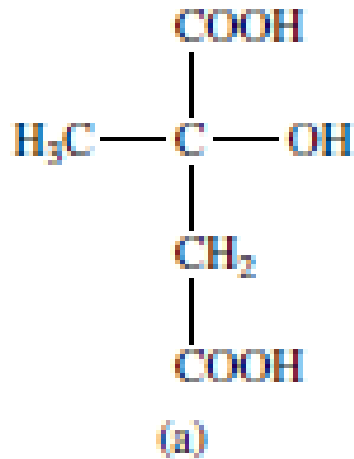


Fig. 2.18. (a) Citramalic acid and (b) dimethylglyceric acid

0-300 e 0-600 mg/L

Produção de ácido acético pelas leveduras 100-200 mg/L

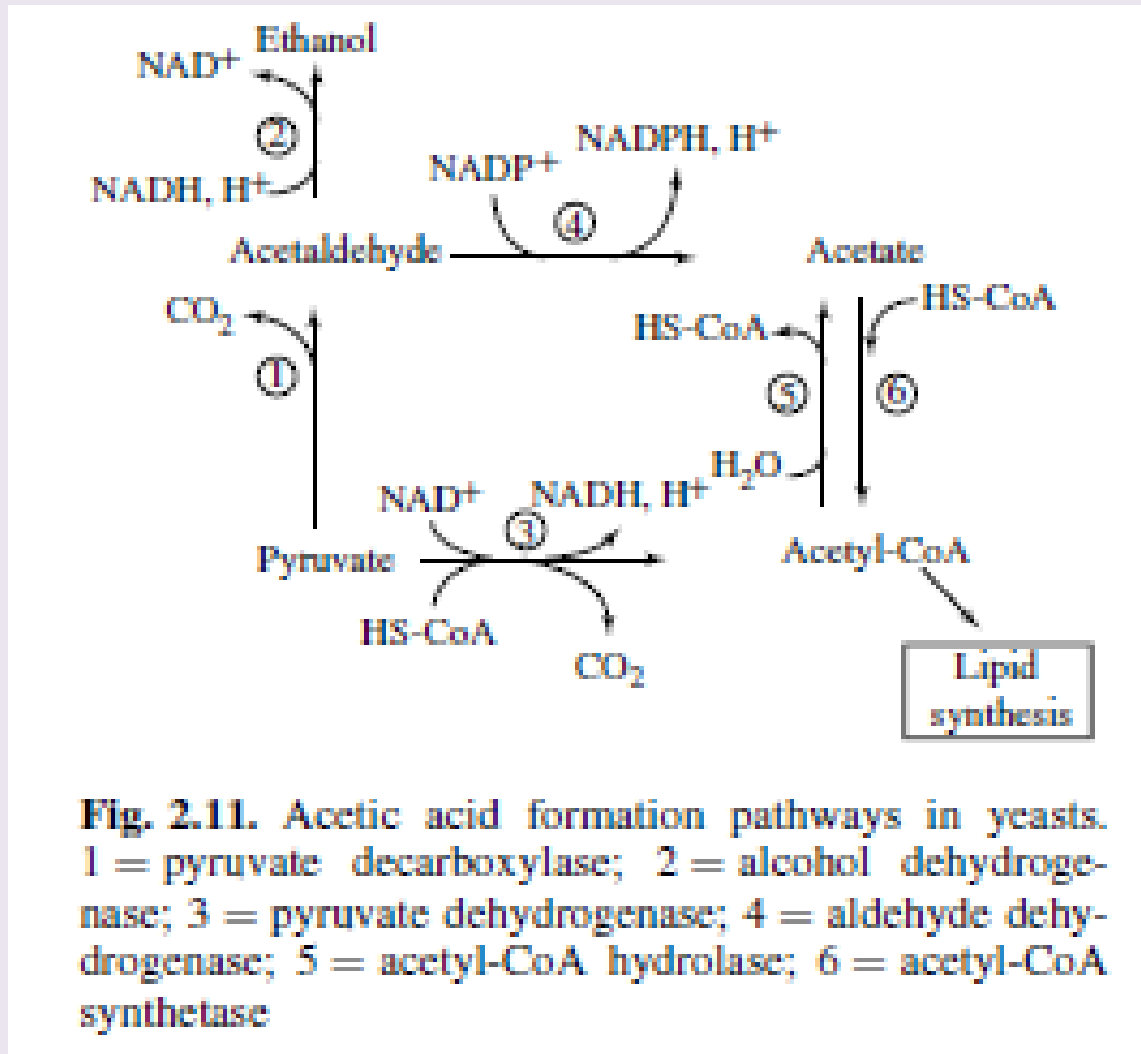


Table 2.3. Effect of initial sugar concentration of the must on the formation of secondary products of the fermentation (Lafon-Lafourcade, 1983)

Initial sugar (g/l)	Fermen- ted sugar (g/l)	Secondary products		
		Acetic acid (g/l)	Glycerol (g/l)	Succinic acid (g/l)
224	211	0.26	4.77	0.26
268	226	0.45	5.33	0.25
318	211	0.62	5.70	0.26
324	179	0.84	5.95	0.26
348	152	1.12	7.09	0.28

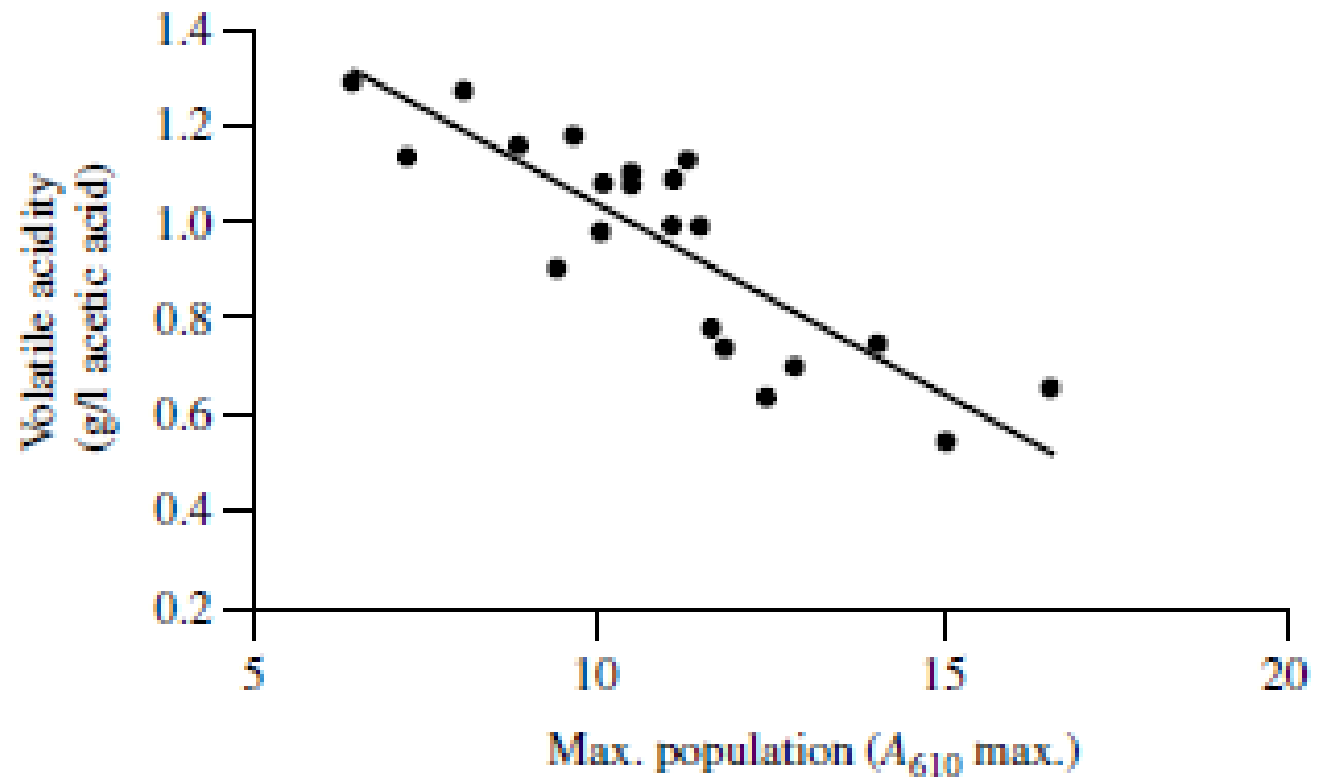


Fig. 2.13. Correlation between volatile acidity production and the maximum cell population in high-sugar, botrytized musts

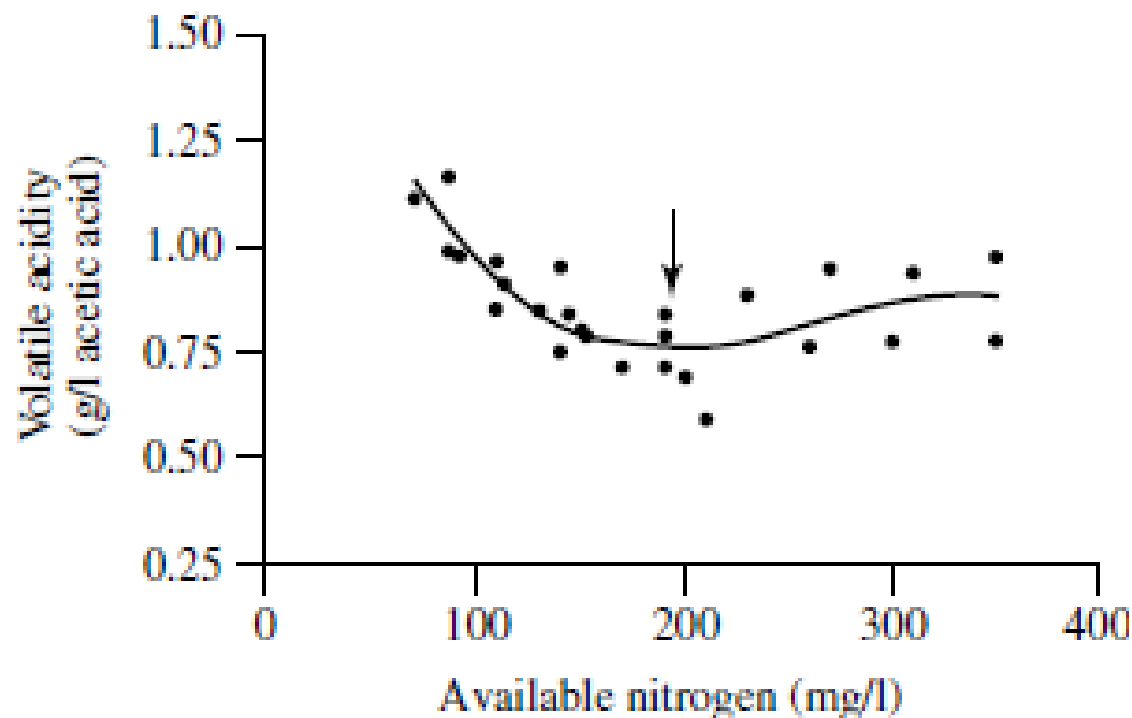


Fig. 2.14. Effect of the available nitrogen content in must (with or without ammonium supplements) on the production of volatile acidity (initial sugar content: 350 g/l)

Ácido acético é o principal ácido volátil do vinho

Em altas concentrações apresenta aroma de vinagre e sensação desagradável na boca.

Por essa razão é um dos parâmetros analíticos mais importantes em enologia

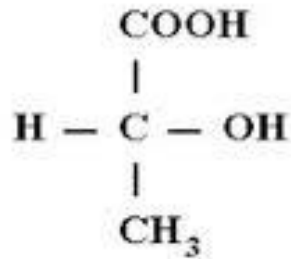
Ácido acético pode ser produzido tanto pelas leveduras como pelas bactérias lácticas e bactérias acéticas.

Mas normalmente *Saccharomyces cerevisiae* somente produz pequenas quantidades durante a fermentação alcoólica (0.1–0.3 g/L).

Lentidão e interrupção da fermentação alcólica pode produzir grandes quantidades

Formação de ácido láctico pelas leveduras

A partir do ácido pirúvico 200-300 mg/L



Degradação do ácido málico pelas leveduras

pH mais baixo degradação mais efetiva

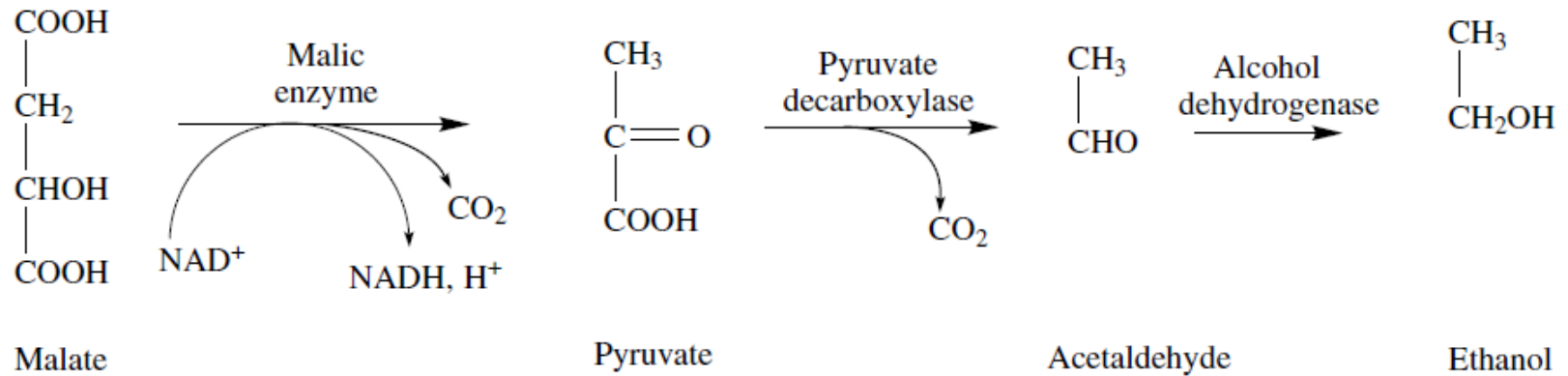


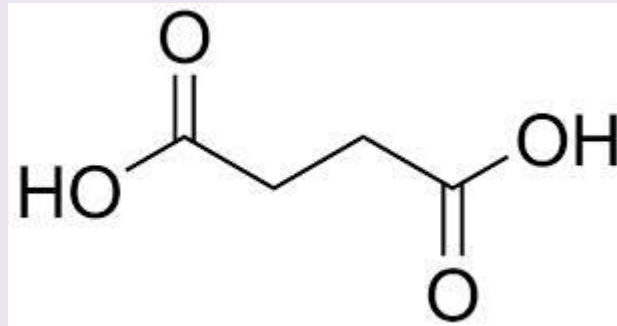
Fig. 2.19. Decomposition of malic acid by yeasts during alcoholic fermentation

10-20%

Ácido succínico é quantitativamente o terceiro produto da fermentação alcoólica,

sendo que alguns autores sugerem que seja sintetizado pelo Ciclo de Krebs

Porém é bastante contraditório



Problemas de paralisação e lentidão de fermentação : Causas e soluções

Muitas vezes a fermentação alcoólica torna-se lenta próximo ao final do processo.

As leveduras reduzem drasticamente o consumo de açúcares mesmo antes de metabolizar todos os açúcares fermentescíveis. Quando isso ocorre os enólogos deparam-se com dois problemas:

1. O vinho não está pronto e algo deve ser feito para termina-lo
2. O risco de contaminação bacteriológica é muito alto, sendo que bactérias lácticas podem produzir grandes quantidades de ácido acético.

As causas para essa paralisação tem sido objeto de inúmeros estudos (Larue et al. 1982; Ingledew and Kunkee 1985; Alexandre and Charpentier 1998; Bisson 1999).

E encontram-se resumidos nos próximos slides:

Elevadas concentrações de açúcar:

Inibe leveduras principalmente nos estágios finais da fermentação com

elevadas concentrações de etanol principalmente em vinhos tintos

Leveduras com alta resistência a etanol são recomendadas.

Table 3.6. Effect of ethanol addition to must on fermentation (in limited aerobiosis at 25°C) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975a)

Alcohol addition (% vol.)	Delay for initiation of fermentation	Yeast population (10^6 /ml)	Alcohol content attained (% vol.)	Alcohol formed (% vol.)	Residual sugar (g/l)	Nitrogen assimilated (mg/l)	Glycerol (mmol/l)
+0	1 day	80	14.0	14.0	2	252	57
+2	2 days	67	15.6	13.6	6	233	65
+6	4 days	62	18.2	12.2	15	194	72
+10	12 days	30	16.0	6.0	125	81	80

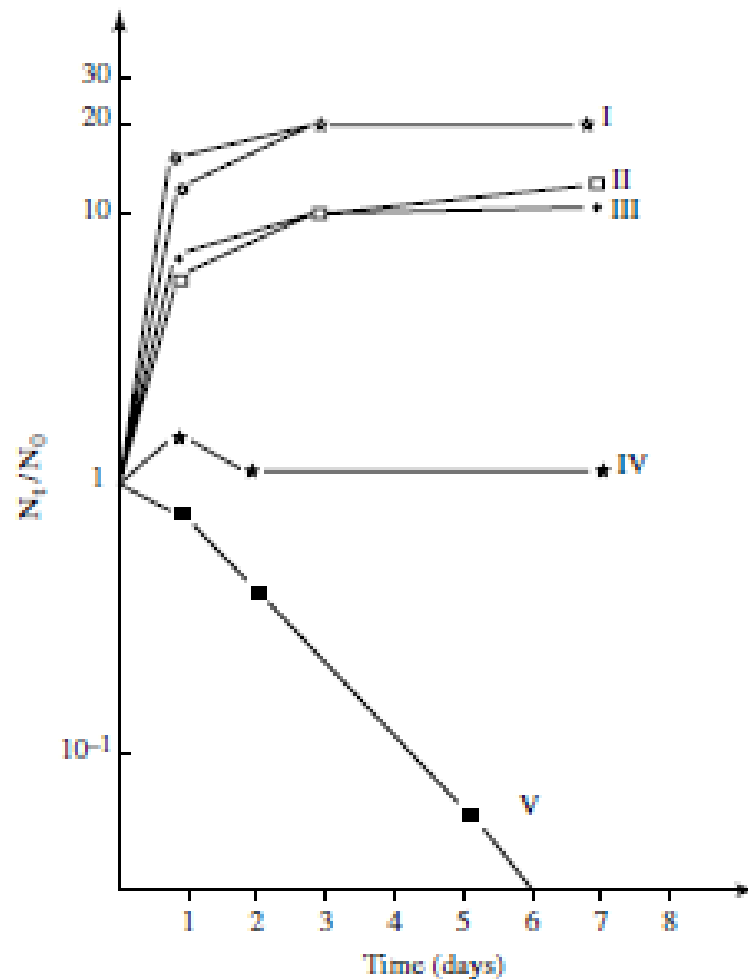


Fig. 3.7. Evolution of *Saccharomyces cerevisiae* population in fermenting media containing different alcohol concentrations (A = 1.7% vol.; B = 7.0% vol.; C = 9.5% vol., obtained by fermentation or alcohol additions) (Geneix *et al.*, 1983). N_t = cell count at time t ; N_0 = cell count at start (approximately 10^7 cells/ml). (I) non-fermented media A and B. (II) non-fermented medium C. (III) pre-fermented medium A. (IV) pre-fermented medium B. (V) pre-fermented medium C

Temperaturas extremas:

Temperaturas baixas no início podem levar a uma população de leveduras deficiente.

Se for muito alta acima de 30° C corre o risco de ser interrompida .

Por essa razão hoje em dia é necessário o controle da temperatura e sua variação brusca. Pois uma drástica queda de temperatura pode provocar rigidez excessiva da membrana plasmática

Table 3.10. Fermentation initiation speed and limits according to temperature (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975a)

Temperature	Initiation of fermentation	Alcohol content attained (% vol.)
10°C	8 days	16.2
15°C	6 days	15.8
20°C	4 days	15.2
25°C	3 days	14.5
30°C	36 hours	10.2
35°C	24 hours	6.0

(Initial sugar concentration: approximately 300 g/l).

Table 3.11. Alcohol formation (% vol.) according to fermentation temperature (Müller-Thurgau, 1884)

Sugar concentration (g/l)	Potential alcohol (% vol.)	Alcohol produced at			
		9°C	18°C	27°C	36°C
127	7.2	7.0	6.9	6.9	4.2
217	12.4	11.8	11.0	9.4	4.8
303	17.3	9.9	9.1	7.7	5.1

Completa anaerobiose:

Oxigênio é necessário para sintetizar ergosterol e ácidos graxos de cadeia média MCFA.

Sem oxigênio as leveduras demoram muito para crescer e adaptar suas membranas as condições do ambiente, por essa razão a aeração é recomendada principalmente durante a fase de crescimento exponencial

Deficiência de nutrientes:

A ausência de alguns nutrientes no mosto pode causar sérios problemas durante a fermentação, nitrogênio, vitaminas, minerais e etc podem estar deficitários no mosto.

Por está razão ativantes de leveduras são usualmente utilizados nas modernas vinícolas.

Os ativantes padrões são feitos com sais de amônio (fosfatos e/ou sulfatos) tiaminas e sua aplicação é certamente muito útil.

Contudo a dose de Nitrogênio no mosto deve ser cuidadosamente selecionada levando-se em conta a concentração inicial de Nitrogênio assimilável e o potencial alcoólico do mosto.

A adição de Nitrogênio é mais efetiva se for adicionado em 2 ou mais etapas combinadas com aeração.

Doses: Início da fermentação, meio da fase parcialmente estacionária (quasi-stationary phase) e a terceira no final dessa fase.

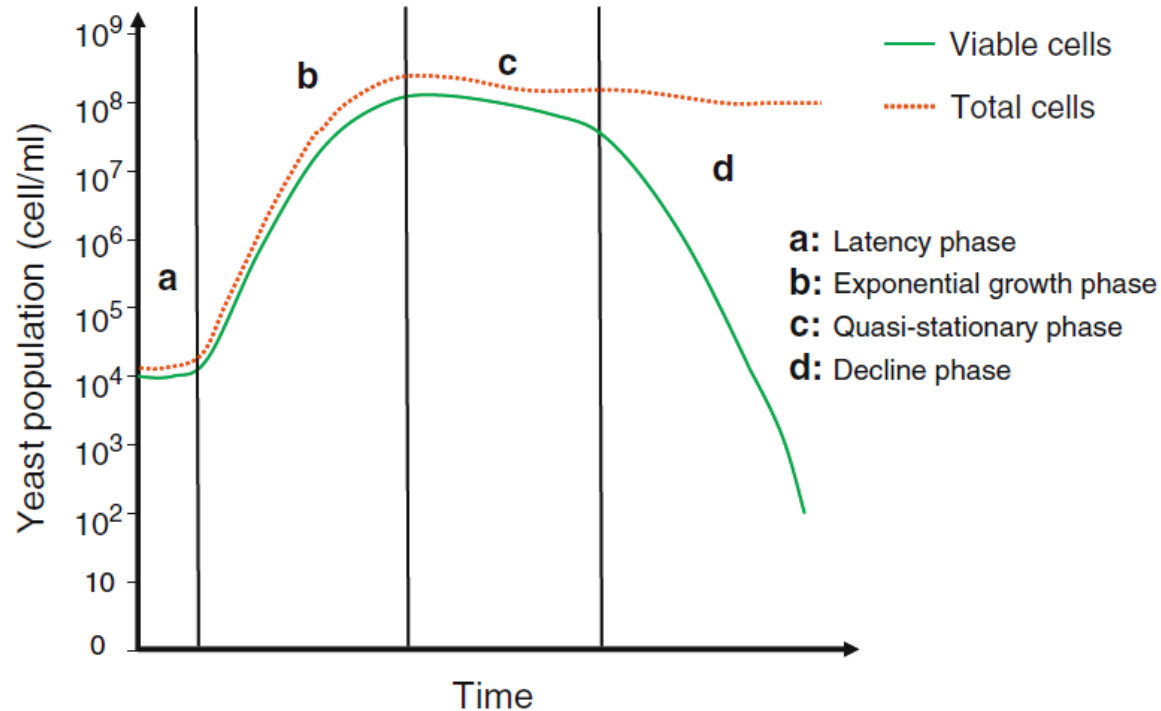


Fig. 1.1 Yeasts growth cycle

Nos últimos anos uma nova geração de ativantes tem surgido no mercado com outras substâncias interessantes como esteróis, minerais, ácido pantotênico UFA, que são extremamente úteis no final da fermentação

Presença de substâncias anti-fúngicas:

Tratamento dos vinhedos com agroquímicos (Captan Dithane)

Respeitar as carências e cuidado na produção do pé de cuba

Presença de MCFA:

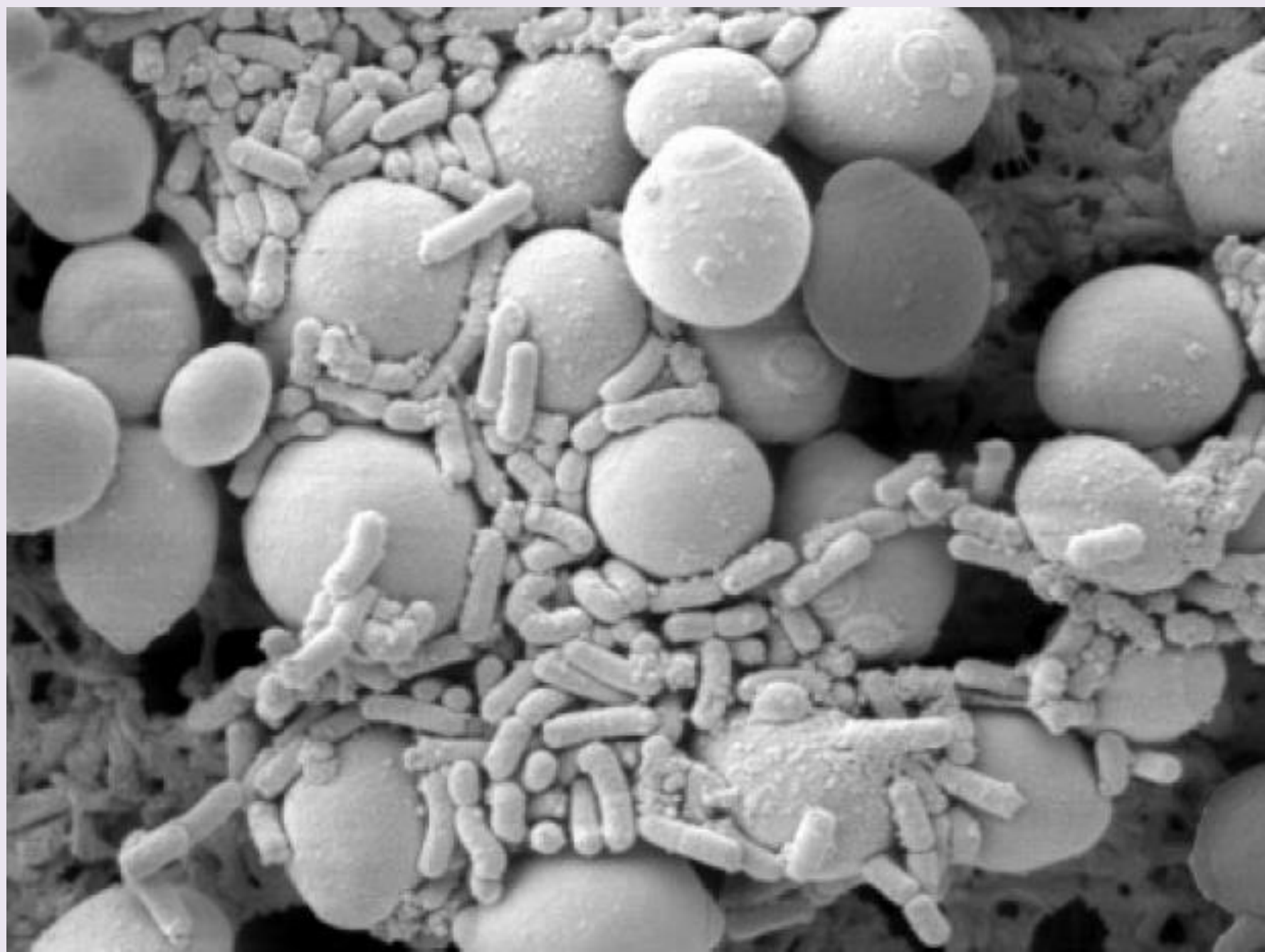
Pode diminuir a viabilidade das leveduras e até interromper a fermentação alcoólica

Esse problema é mais relevante na elaboração de vinhos brancos devido a utilização de baixas temperaturas e pouca aeração

Cascas de leveduras tem sido bastante úteis para evitar esse problema, pois absorvem MCFA do meio e fornecem esteróis e UFA (unsaturated fatty acids)

Pode ser usado de forma preventiva (20 g/hl)

Ou curativa (40–50 g/hl)



Dentre as causas de interrupção de fermentação

Todas as causas citadas são possíveis e podem prevenir que a fermentação alcoólica ocorra corretamente.

Contudo usualmente uma combinação sinérgica de algumas dessas causas que traz problemas para lentidão e interrupção da fermentação.

Se essas causas são eliminadas os problemas estão praticamente solucionados.

Contudo se algum tanque de fermentação apresenta problemas a intervenção técnica deve ser a mais rápida possível.

Aeração abundante e a adição de cascas de leveduras podem resolver o problema.

Se a fermentação parar as leveduras devem ser reinoculadas.

Sendo que a escolha da levedura e a forma como é pré-adaptada ao meio com etanol é a chave do sucesso do inóculo.

Dekkera e Brettanomyces: Leveduras não Competitivas que Deterioram Vinhos

Por ser oportunista e por apresentar um caráter não competitivo, estes gêneros permitem que as demais leveduras atuem no processo fermentativo.

Após esta fase, entram lenta e progressivamente em atividade, causando sérios danos ao vinho.

Devido ao metabolismo, estes microrganismos podem provocar aumento da acidez volátil e a formação do 4-etil-fenol no vinho, levando à depreciação o produto final.

A ação deteriorante dos gêneros Dekkera e Brettanomyces é de efeito retardado.

O gênero **Brettanomyces** já era conhecido, segundo Smith et al. (1990), desde 1904, quando Claussen, conseguiu isolar esta levedura a partir de cerveja inglesa no final da fermentação.

O nome Brettanomyces é uma alusão ao termo “British“ devido ao uso de espécies deste gênero na elaboração de cerveja de aroma forte (Franson, 2001).

O vigor na formação de ácido acético, o crescimento lento em ágar malte ou extrato de malte, o curto período de sobrevivência, a frequência de células ogivais e a ausência de ascósporos, permitiram agrupar os integrantes deste gênero em quatro espécies e duas variedades (linhagens).

Dekkera

Este gênero apresenta, ao microscópio, células esferoidais a elipsoidais, muitas vezes ogivais. Células ogivais são aquelas que mostram uma estrutura semelhante à chama de uma vela nas extremidades. Podem também ser cilíndricas ou alongadas. A reprodução vegetativa se dá por brotamento e exibe pseudomicélio.



1a



Fig. 2. Células alongadas e esferoidais de *Dekkera bruxellensis* (Fonte: Barnett et al., 1990).

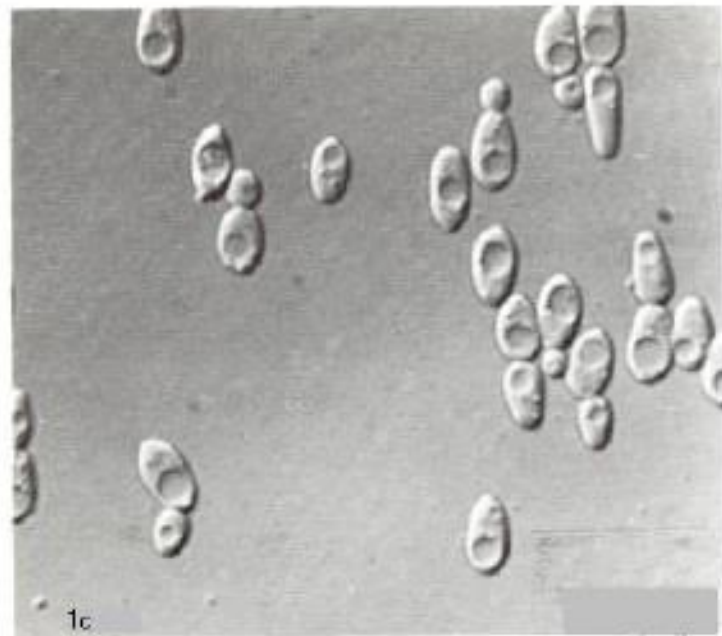


Fig. 3. Células esferoidais de *Dekkera bruxellensis* (Fonte: Barnett et al., 1990).

Brettanomyces

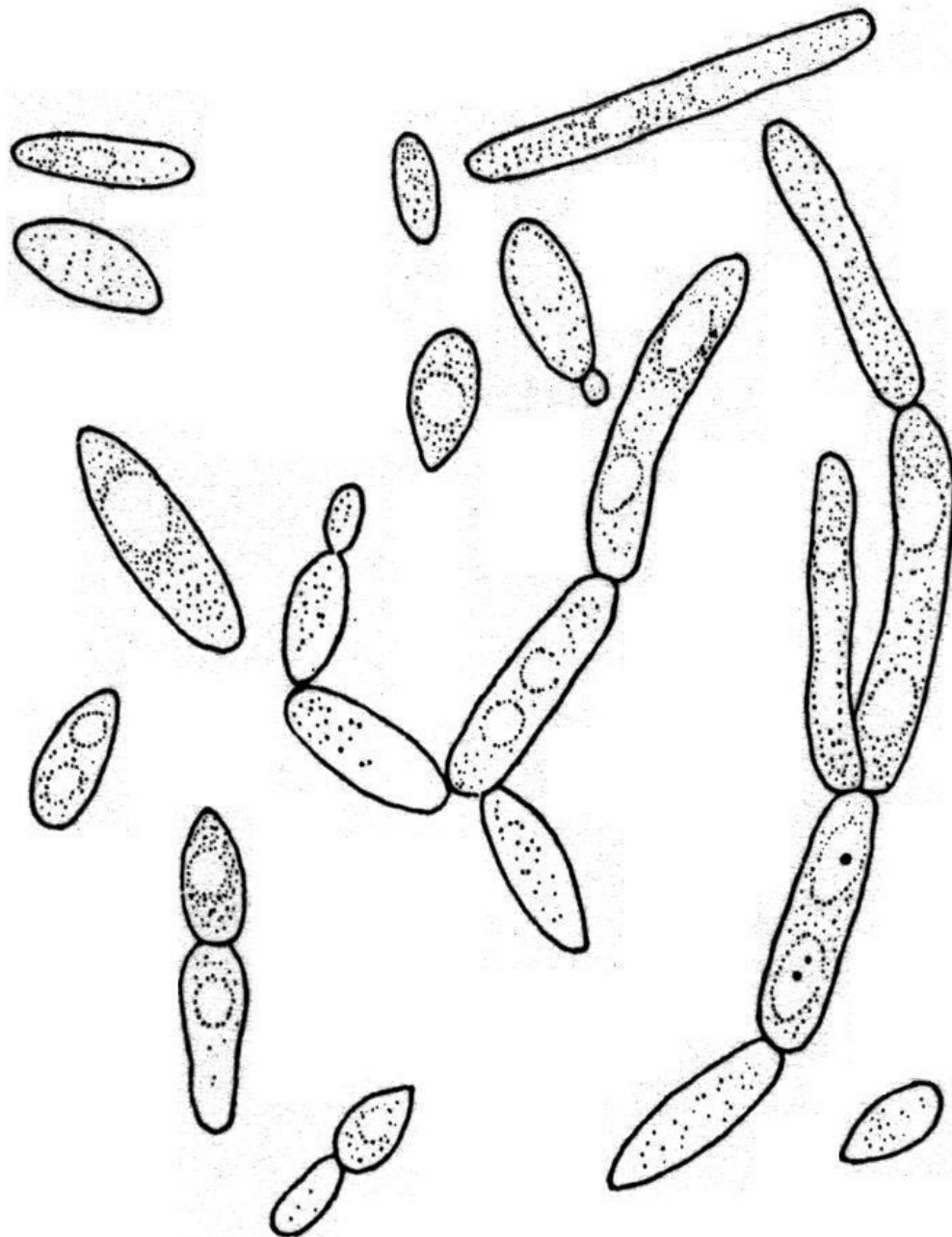
Este gênero não forma asco, ou seja, se trata da forma imperfeita do gênero Dekkera.

Apresentam-se como células esferoidais, subglobosas a elipsoidais, ogivais, cilíndricas e alongadas. Sua reprodução se dá por brotamento.

Por se tratar da forma imperfeita do gênero Dekkera, não possui fase sexuada e, portanto, não forma ascosporos. Pode formar pseudomicélio e micélio ramificado dando uma visão unicelular por não apresentar septos e nem invaginações.

**Cellule di *Brettanomyces* sp.
osservate al microscopio elettronico**





Algumas características importantes que *Dekkera* e *Brettanomyces* exibem, são a formação de ácido acético, a presença do efeito Custer, também chamado de efeito Pasteur negativo (Scheffers, 1966; Smith et al., 1981), relacionada com deterioração de vinho.

A fermentação em condições anaeróbicas desta espécie é estimulada por substâncias formadas por *Sacch. cerevisiae* durante a fermentação da glicose *Sacch.cerevisiae*.

Ou seja, o O₂ pode ser substituído, no efeito Custer, por moléculas formadas durante a fermentação da glicose (Scheffers, 1961). Isto explica o desenvolvimento de *Dekkera* e *Brettanomyces* em vinhos onde a concentração de O₂ é praticamente nula. Se o metabolismo da levedura dependesse apenas do O₂, sua atividade estacionária no momento em que o O₂ fosse completamente utilizado.

Observa-se que em garrafas de vidro, onde a troca de oxigênio entre o vinho e o ambiente se restringe à rolha, a fermentação ocorre de forma persistente com acúmulo de CO₂ no espaço livre da garrafa.

Problemas de ordem geral:

Alguns problemas causados por leveduras são de fácil detecção quando o vinho está pronto. Entre estes estão:

- Turbidez e formação de névoa - as leveduras selvagens, além de causar turvação, podem formar sedimentos
- Formação de filme ou película - na presença de ar, algumas leveduras podem formar película sobre a superfície do vinho. Outras podem até mesmo ascender pelas paredes da garrafa.
- Atenuação - Leveduras selvagens podem crescer às custas de fontes de carbono que normalmente *Sacch. cerevisiae* não utiliza. Nestes casos, o teor de etanol pode aumentar e formar aromas indesejáveis.

Problemas específicos potenciais e condições para a síntese microbiológica de fenóis

Substâncias fenólicas são componentes clássicos do aroma de vinhos. Entre estes estão os vinil-fenóis, nos vinhos brancos, e os etil-fenóis, nos tintos (Dubois et al., 1971; Etiévant, 1981; Boidron et al., 1988). Análises efetuadas em vinhos brancos revelaram que apenas determinados vinhos continham vinil-fenóis (Chatonnet et al., 1993).

O 4-vinil-guaiacol, além de ser mais agradável, pois contribui para a intensidade aromática do vinho, conferindo-lhe nota floral, é mais facilmente percebido em vinhos que o 4-vinil-fenol. Mesmo em concentrações abaixo do limiar de percepção, este último mascara a nota frutada do vinho branco (Chatonnet et al., 1993).

Vinhos contaminados com *Dekkera* ou *Brettanomyces* apresentam elevadas concentrações de ácido acético e se tornam túrbidos. Nos casos mais graves, há formação de derivados do tipo 2-acetil-2-etil-tetraidro-piridina e acetil-pirolina, resultando em forte cheiro conhecido como "odor de rato" (Chatonnet et al., 1999).

Outros componentes de odor desagradável também são encontrados neste tipo de deterioração. Entre estes componentes estão os que apresentam odores fenólicos e animais, lembrando "couro" ou "urina de cavalo" em vinhos tintos. Licker et al. (1998) apresentam várias descrições para o aroma exalado pelo vinho devido à ação de *Dekkera* e *Brettanomyces*.

Entre estas estão, estábulo, plástico queimado, suor de cavalo, couro molhado, band-aid e animal molhado. Há outras descrições como tempero forte, fumaça, cravo da Índia, fenol e remédio.

Na forma pura, enquanto o 4-etil-fenol exibe um aroma de Band-Aid, o 4-etil-guaiacol exala aroma de madeira queimada, sendo, a presença destes dois componentes, fortes indicadores da presença de Dekkera e Brettanomyces (Olsen, 2002).

Vinhos com estes atributos são considerados "Bretty". Este tipo de defeito tem sido qualificado como simplesmente de caráter fenólico dos vinhos tintos.

Tabela 3. Limiares de percepção do 4-etil-fenol e 4-etil-guaiacol em vinhos tintos e de 4-vinil-guaiacol e 4-vinil-fenol em vinhos brancos. (Fontes: Chatonnet et al., 1992; Chatonnet et al., 1993).

Compostos voláteis	H ₂ O	Solução Hidroalcoólica Modelo	LP ($\mu\text{g/L}$)
Vinho tinto			
4-etil-fenol	130	440	620
4-etil-guaiacol	25	47	140
4-etil-fenol + 4-etil-guaiacol (10:1)	426
Vinho branco			
4-vinil-guaiacol	32	130	570
4-vinil-fenol	85	180	0
4-vinil-guaiacol + 4-vinil-fenol (1:1)	725

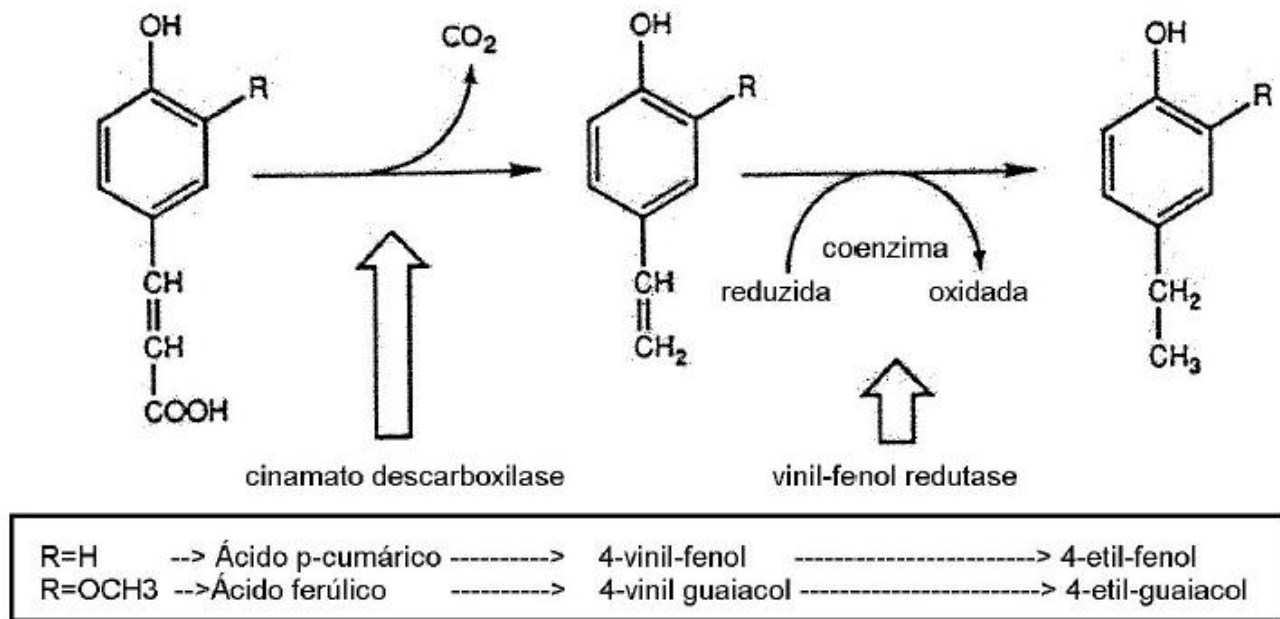


Fig. 17. Síntese de etil-fenóis por *Dekkera* e *Brettanomyces*. Fonte: Chatonnet et al. (1992)

Entre as sugestões para reduzir a incidência de Dekkera e Brettanomyces nos vinhos estão:

- não permitir que nas proximidades da cantina seja acumulada casca de uva ou material passível de fermentação
- usar agentes esterilizantes (calor, ozônio, gás de enxofre ou DMDC) na limpeza das barricas, das rolhas e das tubulações que entram em contato com o vinho
- ajustar o pH do mosto de modo que, depois da fermentação malolática, o pH se situe entre 3,5 e 3,6 (Franson, 2001)
- estabilizar o tartarato (Franson, 2001)
- não permitir que o SO₂ livre fique abaixo de 25 mg/L, após a fermentação maloláctica, (Franson, 2001)
- manter o vinho numa temperatura entre 12 °C e 14 °C (Franson, 2001)

- efetuar o corte muito antes do engarrafamento para evitar o aparecimento de Dekkera e Brettanomyces na garrafa (Olsen, 2002)
 - detectar indícios da presença de Dekkera e Brettanomyces por meio da sensação odorífera característica no espaço livre do tanque (Franson, 2001)
 - se a concentração de 4-etil-fenol estiver acima de 426 mg/L, deve-se:
 - isolar o tanque para que não haja contaminação
 - determinar a concentração de células viáveis de Dekkera e Brettanomyces
 - verificar a concentração de 4-etil-fenol
 - determinar a concentração de SO₂ livre e ajustar para 35-45 mg/L
- (Franson, 2001)

- determinar a concentração de células viáveis de Dekkera e Brettanomyces depois de 15 dias e, se necessário, repita a determinação de 15 em 15 dias
- verificar a concentração de 4-etil-fenol depois de 15 e, se necessário, repetir a análise de 15 em 15 dias
- verificar a concentração de 4-etil-fenol em cada trasfega (Franson, 2001)
- tratar o vinho antes do engarrafamento, se disponível e se permitido por lei, com DMDC, não ultrapassando a concentração final no vinho de 200 mg/L)
- alternativamente filtrar o vinho (Olsen, 2002)
- iniciar o engarrafamento dos vinhos sem problema de contaminação
- esterilizar por vapor toda a linha de enchimento antes de iniciar o processo

Considerações sobre leveduras

A fermentação alcoólica não é uma simples transformação de açúcares em etanol.

Ao contrário é um processo extremamente complexo que é utilizado para obtenção de uma bebida extremamente prazerosa.

Dentre os produtos existem os que contribuem positivamente e os que contribuem negativamente para a qualidade sensorial dos vinhos

A fermentação alcoólica também utiliza outros componentes do vinho na transformação e obtenção de compostos de interesse ao mesmo.

Consideráveis progressos tem sido feitos nos últimos anos nesse estudo e com certeza novos devem surgir.

Exercício

Com base no que foi visto até o momento sobre leveduras, como você procederia uma vinificação em tinto e em branco e quais cuidados teria?

FERMENTAÇÃO MALOLÁTICA

Transformações bioquímicas produzidas pela fermentação malolática

- Ecologia e desenvolvimento de bactérias ácido lácticas durante a vinificação
- Bactérias ácido lácticas em vinhos
- Desenvolvimento durante a vinificação
- Aspectos relevantes do metabolismo das bactérias ácido lácticas em vinhos
- Metabolismo dos carboidratos
- Metabolismo dos ácidos orgânicos
- Metabolismo dos compostos fenólicos
- Hidrólise de glicosídeos
- Metabolismo de aminoácidos
- Quebra de proteínas e peptídeos

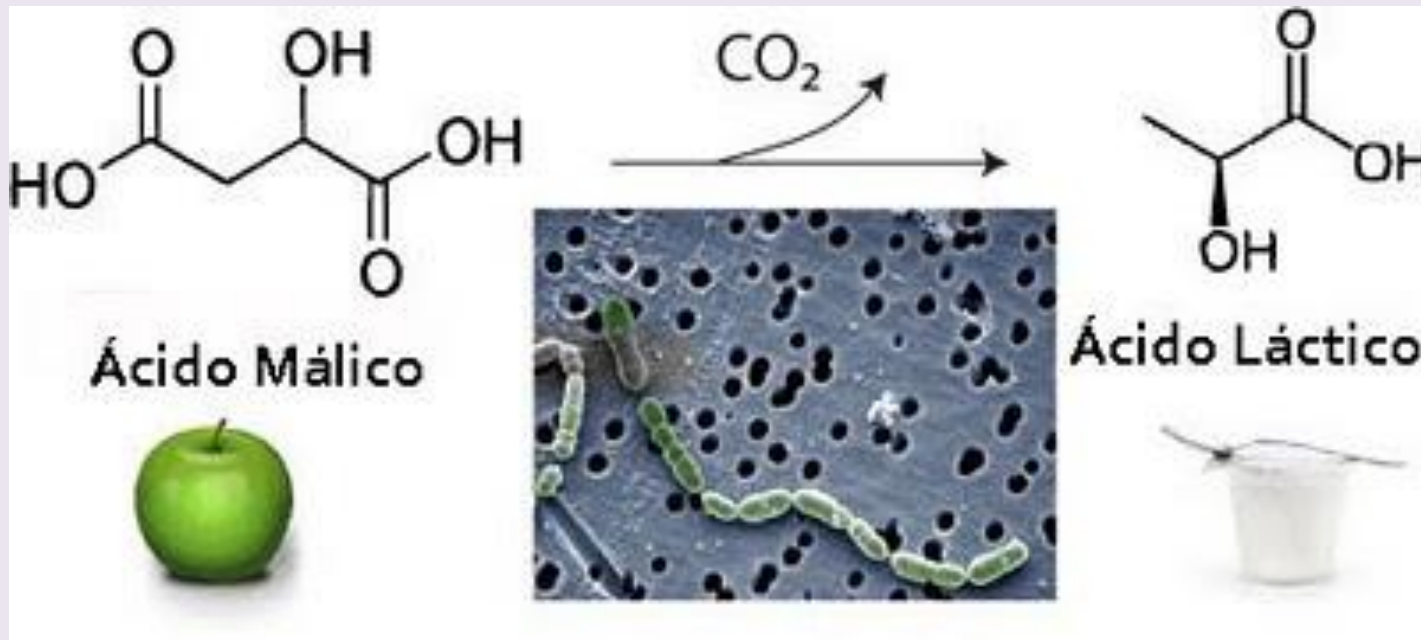
- Contribuição da fermentação malolática as características organolépticas dos vinhos
- Novos avanços na performance de fermentações maloláticas em vinícolas
- Uso de culturas Starters
- Tempo de inoculação/co-inoculação
- Fermentação malolática em barricas/micro-oxigenação
- Resíduos de bactérias ácido lácticas
- Aspectos relacionados a qualidade organoléptica de vinhos
- Aspectos relacionados a qualidade higiênica de vinhos
- Métodos de manejo do crescimento de bactérias

Fermentação Malolática (MLF)

Conversão enzimática do ácido L-Málico para ácido L-Lático

Processo secundário que usualmente ocorre após a fermentação alcoólica, porém pode ocorrer concorrentemente.

Essa redução não realmente é uma fermentação mas uma reação enzimática realizada pelas bactérias lácticas LAB após sua fase de crescimento exponencial



Pasteur estudou as BAL entre 1857 e 1863, mas apenas em 1973, Lister isolou a primeira cultura pura destas bactérias (“*Bacterium lactis*”) (*et al.*, 2009). Como já foi referido, existem 4 géneros importantes em vinhos e as características gerais, válidas para todas as BAL, são:

organismos procariotas, dividem-se por fissão binária, coloração Gram-positivo, não móveis e não esporulados, anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos (requerem meio rico para fermentar), têm uma temperatura ótima entre 20° e 30°C e possuem uma forma esférica ou alongada, em pares ou pequenas cadeias (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a; Krieger, 2005).

Em geral realizada pela *Oenococcus oeni*, espécie que pode resistir a baixo pH (<3.5), elevada concentração alcoólica (>10 vol.%) e altas concentrações de SO₂ (50 mg/L)

Cepas mais resistentes de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* também podem crescer no vinho e contribuir para a MLF; especialmente em vinhos com pH que excedem 3.5 (Davis et al. 1986; Wibowo et al. 1985).

O benefício mais importante da MLF é a desacidificação de vinhos muito ácidos

As LAB contribuem também para o flavour, complexidade aromática e estabilidade microbiológica (Lonvaud-Funel 1999; Moreno-Arribas and Polo 2005).

Infelizmente MLF não controlada apresenta riscos para a contaminação do vinho por off-flavours (incluindo ácido acético, fenóis voláteis e mousiness 2-acetyl-3,4,5,6-tetrahydropyridine).

Podendo também ser nocivo para saúde humana com compostos como etil carbamato e aminas biogênicas.

Ecologia e desenvolvimento de LBA durante a vinificação

As LBA encontram-se presentes tanto da casca das uvas como também em barricas, tanques e utensílios de vinificação

São divididas de acordo com os produtos finais do metabolismo de açúcares (Figura). As hexoses, tais como a glucose, são fermentadas pelas bactérias do grupo homofermentativo produzindo mais de 85% de ácido láctico (via Embden-Meyerhof-Parnas). Esta via, inclui uma primeira fase de todas as reações de glicólise que conduzem ao piruvato e o acceptor final de eletrons é o piruvato que é reduzido a ácido láctico. Por cada molécula de glucose utilizada são produzidas dois moles de lactato e de ATP (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a; Liu, 2002).

Por outro lado, temos o grupo heterofermentativo (via 6P-gluconato/fosfocetolase) que por cada mole de açúcar fermentada, produz CO₂, etanol e ácido acético, para além do ácido láctico. Podem ser também divididas em obrigatórias (são heterofermentativas para as pentoses) ou facultativas (são homofermentativas para hexoses).

Grupo	Fermentação de glucose	Espécies
Células alongadas	Heterofermentativo	<i>Lactobacillus casei</i>
	facultativo	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	Heterofermentativo	<i>Lactobacillus brevis</i>
	obrigatórias	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
Células redondas	Homofermentativo	<i>Pediococcus damnosus</i>
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Heterofermentativo	<i>Oenococcus oeni</i>

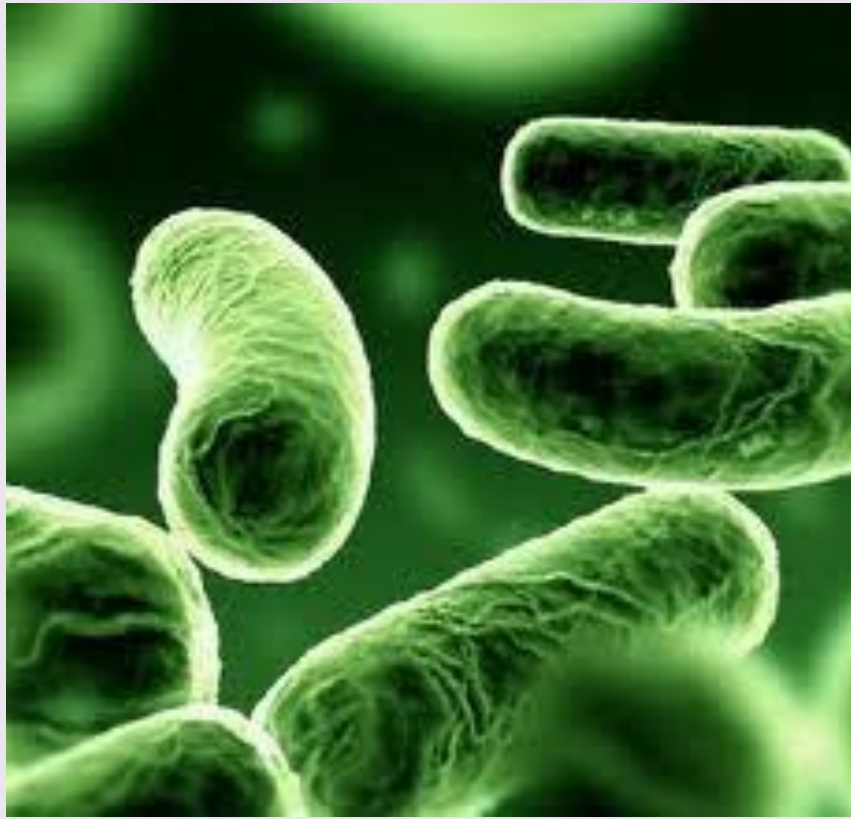
Lactobacillus

Gram-positiva, bacteria microaerofílica;

Suas células não são móveis e apresentam-se como hastes longas ou curtas

(Kandler and Weiss 1986) podendo também aparecer como células sozinhas,

em pares ou em cadeias com diferentes tamanhos



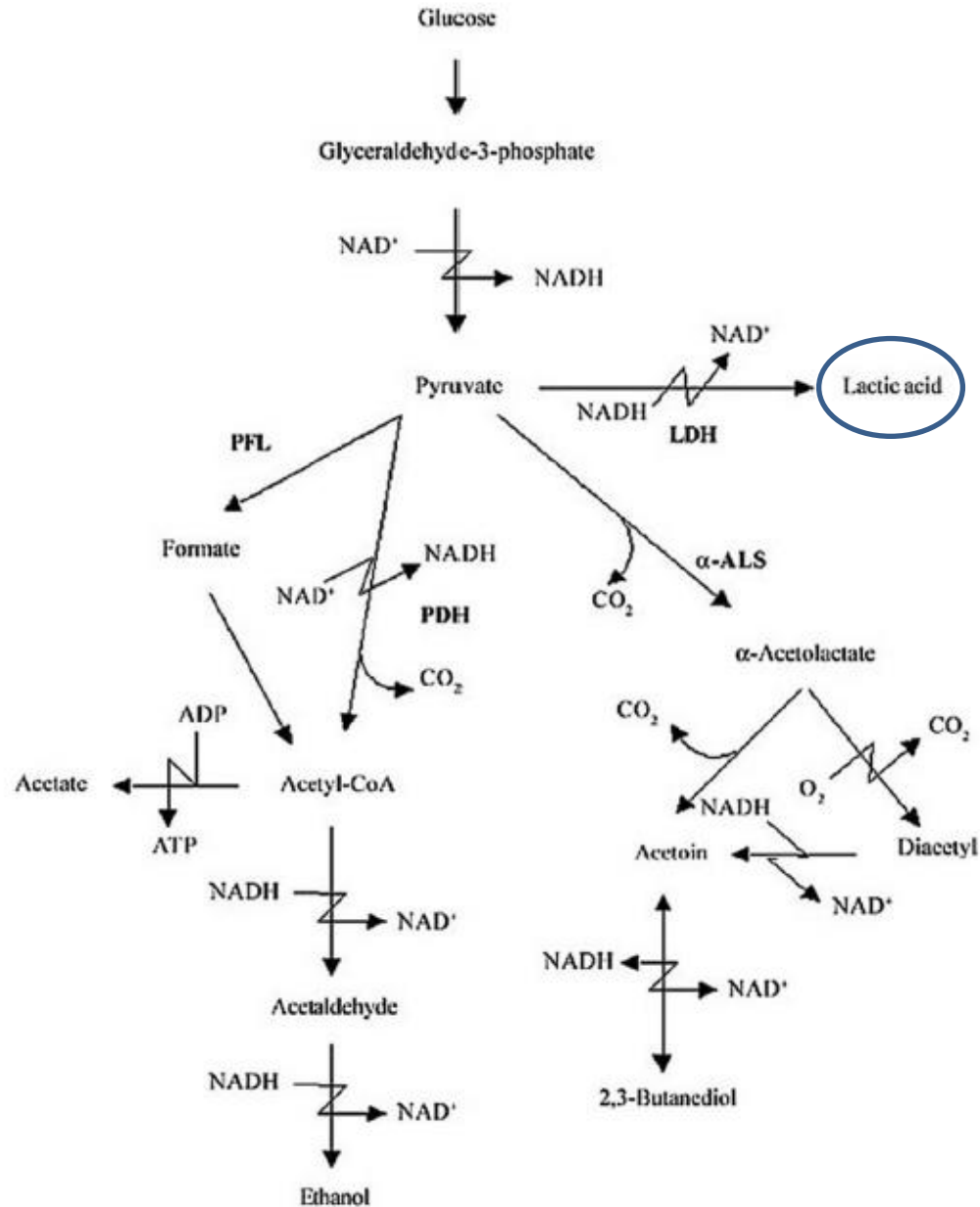
As Bactérias pertencentes a esse gênero são anaeróbicas facultativas e requerem um meio rico em açúcares fermentescíveis

São divididas em dois grupos em relação ao metabolismo das hexoses:

Stricto heterofermentativas (*L. brevis*, *L. hilgardii*)

Facultativas heterofermentativas (*L. casei*, *L. plantarum*)

Rota heterofermentativa



LDH: lactate dehydrogenase;

PDH: pyruvate dehydrogenase;

PFL: pyruvate-formate lyase;

α-ALS: acetolactate synthase

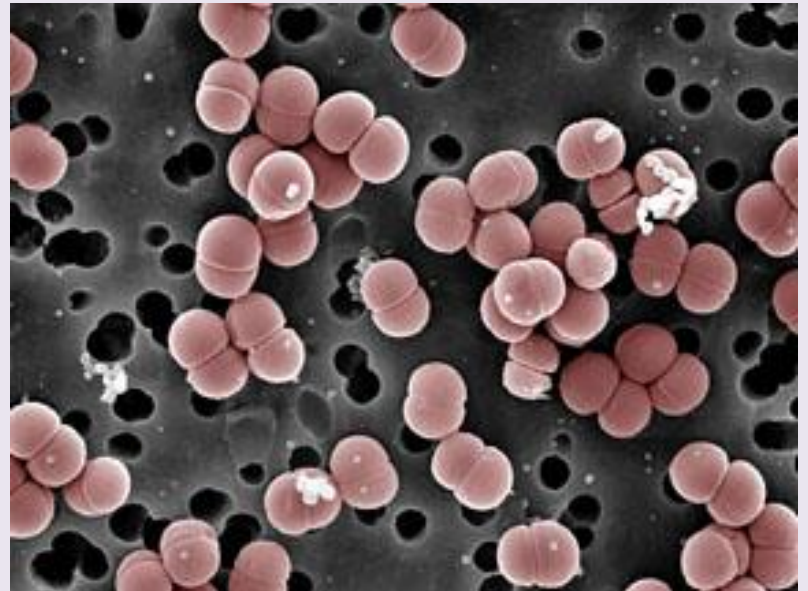
Pediococcus

As células não são móveis apresentam formato esférico, são as únicas LBA que se separam em dois planos resultando na formação de pares.

São facultativas anaeróbicas e requerem um meio que contenha bastante açúcar fermentescível para seu desenvolvimento.

Sua temperatura ótima é entre 25–30 °C com pH 6.

São homofermentativas o que significa que toda glicose é metabolizada em ácido lático e não fermenta pentose.

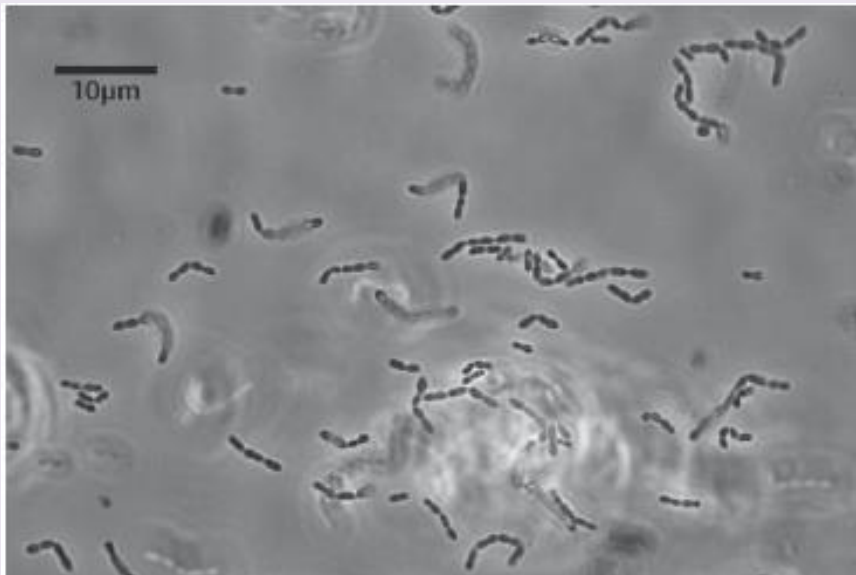


Oenococcus

Oenococcus oeni é descrita como Gram-positiva não móvel apresenta formato de coccus e frequentemente ocorre em pares e cadeias de diferentes tamanhos

Oenococcus é anaeróbia acidófila facultativa e cresce em pH 4.8 com temperaturas entre 18 °C and 30 °C. Requer meio rico suplementado por suco de uvas.

É heterofermentativa. Converte malato em lactato e CO₂ em presença de açúcares fermentescíveis



Desenvolvimento durante a vinificação

Crescimento de MO tem uma ordem específica;

Durante o período de colheita as bactérias e leveduras colonizam a vinícola em pequeno número e são representadas principalmente por:

L. plantarum, *L. casei*, *L. mesenteroides* e *O. oeni*.

Nos primeiros dias de fermentação elas se multiplicam mas sua população é limitada a níveis de 10^4 cells/mL. A medida que a fermentação alcoólica avança esse valor reduz para 10^2 cells/mL (pH álcool)

Após a fase lag 10^6 – 10^8 cells/mL estágio que ocorre a fermentação malolática *O. oeni* é a principal espécie identificada durante a MLF. Seu desenvolvimento é natural mas pode ser ampliado com temperaturas de 20–25 °C e baixo SO₂ (menos de 15–20 mg/L “livre”).

Após completar a MLF, outras bactérias como *Lactobacillus* e *Pediococcus*, podem aparecer e permanecerem viáveis durante o processo de armazenamento não exibindo tendência de crescimento e demonstrando um lento e progressivo declínio em sua viabilidade.

Mas mesmo assim podem metabolizar algumas substâncias indesejáveis para a qualidade do vinho, especialmente pela ação de cepas de *Pediococcus* and *Lactobacillus*

Fatores que afetam a Fermentação malolática:

1. Temperatura,
2. pH,
3. Concentração alcoólica,
4. SO₂
5. Disponibilidade de nutrientes

Em alguns casos diversas semanas ou meses são necessários para que se atinja o número apropriado de células capazes de degradar o ácido málico em vinhos tintos.

Devido a isso vem se tornando uma prática comum a utilização de culturas starter concentradas.

Aspectos relevantes no metabolismo de LAB em vinhos

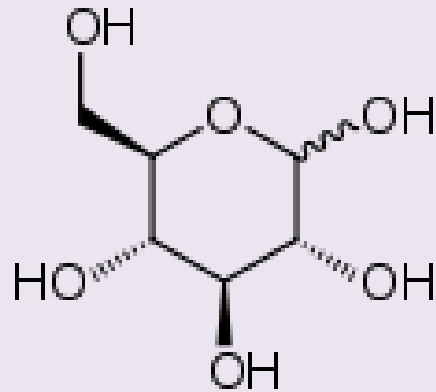
Dentre todas as atividades metabólicas das LAB a mais importante e desejável é a descarboxilação do ácido Málico

Contudo a quebra dos ácidos málico e cítrico tem consequências na perspectiva da elaboração de vinhos

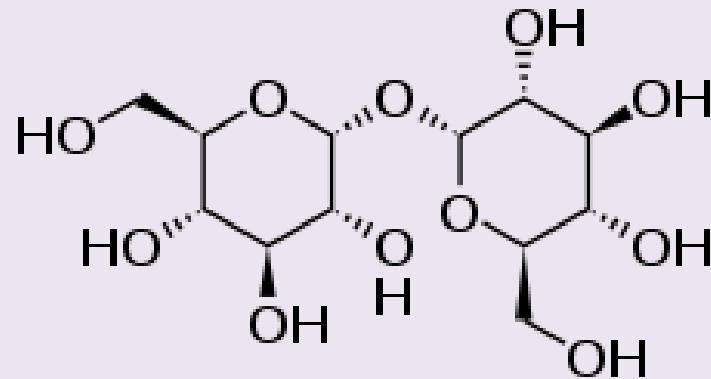
Também é evidente que as LAB metabolizam outros substratos do vinho para assegurar sua multiplicação, incluindo açúcares, ácido tartárico, glicerol e também alguns aminoácidos

Metabolismo dos carboidratos

Açúcares são a principal fonte de energia para o crescimento das bactérias, com preferência para:



Glicose



Trealose

A rota metabólica para açúcares ainda não foi completamente elucidada especialmente para *O. oeni*.

Podendo ser tanto por glicolise (homofermentação) ou pela rota da pentose (heterofermentação).

Dentre elas somente a rota da pentose gera ácido acético que aumenta a acidez volátil dos vinhos.)

Todavia numa vinificação normal sem acidentes as LAB multiplicam-se no meio e somente açúcares não fermentescíveis permanecem, em geral isso corresponde a centenas de mg/L de glicose e frutose e pentoses (xylose and arabinose).

Sendo que o açúcar residual fornece a energia suficiente para o crescimento bacteriano e permite a formação de biomassa para a MLF.

As LAB podem também degradar polissacarídeos e *O. oeni* tem demonstrado atividade glucanase extracelular (1→3) (Guilloux-Benatier et al. 2000)

Metabolismo dos ácidos orgânicos

A habilidade de metabolizar os ácidos orgânicos é muito difundida e leva a muitas mudanças organolépticas sendo que as mais estudadas são a fermentação malolática e recentemente a degradação do ácido cítrico.

Transformação do ácido málico

Essa é a principal reação da MLF que consiste quimicamente em uma simples descarboxilação e conversão do ácido málico em láctico.

Bioquimicamente é o resultado da atividade da enzima malolática característica das bactérias ácido lácticas.

Essa transformação tem um duplo efeito:

O primeiro que ocorre uma desacidificação do vinho aumentando o pH, efeito devido as grandes concentrações de ácido málico e também atribui ao vinho um sabor mais suave substituindo a acidez e adstringência do ácido málico pela suavidade do ácido láctico.

Mudança nas características de um vinho .

E por isso que é recomendada.

A duração da fermentação malolática depende da concentração inicial de ácido málico e da população total de bactérias presentes.

A enzima malolática é dimérica e compreende duas subunidades idênticas de 60 kDa usando NAD^+ and Mn^+ como cofatores .

Existem inúmeros estudos que demonstram que as enzimas agem em um mecanismo arranjado no qual os cofatores fixam antes do malato

Considera-se ainda que a atividade é induzida pela reação do ácido málico com o substrato.

Quebra do ácido cítrico

Enquanto o vinho contém inúmeros g/L de ácido málico usualmente contém entre 200 e 300 mg/L de ácido cítrico mas mesmo assim apresenta grande importância.

Se por um lado sua rota metabólica leva à produção de ácido acético por outro leva à produção de diacetil e outros compostos acetônicos que afetam o aroma.

5 mg/L, diacetil aumenta a complexidade do aroma dos vinhos com notas de Nozes e caramelos.

Porém acima de 5mg/L apresenta aroma de manteiga rancificada e é caracterizado como um defeito.

A formação microbiológica de diacetil é um processo dinâmico cuja concentração depende de diversos fatores como:

Cepa bacteriana

pH,

Contato com as borras

Concentração de SO₂ (Martineau and Henick-Kling 1995; Nielsen and Richelieu 1999).

Metabolismo de compostos fenólicos

A maior parte de estudos de interação entre compostos fenólicos e LAB refere-se ao metabolismo de ácidos hydroxicinamicos (ferúlico e coumarico) por diferentes espécies de bactéria gerando fenóis voláteis como (4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol) (Cavin et al. 1993; Gury et al. 2004). Esses derivados são off-flavors devido as características de aroma e baixo OT .

A cor e corpo dos vinhos tintos podem ser alterados devido a modificações de compostos fenólicos, sendo que alguns fenóis precipitam ou sofrem alterações a nível estrutural. Assim, a fermentação malolática pode reduzir as antocianinas livres e a adstringência por reação de taninos e antocianinas (Lonvaud-Funel, 1999).

Hidrolise de Glicosídeos

O. oeni apresenta capacidade glucosidásica. A capacidade de *O. oeni* de hidrolisar precursores aromáticos glicosilados sugere que diferentes tipos de enzimas, como proteases, esterases, c transferases, descarboxilases e β -glucosidases podem influenciar o sabor final dos vinhos, ao hidrolisar precursores de aromas, como é apresentado na Tabela.

Estas enzimas permitem a hidrólise dos precursores e consequente libertação dos aromas. Estudos demonstram que *O. oeni* foi capaz de formar vanilina e aumentar a concentração deste composto em barris, sugerindo que há um precursor na madeira de carvalho que pode ser convertido pelas bactérias (Bloem *et al.*, 2007; Bloem *et al.*, 2008).

Enzimas	Função
Proteases	<p>Atuam em proteínas do vinho e diferentes polipéptidos, libertando aminoácidos livres</p> <p>(Du Toit <i>et al.</i>, 2011)</p>
Esterases	<p>Diferentes estirpes bacterianas podem hidrolisar diferentes ésteres, formando diferentes ésteres etílicos</p> <p>(Sumby <i>et al.</i>, 2010; Malherbe <i>et al.</i>, 2012)</p>
Citrato liase	<p>Responsável pela libertação de ácido acético e oxaloacetato, no metabolismo do ácido cítrico</p> <p>(Du Toit <i>et al.</i>, 2011)</p>
Descarboxilases	<p>Algumas LAB possuem descarboxilases de ácidos fenólicos, capazes de metabolizar derivados de compostos 4-vinilfenol e 4- etilfenol</p> <p>(Cavin <i>et al.</i>, 1997)</p>
β-glucosidases	<p>Clivagem enzimática de ligações glicosídicas, como α-L-arabinosídeos</p> <p>(Boido <i>et al.</i>, 2002, Ugliano <i>et al.</i>, 2003; D’Incecco <i>et al.</i>, 2004)</p>

Metabolismo de Aminoácidos

Cisteína e metionina são metabolizados pelas bactérias formando diversos compostos sulfurados que podem ser divididos em leves e pesados

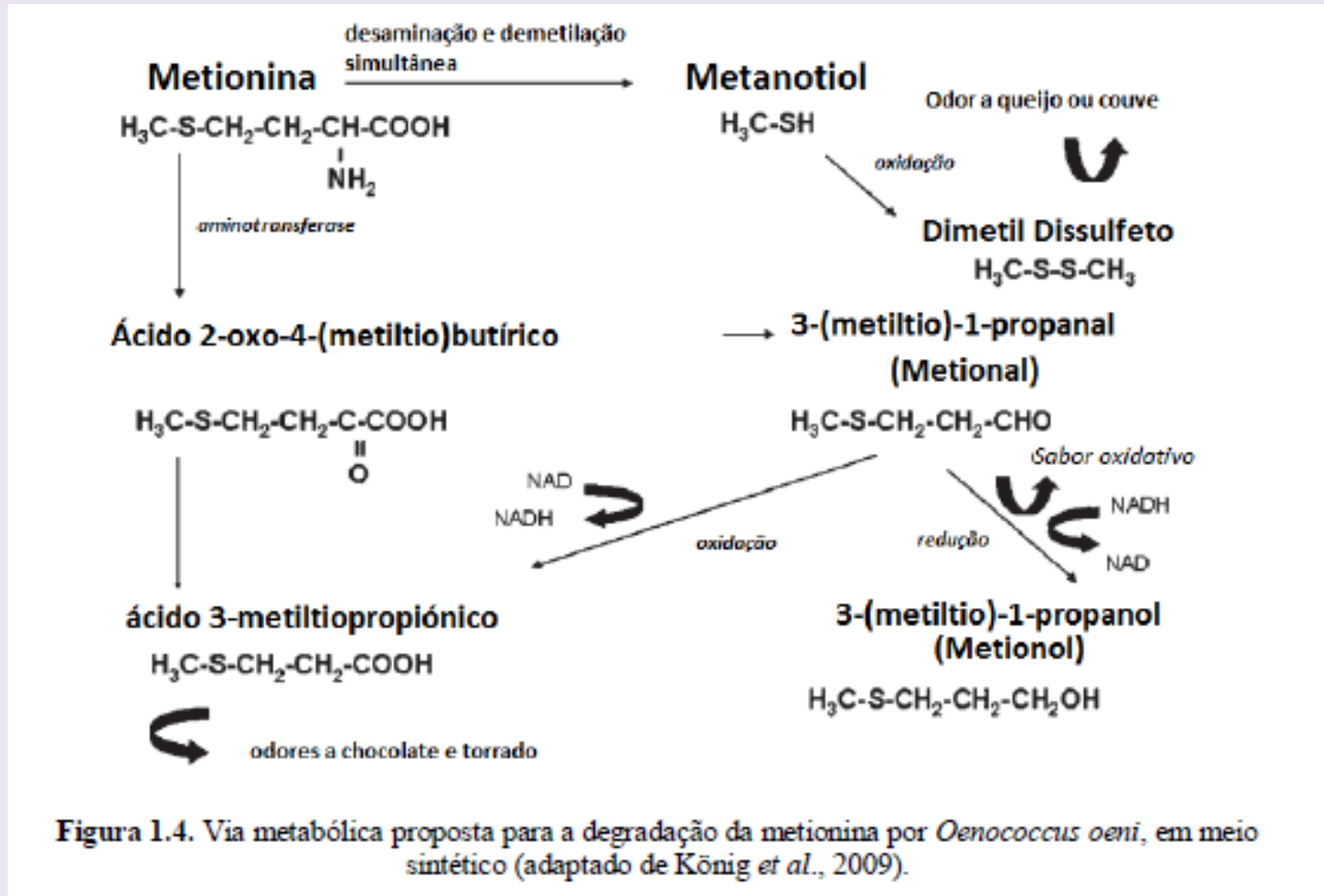


Figura 1.4. Via metabólica proposta para a degradação da metionina por *Oenococcus oeni*, em meio sintético (adaptado de König *et al.*, 2009).

Compostos	Aroma	Limite de percepção no vinho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração no vinho ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Metiltio-1-propanol (Metionol)	Batata, sopa, couve cozida, couve-flor	3200	140-5000
2-Mercaptoetanol	Aves, boxer, cheiro a quinta	100	0.13 – 18
4-Metiltio-1-butanol	Cebola, alho, terroso	600	0-181
2-(Metiltio) etanol	Feijão	640	0-139
3-Mercapto-1-propanol	Doce, batata, assado	Similar ao metionol	0-13.5
Propionato de 3-(metiltio) etilo	Sulfuroso ou metálico	1000	0-10
Acetato de <i>S</i> -tiometilo	Queijo, vegetais cozinhado	300 (em solução modelo)	0-10
Acetato de <i>S</i> -tioetilo	Repolho, queijo curado	60 (em solução modelo)	0-115
3-Mercapto-1-hexanol	Frutado, animal, maracujá	0.001 (em água)	0-56
Ácido 3-Metiltiopropiónico	Manteiga, rançoso	250	0-1811
Benzotiazole	Borracha	115	0-11
Dimetilsulfona	Inodoro	-	-
2-metiltetrahidrotiofen 3-ona	Metálico, gás natural	250	18.7-61.7

Quebra de Proteínas e Peptídeos

A fração peptídica de um vinho tinto foi estudada e percebeu-se que as LAB tem a capacidade de hidrolizar proteínas o que é interessante para os vinhos, Battonage.

Contribuições da fermentação malolática (organopelticamente)

Acidez

Aroma

Aumenta o aroma frutado e amanteigado

Reduz os aromas vegetais (grama)

Novos avanços na “fermentação malolática”

Utilização de culturas Starters

Melhor controle da fermentação

Tempo de Inoculação e co-inoculação

Durante o final da fermentação alcoólica

Após o término

Fermentação malolática em barricas / microoxigenação

O que é?

Como funciona?



BACTÉRIAS ACÉTICAS

Bactérias acéticas são bastante prevalentes na natureza e muito bem adaptadas a meios ricos em açúcar e álcool;

Vinhos, cervejas e sidras são os habitats naturais dessas bactérias quando a produção e o armazenamento não é corretamente controlado.

FERMENTAÇÃO ACÉTICA

- A fermentação acética corresponde à transformação DO ÁLCOOL EM ÁCIDO ACÉTICO POR DETERMINADAS BACTÉRIAS, conferindo o gosto característico de vinagre.
- As bactérias acéticas constituem um dos grupos de microrganismos de maior interesse econômico, pela sua função na produção do vinagre.

PRODUÇÃO DO VINAGRE

- FERMENTAÇÃO ACÉTICA:
- Produção de vinagre - Fermentação realizada por um conjunto de bactérias do gênero *Acetobacter* ou *Gluconobacter*, pertencentes à família ***Pseudomonaceae***.
- O ácido acético produzido por bactérias desse gênero é o composto principal do vinagre.



Acetobacter

Cette bactérie est à l'origine de la fermentation en acide acétique (vinaigre) de substances telles que les jus de fruits...

ntar

ndo
de

no em

Fatores de crescimento: exigências nutricionais - Gênero Acetobacter

- Vitaminas do complexo B: tiamina, ácido pantotênico e nicotínico.
- **Principais matérias/fonte** : água de maceração de milho, extrato de leveduras, malte ou extrato de malte.
- **Aminoácidos como fontes de nitrogênio**: de valina, cistina, histidina, alanina e isoleucina.

ACETOBACTER

- Bactéria em formas de bastonetes e cocos, formando correntes e filamentos.
- **Em relação à temperatura de crescimento:**
- Ideal - 25°C e 30°C,
- Mínima de 4°C a 5°C
- Máxima de 43°C.
- Temp inferiores a 15°C e superiores a 35°C tornam a fermentação acética muito lenta, pois reduzem a atividade bacteriana.

Teor alcoólico do vinho

- O teor alcoólico do vinho varia entre 8% v/v e 10% v/v – **máximo 12% v/v de álcool.**
 - A acetificação de vinhos com graduação alcoólica **muito elevada torna o processo lento e difícil é tóxica as bactérias.**
 - O teor alcoólico muito elevado - pode causar parada do processo de acetificação devido à ação inibidora do álcool ou do próprio ácido acético presente.
- A utilização de vinhos com teor alcoólico BAIXO (inferior a 4% v/v) origina vinagre fracos de baixa acidez e pouca qualidade sensorial, e favorecem a contaminação (POR QUAL MI) além de apresentar custo elevado de produção.

DEFINIÇÃO – Vinagre

- **De acordo com a LEGISLAÇÃO BRASILEIRA –**
- Vinagre ou vinagre de vinho como o produto obtido da fermentação acética do vinho, com um mínimo de:
- 40g de ácido acético/L (ou 4% ou 4g/100 mL), não exceder 1% em volume de etanol e ser pasteurizado.
- Vinagre é um líquido azedo e adstringente usado como condimento e conservante;
- Pode ser produzido usando vários tipos de matérias-primas;

AS BACTÉRIAS UTILIZADAS DEVEM APRESENTAR AS SEGUINTE QUALIDADES INDUSTRIAIS:

- Produzir concentração elevada de ácido acético.
- Não formar material viscoso ou gelatinoso
- Tolerar altas concentrações de etanol
- Tolerar altas concentrações de ácido acético
- Ser resistente a temperatura entre 25 e 30°C

A produção de um bom vinagre depende :

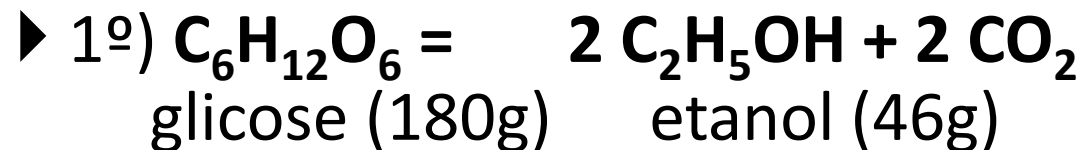
- Linhagem e a seleção do microrganismo;
- Quantidade de O₂;
- Temperatura de fermentação (na faixa de 20° a 30°C);
- O pH ótimo - 5 e 6;
- Maturação e a conservação;
- Clarificação, o envase, pasteurização;
- Outros

O processo de obtenção do vinagre ocorre em duas etapas:

1) ETAPA –FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

- ▶ Inicialmente, o suco de frutas (UVA, Maça, etc.) passa pela ação das leveduras normalmente presentes na matéria prima ou para se obter aroma mais agradável no vinagre, é aconselhável a utilização de leveduras puras de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fermentação Alcoólica



FERMENTAÇÃO BACTERIANA (aeróbia).

- A segunda parte do processo é aeróbico, realizada pelas bactérias, microflora mista de *Acetobacter*, que transforma o etanol em ácido acético.
- **Fermentação Acética**
- 2º)
$$2 \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2 \text{O}_2 = 2 \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O}$$

etanol (32g) ácido acético (60g)

Produção vinagre – Lento (Orleans)

Realiza-se em barricas de 200 litros com orifícios, na tampa, fechados por tela fina. Os tanques tem um terço de seu volume com vinagre de boa qualidade.

- ▶ 60 litros de vinagre não pasteurizado +
- ▶ 15 litros de vinho.
- ▶ Semanalmente, adiciona-se 15 litros de vinho.
- ▶ Após a quinta semana, quando 2/3 do barril estiverem preenchidos, retira-se 15 litros de vinagre e adiciona-se 15 litros de vinho.
- ▶ Se o vinagre apresentar mais de 1% de etanol, deve-se esperar mais tempo para a retirada.

Sem ruptura da película sobre o líquido ou movimento de partículas decantadas

A Figura 2.1 esquematiza os recipientes utilizados para a obtenção de vinagre de vinho por esse processo.

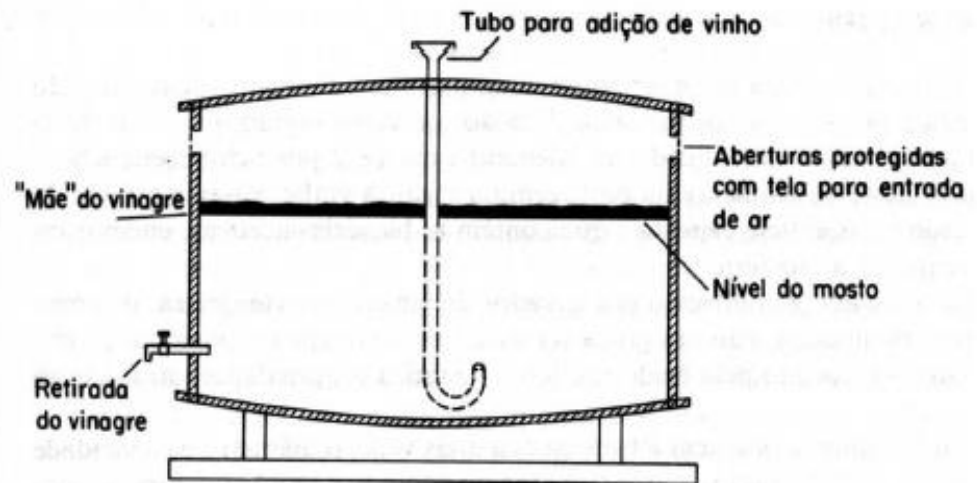


Figura 2.1 - Recipiente usado no processo de Orleans para a produção de vinagre

(AQUARONE *et al.*, 2001).

VANTAGENS E DESVANTAGENS

Vantagem

- Obtenção de um produto de boa qualidade
- Dispensa clarificação e filtração

- **Desvantagem**

- Baixa produtividade,
- Ocupa muito espaço
- Inviável economicamente e é usado somente na produção doméstica de vinagre.

Processos Rápidos- Alemão

Equipamento consiste de 3 câmaras

▶ CÂMARA SUPERIOR

▶ Função: Distribuir uniformemente a mistura (vinho + vinagre) em acetificação sobre o material enchimento.

▶ **CÂMARA INTERMEDIÁRIA** – local onde fica o material de enchimento + bactérias acéticas - As bactérias acéticas colonizam a superfície do material e oxidam etanol a ácido acético.

▶ **CÂMARA INFERIOR** – Deposito de líquido parcialmente acetificado onde é recirculado para a câmara superior a fim de completado a sua acetificação ou quando totalmente acetificado e retira.

Figura 2.2 mostra o gerador utilizado para a produção de vinagre.

Material de enchimento:

Bagaço de cana, sabugo de milho, tiras de madeira, bagaço de uva, carvão vegetal, cerâmica em pedaços, vime, plástico, isopor

Tpvida=12 meses –
material gelatinoso –
obstrução da passagem da mistura

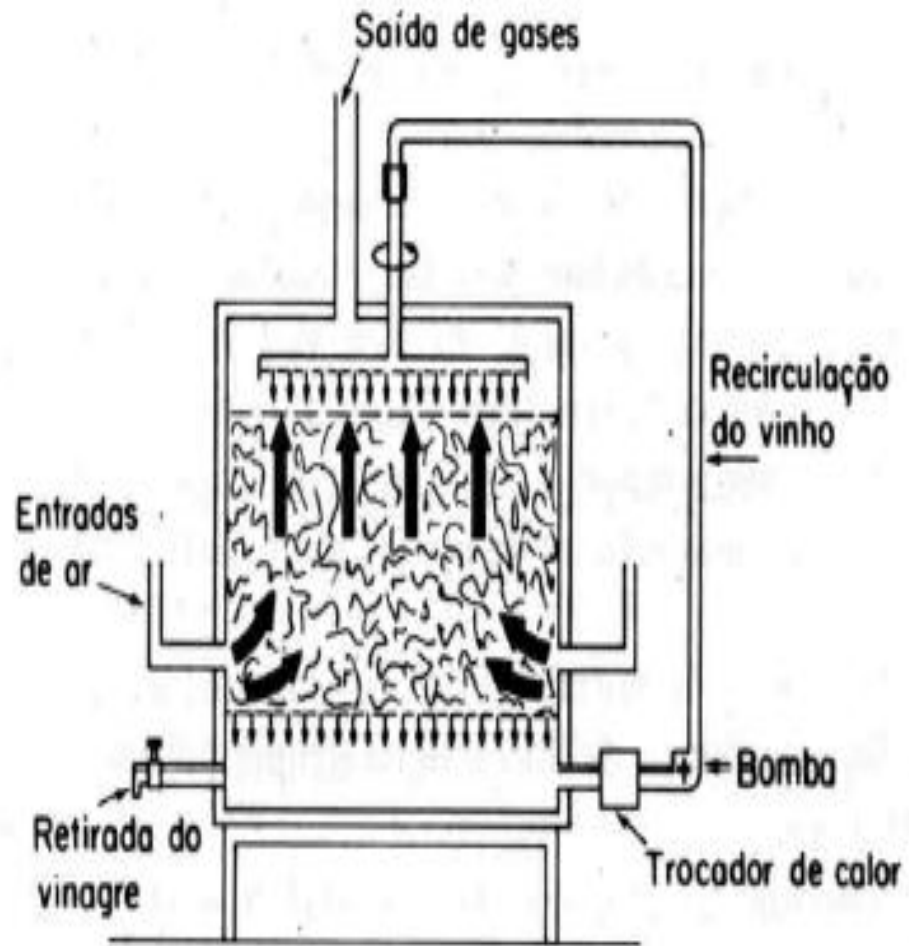


Figura 2.2 - Gerador para a produção de vinagre com recheio (AQUARONE *et al.*, 2001).

PROCESSOS DE FINALIZAÇÃO ENVELHECIMENTO

- O vinagre é estocado em tanques, completamente cheios, para se evitar a aeração do produto.
- De acordo com a matéria-prima utilizada, vinho ou suco de frutas, o vinagre deve ser envelhecido por um tempo superior há um ano.
- Durante esse tempo, ocorrem reações de esterificação, responsáveis pelo desenvolvimento de aromas agradáveis.

EMBALAGEM

- O vinagre deve ser embalado em material resistente que não sofra corrosão e que não transmita cor ou odores desagradáveis ao produto.
- Após o engarrafamento, é feita uma pasteurização a 60-66°C, durante 30 min. Pode-se fazer a pasteurização contínua e embalar subsequentemente.

APLICAÇÃO E RENDIMENTO

Rendimento - Industrialmente para cada 1 g de etanol, a produção de 1 g de ácido acético.

- ▶ Como condimento em saladas (vinagre)
- ▶ Como solvente
- ▶ Síntese de perfumes e corantes
- ▶ Neutralização de filmes e papéis fotográficos
- ▶ Tinturaria
- ▶ Obtenção de sais metálicos para a fabricação de tintas e inseticidas.
- ▶ Produção da aspirina.

O SO₂ em Vinificação

José Carvalheira - EVB

Resumo da apresentação:

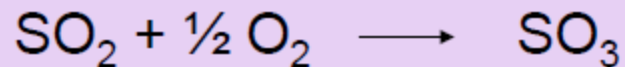
1. Origem da utilização do SO₂
2. Propriedades do SO₂
3. Efeitos fisiológicos
4. Estados em que o SO₂ se pode encontrar
5. Moléculas que combinam o SO₂ nos mostos/vinhos
6. Propriedades benéficas do SO₂ na vinificação
7. Doses de utilização em vinificação
8. Formas de utilização do SO₂ em vinificação
9. Limites legais da presença deste composto nos vinhos
10. Produtos que complementam a acção do SO₂ em vinificação

1. Origem da utilização do SO₂:

- ⇒ Iniciou-se o uso generalizado do “anidrido sulfuroso”, na conservação dos vinhos, em finais do séc. XVIII, devido ao reconhecimento das suas propriedades
- ⇒ Na vinificação, esse início remonta apenas ao começo do séc. XX, com o objectivo fundamental de evitar a casse oxidásica. Tendo posteriormente, sido reconhecidas as suas propriedades antissépticas.

2. Propriedades do SO₂:

⇒ Antioxidante – combina o oxigénio dissolvido no meio



Reacção lenta, com efeitos práticos nos vinhos (oxidação química), mas sem efeitos para a oxidação dos mostos, que é rápida, de natureza oxidásica.

⇒ Antioxidásico – inibe as enzimas oxidásicas presentes nos mostos (tirosinase e, lacase de *Botrytis cinerea*), protegendo-os da oxidação a que estão fortemente sujeitos antes do início da F.A.

2. Propriedades do SO₂ (Continuação):

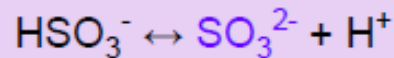
- ⇒ Melhorador gustativo dos vinhos – combinando o etanal e compostos similares, faz desaparecer os aromas de oxidação (arejado), melhorando a qualidade e limpeza do aroma
- ⇒ Antisséptico – inibe o desenvolvimento de microorganismos, possuindo uma mais forte actividade **anti-bacteriana** que **anti-levuriana**. Na vinificação, esta propriedade é de extrema importância, porque permite que a população de leveduras tenha forte preponderância sobre a de bactérias, evitando por exemplo que a F.A. e a F.M.L. não ocorram simultaneamente, enquanto restarem açúcares no meio.

3. Efeitos fisiológicos – a utilização deste composto pode levantar questões de ordem higiénica

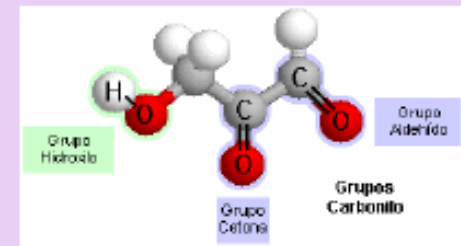
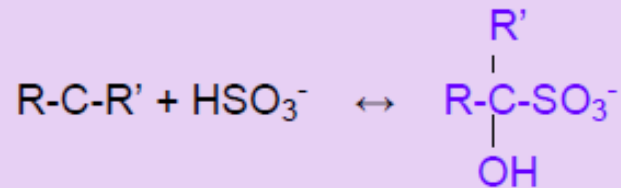
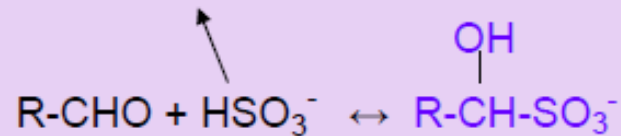
- ⇒ Toxicidade associada à destruição da vitamina B1 (Tiamina)
- ⇒ DMST (Rato) – 72 mg/kg → DDA (OMS) – 0,7 mg/Kg
0,5 L vinho com 100 mg/L SO₂ (70 Kg)
- ⇒ Reacções alérgicas, em doses baixas, nos asmáticos, levaram a FDA a obrigar que fosse mencionada na rotulagem dos vinhos a sua presença: “Contém sulfitos” (Teor > 10 mg/L), que mais recentemente é também de uso obrigatório na UE
- ⇒ Peritos do OIV estudam possibilidade dos teores limite serem reduzidos em 10 mg/L, para os vinhos comuns
- ⇒ Para os aplicadores é altamente perigosa uma concentração de 1000-1300 mg/m³ instantaneamente ou 270 mg/m³ durante ≥ 60 minutos

4. Estados em que o SO₂ se pode encontrar

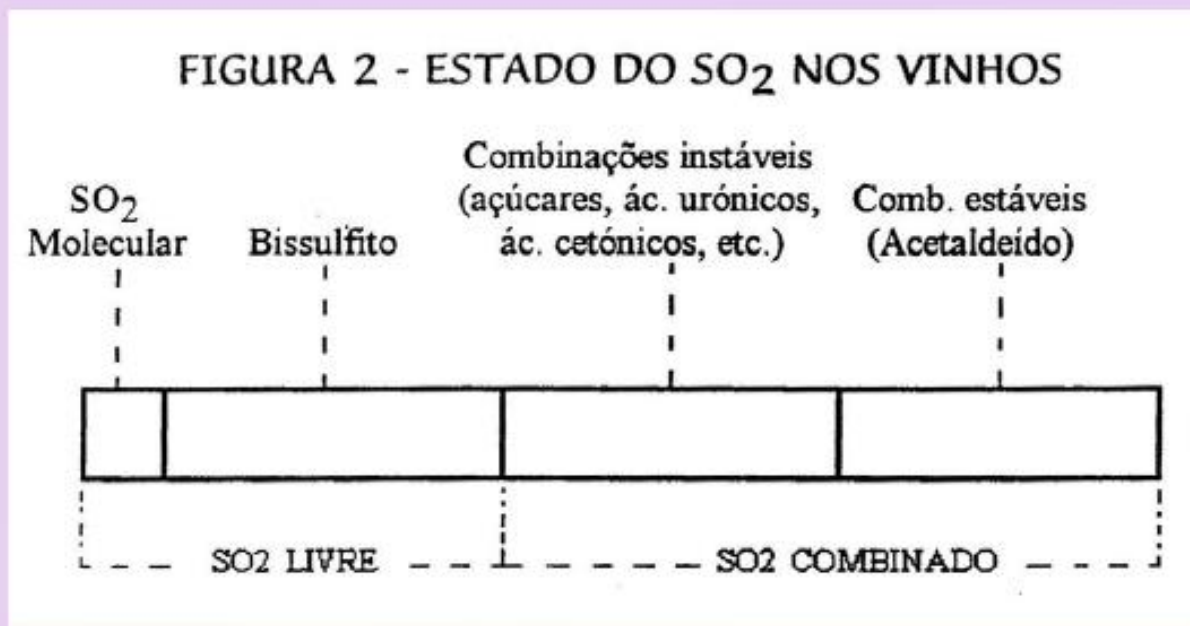
⇒ SO₂ LIVRE : SO₂ Molecular, HSO₃⁻, SO₃²⁻



⇒ SO₂ COMBINADO: COMBINA-SE C/ MOLÉCULAS COM CARBONILOS



4. Estados em que o SO_2 se pode encontrar (Cont.)
⇒ SO_2 LIVRE e SO_2 COMBINADO



4. Estados em que o SO_2 se pode encontrar (Cont.)

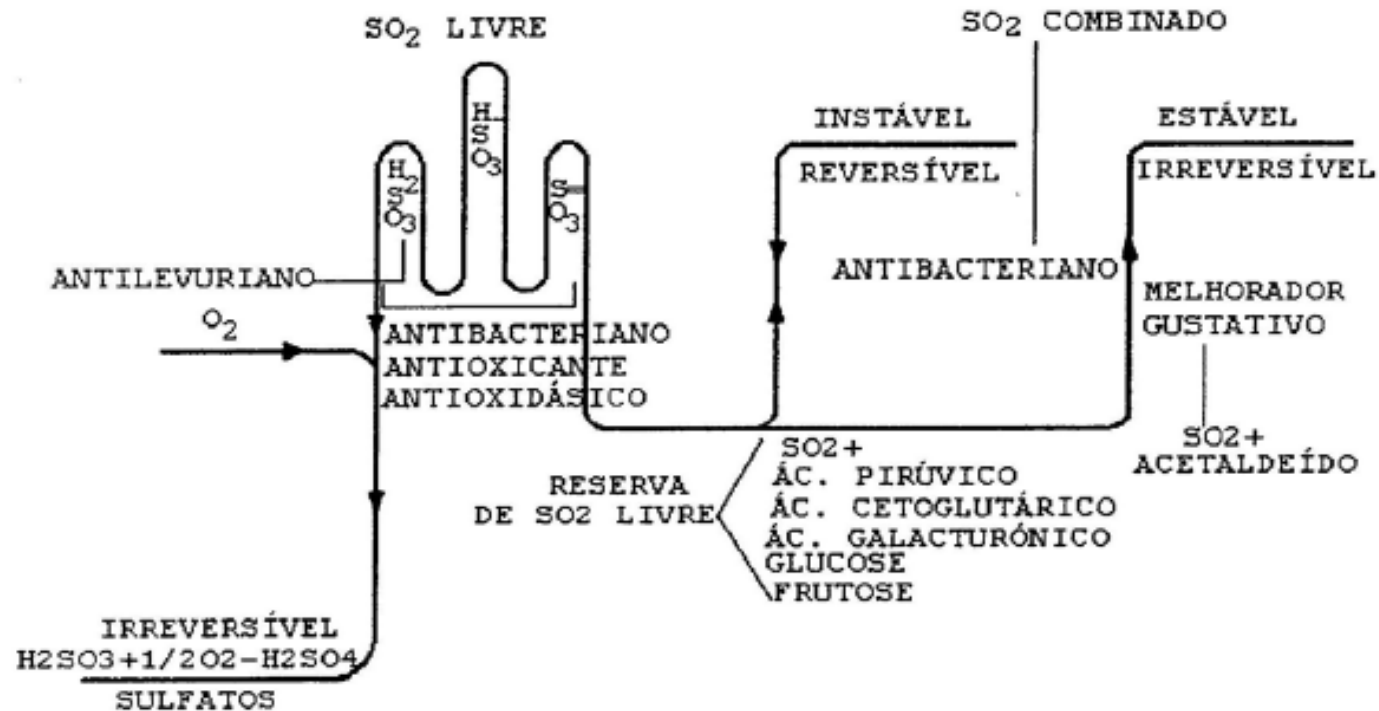
$$\text{SO}_2 \text{ LIVRE} + \text{SO}_2 \text{ COMBINADO} = \text{SO}_2 \text{ TOTAL}$$

⇒ OS LIMITES LEGAIS EXISTENTES, RESPEITANTES À PRESENÇA DESTE COMPOSTO NOS MOSTOS/VINHOS DIZ RESPEITO EXCLUSIVAMENTE AO

SO_2 TOTAL

Propriedades das diferentes formas do SO₂

FIGURA 1 - ESQUEMA DE ACTIVIDADE DO SO₂



Percentagem do SO₂ Livre no estado molecular em função do pH

QUADRO 1

pH	SO ₂ Molecular	HSO ₃ ⁻
3.0	6.06	93.92
3.2	3.91	96.07
3.4	2.51	97.46
3.6	1.60	98.36
3.8	1.01	98.91
4.0	0.64	99.24
4.2	0.41	99.42
4.4	0.26	99.55

5. Moléculas que combinam o SO₂ nos mostos/vinhos

⇒ Etanal (Acetaldeído)

EPC

⇒ Ácidos cetónicos: ácido pirúvico e ácido α-cetoglutárico (pode diminuir-se a formação destes compostos pela adição de tiamina – 0,5 mg/L)

MPC

⇒ Açúcares e seus derivados: Arabinose, glucose, xilose 5-cetofrutose e, ácidos 2-ceto-glucónico e 2,5-diceto-glucónico

BPC

MPC

⇒ Moléculas dicarboniladas: Glioxal, metilglioxal e hidroxipropanedial. Concentrações mais elevadas em uvas atacadas de podridão cinzenta

EPC

⇒ Ácido glucónico, galacturónico, glioxílico, oxalacético

BPC/MPC

⇒ Antocianas (Descoloração dos mostos após sulfitação)

EPC

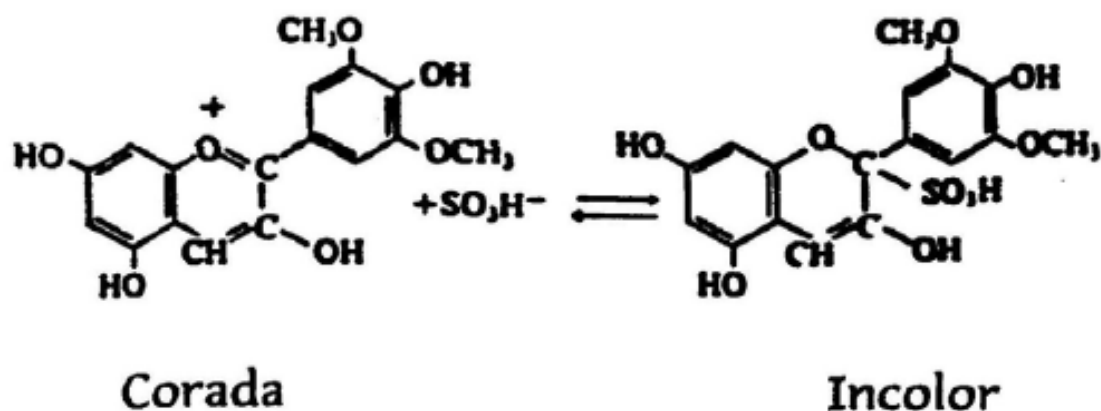
EPC – Elevado poder de combinação

MPC – Médio poder de combinação

BPC – Baixo poder de combinação

5. Reacção de combinação das antocianinas pelo SO_2

Acção do SO_2 sobre as antocianinas:



- A sulfitação provoca uma descoloração do mosto. Após o desaparecimento do HSO_3^- por oxidação, restabelece-se a coloração.

6. Propriedades benéficas do SO₂ na vinificação

- ⇒ Antioxidante/Consumidor de oxigénio – Esta propriedade é pouco importante na vinificação. A oxidação do mosto é sobretudo devida à actividade enzimática.
- ⇒ Antioxidásico – Porventura a razão do início da sua utilização na vinificação. Inibe as enzimas tirosinase e lacase segregada pela *Botrytis cinerea* (mais activa e estável), permitindo assim elaborar vinhos tintos com maior IC e IPT
- ⇒ Inibição de leveduras – inicial e transitória, pode ser favorável, pois origina um arrefecimento e logo uma cinética de fermentação menos tumultuosa. Na vinificação em branco, possibilita a sedimentação das partículas em suspensão

6. Propriedades benéficas do SO₂ na vinificação (Cont.)

- ⇒ Activação de leveduras – Em doses moderadas, embora atrase o arranque da fermentação, permite acabamentos mais completos, talvez devido à destruição de substâncias antifúngicas ou ao aumento da actividade proteásica (maior disponibilidade de aminoácidos)
- ⇒ Selecção de leveduras – A sulfitação permite a eliminação das leveduras menos resistentes a este composto e, que originariam vinhos menos finos e de menor TAVA (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*), prevalecendo as mais resistentes e de melhor qualidade (*Saccharomyces*)
- ⇒ Selecção entre leveduras e bactérias – O SO₂ atrasa mas não impede a fermentação alcoólica (leveduras), mas as bactérias existentes na uva são senão inactivadas, pelo menos fortemente paralisadas. Benéfico no caso de bactérias indesejáveis, mas discutível no caso das bactérias lácticas. A dose de SO₂ a aplicar nos mostos tintos não deve, pois, ser demasiado elevada, que impeça a FML

6. Propriedades benéficas do SO₂ na vinificação (Cont.)

- ⇒ Favorecimento da dissolução de compostos da película – A destruição das células de película pelo SO₂, favorece a libertação dos compostos fenólicos, em particular das antocianinas, particularmente no caso de macerações curtas, ou no caso de macerações sulfíticas
- ⇒ Melhorador do aroma dos vinhos novos – protegendo o aroma dos vinhos novos, minimizando a revelação de aromas defeituosos no caso de vinhos elaborados de uvas atacadas de podridão

Inconvenientes:

- ⇒ Odor e sabor desagradáveis – no caso de doses demasiado elevadas ou formação de H₂S ou mercaptanos, por permanência sobre borras muito longa
- ⇒ Bloquear ou atrasar a FML em vinhos tintos

7. Doses de utilização em vinificação (valores indicativos)

Vinificação em tinto	mg SO ₂ /L mosto
Uvas sãs, acidez elevada	50-60
Uvas sãs, acidez baixa	60-80
Uvas com podridão	80-100
Vinificação em branco	
Uvas sãs, acidez elevada	50-60
Uvas sãs, acidez baixa	60-90
Uvas com podridão	90-120

8. Formas de utilização do SO_2 em vinificação

- ⇒ Soluções sulfurosas a 6% de SO_2 (contem 6 g de SO_2 / 100 mL solução) – preparadas borbulhando o gás SO_2 na água. A sua concentração é verificada por densimetria ou quimicamente. Perdem concentração em contacto com o ar. (Sol. 6% - $d_{15^\circ\text{C}} = 1032,8$)
- ⇒ Soluções de Bissulfito de potássio a 15% de SO_2 – utilizadas mais recentemente devido ao facto de possuírem um odor pouco sufocante, comparativamente às anteriores
- ⇒ Metabissulfito de potássio (Pirossulfito de potássio – $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) – em termos práticos origina 50 % do seu peso em SO_2 . Pode usar-se quer em pó (diluído previamente em água), quer preparando soluções a 10 % de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, ou seja, doseando 5 % de SO_2

9. Limites legais da presença deste composto nos vinhos

⇒ Vinhos Brancos e rosados com teor de açúcares < 5 g/L

210 mg SO₂/L

⇒ Vinhos Brancos e rosados com teor de açúcares > 5 g/L

260 mg SO₂/L

⇒ Vinhos Tintos com teor de açúcares < 5 g/L

160 mg SO₂/L

⇒ Vinhos Tintos com teor de açúcares > 5 g/L

210 mg SO₂/L

❖ Estes limites aplicam-se aos vinhos comuns, existem exceções em determinadas regiões vitícolas mundiais, por exemplo nas produtoras de vinhos doces naturais

10. Produtos que complementam a acção do SO₂ em vinificação

- ⇒ Ácido ascórbico/Vitamina C – a sua utilização em vinificação em branco, nalguns países, conjuntamente com o metabissulfito de potássio (SO₂), tem por objectivo limitar as oxidações catalisadas pelas enzimas lacase e tirosinase

- ⇒ Gelo Seco e Neve carbónica – Utilizados quer para o arrefecimento de mostos/massas vínicas, quer para protegê-los de oxidações

- ⇒ Ácidos gordos de cadeia curta (decanóico e octanóico) – estes compostos possuem uma acção anti-levuriana importante, comprovada pela sua intervenção nas dificuldades de final de fermentação. Assim, podem ter um papel importante no amuo de vinhos doces.

11. Evolução no tempo do SO_2 adicionado ao mosto

- ⇒ Perdas durante a fermentação por: evaporação e oxidação (sulfatos)
- ⇒ No final da fermentação alcoólica, restam 50 a 70 % do SO_2 adicionado, dependendo da temperatura e da velocidade da fermentação
- ⇒ No final da FML, não restam mais de 40 a 50 % do SO_2 adicionado ao mosto
- ⇒ Após a FA ou a FML, os vinhos devem receber nova adição de SO_2 , com o objectivo de os proteger de oxidações químicas ou enzimáticas, para se evitarem desenvolvimentos microbianos e para se mascarar o etanal.

12. Exemplo de sulfitações em esquema de vinificação clássica

