

# TECNOLOGIA DOS VINHOS I VINIFICAÇÃO

## MICROBIOLOGIA E BIOQUÍMICA DAS FERMENTAÇÕES (FUNDAMENTOS)



• António M. Jordão

LICENCIATURA EM ENGENHARIA AGRONÓMICA  
CURSO TESP EM VITICULTURA E ENOLOGIA



## Caraterização da microflora dos mostos:

- Constituída por leveduras, algumas espécies de bactérias acéticas e por bactérias lácticas.

Fundamento do processo da fermentação alcoólica:



## Caraterização da microflora dos mostos:

- **Leveduras:** microrganismos unicelulares responsáveis pela fermentação alcoólica, sendo organismos eucariotas e encontrando-se na película do bago de uva.

- Constituídas por água (75%),  
matéria seca (25%)

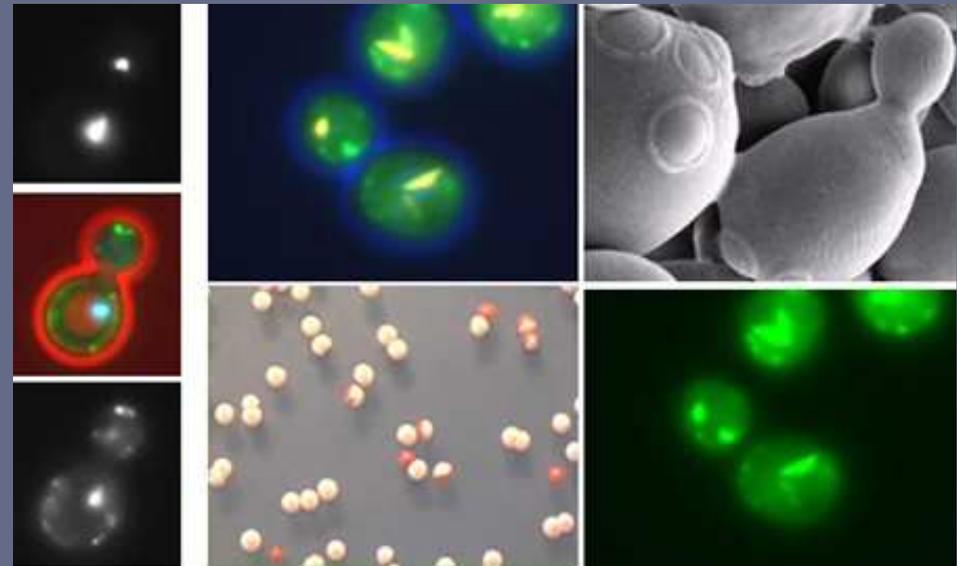


Glúcidos (25---40%)

Prótidos (2---5%)

Lípidos (2---5%)

Matérias minerais (3---40%)



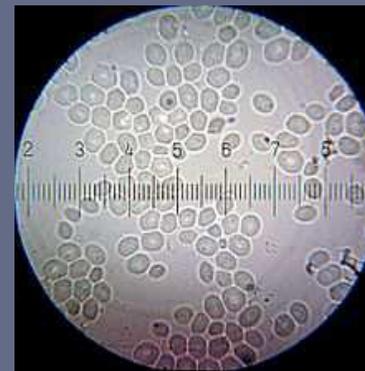
## Caraterização da microflora dos mostos:

Current species name	Original name
<i>Saccharomyces bayanus</i>	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	-
<i>Saccharomyces pastorianus</i> var. <i>pastorianus</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	-
<i>Saccharomycopsis vini</i>	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> var. <i>pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Saccharomyces delbrueckii</i>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	-
<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	<i>Torulopsis domercqii</i>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Hansenula anomala</i>
<i>Zigoascus hellenicus</i>	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> var. <i>bailii</i>	<i>Saccharomyces bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	<i>Saccharomyces bisporus</i>

Zanol et al. (2010)

## Caraterização da microflora dos mostos:

- De acordo com a seletividade das leveduras para fermentarem a glucose e a frutose, distinguem-se 3 categorias de leveduras:
  - Leveduras glucofílicas (maioria do género *Saccharomyces*);
  - Leveduras frutófilas;
  - leveduras com capacidade de fermentar os 2 açúcares a velocidades Idênticas.



## Caraterização da microflora dos mostos:

- Características importantes das leveduras do ponto de vista tecnológico:
  - Poder alcoogénico;
  - Produtos secundários produzidos durante a fermentação;
  - Necessidades em fatores de crescimento;
  - Influência da temperatura;
  - Resistência ao sulfuroso.



## Caraterização da microflora dos mostos:

- Poder alcoogénico
  - Consiste no teor alcoólico máximo obtido pela levedura num mosto suficientemente rico em açúcar.
  - No geral, pretende-se leveduras com elevado poder alcoogénico e baixo nível de produção de produtos secundários (ex: ácido acético, ácido succínico).
  - Teoricamente considera-se que são necessários 15.53 g açúcar por litro de mosto para se formar 1% de álcool.

## Caraterização da microflora dos mostos:

- Produtos secundários produzidos durante a fermentação
  - Na prática, é necessário cerca de 17.0 g açúcar por litro de mosto para se formar 1% de álcool.
  - Na realidade
    - Açúcar -----> **ETANOL**
      - > Utilização na respiração
      - > Nutrição das leveduras
      - > Multiplicação das leveduras
      - > Produção de produtos secundários
      - > Atividade de outros microrganismos

## Caraterização da microflora dos mostos:

- Necessidades em fatores de crescimento
  - Leveduras prototróficas, apresentam a capacidade de se desenvolverem em meios privados de fatores de crescimento.
  - Leveduras auxotróficas, apresentam a incapacidade de se multiplicarem em meios sem fatores de crescimento.
- Influência da temperatura
  - O género *Saccharomyces*, apresentam capacidade alcoogénica máxima a 17°C (a 4°C fermentam cerca de 75% do total de açúcar).

## Caraterização da microflora dos mostos:

- Influência da temperatura
  - Leveduras com temperatura ótima de 25°C, caso das *Sacch. Bailli*.
  - As leveduras para valores entre 30 e 38°C apresentam ainda alguma atividade, enquanto que para valores entre 4 e 13°C, ocorre alguma dificuldade em efetuarem o processo de fermentação.
  - As leveduras *Bretanomyces*, apresentam uma fase de latência a 25°C durante 8 a 10 dias e de 2 a 3 dias a 35°C, sendo no entanto consideradas leveduras de contaminação.

## Caraterização da microflora dos mostos:

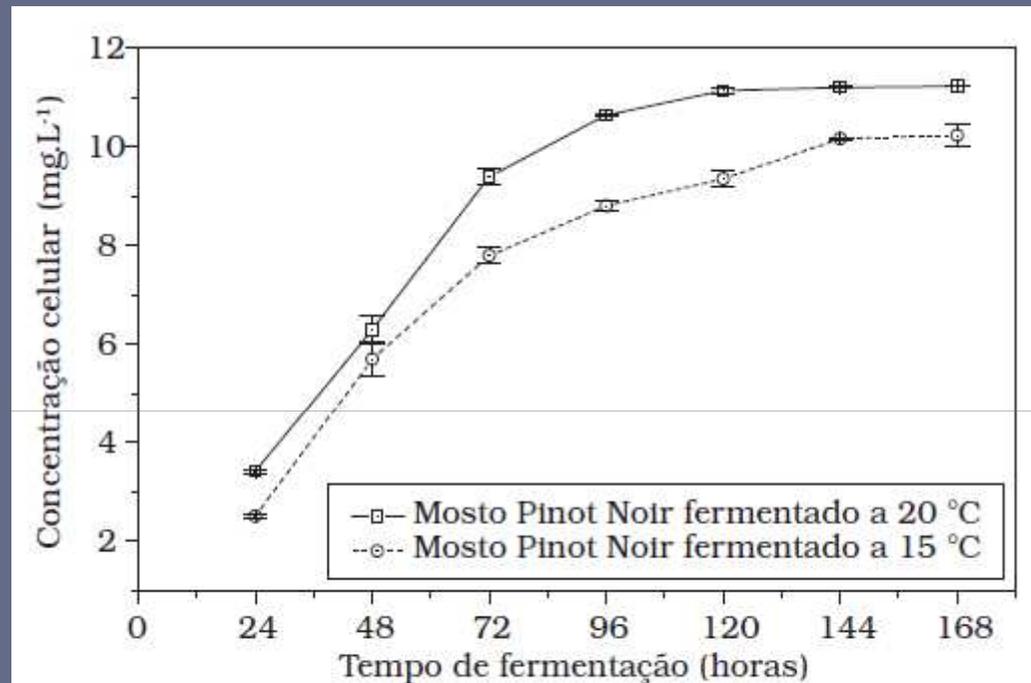
**Tabela 1.** Valores das médias da concentração dos compostos majoritários produzidos durante a fermentação de mostos.

Amostra	Concentração dos compostos majoritários						
	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Acetato de etila (mg.L <sup>-1</sup> )	Acetato de isoamila (mg.L <sup>-1</sup> )	Acetaldeído (mg.L <sup>-1</sup> )	1-Propanol (mg.L <sup>-1</sup> )	Isobutanol (mg.L <sup>-1</sup> )	Álcool isoamílico (mg.L <sup>-1</sup> )
1	31,5 <sup>a</sup>	286,0 <sup>a</sup>	30,6 <sup>a</sup>	67,8 <sup>a</sup>	10,2 <sup>a</sup>	30,7 <sup>ad</sup>	96,0 <sup>a</sup>
2	32,5 <sup>a</sup>	270,0 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>	42,7 <sup>b</sup>	10,8 <sup>a</sup>	33,7 <sup>b</sup>	98,0 <sup>a</sup>
3	24,7 <sup>b</sup>	131,3 <sup>b</sup>	27,3 <sup>b</sup>	32,3 <sup>c</sup>	8,0 <sup>a</sup>	25,7 <sup>cd</sup>	97,3 <sup>a</sup>
4	25,0 <sup>b</sup>	147,0 <sup>b</sup>	28,0 <sup>b</sup>	35,3 <sup>bc</sup>	8,3 <sup>a</sup>	27,3 <sup>acd</sup>	79,7 <sup>b</sup>

Amostras: 1) Mosto P. Noir fermentado por *P. membranaefaciens* a 20 °C; 2) Mosto Chardonnay fermentado por *P. membranaefaciens* a 20 °C; 3) Mosto P. Noir fermentado por *P. membranaefaciens* a 15 °C; e 4) Mosto Chardonnay fermentado por *P. membranaefaciens* a 15 °C. Médias marcadas com letras iguais não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Mamede & Pastore (2007)

## Caraterização da microflora dos mostos:



**Figura 2.** Concentração celular expressa em massa seca, da fermentação pela *Pichia membranaefactens* em mosto Pinot Noir.

Mamede & Pastore (2007)

## Caraterização da microflora dos mostos:

- Resistência ao sulfuroso
  - Podemos considerar a existência de 3 categoriais de leveduras, as sensíveis, média resistência e as resistentes.
  - leveduras sensíveis, não se desenvolvem para doses de  $\text{SO}_2$  superiores a 100 – 150 mg/L (*Sacch. Rosei* e *Hanseniaspora*).
  - Leveduras de média resistência, desenvolvem-se em meios com doses de  $\text{SO}_2$  entre 100 e 150 mg/L (*Sacch. Ellipsoideus*).
  - Leveduras resistentes, desenvolvem-se em meios com doses de  $\text{SO}_2$  superiores a 250 mg/L (*Sacch. Oviformis*, *Sacch. Bailli*).

## Caraterização da microflora dos mostos:

- Leveduras de alteração

Existem algumas leveduras que apresentam uma atividade negativa, nomeadamente nos vinhos, dando origem a doenças como seja a flor e a refermentação.

**Flor** – desenvolvimento em condições de aerobiose de leveduras do género, *Cândida*, *Pichia* e *Hansenula*.

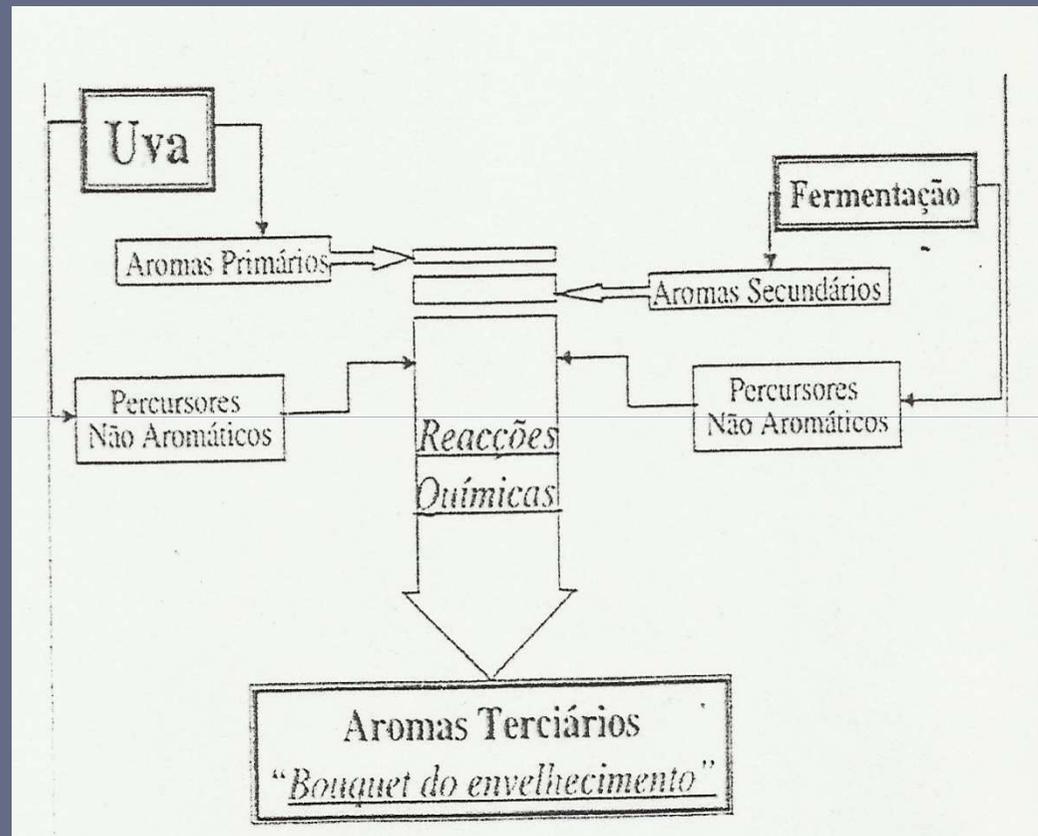
**Refermentação** – Após a fermentação alcoólica terminar, causando a turvação do vinho. Exemplos: *Brettanomyces*, *Zigosacharomyces bailli*, *Toruslapora delbruekii* e *Dekkera*.

## Caraterização da microflora dos mostos:

- Metabolismo das leveduras e a produção de aromas
  - De acordo com a origem, temos no vinho:
    - **Aromas primários** - provenientes das uvas.
    - **Aromas secundários** - provenientes dos produtos formados durante a fermentação pela ação nomeadamente das leveduras e bactérias.
    - **Aromas terciários ou bouquet** - formados durante a conservação e envelhecimento dos vinhos.

## Caraterização da microflora dos mostos:

### Origem dos aromas nos vinhos



## Caraterização da microflora dos mostos:

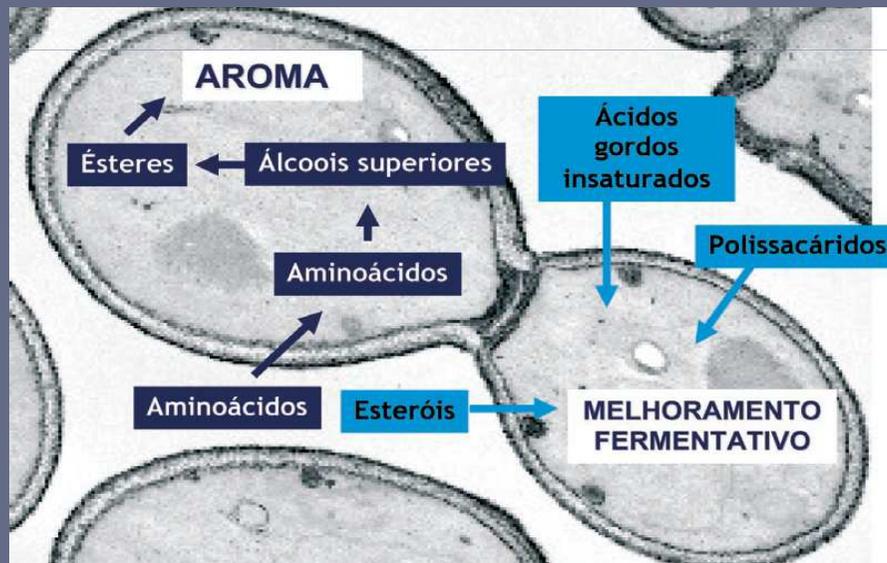
### • *Aromas primários*

- Podem manter-se durante o processo de vinificação ou então sofrer alterações, podendo mesmo correr uma tendência em alguns casos, para o seu desaparecimento nos vinhos.
- Alguns aspetos a considerar que podem contribuir para alterações: técnica de vinificação, condições de fermentação, utilização de diversos produtos enológicos, etc.

## Caraterização da microflora dos mostos:

- *Aromas secundários*

- A fermentação ao ocorrer com valores de pH  $\pm$  3.4 e a temperaturas próximas de 20°C, permite a formação pelas leveduras de um elevado número de compostos de carácter aromático.



Esquema do processo de síntese de ésteres pela *Saccharomyces cerevisiae*

## Caraterização da microflora dos mostos:

- *Aromas secundários*

- A Para estimular a produção de compostos voláteis durante a fermentação, existem alguns aspetos importantes a controlar:

- Controle da acidez do mosto;
- Temperatura de fermentação;
- Tipo de levedura usada;
- Tecnologia de vinificação;
- Produtos enológicos usados.

- Exemplos de compostos voláteis resultantes da atividade microbiana: álcoois superiores, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, etc.

## Caraterização da microflora dos mostos:

- *Aromas secundários*

- A Para estimular a produção de compostos voláteis durante a fermentação, existem alguns aspetos importantes a controlar:

- Controle da acidez do mosto;
- Temperatura de fermentação;
- Tipo de levedura usada;
- Tecnologia de vinificação;
- Produtos enológicos usados.

- Exemplos de compostos voláteis resultantes da atividade microbiana: álcoois superiores, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, etc.

## Caraterização da microflora dos mostos:

- *Aromas secundários*

- A formação de uma maior quantidade de ésteres pode ser conseguida com a fermentação a baixas temperaturas, maximizando o metabolismo secundário das leveduras.

- Acetato de hexilo: mostos ácidos e baixos níveis de  $\text{SO}_2$  livre.
- Lactato de etilo: mostos ácidos e baixas temperaturas.
- Acetato isoamilo: resultante da fermentação alcoólica.
- Diacetil: composto resultante da fermentação maloláctica.

## Caraterização da microflora dos mostos:

### Aromas secundários



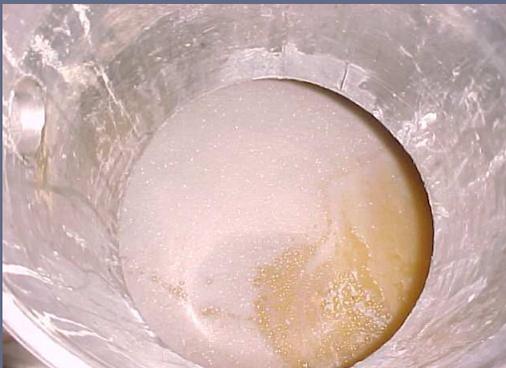
**TABELA 2.** Composição de voláteis das amostras de mostos após 168 horas de fermentação tanto a 20°C quanto a 15°C.

Compostos voláteis detectados	Amostra
1) Etanol	1 e 2
2) 1-Hexenol	3 e 4
3) Isobutanol	1, 2, 3 e 4
4) Álcool isoamílico	1, 2, 3 e 4
5) 1-Propanol	1, 2, 3 e 4
6) Butanol	4
7) Acetato de etila	1, 2, 3 e 4
8) Acetato de metila	1 e 2
9) Acetato de propila	1
10) Acetato de isopropila	2
11) Acetato de isoamila	1, 2, 3 e 4
12) Propionato de etila	1
13) Butirato de etila	3
14) Butil isobutirato	3
15) 3-Hidroxi-2-butanona	2
16) n-propanal	2, 3 e 4
17) 1-Butanal	2, 3 e 4
18) 3-metil, butanal	2, 3 e 4
19) Isobutiraldeído	2, 3 e 4
20) Acetaldeído	1 e 2
21) Ácido acético	1, 2, 3 e 4
22) Ácido caprónico	1, 2, 3 e 4

Amostras: 1= Mostos Chardonnay e Pinot Noir fermentados por *Kloeckera apiculata*; 2 = Mostos Chardonnay e Pinot Noir fermentados por *Saccharomyces cerevisiae*; 3 = Mosto Chardonnay sem fermentação; 4 = Mosto Pinot Noir sem fermentação. Compostos identificados por Espectrometria de massas.

## Caraterização da microflora dos mostos:

### Aromas secundários



**TABELA 1. Componentes do vinho branco, determinados por cromatografia gasosa, em função de diferentes linhagens de leveduras autóctones, em comparação com uma levedura comercial importada.**

Leveduras	Componentes					
	Acetaldeído (mg/l)	Acetato de etila (mg/l)	Propanol-1 (mg/l)	Metil-2 propanol-1 (mg/l)	Metil-3 butanol-1 + metil-2 butanol-1 (mg/l)	Glicerol (g/l)
EMBRAPA-20B	83,1	28,2	18,5	13,4	131,8	8,4
EMBRAPA-81B	89,4	24,0	12,0	21,4	153,1	7,1
EMBRAPA-82B	65,9	15,2	9,1	20,5	149,3	5,2
EMBRAPA-87B	75,5	20,0	13,2	28,0	160,9	-
Importada	111,6	26,6	13,6	9,9	116,6	8,3

Silva & Silva (1997)

- António M. Jordão

## Caraterização da microflora dos mostos:

### Aromas secundários

Valores das médias da concentração de alguns compostos após 168 h de fermentação.

Amostra	Médias das Concentrações						
	Acetaldeído (mg/L)	Etanol (g/L)	1-propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Álcool isoamílico (mg/L)	Acetato de etila (mg/L)	Acetato de isoamila (mg/L)
1	131,3 <sup>a</sup>	34,0 <sup>a</sup>	9,0 <sup>ab</sup>	54,0 <sup>a</sup>	7,0 <sup>d</sup>	184,0 <sup>b</sup>	20,7 <sup>bc</sup>
2	125,3 <sup>a</sup>	32,0 <sup>ab</sup>	7,3 <sup>b</sup>	52,3 <sup>a</sup>	6,0 <sup>d</sup>	194,0 <sup>b</sup>	20,3 <sup>bc</sup>
3	53,3 <sup>d</sup>	24,0 <sup>bc</sup>	15,3 <sup>a</sup>	20,7 <sup>c</sup>	112,3 <sup>b</sup>	310,0 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>
4	45,7 <sup>d</sup>	22,0 <sup>cd</sup>	11,7 <sup>ab</sup>	19,0 <sup>c</sup>	126,0 <sup>a</sup>	295,0 <sup>a</sup>	24,0 <sup>b</sup>
1'	99,0 <sup>b</sup>	28,0 <sup>abc</sup>	8,0 <sup>b</sup>	37,3 <sup>b</sup>	5,0 <sup>d</sup>	110,0 <sup>c</sup>	15,0 <sup>c</sup>
2'	80,3 <sup>c</sup>	27,3 <sup>abc</sup>	6,0 <sup>b</sup>	36,0 <sup>b</sup>	5,0 <sup>d</sup>	120,0 <sup>c</sup>	14,7 <sup>c</sup>
3'	15,0 <sup>e</sup>	15,3 <sup>d</sup>	9,7 <sup>ab</sup>	18,0 <sup>c</sup>	98,3 <sup>c</sup>	200,0 <sup>b</sup>	19,7 <sup>bc</sup>
4'	14,3 <sup>e</sup>	6,3 <sup>e</sup>	9,3 <sup>ab</sup>	18,3 <sup>c</sup>	98,0 <sup>c</sup>	197,0 <sup>b</sup>	19,3 <sup>bc</sup>

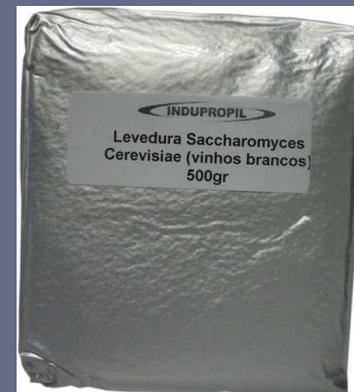
Mamede e Pastore (2004)

1 = Mosto fermentado pela *Saccharomyces cerevisiae*, 2 = Mosto Pinot Noir fermentado pela *Saccharomyces cerevisiae*, 3 = Mosto Chardonnay fermentado pela *Kloeckera apiculata*, 4 = Mosto Pinot Noir fermentado pela *Kloeckera apiculata*. As fermentações das amostras de 1' a 4' foram realizadas a 15°C e seguem a mesma sequência de ordem das amostras 1-4. Médias marcadas com letras iguais não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## Caraterização da microflora dos mostos:

- **Leveduras selecionadas**

- Apresentam a função de fermento, apresentando um maior rendimento fermentativo, elevada velocidade de fermentação, neutras ao fator killer, baixa produção de ácido acético, maior tolerância ao sulfuroso e pH do mosto.



## Caraterização da microflora dos mostos:

- Leveduras selecionadas

### Exemplo de características tecnológicas de leveduras selecionadas

Estirpe	Espécie	Temperatura de Fermentação	Fase de Latência	Velocidade de Fermentação	Tolerância ao Álcool	Factor Killer	Compatibilidade com a FML	Necessidades de Azoto	Necessidades de Oxigénio	Produção de SO <sub>2</sub>	Produção de Acidez Volátil	Características Aromáticas
SB	<i>S. bayanus</i>	18-32°C	Média	Elevada	15%	Neutra	Baixa	Baixa	Baixa	Média	Baixa	Neutra
SC	<i>S. cerevisiae</i>	15-30°C	Curta	Elevada	13%	Neutra	Boa	Média	Média	Baixa	Baixa	Neutra
TT	<i>S. bayanus</i>	15-30°C	Curta	Elevada	16%	Neutra	Neutra	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Ésteres
HT	<i>S. cerevisiae</i>	20-35°C	Curta	Elevada	14%	Neutra	Elevada	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Varietal
TOP Floral	<i>S. bayanus</i>	10-25°C	Média	Moderada	15%	Neutra	Boa	Média	Média-Baixa	Baixa	Baixa	Ésteres + Álcoois Superiores
TOP Essence	<i>S. cerevisiae</i>	15-25%	Curta	Moderada	15%	Killer	Baixa	Média	Média	Média	Baixa	Ésteres
TOP 20	<i>S. cerevisiae</i>	15-30°C	Média	Moderada	15%	Neutra	Elevada	Média	Média	Baixa	Média-Baixa	Ésteres
TOP 15	<i>S. bayanus</i>	10-28°C	Curta	Elevada	17%	Killer	Neutra	Média-Baixa	Baixa	Baixa	Baixa	Neutra
Redfruit	<i>S. cerevisiae</i>	14-34°C	Curta	Elevada	16%	Killer	Neutra	Elevada	Elevada	Média	Média-Baixa	Ésteres
Vintage Red	<i>S. cerevisiae</i>	18-32°C	Curta	Moderada	16%	Neutra	Elevada	Média	Média-Elevada	Baixa	Média	Varietal

Retirado de: Catálogo Enartis

- António M. Jordão

LICENCIATURA EM ENGENHARIA AGRONÓMICA  
CURSO TESP EM VITICULTURA E ENOLOGIA



## Caraterização da microflora dos mostos:

### • Leveduras selecionadas comerciais – exemplo de características e modo de aplicação

- Matéria seca: 94% (+ ou - 1)
  - Boa capacidade fermentativa com amplo espectro de temperatura (de 12 a 32°C)
  - Levedura neutra ao factor killer
  - Período de latência inferior a 6 horas com rápida multiplicação celular
  - Formação de espuma quase nula
  - Possui específicas características acidificantes
  - Poder de produção de álcool, superior a 15%, se bem nutrida
  - Rendimento açúcar/álcool de 17,2 a 17,9 g de açúcar/litro para produzir 1% de álcool em volume
  - Óptima resistência ao SO<sub>2</sub>
- Em caso de elevada carência nutricional (APA < 120 mg/L), existe uma ligeira tendência a produzir H<sub>2</sub>S

Retirado de: Catálogo AEB (2013)

#### Dose recomendada

20-30 g por 100 kg de massa ou por hL de mosto.

#### Rehidratação

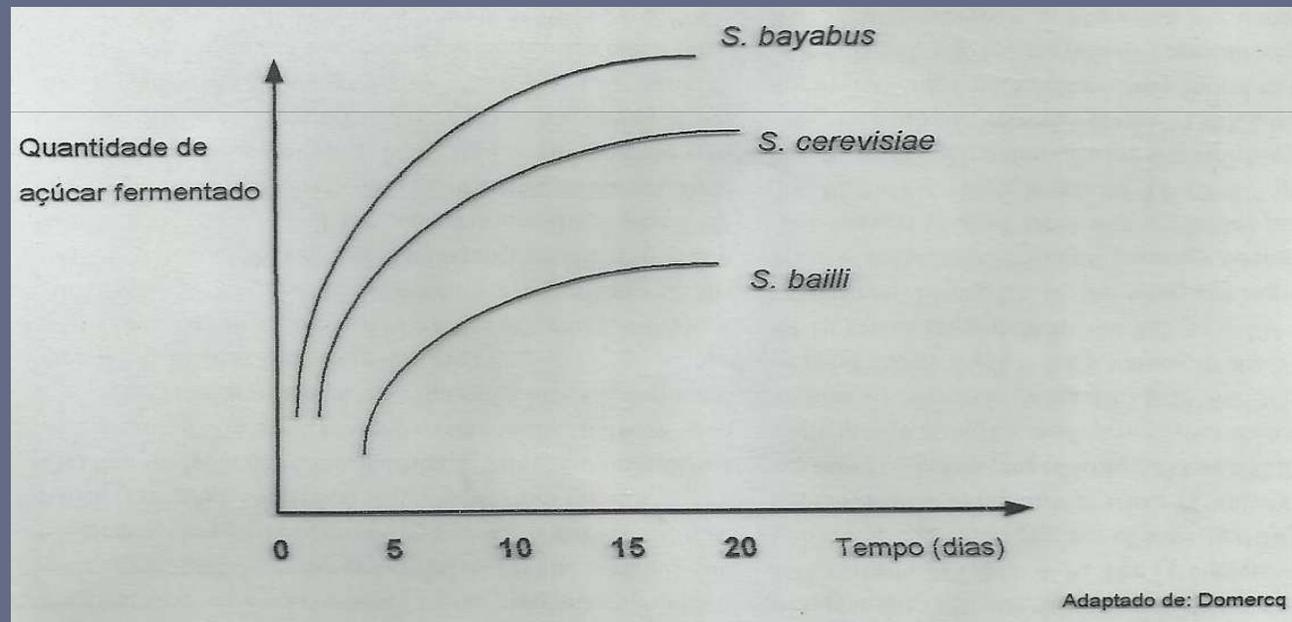
Em 10 partes de água tépida açucarada, máx. 38°C por pelo menos 20-30 minutos.

#### Composição

Levedura seleccionada activa *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *cerevisiae*.

## Caraterização da microflora dos mostos:

- Evolução da microflora dos mostos durante a fermentação
- Durante a fermentação vai existir uma sucessão de diferentes espécies de leveduras.



## Caraterização da microflora dos mostos:

- Alguns produtos secundários formados durante a fermentação alcoólica:
  - Ácido acético;
  - Ácido butírico;
  - Ácido fumárico;
  - Ácido succínico;
  - Etanol;
  - .....