

ENARTIS NEWS • A NUTRIÇÃO DAS LEVEDURAS: O QUE É, COMO FAZER E QUANDO...

Uma gestão adequada da nutrição das leveduras engloba os fatores nutricionais essenciais necessários em determinada fase e o momento ideal da sua adição. As estratégias nutricionais devem ser igualmente adaptadas às condições de fermentação alcoólica e aos fatores que a antagonizam, porque diferentes práticas enológicas podem ter um impacto significativo na quantidade e na disponibilidade dos nutrientes presentes no mosto. Apenas pela dotação às leveduras da dosagem adequada de nutrientes e no momento adequado do seu ciclo de vida, é possível produzir vinhos limpos e de qualidade, minimizando eventuais efeitos aromáticos negativos da fermentação (H_2S , etc.).

AZOTO

A seguir à glucose e à frutose, o nitrogénio (ou azoto) é o fator nutricional mais importante para as leveduras. É utilizado na síntese de numerosas moléculas, essencialmente proteínas:

- proteínas estruturais, necessárias à formação de novas células;
- enzimas, necessárias para a manutenção dos processos metabólicos, incluindo a conversão do açúcar em álcool;
- proteínas de transporte localizadas nas membranas celulares, que regulam as trocas entre o exterior e o interior da célula.

Sem dúvida, a disponibilidade de azoto é um dos fatores de crescimento decisivos para estimular a multiplicação das leveduras e garantir um metabolismo de fermentação eficiente.

É sabido que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem apenas a capacidade de assimilar formas simples de azoto, como amónio, aminoácidos e pequenos péptidos constituídos por 2 - 5 aminoácidos.

A levedura assimilará estes compostos a diferentes cinéticas e quantidades, de acordo com uma escala de preferência: o amónio é consumido mais rapidamente que os aminoácidos, determinados aminoácidos são totalmente assimilados enquanto outros não o são de todo. Razão pela qual nos devemos referir ao Nitrogénio Facilmente Assimilável pela Levedura (NFA), para designar os compostos que podem ser efetivamente utilizados pela levedura.

As exigências em NFA variam de acordo com:

- Estirpe de levedura selecionada;
- Teor de açúcar do mosto: quanto maior o teor de açúcar, maior é a necessidade de NFA;
- Quantidade de biomassa: quanto maior a população levuriana, maiores as exigências em NFA.

As concentrações de NFA no mosto variam sendo frequentemente deficientes e insuficientes para atender às exigências nutricionais das leveduras. Quando a fase pré-fermentativa é longa, como é o caso da vinificação de brancos e maceração a frio de tintos, o crescimento de microrganismos indígenas provocam o esgotamento dos fatores nutricionais, incluindo o azoto.

Muitos autores estimam que o teor mínimo de NFA necessário para uma fermentação completa seja de 150 mg/L de NFA num mosto com 200 g/L de açúcares. Para além do conceito das exigências nutricionais básicas para uma fermentação regular e completa, com o intuito de “otimizar a qualidade sensorial do vinho”, as exigências de NFA podem aumentar para valores de 350 mg/L ou mesmo superiores.

AZOTO AMINOACÍDICO

Os aminoácidos são absorvidos pela célula através das proteínas de transporte presentes na membrana celular, que necessitam de energia para funcionar. O ião amónio inibe muitos destes sistemas de transporte, pelo que, quando adicionado ao mosto e quantidade elevada, atrasa ou até mesmo em alguns casos, impede a absorção de aminoácidos. O álcool inibe igualmente a absorção de aminoácidos. A captação de aminoácidos está associada ao transporte de um ou mais protões (H^+). A concentração de H^+ numa solução está relacionada com o seu pH: quanto maior o teor em protões, menor o valor de pH. No interior da célula de levedura, o pH é de aproximadamente 6-7 e deve manter-se neste intervalo para garantir um metabolismo normal. Na membrana celular a bomba de protões é ativada expulsando os protões para o mosto, mantendo o equilíbrio do pH intracelular. Durante a fermentação a produção de álcool torna a membrana celular progressivamente mais permeável ao H^+ , o que provoca a difusão passiva de protões para o interior da célula. As células de levedura tentam limitar a acidificação do pH intracelular bloqueando o transporte de aminoácidos.

Por este motivo, estrategicamente, a levedura apenas absorve aminoácidos nas fases iniciais da fermentação e unicamente na ausência de amónio. Uma vez transportados para o interior da célula, estes acumulam-se nos vacúolos, onde são armazenados constituindo uma reserva. Isto permite que as células de levedura possam utilizar os aminoácidos nas fases mais avançadas da fermentação, quando a presença do álcool inibe a sua absorção a partir do mosto.

Quando adicionar aminoácidos

De acordo com o descrito anteriormente, o ideal é que a suplementação de aminoácidos ocorra durante a hidratação da levedura ou imediatamente após a inoculação, evitando a adição simultânea de amónio. Incentivar a utilização de aminoácidos pela levedura tem o efeito de potenciar os aromas do vinho. De facto, os aminoácidos podem ser considerados precursores aromáticos, elementos constitutivos dos aromas secundários do vinho. Uma vez eliminado o grupo amínico, o esqueleto carbonílico do aminoácido pode ser eliminado pela célula sob a forma de álcool superior ou éster e contribuir para o aroma do vinho.

Como adicionar aminoácidos

Nutrientes de fermentação compostos por leveduras autolisadas são a única fonte de aminoácidos permitida em enologia.

AZOTO AMONIAICAL

Como os aminoácidos, o azoto amoniaco ou amónio, é assimilado através de um sistema de transporte ativo menos sensível ao álcool e que apenas é bloqueado na fase avançada da fermentação.

Quando adicionar amónio

Considerando a absorção preferencial do amónio pelas leveduras, é aconselhável adiar a sua suplementação até ao final da fase de crescimento exponencial, isto é, cerca de 1/3 da fermentação alcoólica. Nesta fase, o amónio é utilizado para sintetizar novas proteínas membranares intactas. A vida útil média das proteínas de transporte é de cinco a seis horas. Foi verificado que cinquenta horas após uma carência completa em azoto, as proteínas de transporte deixam de funcionar e as células de levedura interrompem a absorção do açúcar.

A adição de amónio na segunda metade da fermentação alcoólica pode ajudar a reverter o fenómeno de redução. No entanto, a quantidade deve ser moderada, pois a presença de amónio residual pode subsequentemente favorecer o crescimento de leveduras de contaminação, como *Brettanomyces*.

Como adicionar amónio

O amónio pode ser incorporado sob a forma de fosfato de diamónio (DAP) e sulfato de amónio, até um limite máximo de 1 g/L equivalente a aproximadamente 200 mg/L de NFA. A tendência comum é limitar a utilização de sulfato de amónio para evitar quantidades excessivas de sulfatos suscetíveis à redução em H₂S.

Conclusão, a utilização combinada de aminoácidos na inoculação de leveduras e de amónio a partir de 1/3 da fermentação alcoólica é preferível à utilização de uma única forma azotada e à adição numa dose única porque:

- A utilização de grandes quantidades de sais de amónio pode transferir ao vinho um gosto salgado semelhante a solvente;
- Uma adição elevada de azoto na inoculação estimula uma multiplicação excessiva das leveduras, provocando consequentemente, um aumento global das exigências em azoto. Além disto, uma elevada temperatura de fermentação resultante pode originar fermentações lentas ou a sua paragem.

FATORES DE SOBREVIVÊNCIA: ÁCIDOS GORDOS E ESTERÓIS DE CADEIA LONGA

A membrana celular é a barreira protetora que permite às leveduras o seu desenvolvimento e sobrevivência no ambiente hostil do vinho, que compreende pH ácido e a presença de substâncias tóxicas, como o anidrido sulfuroso e o próprio álcool. A membrana é composta por uma dupla camada de fosfolípidos anfipática onde os ácidos gordos de cadeia longa formam uma matriz na qual estão presentes esteróis e proteínas estruturais e de transporte. Para trocas regulares entre a célula e o meio externo, a membrana celular deve manter uma fluidez constante. A acumulação de álcool provoca a resistência da membrana e aumenta a permeabilidade da membrana aos prótons, levando à acidificação citoplasmática, morte celular e, consequentemente, à paragem da fermentação. Alguns estudos demonstraram que a perda de

fluidez membranar causada pelo álcool está correlacionada com a redução do teor de esteróis e com a diminuição do índice de insaturação dos ácidos gordos. De facto, em condições anaeróbicas, as leveduras são incapazes de sintetizar esteróis e ácidos gordos insaturados de cadeia longa. Portanto, a cada divisão celular o conteúdo destas substâncias é esgotado até se tornar um fator limitante para a multiplicação das leveduras e para a síntese de membranas.

Esta carência estimula a levedura a produzir os lípidos necessários à reconstituição da membrana, mas a escassez de oxigénio interrompe a via de síntese a um nível que leva à acumulação de intermediários tóxicos, como ácido acético e ácidos gordos de cadeia média. Em conclusão, a falta de ácidos gordos de cadeia longa e esteróis é uma das principais causas das fermentações difíceis e aumento da acidez volátil.

Quando adicionar ácidos gordos de cadeia longa e esteróis

Ácidos gordos de cadeia longa (C16 e C18) e esteróis são essenciais para a sobrevivência das leveduras na segunda metade da fermentação alcoólica e devem ser adicionados durante a multiplicação antes de se tornarem um fator limitante. Estes podem ser adicionados na inoculação das leveduras ou durante a primeira metade da fermentação.

Como adicionar os ácidos gordos de cadeia longa e esteróis

Os sólidos da uva contêm grandes quantidades de ácidos gordos de cadeia longa e esteróis. Nos mostos brancos severamente clarificados existe deficiência em lípidos. Existem duas opções para compensar esta carência:

- adicionar novamente sólidos ao mosto até ser atingida uma turbidez entre os 100-150 NTU;
- adicionar paredes celulares de levedura ricas em lípidos.

OXIGÉNIO

As leveduras necessitam de oxigénio para sintetizar esteróis e ácidos gordos insaturados. Dada a importância destes lípidos para a integridade e sobrevivência das membranas das leveduras, o oxigénio deve ser considerado um nutriente.

Quando adicionar oxigénio

As Leveduras Secas Ativas (LSA) contêm inicialmente uma grande quantidade de lípidos devido às condições aeróbicas aplicadas durante a sua produção. A adição de oxigénio é crucial entre 1/3 e 1/2 do esgotamento de açúcares. O oxigénio é instantaneamente utilizado pelas leveduras para a síntese de esteróis e ácidos gordos.

A quantidade de oxigénio necessária para o metabolismo das leveduras é de aproximadamente 10 mg/L. O resultado da oxigenação é uma aceleração da segunda metade da fermentação. Este efeito é ainda mais acelerado quando o oxigénio é combinado com a adição de amónio. No caso de fermentações espontâneas, as leveduras apresentam baixo teor em lípidos, uma vez que não são cultivadas em condições aeróbicas, por isso é ainda mais importante ter atenção às exigências de oxigénio.

A adição de oxigénio durante a inoculação não é recomendada, uma vez que as enzimas oxidásicas prejudiciais (tirosinase e lacase) podem utilizar o oxigénio mais rapidamente do que as leveduras, conduzindo ao acastanhamento e oxidação do mosto.

Como adicionar oxigênio

Durante a fermentação, o oxigênio pode ser adicionado por remontagem aberta, por *délestage* ou usando equipamento de macro-oxigenação.

As remontagens não são tão controladas, não sendo esta a forma mais segura de oxigenar o mosto. A quantidade máxima de oxigênio que pode ser dissolvida no mosto é de 6,5 mg/L a 20°C. Esta quantidade de oxigênio pode unicamente ser obtida por remontagem do volume total do mosto em fermentação. Isto requer a presença constante de um operador para garantir que o volume total é transferido. Mesmo assim, esta remontagem inicial com arejamento nem sempre é suficiente para responder às exigências de oxigênio das leveduras, exigindo múltiplas remontagens. No caso da *délestage*, além da presença de um operador, é igualmente necessária a existência de um depósito vazio suplementar. A utilização de um equipamento de macro-oxigenação permite maior precisão de dosagem, maior taxa de solubilização e não necessita de vigilância contínua, uma vez que estas unidades de dosagem são automatizadas.

FATORES DE CRESCIMENTO: VITAMINAS E OLIGOELEMENTOS

Vitaminas (biotina, tiamina, ácido pantotênico, inositol e ácido nicotínico) e oligoelementos (potássio, magnésio, fósforo, enxofre, zinco, manganês, etc.) são utilizados como cofatores em reações enzimáticas. A importância das vitaminas e dos oligoelementos é particularmente evidente no início da fermentação e por esta razão são igualmente denominados de "fatores de crescimento". Se destacarmos o caso da tiamina, observamos que a suplementação no momento da inoculação aumenta o número de células ativas e a cinética de fermentação. Existem condições enológicas que provocam a carência em tiamina: uma contaminação severa por leveduras (em particular, *Kloeckera apiculata*), consumo por *Botrytis cinerea*, bem como, uma fase de pré-fermentação prolongada. A gestão incorreta do anidrido sulfuroso induz uma carência de tiamina, uma vez que o sulfuroso livre se pode ligar à tiamina ficando esta indisponível para as leveduras. Por esta razão, a tiamina deverá ser adicionada entre 3-4 horas após a adição de SO₂.

Numerosos estudos mostraram igualmente que, embora o mosto seja geralmente rico em fatores de crescimento, frequentemente estes não estão disponíveis para as leveduras, uma vez que se encontram ligados a compostos como polissacáridos, polifenóis e proteínas. Carências em qualquer destes fatores de crescimento podem provocar problemas de fermentação.

Quando adicionar vitaminas e oligoelementos

Vitaminas e oligoelementos devem ser adicionados imediatamente após a inoculação das leveduras. As exigências destas substâncias são diretamente proporcionais ao teor de azoto do mosto: quanto maior o NFA, maior o número de células formadas, maior a exigência em vitaminas e microelementos. Para garantir a sua absorção e utilização ótimas, é preferível adicionar estes fatores de crescimento na reidratação das leveduras.

Como adicionar vitaminas e oligoelementos

A legislação enológica permite apenas a adição de tiamina na dose máxima de 0,6 g/hL. Outras vitaminas e oligoelementos podem ser adicionados através da utilização de leveduras autolisadas.

CONCLUSÕES

Uma estratégia adequada da gestão nutricional das leveduras considera os fatores nutricionais necessários e a fase em que estes devem ser adicionados.

Nas primeiras fases da fermentação, a suplementação de aminoácidos estimula a síntese de compostos aromáticos e, juntamente com vitaminas e oligoelementos, permite um crescimento populacional adequado sem provocar o aumento da temperatura. Estimular uma acumulação precoce de ácidos gordos de cadeia longa, esteróis e aminoácidos permite aumentar a resistência e a sobrevivência das leveduras na segunda metade da fermentação.

A 1/3 da fermentação, devem ser adicionados oxigênio e amónio de forma a garantir que a membrana celular permaneça funcional até ao esgotamento completo dos açúcares.

A estratégia nutricional também deve ser ajustada às condições de fermentação (elevado potencial alcoólico, baixo NFA, etc.). Diferentes práticas enológicas podem ter um impacto considerável no conteúdo e disponibilidade de nutrientes no mosto. Unicamente disponibilizando às leveduras a dose adequada de nutrientes, no momento adequado do ciclo de vida, é possível produzir vinhos limpos e de qualidade com o mínimo de defeitos aromáticos (H₂S, etc.).

Impacto das condições de fermentação e das práticas enológicas no teor de nutrientes no mosto.

Condição/prática enológica	Impacto na nutrição das leveduras	O que fazer
Uvas em estado de maturação avançado	À medida do progresso da maturação, o teor de NFA da uva diminui e o teor de álcool potencial aumenta, conduzindo a uma provável carência de NFA.	Se o valor de NFA é inferior a 100 mg/L, adicionar nutrientes compostos por leveduras autolisadas durante a inoculação e suplementar com amônio a partir de 24-36 horas após a inoculação.
Extensão da fase pré-fermentativa (clarificação do mosto, maceração pré-fermentativa a frio, etc.)	Consumo de NFA, vitaminas e oligoelementos pela microflora indígena.	Se NFA é inferior a 100 mg/L, adicionar nutrientes compostos por leveduras autolisadas na inoculação e suplementar com amônio a partir de 24-36 horas após a inoculação.
Clarificação severa do mosto	Carência em esteróis e ácidos gordos	Adicionar nutrientes constituídos por paredes celulares de leveduras ricas em lípidos durante a inoculação. Adicionar oxigênio e paredes celulares de leveduras ricas em lípidos a 1/3 do esgotamento dos açúcares.
Mosto tratado com bentonite	Diminuição do teor de aminoácidos por adsorção da bentonite.	Na inoculação das leveduras, adicionar aminoácidos através de nutrientes constituídos por leveduras autolisadas.
Estirpe de levedura	Diferentes estirpes de leveduras têm diferentes exigências em NFA.	Ajustar as exigências de NFA à estirpe de levedura.
Fermentação espontânea	As leveduras indígenas geralmente esgotam os esteróis e ácidos gordos.	Adicionar nutrientes constituídos por paredes celulares de leveduras ricas em lípidos durante a inoculação. Adicionar oxigênio e paredes celulares de leveduras ricas em lípidos a 1/3 do esgotamento dos açúcares.
Fermentação em condições de redução	A deficiência em oxigênio torna impossível a síntese de esteróis e ácidos gordos insaturados.	Adicionar paredes celulares de leveduras ricas em lípidos.
Fermentação a baixas temperaturas	A baixa temperatura torna a síntese de ácidos gordos insaturados difícil.	Adicionar nutrientes constituídos por paredes celulares de leveduras ricas em lípidos durante a inoculação. Adicionar oxigênio e paredes celulares de leveduras ricas em lípidos a 1/3 do esgotamento dos açúcares.

PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS NUTRIENTES E ADJUVANTES DE FERMENTAÇÃO ENARTIS

	<i>NUTRIFERM AROM PLUS</i>	<i>NUTRIFERM ENERGY</i>	<i>NUTRIFERM SPECIAL</i>	<i>NUTRIFERM VIT</i>	<i>NUTRIFERM ADVANCE</i>	<i>NUTRIFERM GRADUAL RELEASE</i>	<i>NUTRIFERM NO STOP</i>	<i>NUTRIFERM CONTROL</i>
APLICAÇÃO	Fornecimento de precursores para a síntese de aromas de fermentação	Reforçar a capacidade de fermentação da levedura	Nutrição equilibrada e completa	Nutrição básica de azoto	Regulador para uma fermentação completa e limpa	Regulador para uma fermentação completa e limpa	Prevenção e tratamento de fermentações paradas	Desintoxicação do mosto
AZOTO AMINOACÍDICO	★★★★★	★★★★	★★					
AZOTO INORGÂNICO			★★★	★★★★★★	★★★	★★★★★★		
PRECURSORES AROMÁTICOS	★★★★★★	★★★	★				★	
ESTERÓIS E ÁCIDOS GORDOS	★★★	★★★★	★★		★★★		★★★★★★	
MINERAIS	★★★	★★★	★★		★★		★★	
VITAMINAS	★★★	★★★★	★★	★	★★		★★★	
TANINOS						★		
EFEITO DE ADSORÇÃO	★★★★	★★★★	★★★		★★★		★★★★★★	★★★★★★
MOMENTO DE ADIÇÃO	Inoculação de leveduras	Inoculação de leveduras	Inoculação de leveduras	24 horas após a inoculação de leveduras	1/3 da fermentação	Antes do enchimento da cuba de fermentação	Segunda metade da fermentação e em fermentação lenta ou parada	A qualquer momento durante a fermentação e em fermentação lenta ou parada
DOSE RECOMENDADA	30 g/hL	20 g/hL	30 g/hL	30 g/hL	30 g/hL	20 g/hL	20 g/hL	30 g/hL
DOSE MÁXIMA LEGAL (Reg. UE)	40 g/hL	40 g/hL	60 g/hL	40 g/hL	250 g/hL	110 g/hL	40 g/hL	q.b.
APTO P/ VINHO BIOLÓGICO (Reg. UE)	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO	SIM	SIM	SIM

Mantenha-se em contacto!

SUBSCREVA A NEWSLETTER

www.enartis.com/pt/newsletter/