

Avaliação de mosto de uva fermentado

Evaluation of fermented grape must

Maria Eugênia de Oliveira MAMEDE^{1*}, Gláucia Maria PASTORE²

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar a concentração de compostos voláteis nos mostos de uva Chardonnay e Pinot Noir fermentados pela *Pichia membranaefaciens*, como também analisar as fases de crescimento da levedura durante a fermentação a 15 e 20 °C. Compostos voláteis majoritários da fermentação como: etanol, acetato de etila, acetato de isoamila, acetaldeído, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico foram isolados e quantificados pelo sistema de "Purge and Trap". A fermentação conduzida a 15 °C mostrou ser mais adequada na produção de acetato de etila, com valores inferiores a 200 mg.L⁻¹ (131,3 e 147,0 mg.L⁻¹) nos mostos Pinot Noir e Chardonnay, respectivamente, enquanto que a 20 °C a produção foi de 286,0 e 270,0 mg.L⁻¹ nos mostos Pinot Noir e Chardonnay, respectivamente.

Palavras-chave: compostos de aroma; fermentação; *P. membranaefaciens*; "Purge and Trap"; vinho.

Abstract

The aim of this study was to determine the concentration of volatile compounds in Chardonnay and Pinot Noir grape musts. The study also aims to analyze yeast growth phases during fermentation at 15 and 20 °C. Major volatile compounds of fermentation such as ethanol, ethyl acetate, isoamyl acetate, acetaldehyde, 1-propanol, 3-methyl butanol and 2-methyl butanol were isolated and quantified using the Purge and Trap system. Fermentation carried out at 15 °C was more appropriate in the production of ethyl acetate (131.3 and 147.0 mg.L⁻¹ in the Pinot Noir and Chardonnay musts, respectively), whilst at 20 °C the production was of 286.0 and 270.0 mg.L⁻¹ in the Pinot Noir and Chardonnay musts respectively.

Keywords: aroma compounds; fermentation; *P. membranaefaciens*; purge and trap; wine.

1 Introdução

Diferentes leveduras como as do gênero *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Candida*, *Hansenula*, *Hanseniospora* e *Pichia* entre outras, em conjunto com a *Saccharomyces cerevisiae* podem iniciar a fermentação do mosto de uva e dar origem ao vinho. Embora as leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae* participem apenas do início da fermentação, elas exercem grande contribuição para a qualidade do aroma do vinho pela capacidade de produzir ésteres e álcoois em concentração superior às leveduras *Saccharomyces cerevisiae*^{1,4}.

A qualidade sensorial do vinho é o mais importante fator durante a sua fabricação. O aroma do vinho é formado pela presença de compostos voláteis que impressionam o sistema olfativo. MAMEDE, CARDELLO e PASTORE⁵ avaliaram a qualidade sensorial de diferentes mostos de uvas fermentados. O aroma do mosto de uva fermentado pela *Pichia membranaefaciens* teve a maior aceitação e intenção de compra.

ROJAS et al.⁹ mostraram que a mistura de culturas de *Saccharomyces cervisiae* and *Pichia anomola* teve um grande efeito na produção de ésteres durante a fermentação de mosto de uva.

PLATA et al.⁸ estudaram a formação de ésteres como acetato de etila e acetato de isoamila por diferentes leveduras.

Pichia membranaefaciens produziu baixas concentrações destes ésteres quando comparado a outras leveduras.

Recentemente, MAMEDE e PASTORE⁶ avaliaram o comportamento do crescimento e a produção de compostos voláteis de aroma em mostos de uvas após a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* e *Kloeckera apiculata*. Compostos como acetato de etila, acetato de isoamila, isobutanol foram identificados e quantificados. Mosto fermentado pela *Kloeckera apiculata* apresentou concentrações dentro de limites aceitáveis para vinho.

Este estudo procurou avaliar a produção de compostos voláteis de aroma produzidos em mostos de uva fermentados pela *Pichia membranaefaciens*, e também analisar as fases de crescimento da levedura durante a fermentação por 7 dias a 15 e a 20 °C.

2 Material e métodos

2.1 Isolamento e identificação

Pichia membranaefaciens isolada da região central do Brasil foi identificada de acordo com VAN DER WALT e YARROW¹¹. O isolamento ocorreu em placa de Petri contendo meio "yeast malt" (1% de glicose; 2% de agar; 0,5% de peptona; 0,3% de malte e 0,3% de extrato de levedura). As colônias foram selecionadas com base em sua morfologia e repicadas novamente. O isolado foi mantido em meio descrito acima, com sucessivos repiques de 15 em 15 dias até a sua identificação.

2.2 Condição de fermentação

A fermentação foi iniciada após a inoculação de 1×10^7 células.mL⁻¹ em erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de mosto

Recebido para publicação em 10/5/2006

Aceito para publicação em 23/4/2007 (001748)

¹ Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, R. Jeremoabo, s/n, CEP 40170-115, Ondina, Salvador - BA, Brasil, E-mail: mmamede@ufba.br

² Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, R. Monteiro Lobato, 80, CP 6121, CEP 13083-970, Cidade Universitária, Campinas - SP, Brasil

*A quem a correspondência deve ser enviada

filtrado em membrana Millipore (poro de 0,22 μm). As amostras foram incubadas a 15 °C e a 20 °C por 7 dias, com agitação a 100 rpm. Após 168 h de fermentação os mostos foram filtrados usando uma membrana Millipore (poro de 0,22 μm). A concentração celular expressa em massa seca foi quantitativamente determinada através de secagem destas membranas a 100 °C por 24 horas. O mosto livre de células foi levado ao Freezer a -10 °C até o início da realização das análises cromatográficas. As fermentações foram realizadas em triplicata.

2.3 Análise dos compostos voláteis

Os compostos voláteis foram isolados pelo sistema Purge and Trap concentrator/Dynamic Headspace, model HP-(G1900-60500), usando as condições descritas por MAMEDE, CARDELLO e PASTORE⁵.

O cromatógrafo gasoso HP-G 1908-60500 (FID) foi equipado com uma coluna capilar HP-Innowax (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), de fase ligada polietilenoglicol. O gás de arraste utilizado foi o hélio a 1 mL/minuto. A programação da temperatura da corrida cromatográfica foi: 35 °C/5 minutos, rampa: 3 °C/minuto \rightarrow 140 °C \rightarrow 180 °C/5 minutos., temperatura do detector: 250 °C e temperatura do injetor: 200 °C. O modo de injeção foi do tipo splitless (para quantificação) e split (split razão, 1:100 para identificação). A identificação foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu – (EM) QP 5000 (Espectrometria de massas) nas mesmas condições citadas acima.

A quantificação foi realizada pelo método de padronização, assim como feito por ROSILLO et al.¹⁰, usando gráficos de padrões de voláteis correspondentes à Sigma-Aldrich e Merck.

2.4 Análise da composição dos mostos Chardonnay e Pinot Noir não fermentados

As determinações de concentração de nitrogênio amoniacal/ NH_4 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), açúcar ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), dióxido de enxofre livre ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), dióxido de enxofre total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), acidez total ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), acidez volátil ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), % de álcool e o valor de pH dos mostos utilizados neste trabalho foram executados de acordo com o proposto por MAMEDE e PASTORE⁶.

3 Resultados e discussão

3.1 Composição dos mostos Chardonnay e Pinot Noir não fermentados

As composições dos mostos (dados não mostrados) estavam em condições adequadas para iniciar as fermentações, apresentando valores de composição e pH dentro de limites aceitáveis estabelecidos por MAMEDE e PASTORE⁶.

3.2 Variação do crescimento celular nos mostos de uvas Chardonnay e Pinot Noir

As concentrações celulares durante as fermentações a 20 °C e a 15 °C do mosto Chardonnay estão representadas na Figura 1. Seus valores expressos em massa seca no final das fermentações (168 horas) a 20 e a 15 °C foram de 11,6 e de 10,6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,

respectivamente. O mesmo comportamento foi observado na fermentação no mosto Pinot Noir (Figura 2), com valores finais a 20 e a 15 °C iguais a 11,2 e 10,2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

O período de maior crescimento a 20 °C aconteceu nas 96 horas iniciais da fermentação. Após este período, houve um declínio da velocidade, mas de 96 a 120 horas continuou havendo crescimento (Figura 1), correspondendo à fase estacionária. Em 120 horas de fermentação, o crescimento estagnou, correspondendo à fase estacionária. A concentração celular obtida no mosto Pinot Noir foi de 11,2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mesmo valor encontrado em 168 horas de fermentação. O mesmo comportamento foi observado no mosto Chardonnay.

A fermentação conduzida a 15 °C mostrou ser rápida e brusca nas 72 horas iniciais da fermentação. Nos dois mostos estudados a fase de crescimento atingiu as 144 horas de fermentação. Este comportamento de fermentação de mosto de uva pela *Pichia membranaefaciens* também foi observado por LEMA et al.⁴.

O valor de pH inicial, que era de 3,20 durante a fermentação, caiu para 2,7 a 20 °C, enquanto que na fermentação a 15 °C o pH final chegou a 2,8. Dados semelhantes foram observados em mostos fermentados por *Kloeckera apiculata* e *Saccharomyces cerevisiae*⁶.

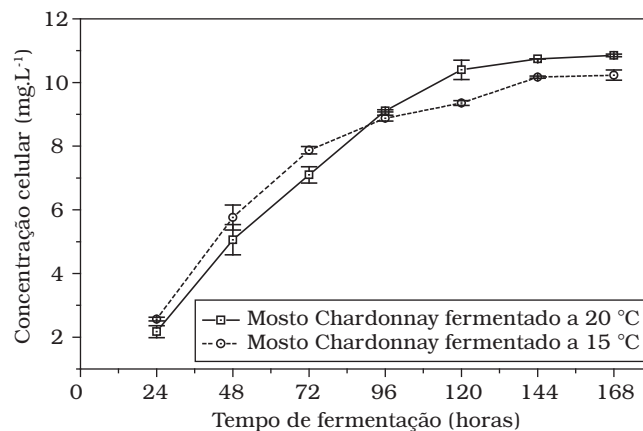


Figura 1. Concentração celular expressa em massa seca, da fermentação pela *Pichia membranaefaciens* em mosto Chardonnay.

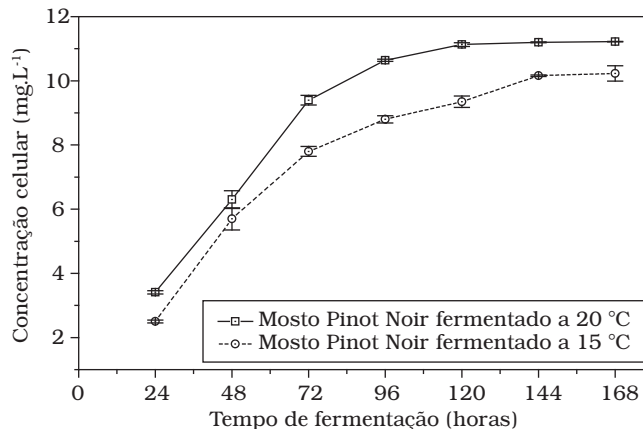


Figura 2. Concentração celular expressa em massa seca, da fermentação pela *Pichia membranaefaciens* em mosto Pinot Noir.

3.3 Quantificação dos compostos voláteis após a fermentação

Os resultados de quantificação dos compostos voláteis majoritários são mostrados na Tabela 1. Os compostos majoritários da fermentação foram: etanol, acetato de etila, acetato de isoamila, acetaldeído, 1-propanol, isobutanol e álcool isoamílico.

Não houve grandes variações da produção dos compostos quantificados entre os mostos Chardonnay e Pinot Noir. A temperatura de fermentação exerce grande influência na produção de voláteis. A fermentação a 20 °C favorece a produção de uma maior concentração dos compostos voláteis majoritários de aroma do que a fermentação a 15 °C.

As concentrações de acetato de etila nas amostras 1 e 2 (amostras de mosto de uva fermentadas a 20 °C) diferiram significativamente das amostras 3 e 4 (amostras de mosto de uva fermentadas a 15 °C). O acetato de etila tem um papel importante na qualidade do aroma de um vinho. A concentração de acetato de etila não deve ultrapassar 200 mg.L⁻¹, pois concentrações superiores resultam na formação de odor semelhante a solvente, ou seja, desagradável². As fermentações conduzidas a 20 °C produziram concentrações superiores a 200 mg.L⁻¹ de acetato de etila. Portanto, nesta temperatura, a quantidade deste composto formado não é positiva para a qualidade do aroma do vinho.

Compostos como o acetato de isoamila e o etanol apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação às temperaturas de fermentação, mas não em relação aos mostos de uva em fermentação.

O 1-propanol foi o único composto que não deferiu estatisticamente, nem em relação ao mosto de uva e nem em relação às temperaturas de fermentação. Este resultado também foi observado nos mesmos mostos de uva fermentados pela *Kloeckera apiculata* e *Saccharomyces cerevisiae*⁶. GAROFOLO, MORASSUT e CIOLFI² verificaram que a produção de 1-propanol em vinho não deve ultrapassar 27 mg.L⁻¹. Portanto os dados aqui obtidos para este álcool (Tabela 1) estão condizentes com trabalhos anteriores.

Em relação à produção de acetaldeído e isobutanol, as amostras apresentaram diferenças estatísticas tanto em relação à variedade do mosto de uva quanto em relação às temperaturas de fermentação.

MAMEDE, CARDELLO e PASTORE⁵ verificaram através de teste sensorial de aceitação, que o aroma de amostras de

mostos de uvas fermentados pela *P. membranaefaciens* a 15 °C tiveram a mais alta média de aceitação 5,50 (que corresponde ao conceito "gostei ligeiramente").

HUANG, LEE e CHOU³ estudaram a produção de 2-feniletanol pela *P. fermentans*. As leveduras deste gênero são capazes de produzir 2-feniletanol. O composto 2-feniletanol influencia na qualidade do sabor e no aroma do vinho e de outras bebidas alcoólicas. Pelo sistema automático "Purge and Trap Concentrator/Dynamic Headspace" não foi possível detectar a formação de 2-feniletanol. MAMEDE e PASTORE⁷ constaram que a técnica utilizada para extração dos voláteis não mostrou ser eficiente para extração de compostos de alto ponto de ebulição. Mesmo utilizando a técnica de isolamento (líquido-líquido), que mostrou ser eficiente para isolar compostos de alto ponto de ebulição, não foi possível detectar a formação de 2-feniletanol. Outra hipótese para a não detecção de 2-feniletanol seria a presença insuficiente de fenilalanina nos mostos, pois a produção de 2-feniletanol foi observada com um mínimo de 0,10% de fenilalanina no meio de fermentação³.

4 Conclusão

As leveduras do gênero *Pichia* participam das fermentações espontâneas por fazerem parte da microflora da uva, por isso foram avaliados mostos de uva fermentados por cultura pura de *Pichia membranaefaciens* sob duas temperaturas de fermentação. A fermentação conduzida a 15 °C produz uma quantidade de acetato de etila que não causa odor desagradável, quando se comparou a quantidade deste composto nos mostos fermentados a 20 °C. A contribuição de leveduras que não são convencionais à produção de vinho pode vir a ser importante quando se analisam os compostos voláteis de aroma formados durante a fermentação. É importante no futuro verificar a fermentação conduzida pela combinação da *Pichia membranaefaciens* com a *Saccharomyces cerevisiae* em fermentadores a 15 °C.

Não foi possível, nas condições de fermentação citadas neste estudo, detectar a produção de 2-feniletanol. O composto pode não ter sido isolado pelo sistema de "Purge and Trap" ou a quantidade de fenilalanina no meio foi insuficiente para sua formação.

Agradecimentos

As autoras agradecem à Chandon do Brasil S/A pela assistência e doação das amostras de mosto Chardonnay e Pinot Noir e ao CNPq pelo financiamento.

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

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

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 ≤ 0,05).

Referências bibliográficas

1. FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Growth during fermentation. In: **Wine microbiology and biotechnology**, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, p. 27-54, 1994.
2. GAROFOLO, A.; MORASSUT, M.; CIOLFI, G. Composizione della base spumante in relazione al metabolismo di stîpiti di specie diverse. **Indu. Bell Devan.**, v. XIX, p. 388-393, 1990.
3. HUANG, C. J.; LEE, S. L.; CHOU, C. C. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. **Food Res. Int.** v. 34, n. 4, p. 277-282, 2001.
4. LEMA, C.; GRACIA-JARES, C.; ORRIOLS, I.; ANGULO, L. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 47, p. 206-216, 1996.
5. MAMEDE, M. E. O.; CARDELLO, H. M. A. B.; PASTORE, G. M. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: Sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. **Food Chem.** v. 89, n 1, p.63-68, 2005.
6. MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação da produção dos Compostos majoritários da Fermentação de Mosto de Uva por Leveduras Isoladas da Região da "Serra Gaúcha" (RS). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 24, n. 3, p. 453-458, 2004.
7. MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Study of methods for the extraction of volatile compounds from fermented grape must. **Food Chem.**, v. 96, n. 4, p. 586-590, 2006.
8. PLATA, C.; MILLÁN, C.; MAURICIO, J. C.; ORTEGA, J. M. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. **Food Microbiol.**, v. 20, n. 2, p. 217-224, 2003.
9. ROJAS, V.; GIL, J. V.; PIÑAGA, F.; MANZANARES, P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 70, n. 3, p. 283-289, 2001.
10. ROSILLO, L.; SALINAS, M.R.; GARIJO, J.; ALONSO, G. L. Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analyses. Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties. **J. Chromatogr.**, v. 847, n. 1-2, p. 155-159, 1999.
11. VAN DER WALT, J. P.; YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: **The yeasts, a taxonomic study**, Elsevier, Amsterdam, p. 45-103, 1984.