Influência da Fermentação Maloláctica Espontânea sobre a Evolução da Acidez Volátil em Vinhos Cabernet Sauvignon

Gildo Almeida da Silva[1]; Liliane Muratore[2]

[1]Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700 000 Bento Gonçalves - RS. E-mail: gildo@cnpuv.embrapa.br
[2]Estagiária da Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700 000 Bento Gonçalves - RS.- Aluna da Unisinos - E-mail: lilitore@aol.com

RESUMO

Foi avaliada a influência da linhagem de levedura e da fermentação maloláctica sobre a evolução da acidez volátil em vinho tinto. A acidez volátil é um dos fatores que depreciam a qualidade do vinho. Entre os microrganismos responsáveis por seu aumento estão determinados gêneros de leveduras e bactérias. Na microvinificação, foram utilizadas uvas da cultivar Cabernet Sauvignon e duas linhagens de Saccharomyces cerevisiae: Embrapa 20B/84 e Embrapa 1VVT/97. As análises de acidez volátil foram realizadas antes e após a fermentação maloláctica espontânea. A acidez volátil dos vinhos (7-8 mEq/L) não apresentou diferença significativa antes do início da fermentação maloláctica. Após a fermentação maloláctica, houve um aumento altamente significativo (P>0,01) da acidez volátil em ambos os vinhos. Os resultados sugerem haver uma importante participação de bactérias lácticas autóctones na elevação da acidez volátil. Houve uma correlação altamente significativa (P<0,01) entre açúcares redutores residuais e acidez volátil após a fermentação maloláctica.

INTRODUÇÃO

A maioria dos vinhos tintos é submetida a uma segunda fermentação comandada por bactérias lácticas, especialmente *Oenococcus oeni (Leuconostoc oenos)* (Vuuren, 1993), logo após a fermentação alcoólica. O ácido málico entra na célula de *Saccharomyces cerevisiae* por simples difusão mas por falta de um transportador de membrana específico e devido à baixa atividade da enzima málica, a levedura não consegue degradar este ácido de forma eficiente (Volschenk, 1997).

Bactérias lácticas exibem a capacidade de converter o ácido málico em ácido láctico, mas podem também conferir ao vinho, uma série de características indesejáveis. O aumento da acidez volátil é um destes problemas porque deprecia a qualidade do vinho. No suco de uvas sãs não há ácidos voláteis (Vogt et al., 1984), porém, em vinhos, atribui-se a presença da acidez volátil ao ácido acético formado como produto secundário da fermentação alcoólica. Concentrações de acidez volátil acima 20 mEq/L impedem sua comercialização. O destino de tais vinhos é geralmente a destilação. Uma quantidade balanceada de acidez volátil é importante para o aroma e sabor. O excesso de acidez volátil é sinal de vinhos com problemas e estes vinhos também, por via de regra, apresentam teores elevados de acetato de etila.

A presença de bactérias lácticas em vinhos tintos é um fenômeno natural e é bem conhecida a capacidade destes microrganismos em promover a descarboxilação espontânea do ácido málico. Este fenômeno é denominado fermentação maloláctica. As bactérias lácticas estão presentes na uva e, consequentemente no mosto quando inicia a fermentação alcoólica. A maioria dos gêneros presentes correspondem a *Lactobacillus, Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus,* sendo que o número, as espécies e a relação numérica entre os microrganismos

são variados. Durante a transformação gradativa do mosto pelas leveduras há uma alteração na flora microbiana, permanecendo em ação no meio apenas as espécies mais resistentes à mudança em curso.

A atividade metabólica de determinadas leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas pode conduzir à elevação da acidez volátil do vinho. Entre as leveduras estão os gêneros *Pichia, Hansenula, Kloeckera, Saccharomycodes,* (Thoukis, 1974) *Dekkera (*Walt, 1984a) e *Brettanomyces* (Walt, 1984b). Determinadas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* também são capazes de elevar substancialmente o teor de acidez volátil de vinhos (Reguant et al. 2000). As bactérias lácticas formam, além de ácido láctico, ácido acético e as bactérias acéticas, como *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans*, produzem, além do ácido acético, o ácido láctico (Drysdale e Fleet, 1989).

As atividades homo e heterofermentativas são critérios básicos e fundamentais para a classificação das bactérias lácticas. As bactérias homofermentativas convertem 95% da glicose em ácido láctico, ao passo que as bactérias heterofermentativas formam uma quantidade de outros produtos como etanol, ácido acético, glicerol e gás carbônico. Apesar do comportamento heterofermentativo, estas bactérias não necessariamente conferem ao vinho características indesejáveis. Mayer (1978) mostrou que vinhos com fermentação maloláctica completa, efetuada pela espécie heterofermentativa *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*), se apresentaram com buquê puro e fino. A participação dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* podem provocar alterações indesejáveis (Ribéreau-Gayon et al., 1975). Reguant et al. (2000) observaram que a produção de ácido acético pela bactéria láctica *Oenococcus oeni*, a partir de ácido cítrico do vinho, pode ser controlada pelo ácido gálico.

A fermentação maloláctica ocorre de maneira espontânea devido a presença de bactérias lácticas que transformam, principalmente, o ácido málico em ácido láctico, promovendo uma diminuição na acidez total de vinhos jovens (Mayer,1978). A fermentação maloláctica se reveste de importância para a enologia porque exerce uma significativa influência sobre um item organoléptico importante do vinho, o gosto. As bactérias lácticas apresentam duas faces. Atuando sobre o ácido málico, estas melhoram o gosto do vinho por reduzir a acidez de vinhos muito ácidos. Em vinhos com acidez baixa, estas bactérias provocam deterioração e instabilidade biológica (Milisavljevic, 1967).

Como o aumento da acidez volátil do vinho é indesejável e pode advir da atividade metabólica de leveduras e de bactérias lácticas, este trabalho avaliou a participação de duas linhagens de levedura na evolução deste tipo de acidez em vinhos tintos e a contribuição das bactérias lácticas neste processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinificação e Microrganismos- Foi utilizada a cultivar Cabernet Sauvignon da safra de 2002. Após o esmagamento, adicionou-se ao mosto SO_2 de modo a fornecer uma concentração de 30 mg/L. Foram utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 20B/84 e 1VVT/97. As duas linhagens de levedura foram produzidas em 35 L de meio G7 e em fermentador Biolafitte™ (França). O equipamento foi operado a 25 °C, com 2 vvm de ar e a 300 rpm. Depois de oito horas de crescimento em condições aeróbicas, as leveduras permaneceram no fermentador sem agitação e sem aeração por 16 horas. Foram centrifugadas em centrífuga contínua (CEPA-New Brunswick™) a 36.566 x g. Aproximadamente, 280g de células (peso úmido) foram obtidas e transferidas para mosto de uva Cabernet Sauvignon para adaptação durante 24 horas. Este foi o período de tempo suficiente para apresentar fermentação ativa. Alíquota de 1000 mL de leveduras em plena atividade fermentativa serviram para inocular os tanques de fermentação com 280 L de mosto. A vinificação em tinto

foi efetuada sem chaptalização e seguiu os procedimentos tradicionais, ou seja, adição de SO_2, inoculação das linhagens de levedura, remontagens durante a fase tumultuosa de fermentação, maceração a 22-24 °C por 4 dias, descuba, trasfegas, estabilização e engarrafamento.

Análises químicas e estatística

As análises químicas realizadas seguiram a metodologia oficial. A acidez volátil foi medida durante toda a fermentação alcoólica (fase tumultuosa e fase lenta), antes e após a fermentação maloláctica espontânea. A fermentação maloláctica foi determinada por cromatografia de papel. Foi considerada a fase anterior à fermentação maloláctica quando, por cromatografia de papel, havia a presença de ácido málico e a ausência de ácido láctico. A fase posterior à fermentação maloláctica foi considerada quando se detectava a presença de ácido láctico e a ausência de ácido málico no vinho.

Acidez volátil - A acidez volátil foi determinada, titulando-se o destilado de 10 mL de vinho com solução 0,1 N de NaOH e empregando uma solução de fenolftaleína 1% (p/v) como indicador. O resultado foi multiplicado por 10 e expresso em mEq/L (Ribéreau-Gayon et al., 1982).

Açúcares redutores totais (ART) – A análise de açúcares redutores totais (ART) foi efetuada pelo método de Fehling, seguindo a técnica apresentada por Ribéreau-Gayon et al. (1982).

Cromatografia de papel – A formação do ácido láctico a partir do ácido málico foi acompanhada por cromatografia ascendente de papel. As amostras de vinho foram diretamente aplicadas em papel Whatman nº1 e submetidas à migração, utilizando-se o solvente B (solução de ácido acético 50% (v/v)) e o revelador A (1 g de azul de bromofenol dissolvida em 1L de butanol). Foram empregados 50 mL da solução A e 20 mL da solução B, segundo método descrito por Ribéreau-Gayon et al. (1982).

Análise estatística - Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os resultados foram submetidos a análise de variância e a comparação das médias foi efetuada pelo teste de Tukey (P=0,05 e P=0,01). Foi efetuada análise de correlação entre os teores de açúcares redutores residuais dos vinhos e a acidez volátil obtida antes e após a fermentação maloláctica.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores da acidez volátil determinados durante a fermentação alcoólica e antes da fermentação maloláctica mostraram-se semelhantes (P>0,05) para as duas linhagens de levedura (Figura 1). As médias de acidez volátil neste período estiveram com seus valores abaixo de 8 mEq/L. A Figura 2 mostra a presença de ácido málico (M) e a tênue presença do ácido láctico (L) no vinho, caracterizando o início da atuação das bactérias lácticas na fermentação maloláctica. Esta fermentação se iniciou após a fermentação alcoólica.

Deve-se salientar que os vinhos elaborados com a linhagem 20B/84 apresentaram um açúcar residual abaixo de 4,5 g/L. Os elaborados com a linhagem 1VVT/97, apenas uma repetição atingiu 4,5 g/L. Todas outras repetições tiveram um teor açúcar residual entre 10,5 e 11,4 g/L (Figura. 1). Situação como esta não é rara, na elaboração de vinho. Atribui-se a diferença entre as repetições dos vinhos elaborados com a linhagem 1VVT/97 à alta capacidade de floculação desta linhagem aliada à remontagem padrão utilizada. Embora tenha-se efetuado uma homogeneização, a distribuição do mosto inoculado nos diferentes recipientes de vidro (20L) não foi uniforme. O primeiro recipiente (repetição 3), recebeu aleatoriamente uma

quantidade mais elevada de leveduras que os demais. Mesmo assim, a diferença nos teores de etanol entre os vinhos não foi significativa (dados não apresentados). O teor de etanol, mesmo sem chaptalização foi elevado, pois variou de 14,03 a 14,42 nos vinhos elaborados com a linhagem 1VVT/97 e de 14,13 a 14,51 G°L nos elaborados com a linhagem 20B/84. Este resultado indica que a linhagem 1VVT/97 possui um fator de conversão alto.

Antes da fermentação maloláctica, a acidez volátil dos vinhos elaborados com as duas linhagens não diferiu significativamente (P>0,05). A diferença entre os valores da acidez volátil obtidos antes da fermentação maloláctica e após fermentação maloláctica foi altamente significativa (P<0,01). Após a fermentação maloláctica, as médias atingiram valores acima de 12,5 mEq/L, e os vinhos elaborados com as duas linhagens de levedura tiveram diferença significativa (P>0,05). O aumento da acidez volátil após a fermentação maloláctica muito provavelmente ocorreu pela ação das bactérias lácticas autóctones durante a fermentação maloláctica. Após a fermentação maloláctica, a diferença na acidez volátil entre as repetições foram mais acentuadas nos vinhos elaborados com a linhagem 1VVT/97.

Acidez volátil mais elevada foi encontrada nos vinhos onde os teores de açúcares redutores residuais também foram maiores. A correlação entre estes dois fatores foi altamente

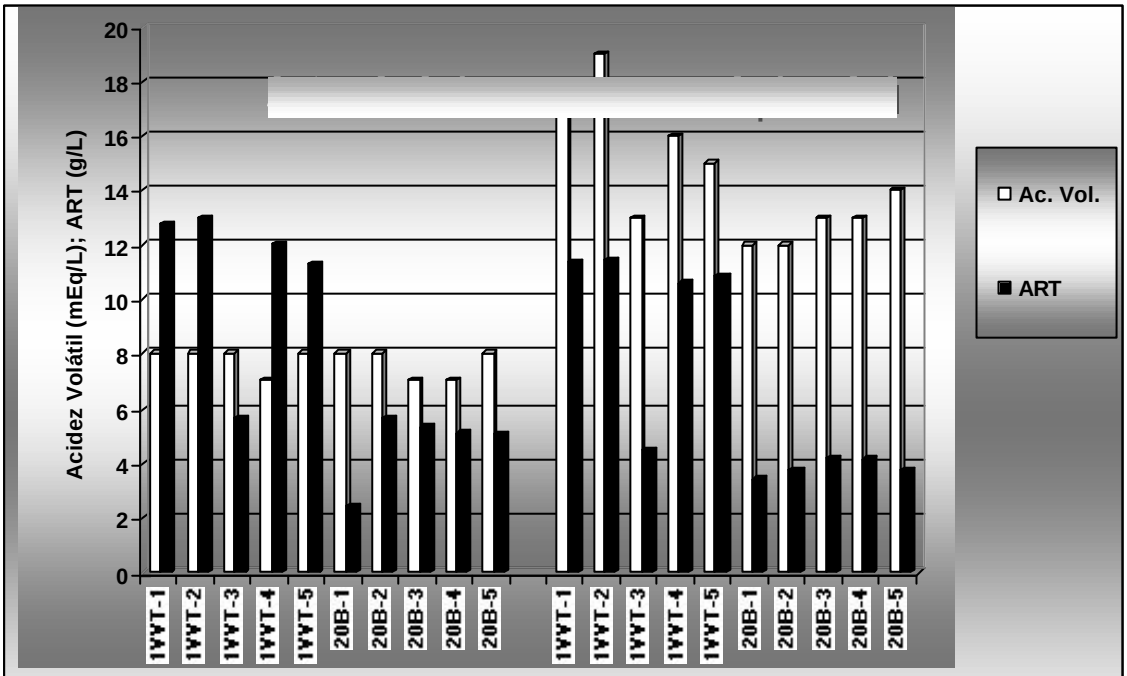

Figura 1. Acidez volátil e açúcares redutores totais (ART) residuais dos vinhos elaborados com as linhagens 1VVT/97 e 20B/84, antes da fermentação maloláctica (fml) e após a fermentação maloláctica (fml). Os valores 1-5 representam as repetições

significativa (P<0,01; r = 0,90) apenas após a fermentação maloláctica. Isto indica que o teor de açúcar redutor residual desempenha um papel importante no metabolismo da bactéria, influenciando a síntese de compostos voláteis e não está relacionado com a evolução da acidez volátil formada durante a fermentação alcoólica. Davis et al. (1986) observaram que a fermentação maloláctica efetuada por *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*) foi acompanhada pela formação de ácido acético. Além disso, observaram que as bactérias *Pediococcus parvulus* e espécies de *Lactobacillus*, depois de realizada a fermentação maloláctica, crescem no vinho, utilizando os açúcares residuais e produzindo os ácidos láctico e acético. Isto explica a acidez volátil mais elevada nos vinhos com valores de açúcares residuais mais altos (Figura 1). Ribéreau-Gayon et al. (1975) obtiveram resultados semelhantes aos apresentados

neste trabalho. Mostraram que mesmo com o teor de açúcares redutores totais residuais baixos (2 g/L), a acidez volátil que antes da fermentação maloláctica era de 8,1 mEq/L, passou para 13,1 mEq/L e o teor residual de açúcares redutores totais baixou para 1,7 g/L, após a fermentação maloláctica. Comparando vinhos elaborados com as cultivares Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon, antes e após a fermentação maloláctica, Rizzon et al. (1997) também observaram que, em ambos os vinhos, mesmo com teores de ART residuais baixos, houve um aumento na acidez volátil após a fermentação maloláctica de mais de duas vezes. Há substâncias do vinho, além do açúcar redutor residual, que promovem a fermentação maloláctica. Alguns componentes, ao contrário, inibem esta fermentação e outros inibem a formação de ácido acético (Geguant et al., 2000) reduzindo, neste último caso, a acidez volátil. Experimentos efetuados em vinhos com culturas puras de bactérias lácticas podem dar resultados diferentes. Rosi et al. (1999), investigando a influência de diferentes linhagens da espécie *Oenococcus oeni* (*Lactobacillus oenos*) sobre a qualidade do vinho, verificaram que, quando havia alteração, o aumento na acidez volátil era pequeno.

Embora a acidez volátil tenha sofrido um acréscimo durante a fermentação maloláctica, é importante salientar que os valores permaneceram dentro do limite estabelecido pela legislação, que estipula um máximo de 20 mEq/L.

O ácido acético é inibidor da fermentação alcoólica. Este pode estar presente no mosto devido a problemas fitossanitários, como podridão ácida por exemplo. Problemas como parada de fermentação ou dificuldade em se obter vinhos secos, podem estar relacionados com a presença, além de outros componentes, de ácido acético no mosto em fermentação (Drysdale e Fleet, 1989). A presença deste ácido em vinhos destinados à produção de espumantes é de especial preocupação no que tange à inibição.

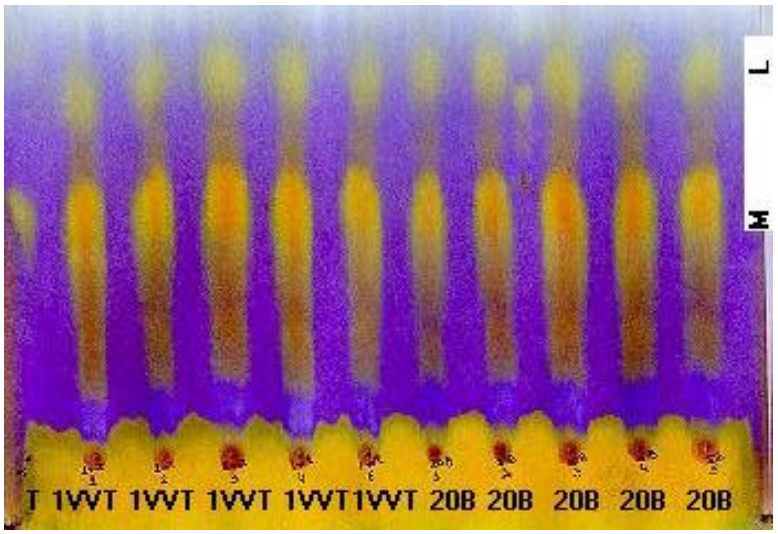

Figura 2. Cromatograma de papel referente ao início da fermentação maloláctica dos vinhos elaborados com as linhagens 1VVT/97, 20B/84; L- ácido láctico; M- ácido málico; T- testemunha

Comparando as Figuras 2 e 3, observa-se a conversão de todo o ácido málico em ácido láctico. Tão logo esta fermentação termine, é de boa prática enológica não permitir que as bactérias prossigam com sua atividade na produção de ácido láctico. Ribéreau-Gayon et al. (1975) têm se referido a problemas causados por bactérias lácticas do vinho. Os açúcares residuais, glicerol e os ácidos orgânicos, especialmente o ácido cítrico, podem servir de fonte de carbono para a síntese de ácido láctico e acético. Quando as bactérias lácticas atuam sobre pentoses, a produção de ácido acético é mais elevada que a de ácido láctico. Sendo o glicerol

metabolizado por bactérias lácticas, pode haver aumento da acidez volátil, formação dos ácidos láctico e succínico, produção de corpos cetônicos, de acroleína e de 1,3-propanodiol. Esta alteração geralmente resulta em forte amargor devido à reação da acroleína com compostos fenólicos do vinho. Como muitos dos defeitos encontrados em vinhos envolvem bactérias lácticas, o monitoramento da fermentação maloláctica é, portanto, uma atividade fundamental no processo de elaboração de vinho. A análise da acidez total e da acidez volátil durante a fermentação maloláctica dá uma indicação do tipo de alteração que está sendo desenvolvida. Na fermentação maloláctica, a acidez total diminui e a acidez volátil praticamente não se altera. Uma significativa elevação da acidez volátil quando ocorre deve-se, provavelmente, ao uso por parte da bactéria de outros substratos. Sob ponto de vista estequiométrico, uma molécula de ácido málico não pode gerar, ao mesmo tempo, uma molécula de ácido láctico e outra de ácido acético.

Bactérias lácticas, como todos os microrganismos, apresentam preferências nutricionais. Células de *Lactobacillus plantarum* usam mais rapidamente e preferem o ácido málico, para a fermentação láctica, à glicose (Gent et al., 1997). Este comportamento oferece condições de controle sobre a formação de produtos indesejáveis provenientes de outras fontes de carbono. Pode-se reduzir a produção destes produtos, inibindo a atividade das bactérias lácticas imediatamente após o esgotamento do ácido málico do meio. Parece razoável a prática de não permitir que a fermentação maloláctica se inicie ainda durante a fermentação alcoólica. Isto pode provocar aumento da acidez volátil no vinho tinto em virtude do esgotamento do ácido málico e do concomitante uso de açúcares pelas bactérias lácticas.

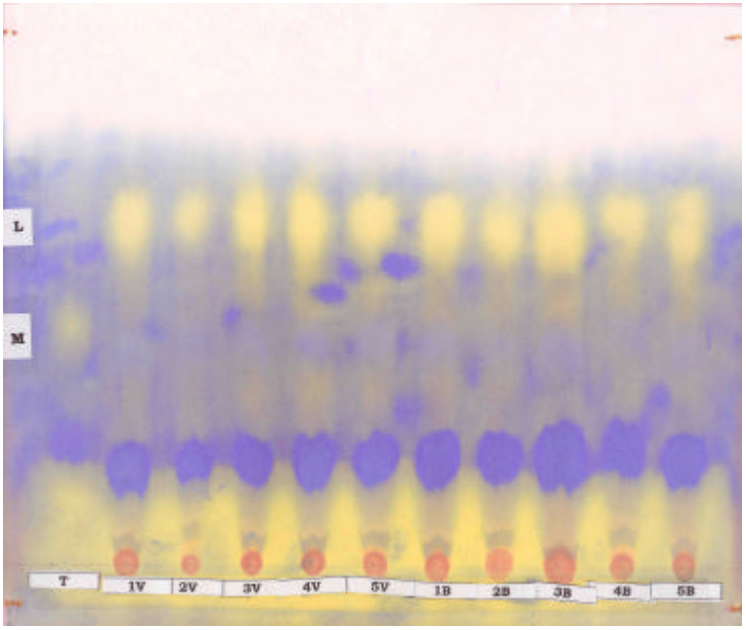

Figura 3. Cromatograma de papel referente à fermentação maloláctica dos vinhos elaborados com as linhagens 1VVT/97 (V) e 20B/84 (B); L- ácido láctico; M- ácido málico; T- Testemunha

Sabe-se que algumas linhagens de leveduras são mais compatíveis que outras em permitir a atuação de bactérias lácticas (Avedovech et al., 1992). Embora não se recomende o emprego de leveduras que produzem SO_2, pelo efeito inibidor que exerce sobre as bactérias lácticas (Henick-Kling e Park, 1994), na elaboração de vinhos, de uma certa forma, seria, este procedimento, uma maneira de inibir a atividade destas bactérias durante a fermentação alcoólica. A linhagem 20B/84 tem se mostrado produtora de SO_2. Este deve, provavelmente

ter sido um dos motivos pelos quais a acidez volátil durante a fermentação alcoólica tenha se mantido abaixo de 8 mEq/L. Considerando a baixa acidez volátil obtida antes da fermentação maloláctica e a não significância entre as linhagens (P>0,05), é possível que a linhagem 1VVT/97 se assemelhe à linhagem 20B/84 quanto à formação de SO_2. Pelos resultados obtidos, observa-se que as duas linhagens permitem a reativação da atividade das bactérias lácticas autóctones. Esta ação se deve, em parte, à disponibilidade de nutrientes promovida pela autólise das células de levedura e à redução na concentração de SO_2 livre.

CONCLUSÕES

Uma vez que os vinhos elaborados com as linhagens de levedura e que não apresentaram valores de acidez volátil elevados até o término de suas atividades, conclui-se que estas duas linhagens não podem ser responsabilizadas pelo aumento da acidez verificado. Os valores elevados de acidez volátil obtidos nos vinhos após a fermentação maloláctica apontam para as bactérias lácticas a responsabilidade por tal alteração. Maiores cuidados devem ser dirigidos, portanto, a estas bactérias, especialmente em vinhos que possuam teores de açúcares redutores residuais totais elevados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avedovech, R.M.JR.; Mcdaniel, M.R.; Watson, B.T. e Sandine, W.E., (1992), An Evaluation of Combinations of Wine Yeast and *Leuconostoc oenos* Strains in Malolactic Fermentation of Chardonnay Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 43, n. 3, p. 253-260.

Drysdale, G.S. e Fleet, G.H. (1989), The effect of acetic bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice, *Journal of Applied Microbiology*, v. 67, p. 471-481.

Gent, A.; Wegener, G. e Radler, F. (1997). Quantitative measurement of heat formation during malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 48, n.4, p. 423-427.

Henick-Kling T. e Park, Y. H. (1994), Considerations for the Use of Yeast and Bacterial Starter Cultures: SO_2 and Timing of Inoculation. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 45, n. 4, p. 464-469.

Mayer, M.K. (1978), Progrés récents dans la connaissance des phénomènes microbiologiques en vinification. *Bulletin de L'O.I.V.*, v.51, n.566, p.269-280.

Milisavljevic, D. (1967), Contrôle microbiologique du vin. *Bulletin de L'O.I.V.*, n. 435, p. 453-474.

Reguant, C.; Bordons, A.; Arola, L. e Rozes, N. (2000), Influence of phenolic compounds on the physiology of Eonococcus oeni from wine. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p. 1065 – 1071.

Ribéreau-Gayon, J.; Paynaud, E.; Sudrad, P. e Ribéreau-Gayon, P. (1982), Sciences et techniques du Vin Tome 1. *Analyse et contrôle des vins. Traité d'oenologie*. Editora Dunod, Paris.

Ribéreau-Gayon, J.; Peynaud, E.; Ribéreau-Gayon, P. e Sudraud, P. (1975), Sciences et techniques du Vin Tome 2 - *Caractères des vins. Maturation du raisin. Levures et bactéries. Traité d'oenologie*. Editora Dunod, Paris.

Rizzon, L. A. R.; Zanuz, M. C. e Miele, A. (1997), Efeito da fermentação maloláctica na composição do vinho. *Ciência Rural*, v. 27, n. 3, p. 497-500.

Rosi, I.; Domizio, P.; Ferrari, S.; Zini, S. e Pcchi, M. (199), Influence des différentes cultures starter de bactéries malolactiques sur la qualité du vin. *Revue Francaise d'Oenologie*, n. 179, p. 26-29

Thoukis, G. (1974), Chemistry of Wine Stabilization: A Review. In. WEBB, A.D. (Ed.) *Chemistry of Winemaking, American Chemical Society*. Washington, D.C. pp. 116-133.

Vogt, E.; Jakob, L.; Lemperle, E. e Weiss, E. (1986), *El vino: Obtención, elaboración y análisis*. Editora Acribia, Zaragoza.

Volschenk , H.; Viljoen, M.; Grobler, J.; Bauer, F.; Lonvaud-Funel , A.; Denayrolles, M.; Subden, R. E. e Vuuren, H. J. J. van (1997), Malolactic fermentation in grape musts by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 48, n. 2, p. 193-197.

Vuuren, H. J. J. van e Dicks L. M. T. (1993), *Leuconostoc oenos*: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 44, p. 99-112.

Walt, J. P. van der (1984a), Discussion of the genera belonging to the ascosporogenous yeasts. Genus 8. *Dekkera* van der Walt. In: Rij. N.J.W. K, van (Ed), *The Yeast a taxonomic study*. Elsevier Science Publisher. Amsterdam. pp. 146 - 151.

Walt, J. P. van der, (1984b), Discussion of the genera belonging to the imperfect yeasts. *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. In: Rij. N. J. W. K. van (Ed), *The Yeast a taxonomic study*. Elsevier Science Publisher. Amsterdam.