

BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo

Vol. 16

Campinas, dezembro de 1957

N.º 18

O EMPRÊGO DE LEVEDURAS SELECIONADAS NA FERMENTAÇÃO DO VINHO (*)

ODETTE ZARDETTO DE TOLEDO, *engenheiro-agrônomo, Seção de Viticultura e* CYRO G. TEIXEIRA, *engenheiro-agrônomo, Laboratório de Microbiologia, Seção de Tecnologia Agrícola, Instituto Agrônomo*

RESUMO

Ensaios foram realizados para estudar o comportamento de 25 leveduras na fermentação vinária, com o objetivo de selecionar aquelas que pudessem influir na obtenção de vinhos com grau alcoólico satisfatório e teores de ácidos voláteis e aldeído acético baixos. Os resultados obtidos mostraram que as leveduras n. 13, 14, 16, 25, 20, 15, 4, 3, 2 e 17 atingiram essa finalidade, podendo servir como ponto de partida para novas observações nas cantinas industriais.

1 — INTRODUÇÃO

É prática comum, entre os produtores de vinho em nosso país, proceder apenas à fermentação espontânea do mosto sulfitado.

Embora a ação do metabissulfito de potássio seja a de inibir o desenvolvimento de grande parte dos microrganismos prejudiciais, encontrados naturalmente no mosto de uva, a microflora que ainda permanece ativa é bastante heterogênea e pode ser responsável pela variação de qualidade observada nos vinhos das diferentes safras. Nos anos de condições desfavoráveis, prevalecerá uma microflora com predominância de organismos indesejáveis, resultando na obtenção de vinhos inferiores.

Outro problema que se nos depara é o da variedade de uva empregada na vinificação. Nos países europeus, a predominância de viníferas constitui, só por si, uma garantia de bons vinhos. Entretanto, em nosso meio, onde as viníferas se desenvolvem mal, temos que recorrer às variedades americanas ou aos híbridos entre viníferas e americanas, cujo mosto, geralmente, apresenta qualidades inferiores àquele das viníferas. Adotar o processo de fermentação espontânea nesse mosto é acrescentar mais um fator

(*) Trabalho apresentado ao VIII Congresso Internacional de Viticultura e Enologia, realizado em Santiago do Chile, de 22 de abril a 2 de maio de 1956.

Recebido para publicação em 28 de agosto de 1957.

indesejável à obtenção de bons vinhos. Se a microflora dominante fôr pouco satisfatória, iremos fatalmente obter produto de má qualidade.

À vista do exposto, seria interessante que, ao lado de um programa de melhoramento da nossa matéria prima, isto é, da criação de novas variedades de uvas com melhores características do que as atualmente cultivadas, fôsse executado também um plano de seleção de leveduras que pudesse concorrer para melhorar o processo de vinificação.

O emprêgo de culturas de fermentos selecionados, com as características desejadas para a produção de determinado tipo de vinho, oferece uma série de vantagens largamente apontadas por diversos pesquisadores. Pelo uso destas leveduras na fermentação do mosto de uva, é possível conseguirem-se, de ano para ano, produtos mais uniformes, sendo as pequenas variações devidas à oscilação do mosto, conforme as condições climáticas que caracterizam os diversos anos, como também às variações na temperatura de fermentação, quando esta é realizada em salas onde não haja sistema de seu contrôle.

Da estirpe de levedura selecionada, utilizada na fermentação de mostos convenientemente sulfitados, vai depender, em grande parte, a composição do vinho resultante. Assim, algumas raças de leveduras vínicas produzem vinhos com maior teor alcoólico, outras produzem mais aldeídos, mais ácidos voláteis etc..

Gomes (6), estudando a microflora duriense, se refere a uma levedura que denominou Douro 72, capaz de produzir grande quantidade de ésteres a partir dos açúcares do mosto (glucose e levulose), possuindo, entretanto, diminuta capacidade de produção de álcool etílico. Nunes (8) realizou também um esboço de estudo das leveduras vínicas portuguesas com a finalidade de conhecer o valor enológico de cada uma delas e estabelecer policulturas a partir das leveduras que apresentassem as características desejadas na elaboração de determinado tipo de vinho.

Trabalho realizado por Gallay, Benvegnin e Capt (5), sôbre o efeito das leveduras selecionadas nos caracteres dos vinhos, levaram-nos às seguintes conclusões:

a) os vinhos obtidos a partir de mostos de igual composição, semeados com leveduras diversas, apresentam características distintas à degustação que não podem ser consideradas como obras do acaso;

b) bons resultados oriundos da utilização de culturas de fermentos selecionados, só poderão ser conseguidos por meio de uma sulfitação adequada do mosto, para evitar o desenvolvimento da flora indígena, responsável por caracteres indesejáveis;

c) o emprêgo de leveduras selecionadas deve ser considerado como uma medida enológica indispensável, destinada, na pior das hipóteses, a evitar o retardamento da fermentação de mostos sulfitados e assegurar completa fermentação dos açúcares.

Amerine (2) também admite que o aroma desejado e o controle dos demais componentes dos vinhos poderão ser obtidos pelo uso de culturas mistas de fermentos selecionados. Por meio de antissépticos seletivos e de estimulantes é possível inibir o crescimento dos microrganismos indesejáveis e, ao mesmo tempo, estimular o crescimento dos desejáveis. Ter-se-ão, dêsse modo, fermentações completamente controladas.

Rankine (12) estudou o problema referente ao uso de culturas de fermentos selecionados pelos vinicultores australianos, verificando que esta prática era adotada por 75% dêsses produtores. Rankine (11) estudou também os produtos resultantes da fermentação de mosto de uva por meio de 44 estirpes de fermentos nas temperaturas de 12, 25 e 35°C, chegando às seguintes conclusões:

a) dependendo da estirpe de fermento selecionado utilizada, o teor alcoólico do mosto fermentado variou entre 8 a 15% em volume, a 25°C;

b) a produção de álcool foi ligeiramente mais elevada nos mostos fermentados a 15°C;

c) algumas estirpes produziram maior acidez volátil a 25°C do que a 15 ou 35°, porém, a acidez fixa e o pH permaneceram mais ou menos invariáveis;

d) de onze estirpes estudadas, duas produziram teor elevado de aldeído acético, particularmente a 15°C.

Em virtude dos resultados obtidos por êsses autores, resolvemos levar avante um programa de isolamento de leveduras nativas, em diversas regiões vinícolas do Brasil, a fim de estudá-las separadamente.

Os mostos foram obtidos de uvas provindas de quatro localidades diferentes, a saber: Campinas e Jundiaí, no Estado de São Paulo, Parreiras, no Estado de Minas Gerais, e Bento Gonçalves, no Estado do Rio Grande do Sul. Dos isolamentos feitos, separamos para nossa experiência apenas as culturas de *Saccharomyces*, num total de 23. Para estudos comparativos, ensaiamos também duas estirpes de fermentos vînicos de procedência estrangeira.

2 — MATERIAL E MÉTODO

Utilizamos suco de uva pasteurizado, preparado no laboratório, constituído por uma mistura de 50% de uvas da variedade Seibel 7053 e 50% Seibel 10096. O Brix do suco obtido foi 20°, medido a 20°C. Adicionamos açúcar de cana a fim de elevar o Brix para um valor ao redor de 24°.

Após correção do Brix, distribuímos porções de 500 ml de suco em frascos Erlenmeyers de 1.000 ml tamponados com algodão. A esterilização foi realizada em autoclave, com vapor fluente, durante 45 minutos. No mosto resfriado, determinou-se o teor em açúcar, acidez total e volátil, pH e nitrogênio. O teor de nitrogênio total foi de 0,096 g/100 ml. A acidez volátil do suco esterilizado foi um tanto elevada, resultante talvez do transporte relativamente demorado, em condições de alta temperatura. O pé de fermentação foi preparado em tubos de cultura, semeando-se 10 ml de suco esterilizado com uma alça de cultura pura do fermento a ser tratado. Os fermentos submetidos a teste foram os seguintes (tratamentos) :

- 1 — *Saccharomyces cerevisiae*?
Origem: híbrido Seibel 7953. Jundiaí, São Paulo.
- 2 — *Saccharomyces oviformis*
Origem: híbrido I.A.C. 74-1 (Seibel 10096 x Syrah) Campinas, São Paulo.
- 3 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido I.A.C. 74-1 (Seibel 10096 x Syrah) Campinas, São Paulo.
- 4 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido I.A.C. 74-8 (Seibel 10096 x Syrah) Campinas, São Paulo.
- 5 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido I.A.C. 164-20 (Niágara rosada x Moscatel rosada) Campinas, São Paulo.
- 6 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido I.A.C. 116-22 (Seibel 7053 x Burgunder Kastenholtz) Campinas, São Paulo.
- 7 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido I.A.C. 116-22 (Seibel 7053 x Burgunder Kastenholtz) Campinas, São Paulo.
- 8 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: Moscatel. University of Wisconsin n. 1, U.S.A.
- 9 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido I.A.C. 124-11 (Seibel 7053 x Merlot) Campinas, São Paulo.
- 10 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: Pennsylvania State College, U.S.A.
- 11 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido Seibel 7053. Jundiaí, São Paulo.
- 12 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido Seibel 10076. Campinas, São Paulo.

- 13 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido Seibel 11342. Campinas, São Paulo.
- 14 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido Seibel 8745. Campinas, São Paulo.
- 15 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: Pinot Chardonnay. Jundiaí, São Paulo.
- 16 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido Seibel 7053. Campinas, São Paulo.
- 17 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido I.A.C. 16-2 (Seibel 11342 x Moscatel de Hamburgo) Campinas, São Paulo.
- 18 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: Peverella. Bento Gonçalves, Rio Grande Sul.
- 19 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: Peverella. Bento Gonçalves, Rio Grande Sul.
- 20 — *Saccharomyces chevalieri*
Origem: Trebbiano. Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul.
- 21 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: híbrido Seibel 7053. Campinas, São Paulo.
- 22 — *Saccharomyces chevalieri*?
Origem: híbrido I.A.C. 74-7 (Seibel 10096 x Syrah)
Campinas, São Paulo.
- 23 — *Saccharomyces fructuum*
Origem: Semillon Jaune. Jundiaí, São Paulo.
- 24 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: mistura de variedades. Parreiras, Minas Gerais.
- 25 — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*
Origem: Rosati. Jundiaí, São Paulo.

A seguir colocamos os tubos já semeados em estufa a 30°C durante 24 horas; decorrido êsse tempo, semeamos os frascos com os 10 ml de cultura de fermento, em câmara asséptica a fim de evitar possíveis contaminações. Uma vez semeados, foram os frascos colocados em estufa a 30°C. Passados 40 dias procedeu-se à análise do mosto fermentado. O desenvolvimento do processo fermentativo foi observado pela pesagem dos frascos em intervalos de 48 horas. No mosto fermentado determinamos o teor alcoólico, acidez total e volátil, os açúcares totais, o extrato sêco, o aldeído acético e o pH.

A acidez total foi expressa em ml de NaOH 0,1N necessários para titular 10 ml de mosto fermentado, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

As determinações de açúcares totais foram efetuadas pelo método de Eynon-Lane, de acôrdo com a técnica preconizada por Amerine (1) sendo expressos em g/100 ml.

QUADRO 1.—Dados analíticos (*) obtidos na fermentação do suco de uva, empregando-se vinte e cinco estirpes diferentes de fermento alcoólico

Fermento	Acidez volátil (**)		Acidez total (**)		Aldeídos	Alcool	Açúcares redutores		pH		Brix			
	Inicial	Final	Inicial	Final			Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
nº	ml	ml	ml	ml	mg/l	vol. %	g/100ml	g/100ml	g/100ml	g/100ml	g/100ml	g/100ml		
1	0,78	0,73	14,31	12,81	36,01	11,85	21,09	0,41	3,56	3,79	25,16	0,54		
2	0,78	0,61	14,31	12,55	37,60	11,90	21,09	0,43	3,56	3,80	25,16	0,57		
3	0,78	0,60	14,31	12,94	31,99	11,30	21,09	0,61	3,56	3,77	25,16	0,89		
4	0,78	0,57	14,31	13,13	30,30	11,31	21,09	0,62	3,56	3,77	25,16	0,92		
5	0,78	0,76	14,31	13,14	35,53	11,48	21,09	0,41	3,56	3,77	25,16	0,79		
6	0,78	1,00	14,31	13,55	45,98	11,55	21,09	0,42	3,56	3,81	25,16	0,70		
7	0,78	0,91	14,31	13,75	37,25	11,61	21,09	0,61	3,56	3,75	25,16	0,82		
8	0,78	0,90	14,31	14,20	59,51	10,31	21,09	2,50	3,56	3,75	25,16	3,36		
9	0,78	0,84	14,31	13,07	42,23	12,34	21,09	0,41	3,56	3,76	25,16	0,48		
10	0,78	0,69	14,31	14,05	34,32	11,17	21,09	0,75	3,56	3,72	25,16	1,30		
11	0,78	0,96	14,31	13,39	36,17	11,16	21,09	0,39	3,56	3,80	25,16	0,77		
12	0,78	0,66	14,31	11,95	30,82	10,62	21,09	1,42	3,56	3,76	25,16	2,03		
13	0,78	0,24	14,31	13,13	31,55	10,91	21,09	1,54	3,56	3,72	25,16	1,93		
14	0,78	0,39	14,31	12,80	40,95	11,61	21,09	0,53	3,56	3,79	25,16	0,67		
15	0,78	0,56	14,31	12,98	33,84	12,22	21,09	0,58	3,56	3,77	25,16	0,46		
16	0,78	0,40	14,31	12,92	35,84	10,53	21,09	2,03	3,56	3,73	25,16	0,73		
17	0,78	0,61	14,31	12,78	30,95	11,05	21,09	0,47	3,56	3,80	25,16	0,93		
18	0,78	1,06	14,31	12,62	39,71	11,64	21,09	0,40	3,56	3,82	25,16	0,69		
19	0,78	1,16	14,31	12,73	24,64	10,82	21,09	0,43	3,56	3,83	25,16	0,90		
20	0,78	0,50	14,31	12,92	28,20	11,50	21,09	0,67	3,56	3,75	25,16	1,14		
21	0,78	1,06	14,31	13,28	23,72	11,16	21,09	0,68	3,56	3,80	25,16	0,83		
22	0,78	1,06	14,31	13,67	28,75	11,18	21,09	0,43	3,56	3,77	25,16	0,85		
23	0,78	0,89	14,31	12,88	34,26	11,93	21,09	0,60	3,56	3,82	25,16	0,65		
24	0,78	0,90	14,31	13,10	29,64	11,55	21,09	0,50	3,56	3,80	25,16	0,75		
25	0,78	0,49	14,31	13,99	23,45	10,96	21,09	0,50	3,56	3,77	25,16	1,11		

(*) Médias de seis repetições.

(**) Em NaOH 1N/100ml

O teor alcoólico foi determinado pelo refratômetro de imersão, na mistura alcoólica resultante da destilação de 100 ml de mosto fermentado.

O extrato foi determinado pelo hidrômetro, conforme o método indicado por Amerine e Joslyn (3).

O método empregado na determinação do aldeído acético foi aquele recomendado por Jaulmes e Espezzel (7).

As experiências com as diversas leveduras consideradas foram executadas de modo a têmos sempre seis repetições de cada um dos diferentes tratamentos.

3 — APRECIÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos nas diferentes determinações estão registrados no quadro 1.

A análise estatística demonstrou que as leveduras se comportaram diferentemente na fermentação do suco de uva. Essa análise foi feita com relação ao teor alcoólico, à acidez volátil e ao teor em aldeído acético.

As análises da variância são apresentadas a seguir.

A) análise da variância para o teor alcoólico:

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F'
Entre as estirpes	24	36,6921	1,5288	1,13
Nas estirpes	125	169,2620	1,3541
Total	149	205,9541

$$F_{1\%} = 1,94$$

$$F_{5\%} = 1,60$$

De acôrdo com o teste de F, verifica-se que não houve diferença entre as leveduras com relação ao teor alcoólico.

B) análise da variância para a acidez volátil:

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F'
Entre as estirpes	24	8,7235	0,3635	11,12**
Nas estirpes	125	4,0829	0,0327
Total	149	12,8064

$$F_{1\%} = 1,94$$

$$F_{5\%} = 1,60$$

C) análise da variância para o aldeído acético:

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre as estirpes	24	8.449,0707	352,0446	3,02**
Nas estirpes	125	14.571,3001	116,5704
Total	149	23.020,3708

$$F_{1\%} = 1,94$$

$$F_{5\%} = 1,60$$

Para a acidez volátil, aplicando-se o teste de Tukey (4), foram selecionadas as seguintes leveduras, que apresentaram teores mais baixos: n. 13, 14, 16, 25, 20, 15, 4, 3, 2 e 17, cujas diferenças das médias foram inferiores a 0,38, ao nível de 5%.

Pôde-se notar que, durante a fermentação com determinadas leveduras, ocorreu uma redução na acidez volátil, isto é, a acidez volátil final foi mais baixa do que a inicial (quadro 1).

Esse fenômeno já tinha sido constatado por Reisch (13), que trabalhou com leveduras selecionadas em meios de culturas contendo doses crescentes de ácido acético.

Ventre (15) observou também o mesmo fenômeno quando estudava o efeito da adição de diferentes ácidos voláteis na fermentação do mosto de uva ou de meio sintético, esterilizados e semeados com uma cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Esse autor verificou que os ácidos voláteis experimentados desapareciam durante a marcha do processo fermentativo, dependendo da sua natureza e da sua concentração inicial a maior ou menor proporção daqueles.

Peynaud (9, 10) constatou que a rapidez de formação do ácido acético e queda da acidez formada variam de uma levedura para outra. Ele pôde distinguir leveduras que formam muito poucos ácidos voláteis, outras que formam relativamente bastante, e outras que provocam importantes e muito rápidas diminuições desses ácidos. Tais diminuições são devidas à redução do ácido acético em etanol, no curso da fermentação. Diversos observadores demonstram que o ácido acético se comporta como um aceitador de hidrogênio. Esse pesquisador verificou que as leveduras apresentam poderes redutores diferentes e tudo se passa como se houvesse uma redução do ácido acético. A quantidade de ácido formada é função do pH e da raça de levedura.

Aplicando o mesmo teste de Tukey (4) para selecionar as leveduras que apresentaram menores dosagens de aldeído acético,

obteve-se o valor de 22,85 ao nível de 5%. Tôdas as leveduras estudadas não apresentaram diferenças entre as médias, com exceção da n. 8.

O aldeído acético é um produto intermediário na fermentação alcoólica. Trillat (14) observou que a oxidação intensa enriquece muito o vinho em aldeído. Quando o arejamento é intenso, há tendência de se formar maior quantidade de aldeído livre e o vinho adquire o odor típico de vinho arejado. Quando isso se passa com os vinhos tintos, diz-se que êle tem o gôsto de ranço. Assim, o teor em aldeído do mosto fermentado tende a aumentar nos vinhos fortemente arejados.

4 — CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas experiências, em escala de laboratório, levaram-nos às conclusões seguintes:

a) as leveduras estudadas comportaram-se diferentemente durante o processo de fermentação do suco de uva;

b) algumas delas resultaram na obtenção de vinhos apresentando boas características, isto é, acidez volátil reduzida e bom teor alcoólico; relativamente ao teor em aldeído acético, apenas uma demonstrou ser diferente;

c) as leveduras que mostraram ser promissoras, e que poderiam ser experimentadas em escala industrial, são as n. 13, 14, 16, 25, 20, 15, 4, 3, 2 e 17, classificadas em ordem crescente conforme o teor de ácidos voláteis;

d) o emprêgo dessas leveduras na vinificação poderia contribuir para o melhoramento das qualidades dos vinhos nacionais.

THE BEHAVIOUR OF DIFFERENT YEAST STRAINS IN WINE FERMENTATION

SUMMARY

Experiments were carried out on laboratory scale to observe the behaviour of different strains of *Saccharomyces* on the wine constituents. The strains of yeasts were isolated from fermented juice of various varieties of grapes raised in three different regions of Brazil. The statistical analyses of the results showed that some of the strains behaved quite differently as far as volatile acids are concerned. Some of them produce wines, with low volatile acidity looking promising to be used successfully in industrial scale as a practice to improve wine quality and acceptance.

LITERATURA CITADA

1. AMERINE, M. A. Laboratory procedures for enology. Davis, University of California, 1952. 91 p. [Mimeografado]
2. ———— Some recent advances in enology. *Wines & Vines* 34 (12): 25-28. 1953; 35 (1): 29-30; 35 (2): 27-30. 1954.

3. _____ & JOSLYN, M. A. Table wines. The technology of their production in California. Berkeley and Los Angeles, University of California Press, 1951. 397 p.
4. FEDERER, W. J. Experimental design. New York, The Macmillan Co., 1955. xix, 544 p. + 47 p.
5. GALLAY, R., BENVENIGNI, L. & CAPT, E. L'effect des levures sélectionnées sur les caractères du vin. Rev. rom. Agric. 8 (9):69-71. 1952.
6. GOMES, J. V. MARQUES. Microflora duriense. Primeira comunicação. Leveduras produtoras de esterés. Ann. Inst. Vinho Pôrto 2:1-20. 1945. (Separata)
7. JAULMES, P. & ESPEZEL, P. Le dosage de l'acetaldehyde dans les vins et les spiritueux. Ann. Falsif., Paris 28:325-335. 1935.
8. NUNES, A. CAETANO. Estudos sôbre as leveduras vînicas portuguesas. In Anais da Junta Nacional do Vinho. Lisboa, 1950. p. 1-14. (Separata)
9. PEYNAUD, E. Contribution a l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins. Bordeaux, Faculté des Sciences, 1946. 93 p. [Tese]
10. _____ Sur la formation et la diminution des acides volatils pendant la fermentation alcoolique en anaérobiose. Ann. Ferment. 5:321-337; 385-401. 1940.
11. RANKINE, B. C. Quantitative differences in products of fermentation by different strains of wine yeast. Amer. J. Enology 6 (1):1-9. 1955.
12. _____ Yeast cultures in Australian wine making. Amer. J. Enology 6 (3):11-15. 1955.
13. REISCH, R. Zur Entstehung von Essigsäure bei der alkoholischen Gärung. Zbl. Bakt. (Abt. II) 14:572-581. 1905.
14. TRILLAT, A. L'aldéhyde acétique dans le vin. Ann. Inst. Pasteur 22:704, 876. 1908.
15. VENTRE, J. Acidité volatile et fermentation. Ann. Ferment. 3:447-465. 1937.