

A ENOLOGIA DE LEVEDURAS NÃO-SACCHAROMYCES

Saccharomyces cerevisiae é a principal espécie de levedura envolvida na fermentação alcoólica do mosto de uva. A evolução da ciência enológica levou à generalização do uso de estirpes selecionadas de *S. cerevisiae*, o que tem proporcionado melhorias assinaláveis no processo fermentativo e à introdução nos vinhos de uma variedade de novos aromas e sabores.

No entanto, o meio fermentativo é um ecossistema onde pontuam diversas espécies de leveduras, muitas delas pertencentes a vários géneros não-*Saccharomyces* que prevalecem durante os estágios iniciais de fermentação alcoólica e contribuem significativamente para o carácter e qualidade do vinho final.

Paulo J.F. Cameira dos Santos¹, Hélder Cunha², Ricardo Franco-Duarte³

¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



² Casca Wines



³ Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), Escola de Ciências, Universidade do Minho



Introdução

A expressão “enologia de leveduras não-*Saccharomyces*” surgiu tardiamente, já início do século XXI, e pretende colocar em evidência o papel e as potencialidades que outras espécies de leveduras podem ter na vinificação e conservação de vinhos. O fenómeno bioquímico central em vinificação é a fermentação alcoólica – transformação do mosto de uva em vinho. Trata-se de um processo microbiano levado a cabo por leveduras (Figura 1) e, de uma forma simplificada, podemos dizer que consiste na conversão da glucose e frutose (principais açúcares do mosto) em etanol e dióxido de carbono (Figura 2). Hoje em dia é um fenómeno bem compreendido, no entanto nem sempre foi assim. Desde que a Humanidade começou a produzir vinho, há mais de 10 000 anos, o fenómeno fermentativo era considerado uma transformação poderíamos dizer, quase mágica ou pelo menos com forte cunho de intervenção divina. Vários investigadores e estudiosos têm-se questionado sobre a razão pela qual há uma predominância quase absoluta da espécie *Saccharomyces cerevisiae* numa fermentação espontânea de mosto de uva. Efetivamente, quando nos dirigimos à vinha em vésperas de vindima, e utilizando um balde colhemos alguns cachos de uva maduros, os esmagamos e os deixamos fermentar espontaneamente (por exemplo, para fabricar o “pé-de-cuba”), iremos ter um fenómeno fermentativo quase inteiramente dominado pela levedura *S. cerevisiae*. Isto, apesar de nos cachos de uva ainda não vindimados, *S. cerevisiae* não ser predominante^[1]. Há muito que os investigadores sabem que é na película do bago de uva que se localizam as leveduras que após o esmagamento irão servir de inóculo e desencadear a fermentação alcoólica espontânea^[2]. A maior parte dessas leveduras não são *S. cerevisiae* (que está em minoria), mas de outras espécies chamadas de não-*Saccharomyces* que serão detalhadas de seguida. Hoje em dia, as leveduras não-*Saccharomyces* têm sido selecionadas para garantir vinhos com maior complexidade aromática, contribuindo deste modo com várias características organoléticas-chave: (a) aumento da concentração de compostos específicos, tais como glicerol e acidez total; (b) redução

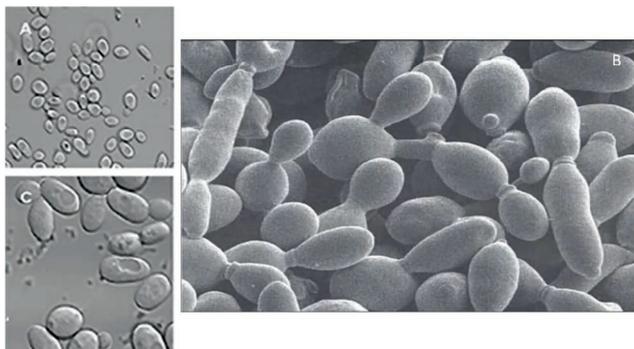


Figura 1 – Células típicas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fase de reprodução assexuada por gemulação.

do conteúdo em ácido acético; (c) aprimoramento do perfil aromático, nomeadamente pela produção de determinados ésteres, álcoois superiores e tióis voláteis; (d) secreção de enzimas que enriquecem o aroma do vinho, especificamente esterases, β -glucosidasas, lipases, proteases entre outras; (e) redução do conteúdo em etanol; (f) controlo da microflora que habitualmente causa deterioração no vinho; (g) melhorias na qualidade geral do vinho e na sua complexidade^[3].

Atualmente (dados de 2021), conhecem-se 293 espécies de leveduras não-*Saccharomyces*. Estas espécies foram isoladas pelo menos uma vez em uvas das espécies *Vitis labrusca*, *Vitis rotundifolia*, *Vitis amurensis* e/ou *Vitis davidii*. As espécies predominantes de leveduras não-*Saccharomyces* (com maior número de isolamentos registados em várias partes do mundo) são *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris*, *Pichia terricola*, *Torulasporea delbrueckii*, *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora guilliermondii* e *Lachancea thermotolerans*.

Portanto, antes de avançarmos no tema deste artigo – “Enologia de não-*Saccharomyces*” – convém em primeiro lugar compreender porque é que a Enologia convencional é, desde há milénios, “Enologia de *Saccharomyces*”. Ou seja, qual a razão porque estando *S. cerevisiae* numa posição desfavorável da grelha de partida, muito longe da “pole position”, acaba invariavelmente por ganhar a corrida, dominando o meio fermentativo e acabando por transformar, sozinha, todos os açúcares fermentescíveis do mosto em etanol?

A resposta é efeito Crabtree, e será desenvolvida na secção seguinte.

O efeito Crabtree, seguro de vida do género *Saccharomyces*

O efeito Crabtree foi descoberto em 1926, por Herbert G. Crabtree quando realizava estudos relativos à utilização de glúcidos por células tumorais^[4]. Este autor observou que a glucose se comportava como inibidor do metabolismo respiratório nesse tipo de células. Posteriormente, verificou-se que este fenómeno não é exclusivo das células cancerígenas, uma vez que tem sido detetado em células normais, com taxas de divisão elevadas, como as da mucosa intestinal, células embrionárias, células do tecido renal, em leveduras e em bactérias^[5].

O efeito Crabtree em *S. cerevisiae* consiste no seguinte: num meio com abundância de oxigénio e de hexoses, ao contrário do que seria normal, *S. cerevisiae* não envereda por um metabolismo respiratório com oxidação completa dos açúcares (produção de dióxido de carbono e água) na sequência glicólise \Rightarrow ciclo de Krebs \Rightarrow cadeia respiratória, enveredando sim por um processo meramente fermentativo (glicólise) com produção de etanol e dióxido de carbono. Esta 2.^a via metabólica (Figura 2) tem a vantagem de permitir à levedura multiplicar-se mais rapidamente e

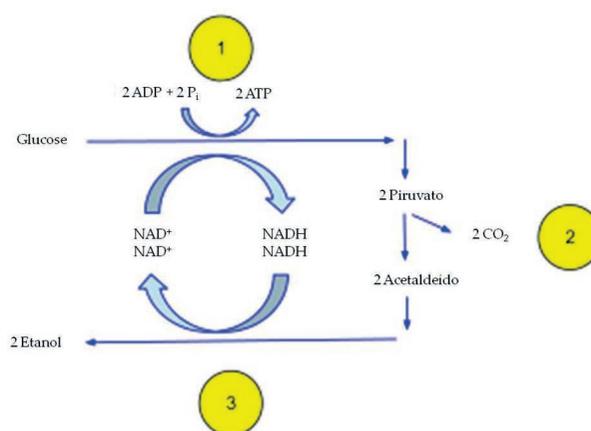


Figura 2 – Esquema da produção de etanol nas leveduras a partir das hexoses (neste caso, glucose), mostrando as 3 fases: (1) Fosforilação; (2) Descarboxilação e (3) Redução. O conjunto das fases (1) e (2) designa-se normalmente Glicólise, e é comum à fermentação alcoólica e à respiração aeróbia.

assim dominar todo o meio fermentativo em pouco tempo, aniquilando potenciais concorrentes.

Canalizar a maior parte do fluxo de carbono para a produção de etanol (processo fermentativo), independentemente da disponibilidade de oxigênio, é, portanto, a assinatura metabólica de algumas espécies de levedura, sendo *S. cerevisiae* a representante mais proeminente do clube “Crabtree positivo”. Vários mecanismos contribuem para o efeito Crabtree nesta espécie^[6], incluindo a repressão catabólica transcricional dos genes necessários para a respiração aeróbia. Mas a taxa de consumo de açúcar também desempenha um papel crucial neste processo, dado que a partir do momento em que se verifica uma desaceleração do transporte de açúcar para o interior das células, ou uma redução na atividade das enzimas glicolíticas, verifica-se um abrandamento do efeito Crabtree. Por seu turno, altas taxas de absorção de açúcares pelas células levurianas provocam um metabolismo de transbordamento a nível do piruvato. A abundância e propriedades cinéticas da piruvato desidrogenase mitocondrial não são suficientes para processar todo o piruvato produzido pela glicólise. Nessas circunstâncias, a maioria do piruvato é metabolizado em acetaldeído pela atividade da piruvato descarboxilase e, depois, para etanol pela enzima acetaldeído desidrogenase^[5]. O efeito Crabtree é parte de uma combinação de adaptações que constituem uma estratégia “primeiro acumular – depois consumir” seguida por várias linhagens de levedura^[7].

Embora muitas espécies de levedura sejam anaeróbias facultativas, apenas algumas delas são capazes de aguentar um crescimento sustentado em condições anaeróbias. A capacidade para a biossíntese anaeróbia de pirimidina é a chave para apoiar crescimento anaeróbio, e portanto o efeito Crabtree.

Riscos associados às fermentações espontâneas

O ideal de qualquer enólogo seria trabalhar sempre com a flora microbiana indígena, que lhe permitisse exprimir nos seus vinhos todo o potencial dos *terroir* onde têm origem. É isso que, em parte, pretendem e reclamam os defensores dos chamados vinhos “naturais”, *biológicos*, *biodinâmicos*, *khosher*, entre ou-



Figura 3 – Fotografia da parte superior de uma cuba de mosto em fermentação espontânea, na sua fase final. Vêem-se colônias de bactérias acéticas, formando um “véu”, porque o ecossistema fermentativo teve desvios importantes permitindo que a população de bactérias acéticas crescesse demasiado, produzindo um vinho com elevado teor em acidez volátil.

tros. Colocamos entre aspas a expressão “*vinhos naturais*” porque, em nosso entender, todos os vinhos são naturais e a expressão acima pressupõe que os outros não o são. O mundo não é a preto e branco e ninguém pode reclamar para si a exclusividade de uma designação, seja ela qual for. Se formos rigorosos, nem os reclamados vinhos “naturais” são totalmente naturais, nem os biológicos são totalmente biológicos, nem os biodinâmicos são totalmente biodinâmicos, etc., etc., porque as normas que presidem à sua elaboração, inicialmente muito rigorosas nos princípios que advogam, acabam sempre por admitir certas exceções e derrogações, caso contrário o universo que abrangem seria extremamente limitado. As fermentações espontâneas acarretam sempre uma certa dose de risco (Figura 3), pois há uma série de fatores que não são controlados, ficando assim ao sabor do acaso.

Por definição, uma fermentação espontânea será aquela em que o mosto, logo após o esmagamento da uva, é deixado fermentar livremente, sem qualquer aditivo químico, servindo como inóculo apenas o microbiota natural que vem depositado na película das uvas.

Neste tipo de evento fermentativo, leveduras “boas” e bactérias indesejáveis, partem da mesma linha da grelha de partida, lado a lado. A probabilidade de ser o primeiro grupo ou o segundo a dominar a fermentação é praticamente 50% para cada lado.

Leveduras não-Saccharomyces já em comercialização e respetivas características

No sentido de minimizar os riscos das fermentações espontâneas, mas mesmo assim usufruir dos benefícios que um ecossistema fermentativo com maior biodiversidade pode trazer aos vinhos produzidos, surgiu a produção e comercialização de leveduras liofilizadas sob a forma de levedura seca ativa (LSA) de diversos géneros e espécies.

A compreensão do modo de funcionamento do ecossistema fermentativo, nomeadamente de fenómenos como o efeito Pasteur, o efeito Crabtree e o carácter Killer de algumas leveduras, é fundamen-



Figura 4 – Células típicas de levedura *Metschnikowia pulcherrima*.

tal para “driblar” *S. cerevisiae* e abrir uma janela de oportunidade para o aumento da população de outras leveduras, conforme o interesse específico do enólogo para o vinho em questão.

A Tabela 1 apresenta-nos exemplos de leveduras não-Saccharomyces já comercializadas e respetivas aplicações.

Conclusões

Durante milénios, a fermentação alcoólica permaneceu misteriosa e obscura. Os registos mais antigos sobre o processo fermentativo datam de 7000 a.C. na região da Ásia Menor, Cáucaso e Me-

PUB



MannoPLUS ND

Nova manoproteína purificada agora em formato líquido

A sua baixa turbidez e coloração permitem adições de última hora, respeitando ao máximo as características aromáticas e filtráveis dos vinhos.



Tabela 1 – Exemplos de leveduras não-*Saccharomyces* já em comercialização e respetivas características

Espécie (por ordem alfabética)	Vantagens e características
<i>Candida zemplinina</i>	É normalmente indicada para vinhos com alto teor alcoólico. O seu uso leva também a uma maior produção de glicerol.
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	Uso ideal em ambientes quentes. O seu uso aumenta a acidez total do vinho, e leva à produção de aromas frescos a morango.
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	O seu uso é vantajoso para inibir o crescimento de outros microrganismos que possam comprometer a qualidade da fermentação.
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Produz teores significativos de ácido láctico durante a FA. Produz aromas complexos no início da FA. Eficaz para reequilibrar vinhos de climas quentes.
<i>Metschnikowia fruticola</i>	Reduz o risco de uma fermentação precoce; a sua competitividade em relação a outras leveduras indesejáveis impede que estas se estabeleçam no processo fermentativo.
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Protege e controla o microbiota indígena indesejável. Permite reduzir os níveis de SO ₂ durante as etapas pré-fermentativas de vinhos brancos e rosés (Figura 4).
<i>Pichia kluyveri</i>	O seu uso promove aromas frutados nos vinhos produzidos, garantindo também uma fermentação com consistência.
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Usada para fermentação malolática, principalmente em tintos. Degrada o ácido málico com alta produção de glicerol. Tem baixa produção de acidez volátil, de sulfitos e de ácido acético.
<i>Starmerella bacillaris</i>	Indicada para vinhos com alto teor alcoólico. Aumenta a produção de glicerol e tem baixo rendimento em álcool, produzindo vinhos com baixo teor alcoólico (< 10% v/v).
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	5 estirpes já disponíveis comercialmente, com características diferentes que vão desde a redução da acidez volátil, o aumento da complexidade do sabor, aumento da diversidade aromática e aumento da resistência osmótica ^[8,9] .
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	O seu uso leva a um aumento da concentração de ésteres de acetato e monoterpenos no vinho.

sopotâmia. Hieróglifos egípcios sugerem que, há mais de 5000 anos, as leveduras eram utilizadas nos processos fermentativos, quer na produção de pão, quer na de bebidas alcoólicas. Curiosamente, só em 1857 Louis Pasteur provou que a fermentação resulta da ação de organismos vivos, postulando a “teoria vitalícia da fermentação”, segundo a qual a fermentação alcoólica só é possível com células vivas. Em 1815, o químico francês Joseph Louis Gay-Lussac tinha sido o primeiro a propor a reação química bruta da degradação da glucose em etanol. Posteriormente, nas décadas iniciais do século XX, o papel de *S. cerevisiae* na fermentação foi sendo elucidado, e esta levedura passou a ser utilizada como

organismo eucariota modelo, uma vez constatadas a segurança na manipulação desse microrganismo, bem como o rápido crescimento e fácil armazenamento. A partir de um projeto colaborativo envolvendo 600 investigadores, *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariota a ter o genoma completamente sequenciado. Compreender e intervir na fermentação alcoólica de uma forma inteligente e criativa, tirando partido de sinergias e potenciando mais-valias que os diversos microrganismos em presença proporcionam, é uma das principais tarefas do enólogo assim que as uvas chegam à adegas. A produção de um bom vinho foi, durante gerações de produtores e enólogos, sinónimo de produzir

um vinho com muito álcool, o que lhe garantia a longevidade e a proteção microbiológica que o efeito antisséptico do etanol proporciona. No entanto, desde há alguns anos que as mentalidades vêm mudando. Os avanços das técnicas de isolamento de leveduras, sua liofilização para produção de levedura seca ativa, puseram à disposição do enólogo, como se procurou demonstrar neste artigo, uma panóplia de leveduras que lhes permite gerir de forma inteligente o processo fermentativo, promover a biodiversidade no seu seio de forma a que se possa retirar os seus proveitos e maximizá-los. ☺

Referências Bibliográficas

[1] Jackson, R.S. (2000). *Wine Science: Principles, Practice, Perception*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, Spain; p. 648.

[2] Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B. (2006). *Handbook of Enology*, 2nd ed.; John Wiley: Chichester, UK; Hoboken, NJ, USA.

[3] Drumonde-Neves, J.; Fernandes, T.; Lima, T.; Pais, C.; Franco-Duarte, R. (2021). Learning from 80 years of studies: a comprehensive catalogue of non-Saccharomyces yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Research*, Volume 21, Issue 3. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab017>.

[4] Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *The Biochemical Journal*, 23(3):536–45. <https://doi.org/10.1042/bj0230536>.

[5] Gonzalez, R. & Morales, P. (2021). Truth in wine yeast. *Microb. Biotechnol.*, 00(00):1–18. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13848>.

[6] Barnett, J.A. (2003). A history of research on yeasts 5: The fermentation pathway. *Yeast*, 20(6):509–43.

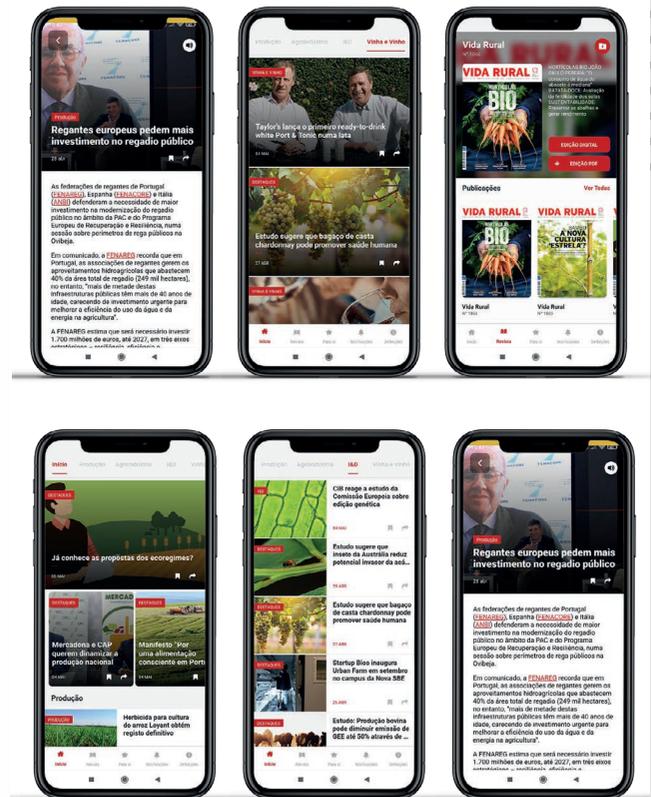
[7] Piskur, J.; Rozpedowska, E.; Polakova, S.; Merico, A. and Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.*, 22:183–186.

[8] Fernandes, T.; Silva-Sousa, F.; Pereira, F.; Rito, T.; Soares, P.; Franco-Duarte, R. & Sousa, M.J. (2021). Biotechnological Importance of *Torulasporea delbrueckii*: From the Obscurity to the Spotlight. *Journal of Fungi*, 7(9):712. <https://doi.org/10.3390/jof7090712>.

[9] Benito, S. (2018). The impact of *Torulasporea delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102:3081–3094. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>.

PUB

AGORA É MAIS FÁCIL COM A APP



CONTEÚDOS EXCLUSIVOS

MELHOR EXPERIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO

REVISTA DIGITAL

LEITURA OFFLINE

NÚMEROS ANTIGOS



Subscrição gratuita até 30 de junho!