

## COMO ASSEGURAR O FIM DA FERMENTAÇÃO?

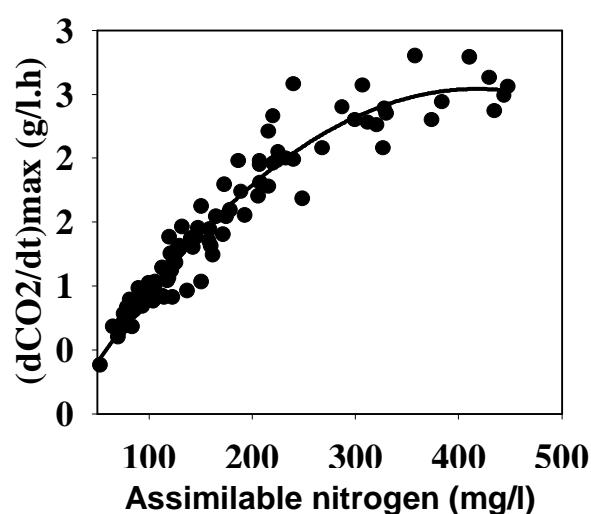
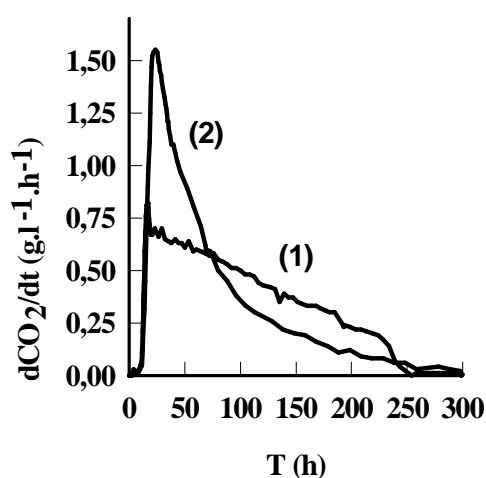
**JM. SABLAYROLLES**

UMR 'Sciences pour l'œnologie'. INRA, 2, place Viala 34070. Montpellier cedex 1.  
France

São muitos os mecanismos que podem originar problemas de fermentação em enologia. Muitos deles foram evidenciados [1, 2] mas, na prática, a questão essencial para os enólogos é conhecer a sua frequência e consequentes tratamentos preventivos a aplicar durante a vinificação.

### O QUE SÃO MOSTOS “DIFICEIS DE FERMENTAR”?

Quando se acompanham as cinéticas de fermentação com precisão (por monitorização on line do valor de produção de CO<sub>2</sub>, por exemplo) podem-se diferenciar dois tipos de curvas (fig.1): (i) fermentações com um baixo valor de produção de CO<sub>2</sub> ao longo do todo processo, às quais chamamos fermentações “lentas”; o valor máximo de produção de CO<sub>2</sub> ((dCO<sub>2</sub>/dt)<sub>max</sub>) indica-nos a tendência para uma fermentação lenta (ii) fermentações com um decréscimo drástico deste valor no final: a estas chamamos fermentações com final lento (ou fermentação parada, quando a concentração em açúcar residual é superior a 2g/l). A tendência para fermentação com final lento (fermentação amuada) pode ser quantificada pelo valor do declive (dCO<sub>2</sub>/dt)<sub>max</sub> no final da fermentação.



*Figura1. Variação da produção de CO<sub>2</sub> durante a fermentação.*

*Tipo1 1: 'fermentação lenta*

*Tipo 2: fermentação com final lento [3]*

*Relação entre a produção máxima de CO<sub>2</sub> e a concentração em Azoto assimilável*

Na prática raramente se faz esta distinção e os dois tipos de fermentação podem eventualmente ter a mesma duração. No entanto, ela é fundamental (a) porque às mesmas correspondem diferentes mecanismos microbiológicos e (b) as fermentações com final lento são muito mais problemáticas, na medida em que, podem conduzir a paragens de fermentação.

## **É POSSIVEL DETECTAR OS MOSTOS “DIFICEIS DE FERMENTAR”?**

As fermentações lentas (normalmente muito longas) são causadas por deficiências em azoto que limitam o valor máximo da produção de CO<sub>2</sub> (fig.2). Podem ser previstas estimando-se a concentração em azoto assimilável no mosto. Foi realizado um estudo estatístico com 178 mostos (múltiplas análises correspondentes) [3] que indicou que o ano e a região de origem influenciam significativamente o risco de fermentações lentas. Contrariamente, não se encontrou qualquer influência significativa da casta, o que ilustra bem a heterogeneidade do teor em azoto para a mesma variedade dependendo da região, ano etc.

As fermentações com final lento são caracterizadas por uma baixa viabilidade das leveduras no final, devido principalmente, às concentrações elevadas de etanol e às deficiências de oxigénio. Ao contrário do que acontece com as fermentações lentas, o estudo estatístico indica que a concentração do mosto em azoto assimilável não tem qualquer influência significativa. Geralmente, e à excepção da concentração inicial em açúcar, nenhuma medição efectuada no mosto ou durante a primeira metade da fermentação incluindo a viabilidade no final da primeira metade (ponto de meia fermentação), parece estar relacionada com o risco das fermentações com final lento.

## **PORQUÊ ADICIONAR OXIGÉNIO E AZOTO AMONIACAL?**

As deficiências em azoto e em oxigénio são da maior importância. O oxigénio é requisitado pelas leveduras para a síntese de constituintes celulares, especialmente esteróis e ácidos gordos insaturados necessários para manter a integridade da membrana citoplasmática (especialmente para elevadas concentrações de etanol). A sua adição diminui também a síntese de ácidos gordos de cadeia média (envolvidos no metabolismo lipídico), que são conhecidos como inibidores das leveduras [5]. As necessidades em oxigénio são diferentes dependendo da composição do mosto, especialmente da sua turbidez.

O azoto assimilável, que normalmente se considera que inclui sais de amónio e  $\alpha$ -amino ácidos, é necessário para a síntese proteica e para o crescimento das leveduras. A quantidade de oxigénio normalmente necessária situa-se entre os valores de 5 e 10 mg/l [6], enquanto que, de acordo com o regulamento Europeu, a adição de azoto está limitada aos valores de 300 mg/l de fosfato ou sulfato de diamónio

## **O MOMENTO DA ADIÇÃO DO OXIGÉNIO E DO AZOTO AMONIACAL É IMPORTANTE?**

A adição combinada de oxigénio e azoto amoniacal pode ser muito eficaz mas só quando efectuada no momento certo, i.e. próxima do ponto de meia fermentação (Fig.3). De facto, quando se adiciona no início, o azoto tem uma grande influência na população celular o que conduz a um valor máximo de produção de CO<sub>2</sub> mas, depois este valor decresce drasticamente sem que o tempo de fermentação seja encurtado, enquanto que, com a sua adição no ponto de meia fermentação, esta permanece eficiente até ao fim. Do mesmo modo, a adição do oxigénio tem muito maior impacto nas cinéticas no final da fermentação (por aumentar a viabilidade final das leveduras) quando efectuada naquele ponto.

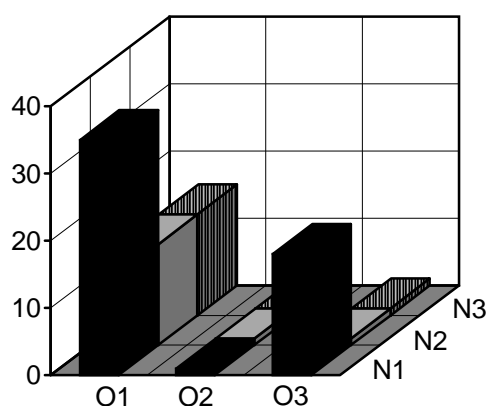


Figure 3a

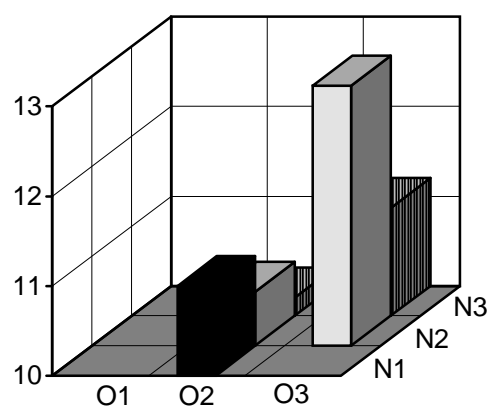


Figure 3b

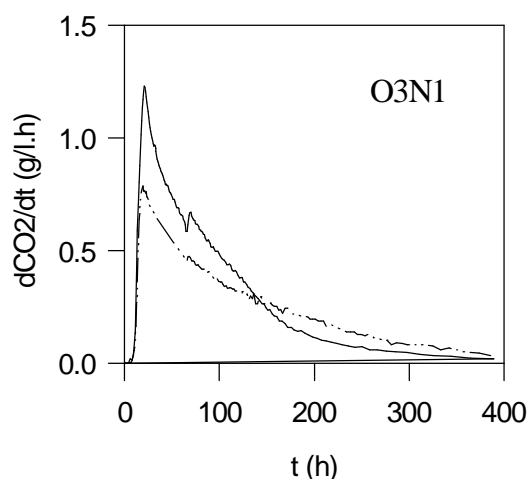


Figure 3c

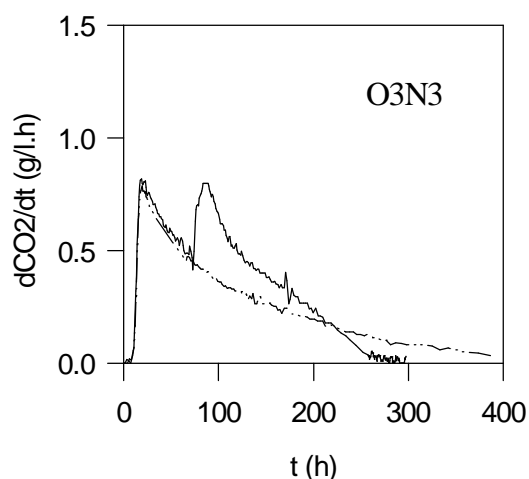


Figure 3d

Figura 3: Efeito do momento da adição de 300 mg/L  $(NH_4)_2 HPO_4$  e de 5 mg/L de oxigénio na concentração de açúcar residual (figura 3a), na duração da fermentação (figura 3b) e nas cinéticas de fermentação (Figuras 3c e 3d). 1: início da fermentação, 2: fim da fase de crescimento, 3: ponto de meia fermentação [7].

### AS ADIÇÕES DE OXIGÉNIO E AZOTO AMONICAL SÃO SEMPRE EFICIENTES?

72 Mostos com tendência para fermentações com final lento ou para paragens de fermentação foram fermentados com a adição combinada de oxigénio e fosfato de diamónio (DAP) aplicados no ponto de meia fermentação. Em todos os casos, a adição combinada conduziu a um (i) drástico decréscimo da duração da fermentação (caso das fermentações com final lento): a duração decresceu em média 44% (Fig. 4), ou (ii) para o esgotamento dos açúcares (caso das fermentações paradas): Em 13 fermentações com açúcares residuais na ordem de 6g/l a 38g/l. O efeito foi similar independentemente da variedade, da origem do mosto e da estirpe de levedura. Estas adições foram também efectuadas em 9 fermentações isentas de risco e a sua duração decresceu em média 35%, indicando que a adição de oxigénio e de azoto amoniacal é muito eficaz mesmo quando não é indispensável.

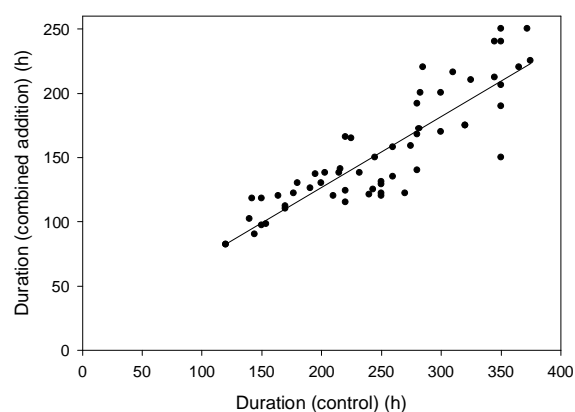


Figure 4a

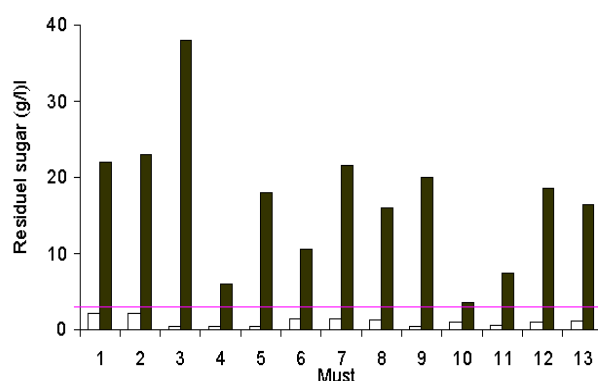


Figure 4b

*Figura 4: Efeito da adição de 300 mg/L de  $(NH_4)_2 HPO_4$  e de 5 mg/l de oxigénio na duração da fermentação (fermentação lenta: figura 4a) e na concentração de açúcares residuais (fermentações paradas: figure 4b) [3]*

Mesmo que limitados às condições de fermentação dos brancos e rosés, estes resultados indicam que a adição de oxigénio e de azoto amoniacal é o tratamento mais eficaz para prevenir fermentações com final lento ou paragens de fermentação. Apesar do impacto potencial destes dois nutrientes na fermentação ser conhecido há muitos anos, não se deu a atenção suficiente à importância do momento da sua aplicação. Não haja dúvida de que na vinificação em tinto os mecanismos principais se mantêm, apesar da presença das partículas sólidas poderem provocar fenómenos específicos. Infelizmente, não estão disponíveis registos estatísticos de interesse nestas condições.

#### **QUAIS SÃO AS CONSEQUÊNCIAS NA QUALIDADE FINAL DO VINHO?**

As adições em azoto amoniacal são normalmente consideradas como neutras ou favoráveis para o aroma do vinho. Contrariamente muitos enólogos têm receio de adicionar oxigénio especialmente na vinificação em branco. Foram estudados à escala piloto três mostos diferentes. A composição final dos vinhos não foi significativamente afectada com a adição de 5mg/l de oxigénio. É de salientar que a acidez volátil não aumentou significativamente e a cor não foi afectada, como indicado pela leitura das densidades ópticas (420,520 e 620 nm). Nas análises sensoriais realizadas não se registaram diferenças significativas nos vinhos.

O efeito de adições excessivas de oxigénio foi depois testado através da adição de 50mg/l em vez das 5mg/l. Para os vinhos Sauvignon, a adição excessiva de oxigénio modificou a cor drasticamente (Tabela 1). As propriedades organolépticas do vinho também se alteraram (provados em copos opacos). Em comparação com a testemunha, os dois painéis encontraram diferenças significativas com níveis significativos de 1% e 5% respectivamente. [3]

*Tabela 1. Efeito de adições de oxigénio na cor dos vinhos. Comparação da adição de 5 e de 50 mg/L. Fermentação à escala piloto num mosto de Sauvignon.*

	Testemunha	Adição de 5 mg/L	Adição de 50 mg/L
DO <sub>420</sub>	0.108	0.103	0.135
DO <sub>520</sub>	0.037	0.042	0.103
DO <sub>620</sub>	0.010	0.010	0.027

### COMO CONTROLAR AS ADIÇÕES DE OXIGÉNIO?

As necessidades das leveduras em oxigénio são relativamente bem conhecidas, mas o controlo da oxigenação é, normalmente, muito impreciso.

#### *Algumas notas sobre o controlo do oxigénio.*

- Não é necessária uma medição muito rigorosa da quantidade de oxigénio transferida para o mosto em fermentação mas, é muito importante estimá-la pelo menos aproximadamente, com o objectivo de se evitar (i) insuficientes, e conseqüentemente ineficazes adições ou, pelo contrário, (ii) adições excessivas as quais podem causar um efeito prejudativo na qualidade do vinho.

- O nível de saturação do oxigénio dissolvido num mosto é de aproximadamente 7 mg/l. Esta concentração aproxima-se da quantidade total que as leveduras necessitam mas, como já foi demonstrado, a oxigenação é mais eficaz quando realizada durante a fermentação. Nesse momento a quantificação do oxigénio disponível para as leveduras é difícil, porque existe CO<sub>2</sub> presente e o oxigénio é consumido assim que é adicionado. Em muitos casos o valor do oxigénio consumido é mais elevado que o valor do oxigénio transferido e, por isso, a concentração dissolvida no mosto em fermentação permanece próxima do zero.

- O oxigénio pode ser adicionado usando-se as técnicas tradicionais, como a remontagem, mas estas técnicas são normalmente difíceis de controlar e não são reprodutíveis. Seria desejável que a adição do oxigénio fosse (i) calibrada (usando-se um depósito cheio com o mosto ...) e (ii) realizada com uma boa reprodutibilidade. A quantidade de oxigénio transferida por remontagem está dependente de diversos parâmetros (tamanho do depósito, caudal da bomba...) e não existem valores gerais disponíveis. No entanto, decorrem experiências à escala piloto e à escala industrial que indicam que, em média, a quantidade necessária de oxigénio pode ser adicionada efectuando-se uma remontagem de uma ou duas vezes o volume da cuba.

- É possível oxigenar ou injectar ambos, ar ou oxigénio puro mas, em ambos os casos é necessário não esquecer que as leveduras unicamente conseguem assimilar o oxigénio dissolvido. A dissolução do oxigénio é máxima quando as bolhas são muito pequenas e ficam o tempo suficiente no mosto em fermentação. Dependendo das características do aplicador, do caudal do gás, do tamanho da cuba..., a quantidade de oxigénio transferido varia de 30% para perto de 100%. É então preferível fazer uma calibração preliminar (ver o exemplo abaixo).

#### *Exemplo de medição da transferência de oxigénio [8]*

Nesta experiência foi usada uma cuba de 500 l, com o aplicador montado no circuito de remontagem (figura 5). Calibrou-se a transferência do oxigénio usando-se dois métodos diferentes:

- Método 1: cálculo do coeficiente de transferência de oxigénio ( $k_1a$ ) (figura 6).

O valor do oxigénio transferido é calculado usando-se a seguinte formula:  $r_{O_2} = k_L a (C^* - C)$ , onde  $C$  = concentração de oxigénio dissolvido (quando  $C = 0$ ,  $r_{O_2} = r_{O_2 \max}$ ),  $C^*$  = saturação da concentração do oxigénio dissolvido.

Condições da testemunha: temperatura 20 ° C,  $C^* = 34$  mg/l, caudal de oxigénio = 22.5 l/h, volume de mosto = 425 l  $\rightarrow k_L a = 2.2$  h<sup>-1</sup>  $\rightarrow r_{O_2 \max} = 74.8$  mg/l.h.

Nota: antes da aplicação deste método, é necessário verificar que não há consumo de oxigénio pelo mosto.

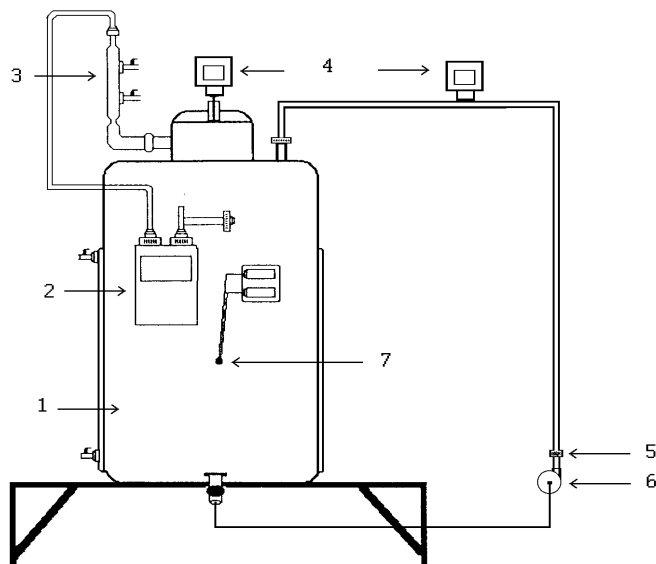


Figura 5. Cuba de 500l. 1: 4: sondas de oxigénio (na cuba e no circuito de remontagem), 5: aplicador, 6: bomba, 7: sondas de temperatura [8].

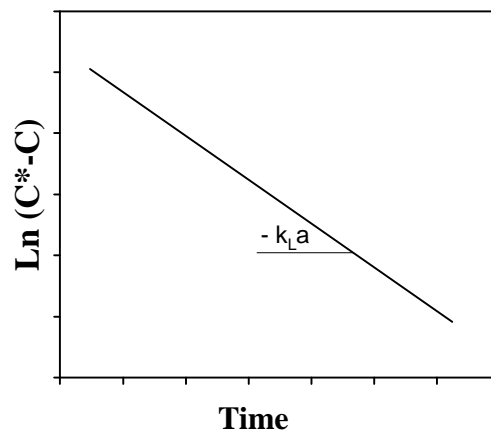


Figure 6. Cálculo do coeficiente de transferência de oxigénio ( $k_L a$ ) num mosto, antes da inoculação (método 1).

- Método 2:  $r_{O_2} = (C_2 - C_1) * Q/V$ , em que  $C_1$  = concentração de oxigénio dissolvido no tanque,  $C_2$  = concentração de oxigénio dissolvido no circuito de remontagem (depois do aplicador),  $Q$  : caudal da bomba de remontagem,  $V$  : volume do mosto.

Este método é mais difícil de realizar mas é praticável durante a fermentação i.e., enquanto o oxigénio é consumido pelas leveduras.

Pela adição de oxigénio realizada diversas vezes durante a fermentação, demonstramos que os valores de  $r_{O_2}$  são (i) constantes quaisquer que sejam os progressos da fermentação, (ii) próximos aos obtidos, usando o método 1.

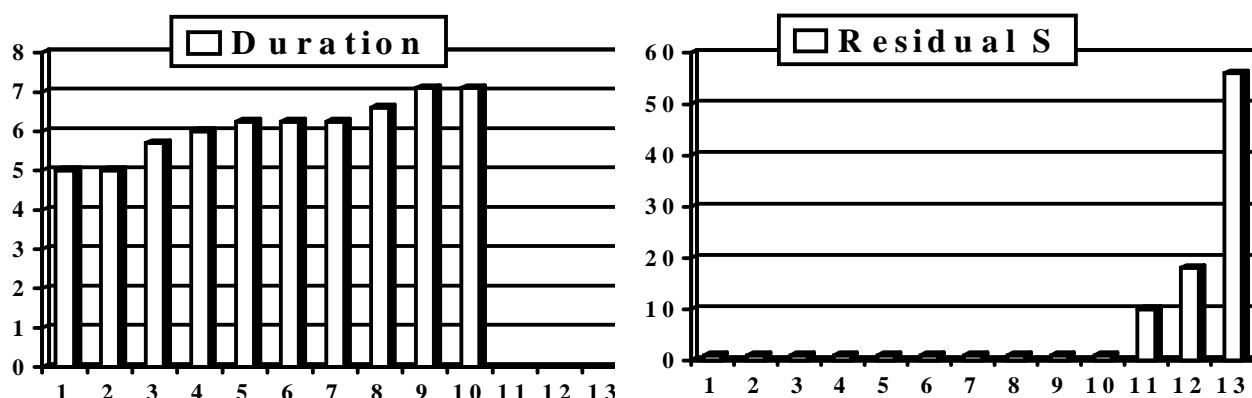
Estes resultados indicam que na prática, é possível fazer uma estimativa rigorosa do oxigénio transferido durante a fermentação, através da medição do coeficiente de transferência de oxigénio no mosto antes da inoculação (método 1).

### A ESCOLHA DA ESTIRPE DE LEVEDURA É IMPORTANTE?

Quando foram testados 72 mostos difíceis de fermentar, somente se notaram pequenas diferenças entre as estirpes (todas conhecidas como “estirpes com boa capacidade fermentativa”). Ao contrário, quando comparamos no mesmo mosto difícil de fermentar, estirpes escolhidas ao acaso, i.e. sem se ter em consideração a sua capacidade fermentativa, observaram-se diferenças drásticas [9]: com três estirpes obtiveram-se paragens de fermentação com o valor de açúcares residuais entre 10 a 56g/l, enquanto

que, as outras estirpes fermentaram todo o açúcar com fermentações que duraram entre 119 a 170 h. Estes resultados confirmam que a escolha da estirpe de levedura é da maior importância para prevenir o risco de paragens de fermentações ou fermentações com final lento.

Figura 7: Influência da estirpe de levedura na duração de fermentação e na concentração de açúcares residuais



Mosto de Chardonnay [9].

#### Necessidades em Azoto

Para se compararem as necessidades em azoto entre estirpes, concentramo-nos no consumo deste elemento durante a fase estacionária uma vez que (i) esta fase tem um elevado impacto tecnológico – em enologia, a maior parte do açúcar é metabolizado depois do crescimento ter parado e (ii) a adição de sais de amónio durante esta fase é, pelo menos, tão eficaz como quando efectuada no mosto mais cedo [4].

Para quantificar a eficácia das adições de azoto durante essa fase realizamos fermentações com cinética constante. De facto, como previamente descrito por Manginot et al [10], a cinética de fermentação pode ser regulada durante a maior parte da fermentação, i.e. desde o momento em que a velocidade de fermentação tem o seu pico, no início da fermentação, até ao momento em que o açúcar residual começa a ser factor limitante, pela adição de azoto.

O número de células assim como a velocidade específica da fermentação permanece constante durante a maior parte da fase de regulação. A quantidade de azoto adicionada para a sua regulação é desta forma um bom critério para quantificar a eficácia da porção de azoto durante a fase estacionária. A curva do azoto adicionado entre 20 e 70 g/l de  $\text{CO}_2$  ( $P_{20-70}$ ) foi sempre uma linha recta, mas os desvios foram muito diferentes dependendo da estirpe de levedura. Como ilustrado na figura 7, os desvios variam de 0.96 a 2.2 mg de azoto / g.  $\text{CO}_2$  libertado. Estes resultados indicam que as leveduras enológicas têm necessidades em azoto muito diferentes, especialmente durante a fase estacionária.

Para se avaliar o interesse tecnológico das medições  $P_{20-70}$  fermentou-se meio sintético e diversos mostos naturais sem qualquer adição de azoto e os tempos totais das fermentações foram comparados com os valores de  $P_{20-70}$ . Às fermentações mais longas corresponderam os valores mais elevados de  $P_{20-70}$  e foi encontrada uma boa relação entre estes dois parâmetros.

A quantificação das exigências em azoto tem particular interesse no caso dos mostos com deficiências em azoto porque, naquelas condições, a duração da fermentação está

francamente relacionada com a capacidade das leveduras de assimilarem eficientemente o azoto.

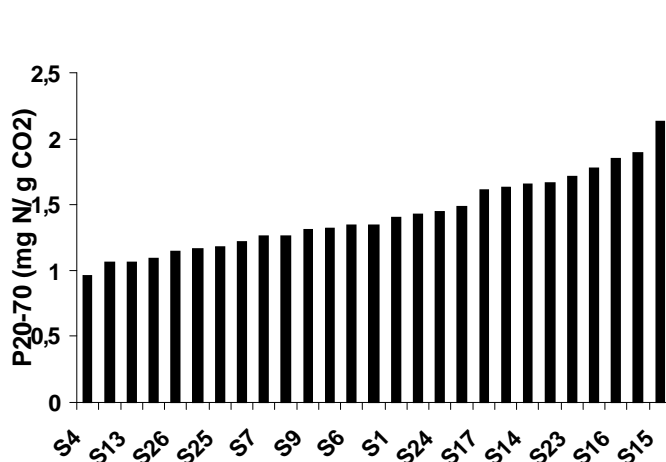


Figura 8 : Diferenças das necessidades em azoto entre estirpes. [11]

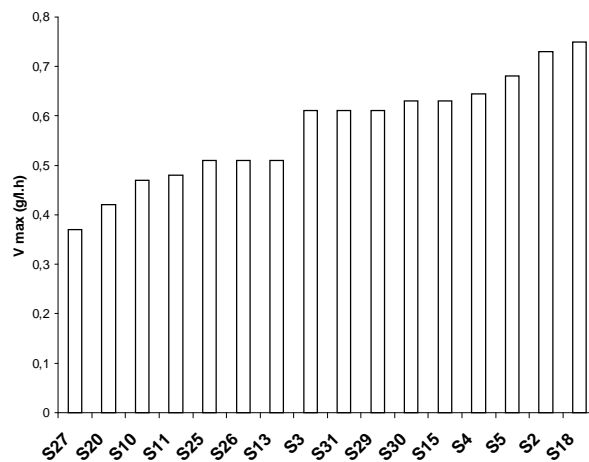


Figura 9: Diferenças das necessidades em oxigénio entre estirpes. [11]

### Necessidades em oxigénio

Para comparar as necessidades das leveduras em oxigénio decorreram fermentações num meio sem ar e sem qualquer crescimento anaeróbico. Nessas condições, a cultura ficou muito limitada em oxigénio. Devido à ausência de oxigénio e de factores de crescimento anaeróbicos, e contrariamente ao que é usual nas condições enológicas onde o crescimento é limitado pelo azoto, o crescimento foi limitado pelo oxigénio. Em consequência, independentemente da estirpe a população celular máxima foi muito baixa. Os valores máximos de produção  $(dCO_2/dt)_{max}$  de  $CO_2$ , relacionados com a população celular máxima também foram baixos mas, curiosamente foram muito diferentes dependendo da levedura (fig.8) variando entre 0.38 to 0.78 g/l.h. Assim a capacidade de fermentação na ausência de oxigénio parece também ser dependente da levedura, certamente relacionada com a aptidão celular para diluir as suas reservas lipídicas durante a fase de crescimento.

Para estimar o interesse tecnológico destas medições decorreram algumas experiências usando-se mostos naturais. Escolhemos mostos que conduziram a fermentações com final lento e comparamos duas estirpes seleccionadas com cinéticas de fermentação bastante diferentes em condições anaeróbicas. A fermentação foi mais curta e a viabilidade final foi maior com a estirpe que conduziria a um valor mínimo de  $(dCO_2/dt)_{max}$  e à menor população celular. Isto confirma os resultados obtidos com os meios sintéticos e indica que os valores baixos de 0.38 a 0.78 g/l.h e as baixas populações celulares são mais favoráveis para manterem uma boa viabilidade celular no fim da fermentação limitando o risco de fermentações com final lento e paragens de fermentação. De facto, nessas condições, valores baixos de  $(dCO_2/dt)_{max}$  parecem ser preferíveis, certamente porque correspondem a uma divisão celular e também a uma diluição lipídica moderadas. Consequentemente haverá uma melhor viabilidade celular no fim da fermentação.



## EM CONCLUSÃO...

As deficiências em oxigénio e azoto não são os únicos mecanismos que conduzem a paragens de fermentação ou a fermentações com final lento mas são, sem dúvida alguma, os seus principais responsáveis.

- A adição destes dois nutrientes tem já sido praticada há muito tempo, mas nem sempre de forma eficiente devido ao mau controlo destas adições, especialmente o seu momento de aplicação. De facto, mesmo pensando-se não ser de difícil execução, estas adições necessitam de um mínimo de atenção para serem suficientemente eficazes e evitarem consequências negativas. Geralmente, mesmo outras operações básicas como a rehidratação das leveduras, são supostamente bem controladas, mas infelizmente, nem sempre é o caso.

- O risco de fermentações paradas ou com final lento pode também ser diminuído através do aumento do nível de inoculo ou através da adição de nutrientes de fermentação contendo não só azoto amoniacal, mas também outros nutrientes como a tiamina, leveduras inactivas etc. Quando se usam estes produtos deverá haver atenção redobrada na escolha do momento da adição.

- A escolha da estirpe de levedura é importante. No caso de mostos difíceis de fermentar é preferível (i) recorrer-se à utilização de estirpes com boa capacidade fermentativa ou (ii) ter muito cuidado com a gestão do oxigénio e das adições azotadas.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Alexandre, H. and Charpentier, C., 1999. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J. Ind. Microb. Biotechnol.*, 20, 20-27.
2. Bisson, L. F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 107-117.
3. Blateyron L. and Sablayrolles J.M., 2001. Stuck and slow fermentations in enology : statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *J. Biosc. Bioeng.*, 91, 184-189.
4. Bely M., Sablayrolles J.M. and Barre P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Ferm. Bioeng.*, 70(4), 246-252.
5. Lafon-Lafourcade S., Geneix C. and Ribereau Gayon P., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape musts by fatty acids produced by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1246-1249.
6. Sablayrolles J.M. and Barre P., 1986. Evaluation des besoins en oxygène de fermentations alcooliques en conditions oenologiques simulées. *Sci. Aliments*, 6, 373-383.
7. Sablayrolles J.M., Dubois C., Manginot C., Roustan J.L. and Barre P., 1996. Effectiveness of ammoniacal nitrogen and oxygen combined additions during sluggish and stuck wine fermentations. *J. Ferm. Bioeng.*, 82 (4), 361-365.
8. Blateyron L., Aguera E., Dubois C., Gerland C. and Sablayrolles J.M., 1998. Control of oxygen additions during alcoholic fermentations. *Vitic. Enol. Sci.*, 53(3), 131-135.
9. Blateyron L., Julien A., Sablayrolles J.M., 2000. Stuck fermentations. O<sub>2</sub> and nitrogen requirements. Importance of optimizing their addition. Lallemand-Research meeting, Vienne (Autriche), 3-4 mai.
10. Manginot C., Sablayrolles J.M., Roustan J.L., Barre P., 1997. Use of constant rate fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enz. Microb. Technol.*, 20(5), 373-380.
11. Julien A., Roustan J.L., Dulau L., Sablayrolles J.M., 2000. Characterization of enological yeast strains : Evaluation of their nutritive requirements in nitrogen and oxygen. Annual meeting of the American Society of Enology and Viticulture. Seattle (USA), 18 –22 juin.