

Considerações sobre a Fermentação Alcoólica

Cecília Gomes*

* Engenheira Agrónoma. Responsável da Qualidade do Laboratório de Química Enológica da DRAPCentro

Anadia |2021

Parte 1: Origem das leveduras e seus competidores

São muitos e variados os microrganismos que podem ser retirados à superfície das uvas maduras, em secreções diversas, mesmo quando os bagos se encontram aparentemente sãos (Fig.1). Tais microrganismos, transportados pelos insetos a partir do solo ou de variados frutos em fermentação, compreendem leveduras, fungos filamentosos (bolores), bactérias lácticas e bactérias acéticas.



Fig.1. Microrganismos isolados da superfície de um bago de uva são.

Uma das espécies que pode estar presente é *Saccharomyces cerevisiae* - a levedura mais importante do ponto de vista da fermentação alcoólica e, consequentemente, da transformação das uvas em vinho - embora, em condições normais, o seu número seja muito reduzido comparativamente com o que se passa com espécies muito menos interessantes do ponto de vista fermentativo, como sejam as dos géneros *Kloeckera*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Candida* e *Hanseniaspora*.

Para além das uvas maduras, as superfícies das adegas e o próprio equipamento usado na vinificação constituem locais propícios à proliferação de leveduras, que se desenvolvem nos resíduos de mosto acumulado. As leveduras do género *Saccharomyces* não são predominantes nas uvas, mas são comuns no equipamento das adegas.

Também as leveduras de degradação, como as dos géneros *Dekkera/Brettanomyces*, entram frequentemente na adega com a receção das uvas e, embora o façam originalmente em pequeno número, estabelecem “residência” dentro da adega.

Mas a flora microbiana das uvas está dependente de vários fatores, nomeadamente: da chuva e da humidade; da altitude e da exposição das vinhas; dos tratamentos fitossanitários efetuados; da presença de insetos vetores; das práticas culturais, em especial da fertilização azotada realizada nas vinhas e da forma como são eliminados os resíduos das adegas. O estado sanitário das uvas

tem uma influência preponderante na microflora presente, sendo que as uvas atacadas por podridões como a cinzenta (Fig.2) e a ácida (Fig.3), possuem uma população de microrganismos muito mais elevada, embora muito menos variada e com predomínio de espécies indesejáveis, comparativamente com o que se passa nas uvas sãs.



Fig.2. Cacho com sintomas de podridão cinzenta, causada pelo fungo *Botrytis cinerea*.



Fig.3. Cacho com sintomas de podridão ácida, causada por várias espécies de leveduras e bactérias.

Existindo danos significativos nos bagos e crescimento de bolores, estes podem esgotar as vitaminas e os minerais essenciais, reduzindo drasticamente o valor nutritivo do mosto e fazendo com que as leveduras tenham dificuldade em completar a fermentação alcoólica.

De entre os microrganismos encontrados nas uvas, mostos e vinhos, as bactérias lácticas são um grupo especialmente importante, pois são responsáveis pela fermentação malolática, ou seja, pela conversão de ácido málico em ácido láctico.

Nas condições de anaerobiose da fermentação alcoólica dos mostos, os bolores e as bactérias aeróbias não conseguem crescer. Ocorre, no entanto, uma exceção no caso dos mostos tintos, quando a fermentação e a produção de dióxido de carbono sofrem um abrandamento, permitindo a formação de uma manta de películas de uva na superfície do mosto. Constitui-se, assim, um ambiente apropriado ao crescimento de alguns destes microrganismos, particularmente *Acetobacter* spp.. A submersão da manta elimina facilmente este problema.

Por outro lado, as leveduras indígenas são capazes de crescimento anaeróbio, tal como aeróbio, e podem persistir durante a fermentação. Estas leveduras competirão com *Saccharomyces* spp. pelos nutrientes, podendo produzir ésteres de ácidos gordos e outros compostos que afetarão os aromas do vinho. Mas, muito poucas destas leveduras indígenas são tão tolerantes ao etanol como as do género *Saccharomyces*, pelo que não são, geralmente, detetáveis no final da fermentação.

Parte 2: Desenvolvimento sequencial e características das leveduras

A maior ou menor persistência das leveduras indígenas, durante a fermentação alcoólica dos mostos, depende de muitos fatores, como a temperatura de fermentação, a disponibilidade de nutrientes, a “força” do inóculo de *Saccharomyces* spp., a utilização e o teor de anidrido sulfuroso e as populações e espécies de microrganismos presentes, à partida, nas uvas. Durante o processo fermentativo, a população de leveduras pode atingir vários milhões por mililitro de mosto.

Em uvas que entrem espontaneamente em fermentação, as diferentes espécies de leveduras não atuam todas ao mesmo tempo, mas fazem-no de forma sequencial. As primeiras são as chamadas apiculadas (devido à forma das suas células, semelhante a um limão), como *Kloeckera* spp. e *Hanseniaspora* spp., ou outras de tamanho igualmente reduzido, como é o caso de *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp.. Trata-se de leveduras que podem produzir, no máximo, 3-4% vol. álcool (em mostos pouco sulfitados), têm um crescimento, normalmente, limitado aos dois ou três primeiros dias de fermentação e necessitam de 20-24g de açúcar para produzir 1% vol. álcool, ou seja, são leveduras de baixo rendimento. Em uvas apodrecidas, a fermentação pode ser iniciada por outras leveduras, nomeadamente *Torulopsis (Candida) stellata*, que consegue chegar aos 7-10% vol. álcool.

Em seguida, entra em ação a levedura elíptica *Saccharomyces cerevisiae* que tem menor sensibilidade ao álcool (pode ir até 8-16% vol. álcool, embora não tenha uma resistência muito elevada e, a partir de 11,5-12% vol. álcool, já “trabalhe” com alguma dificuldade). Esta levedura tem maior tolerância à temperatura, consegue uma melhor captação de nutrientes e tem uma forte intensidade de fermentação (i.e., transforma uma maior quantidade de açúcar por unidade de tempo). Além disso, necessita de apenas 17-18g de açúcar para produzir 1% vol. álcool, ou seja, dá maior rendimento.

Por fim, a levedura ovóide *Saccharomyces bayanus*, muito útil no fabrico de espumantes, tem uma sensibilidade ao álcool ainda menor: algumas estirpes podem exceder a produção de 17-18% vol. álcool, chegando mesmo a 20% vol. álcool em fermentações de laboratório.

Do ponto de vista tecnológico, as características das leveduras que têm mais relevância são as seguintes:

- **Poder alcoogénico:** trata-se do teor alcoólico máximo que uma levedura consegue obter num mosto suficientemente rico em açúcar. As leveduras com alto poder alcoogénico têm também grande resistência ao álcool;
- **Produção de produtos secundários durante a fermentação:** enquanto as leveduras dos géneros *Saccharomyces* e *Saccharomyces* têm um metabolismo fermentativo por excelência, *Torulopsis* spp. e *Hansenula* spp. só fermentam em anaerobiose absoluta, usando qualquer arejamento para realizar a respiração. Trata-se de leveduras acetogénicas (produtoras de ácido acético) e succinogénicas (produtoras de ácido succínico).

As leveduras *Saccharomyces* spp. e *Torulaspota* spp. são as menos esterogénicas (produtoras de ésteres), enquanto *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Pichia* spp. e *Hansenula* spp. formam véu superficial e produzem muito acetato de etilo;

- **Necessidades em fatores de crescimento:** as leveduras prototróficas podem-se desenvolver e provocar a fermentação num meio estritamente privado de fatores de crescimento, pois são capazes de os sintetizar, embora a presença destes fatores funcione como ativador da multiplicação e da fermentação. Contrariamente, as leveduras auxotróficas são incapazes de se multiplicarem caso não exista nenhuma vitamina no meio, como é o caso de *Kloeckera* spp., *Saccharomycodes* spp. e *Hanseniaspora* spp.;
- **Tolerância à temperatura:** as leveduras do género *Saccharomyces* dão uma ilustração perfeita da lei: “o início da fermentação é tanto mais rápido e o grau alcoólico final fraco quanto mais elevada for a temperatura”. Trata-se de leveduras que apreciam temperaturas baixas, fazendo a fermentação máxima, em consumo de açúcar, a 13°C; a 4°C só fermentam 55-75% desta quantidade e, a 30-35°C, apenas 50%. Em termos genéricos, pode dizer-se que as temperaturas elevadas conduzem a fermentações rápidas e que arrancam depressa, mas em que há menor produção de álcool e maior produção de produtos secundários. Além disso, temperaturas elevadas de fermentação provocam perda de aromas.

As espécies *Saccharomyces bailli*, *Saccharomyces heterogenicus*, *Torulopsis stellata* e *Saccharomycodes ludwigii* podem ser consideradas “leveduras quentes”, pois apresentam um ótimo de fermentação a 25°C e ainda são muito ativas a 30-35°C, fermentando mal a 4°C e a 13°C. Possuem um poder alcoogénico fraco e produzem grandes quantidades de ácido acético e de acetato de etilo. As leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* também trabalham, preferencialmente, a temperaturas elevadas, tendo uma fase de latência de 8-10 dias, a 25°C, e de 2-3 dias, a 35°C.

Entre os dois grupos anteriores encontram-se as leveduras *Hanseniaspora* spp., *Kloeckera* spp. e *Saccharomyces rosei*, cujo ótimo de temperatura se situa nos 20°C.

Existe, ainda, um grupo de leveduras que são pouco influenciadas pela temperatura, como é o caso de *Metschnikowia pulcherrima* e *Saccharomyces rouxii*, que não apresentam alterações de comportamento entre 13°C e 35°C;

- **Resistência ao anidrido sulfuroso:** mostos com doses de 100 a 400 mg de anidrido sulfuroso/litro, inoculados com um número constante de leveduras, permitiram separar três categorias (como o anidrido sulfuroso atua sobretudo a nível da parede das leveduras, quanto mais pequenas elas forem mais sensíveis ao anidrido sulfuroso serão):
 - **leveduras sensíveis** – não se desenvolvem com doses superiores a 100-150 mg de anidrido sulfuroso/litro. É o caso de *Saccharomyces rosei*, *Kloeckera* spp. e *Hanseniaspora* spp.;
 - **leveduras de resistência mediana** – resistem a 100-150 mg de anidrido sulfuroso/litro, mas pouco mais, como acontece com *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulopsis stellata*;
 - **leveduras resistentes** – certas estirpes de *Saccaromyces bayanus* chegam a fermentar mostos com 250 mg de anidrido sulfuroso/litro e *Saccharomyces bailli* fermenta-os com 250-400 mg de anidrido sulfuroso/litro; *Saccharomycodes ludwigii* suporta perfeitamente 400 mg de anidrido sulfuroso/litro.

Parte 3: Fatores que condicionam a fermentação alcoólica

Vários fatores influenciam o desenvolvimento das leveduras e, conseqüentemente, a condução da fermentação alcoólica. Entre eles, destacam-se os seguintes:

- **Temperatura:** as leveduras só se desenvolvem bem num leque de temperaturas bastante restrito, de que depende, não só a sua taxa de crescimento, mas também a taxa de fermentação, ou seja, o rendimento e a velocidade fermentativos. Em geral, para mostos “normais” e dentro de certos limites de temperatura, pode dizer-se que, quanto mais elevada for a temperatura a que ocorrer a fermentação:
 - menor será a população de leveduras disponível para realizar a fermentação do mosto;
 - menor será o teor alcoólico atingido;
 - mais cedo se iniciará o processo fermentativo;
 - mais rápida será a fermentação;
 - mais produtos secundários se produzirão;
 - maior será a perda de aromas;
 - mais facilmente as bactérias presentes no mosto entrarão em atividade, com o inconveniente de não produzirem álcool e originarem produtos secundários indesejáveis;
 - maior será a quantidade de anidrido sulfuroso que se combina, deixando de ter as ações desejáveis do livre.

Deste modo, importa estabelecer uma situação de compromisso, pelo que as temperaturas mais convenientes para a fermentação alcoólica situar-se-ão entre os 18°C e os 20°C, para os mostos brancos, e rondarão os 25°C, podendo eventualmente chegar aos 30°C, no caso dos mostos tintos. Nestes, a fermentação é feita com a presença de partes sólidas e, quanto mais elevada for a temperatura, maior será a libertação dos constituintes das películas, conseguindo-se obter um produto final mais rico em matéria corante.

- **Arejamento:** a atividade das leveduras da fermentação alcoólica pode ocorrer na ausência ou na presença de oxigénio, uma vez que elas tanto podem efetuar a fermentação alcoólica (anaeróbia) como a respiração (aeróbia), sendo a glicólise comum a ambos os processos. Todavia, uma molécula de açúcar, por respiração (oxidação a $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$), liberta muito mais energia do que por fermentação (em que origina álcool + CO_2).

A respiração aeróbia é realizada na fase de multiplicação, que ocorre antes do início da fermentação alcoólica, uma vez que, para se multiplicarem, as leveduras necessitam de mais energia, que obtêm oxidando as moléculas do açúcar. Precisam ainda de sintetizar compostos como esteróis e ácidos gordos, importantes para a constituição das suas células, o que também conseguem respirando aerobicamente.

O oxigénio entra no mosto quando da realização das primeiras operações mecânicas sobre as uvas, sendo conveniente proceder a arejamentos periódicos (remontagens) logo a partir do início da fermentação, para permitir a constituição e manutenção de uma população adequada de leveduras.

No caso da produção de vinhos tintos, a remontagem também é benéfica por permitir a passagem dos constituintes da película para o meio, enquanto, na produção de vinhos brancos, o arejamento excessivo leva à oxidação, com alteração da cor para amarelo palha e o aparecimento de sabores e aromas oxidados.

- **pH:** quanto mais elevado for este parâmetro:
 - maior será a velocidade da fermentação;
 - maior será a taxa de crescimento das leveduras, pelo que mais cedo se atingirá a população apta a iniciar a fermentação;
 - mais cedo se iniciará a fermentação;
 - maior será a quantidade de álcool produzida pelas leveduras.

Mas, quanto mais elevado for o pH, melhor atuarão também as bactérias, pelo que é necessário, de novo, uma situação de compromisso, baixando o pH para níveis que ainda permitam o desenvolvimento das leveduras, mas limitem a atividade das bactérias.

- **Concentração de açúcar do mosto:** concentrações elevadas de açúcar causam, à partida, problemas de início e de fim de fermentação: no início, as leveduras preferirão efetuar a respiração em vez da fermentação dos açúcares; no fim da fermentação, a elevada quantidade de álcool, que existirá no meio, irá exercer uma ação antissética, pelo que as leveduras terão dificuldade em trabalhar.
- **Necessidades nutritivas das leveduras:** embora o mosto seja, em geral, relativamente bem provido de tudo o que as leveduras necessitam, pode haver deficiências, nomeadamente de:
 - **azoto:** uvas podres têm falta de azoto assimilável, por ele ter sido consumido pelos agentes das podridões, mas este elemento também pode estar em falta nas uvas sãs, quando excessivamente maduras, devido à sua acumulação sob forma não assimilável. Além disso, determinados tipos de solos, com deficiência de azoto, conduzem à produção de uvas e de mostos com falta de azoto assimilável. A deficiência de azoto assimilável pode ser colmatada pela adição de compostos azotados, nomeadamente fosfato ou sulfato de amónio (este último tem a vantagem de também acidificar o meio);
 - **vitaminas:** podem não existir em quantidades suficientes no mosto, no início do processo fermentativo, sendo permitida a adição de tiamina (vitamina B1);
 - **catiões metálicos:** também podem estar em falta, impedindo o ativar da fermentação alcoólica, mas tal não costuma verificar-se no nosso país.

Importa referir, ainda, que a presença de certos **inibidores**, nos mostos, pode causar perturbações, quer no início, quer no final das fermentações, ou induzir alterações no metabolismo das leveduras. Isto ocorre, nomeadamente, devido à presença de resíduos de pesticidas, em especial dos utilizados nos tratamentos fitossanitários realizados próximo da vindima.