



The Wine EXPERT

Informação prática sobre a elaboração do vinho

LALLEMAND

AS DIVERSAS FUNÇÕES DO AZOTO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O que é o azoto?

O azoto é uma molécula composta por dois átomos (N_2). O seu nome científico é diazoto. Azoto é o principal componente da atmosfera, representando 78% do ar que respiramos. É indispensável porque dilui o oxigénio, caso contrário a atmosfera tão concentrada seria prejudicial para os seres humanos.

O azoto está presente nos mostos em diversos estados: amónio, aminoácidos, peptídeos e proteínas. A fração do azoto que pode ser utilizada pelas leveduras durante a fermentação alcoólica é denominada de "Azoto Assimilável". As células das leveduras também contêm azoto sob a forma de proteínas, peptídeos – particularmente tripeptídeos – e aminoácidos (ver Figura 1).

NFA (Azoto Facilmente Assimilável) inclui α -aminoácidos livres (AA), amónio e alguns peptídeos. Esta é a fração do azoto que pode ser utilizada pelas leveduras do vinho para levarem a cabo uma fermentação eficaz.

NFA = α -aminoácidos livres + NH_4^+ + alguns pequenos peptídeos

A prolina é o único α -aminoácido livre (AA) que não é assimilado pelas leveduras, mesmo sendo um dos AAs mais abundantes em mostos.

- ⇒ **FAN** = azoto α -aminado, que é equivalente aos α -aminoácidos livres
- ⇒ Principais AAs livres (em quantidade) nas uvas: prolina, arginina, glutamato

Porquê que é importante na vinificação?

O azoto é um fator chave que tem um impacto significativo na fermentação do vinho. É o nutriente mais importante para as leveduras, influenciando tanto a cinética da fermentação como a qualidade do vinho.

O azoto é essencial para o crescimento e para o metabolismo das leveduras. Na vinificação, o NFA tem um papel chave a dois níveis diferentes:

- Representa um importante fator nutricional para as leveduras ao longo da fermentação alcoólica devido à sua função na síntese de proteínas e transporte de açúcares.
- É essencial para a biossíntese dos marcadores da qualidade do vinho como álcoois superiores, tióis e ésteres das leveduras.

A concentração de NFA em mostos naturais de uva varia entre 60 mg/L e 500 mg/L, dependendo da casta, da colheita e do microclima.

Em condições de deficiência de azoto, o crescimento das leveduras e a velocidade de fermentação são limitados. Uma concentração inicial de NFA baixa demonstrou ser responsável por fermentações mais lentas e paradas, razão pela qual a adição de azoto ao mosto se tornou numa ação necessária na produção vinícola.

Hoje em dia, a medição de NFA é uma boa forma para as adegas poderem avaliar o estado geral das uvas a nível da concentração de azoto, mas não necessariamente a nível da qualidade de azoto, o que é outro parâmetro chave do ponto de vista da fermentação e da qualidade sensorial do vinho final.

Para uma adequada gestão da fermentação, as melhores práticas de fermentação recomendam a adição de azoto na forma inorgânica (amónio) ou orgânica. O azoto orgânico tem demonstrado ser o nutriente mais eficiente e completo para garantir a fermentação e desenvolver o potencial aromático total da uva, como será mostrado mais adiante.

Onde encontramos Azoto?

No mosto: 1/3 do azoto é encontrado sob a forma de amónio e 2/3 em aminoácidos. Os mostos têm muitas vezes défice de NFA (i.e. < 150 mg/L).

O azoto proveniente de fontes externas pode ser adicionado ao mosto para um melhor desenvolvimento da fermentação:

- Azoto inorgânico: sais de amónio (DAP, DAS), que são adicionados durante a fermentação alcoólica
- Azoto orgânico: proteínas, peptídeos, tripeptídeos e aminoácidos livres provenientes das leveduras (leveduras inativadas e leveduras autolisadas). (Figura 1)

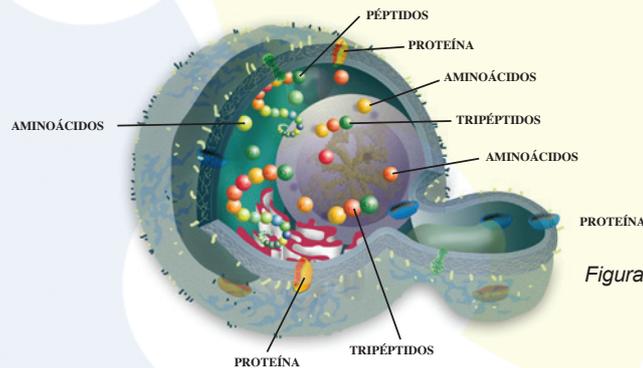


Figura 1. Imagem de uma célula de levedura indicando a localização dos compostos que contêm azoto (aminoácidos, peptídeos e proteínas)

Quando é mais eficiente a adição de azoto?

Diversos estudos foram realizados para determinar o momento ideal para a adição do azoto. Foi demonstrado que uma adição de azoto a 1/3 da fermentação, no momento em que a população de leveduras atinge o máximo – isto é, após o consumo do azoto no mosto (todo o azoto do mosto foi consumido pelas leveduras para a fase de multiplicação e biomassa) - tem o maior benefício na taxa de fermentação e cinética.

Uma única adição de azoto no início da fermentação não é recomendada, pois conduz a uma população de leveduras muito elevada, um aumento súbito da velocidade de fermentação acompanhada por uma reação exotérmica (libertação de calor) e uma redução elevada de azoto. Rapidamente as leveduras ficam sem azoto para converter o açúcar em etanol. Como apresenta a figura 2, fermentações lentas ou paradas podem ocorrer com uma única adição de DAP (30g/hl, equivalente a 63 mg/l de NFA) no início da fermentação.

Quando a nutrição orgânica é utilizada no início e a 1/3 da fermentação para uma melhor eficiência, o consumo do azoto é mais lento e mais controlado. Consequentemente, a fermentação é mais regular – sem picos de calor e com melhor controlo da temperatura – e a FA é concluída como mostra a figura 3.

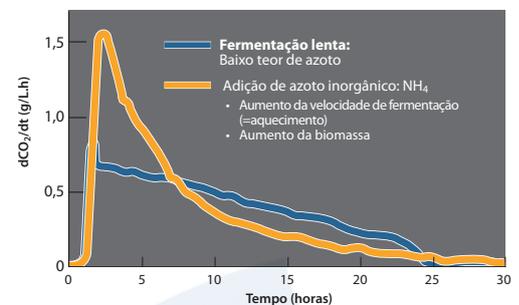


Figura 2. Impacto da nutrição inorgânica adicionada no início da fermentação alcoólica

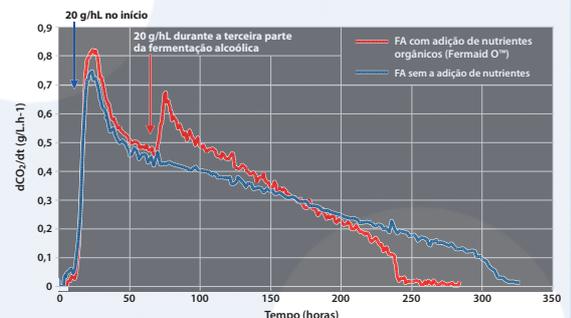


Figura 3. Impacto da adição de nutrição orgânica na fermentação alcoólica. 20g/hl (8mg/l de NFA) de azoto orgânico adicionado no início da fermentação e 20 g/hl (8mg/l de NFA) a 1/3 da FA

UMA PALAVRA DO NOSSO ESPECIALISTA

Jean-Marie Sablayrolles



Jean-Marie Sablayrolles é diretor de investigação do Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) e dirige a UMR - Unité Mixte de Recherche em Montpellier, França, um dos centros de investigação mais importantes a nível mundial, que desenvolve um grande número de projetos em enologia com 90 cientistas, técnicos e estudantes. As suas atividades de investigação

estão focadas em fermentações alcoólicas. Jean-Marie Sablayrolles desenvolveu novas estratégias para otimizar o controlo de fermentação baseado na monitorização online das cinéticas e adição de nutrientes, em particular o azoto assimilável. Jean-Marie Sablayrolles é o autor de 76 artigos científicos e 5 patentes.

O azoto assimilável é essencial na síntese de proteínas pelas leveduras. É habitualmente o nutriente limitante principal e a principal causa de fermentações lentas: em condições standard, existe uma relação entre a concentração de azoto assimilável no mosto e a velocidade máxima de fermentação. O azoto amoniacal e aminoácidos livres são a principal fonte de azoto embora alguns pequenos peptídeos também possam ser assimilados.

A concentração de azoto assimilável é considerada limitante quando é inferior a 150 mg/L. Nesse caso, a adição de 50 a 100 mg N/L é muito eficaz. Quando adicionado antes da inoculação, a população celular e a velocidade fermentativa durante a primeira metade da fermentação aumentam, mas a viabilidade celular poderá decrescer no final. Para diminuir o risco de fermentações paradas, a melhor solução é (i) adicionar azoto no início da fase estacionária, isto é, após 30-40 % da fermentação e (ii) associar esta adição com uma oxigenação ou usar um produto complexo contendo outros nutrientes, como lípidos. Azoto amoniacal pode então ser substituído pelo azoto orgânico, com um melhor efeito sobre as cinéticas de fermentação.

As necessidades em azoto assimilável são diferentes de acordo com as leveduras enológicas utilizadas. Este critério é agora bem quantificado e também deve ser considerado para otimizar a gestão da fermentação.

RESULTADOS

Função 1: O efeito do azoto nas cinéticas de fermentação

A concentração de NFA tem a maior influência na velocidade de fermentação; tem impacto na biomassa das leveduras no início da fermentação, assim como na cinética do transporte de açúcares durante a fermentação. Assim que um mosto tenha uma carência em azoto no final da fase de crescimento, existe uma redução da síntese de proteínas e da atividade de transporte de açúcares. A adição de NFA em mostos com défice de azoto conduz a uma redução significativa na duração da fermentação através da reativação da síntese de proteínas e aumentando a velocidade do transporte de açúcares, o que resulta num aumento da taxa de fermentação.

Existem cada vez mais estudos a descrever a diferença na eficiência entre as adições de azoto orgânico e inorgânico no que diz respeito às cinéticas. Na Figura 4, comparámos a eficiência de ambas as fontes (DAP para inorgânico e Fermaid O™ para orgânico) e aplicámos 2 estratégias de nutrição utilizando a mesma quantidade de NFA: 16 mg/L, na forma orgânica versus inorgânica. Foi realizada uma terceira fermentação, como testemunha, sem nutrição.

A figura 4 mostra que para uma quantidade equivalente de azoto assimilável adicionado, a adição de azoto orgânico efetivamente facilita a cinética de fermentação (linha verde) para se conseguir a fermentação completa. Com a fonte azotada inorgânica adicionada (linha roxa), a fermentação é lenta culminando com a paragem, como é o caso da fermentação testemunha (linha azul) sem azoto adicionado.

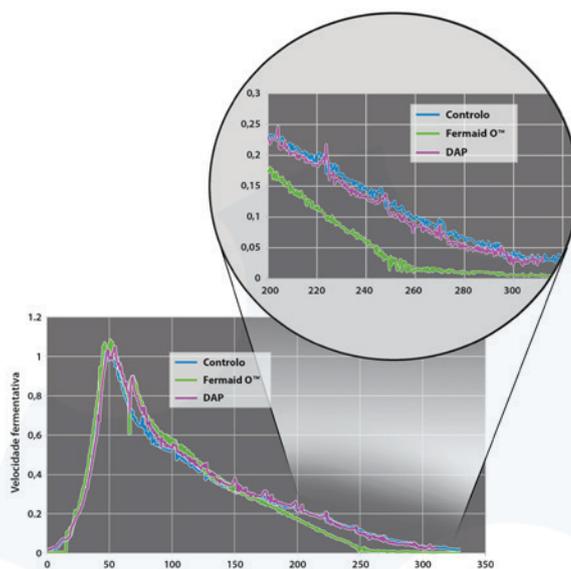


Figura 4. Cinética de fermentação de Viognier fermentado a 18° C com uma concentração de açúcar de 215 g/L, NFA inicial <100 mg/L. Adições de 16 mg/L de NFA sob 2 formas diferentes, azoto inorgânico (DAP) e azoto orgânico (nutriente orgânico), foram realizados em 2 fases de fermentação: 8 mg/L de NFA no início da fermentação alcoólica e 8 mg/L de NFA a 1/3 de FA. A secção com zoom representa o final da fermentação

RESULTADOS

Para uma dose equivalente de NFA, uma fonte de azoto orgânico é muito mais eficiente que uma fonte de azoto inorgânico.

Num mosto com elevada carência azotada (100 mg/L de NFA), uma estratégia apropriada de nutrição orgânica é eficiente e suficiente para completar a fermentação alcoólica.

Função 2: O impacto do azoto no perfil aromático do vinho

O metabolismo do azoto, nomeadamente aminoácidos, origina a formação de numerosos compostos aromáticos envolvidos na matriz do aroma do vinho: álcoois superiores e os seus acetatos. O metabolismo das leveduras também influencia a revelação ou preservação de certos precursores de aroma de natureza amino (precursores cisteinilados ou precursores glutationados de tióis varietais). Como resultado, a composição azotada do mosto pode modular o perfil aromático do vinho. O uso de nutrientes orgânicos tem vindo a mostrar que estes influenciam a formação de compostos aromáticos quando usados durante a fermentação alcoólica.

O impacto de diferentes fontes de azoto no perfil sensorial

1. Ésteres

O metabolismo de aminoácidos (anabolismo e catabolismo) por leveduras conduz à formação de álcoois superiores, ésteres de acetato e ésteres etílicos.

Foi estudada a modulação do perfil ésteres adicionando azoto (projeto AWRI-Lallemand, 2012). Adições de DAP versus adições de nutrientes orgânicos foram realizadas em uvas de Chardonnay. Alguns resultados são mostrados abaixo (Figura 5), comparando as sínteses dos compostos etílicos com uma adição de 50 mg/L de NFA sob forma de DAP versus 24 mg/L de NFA sob a forma de nutriente orgânico. Um aumento significativo para todos os compostos aromáticos foi observado com o nutriente orgânico, subjacente à elevada eficiência do azoto orgânico comparado com o azoto inorgânico no que concerne à formação de ésteres.

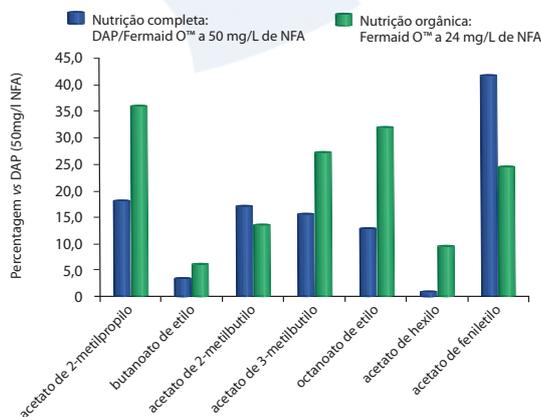


Figura 5. Chardonnay da adega Yalumba fermentado com duas fontes diferentes de azoto (DAP e Fermaid O™)

2. Tióis

Durante a fermentação foi evidenciado que níveis excessivos de amónio ou adição deste no início da FA limitam a libertação de tióis varietais pela levedura (Subileau *et al.* 2008). Este fenómeno pode ser explicado por uma repressão catabólica pelo amónio na síntese dos transportadores de aminoácidos nas leveduras em fermentação. Isto limita a entrada na célula de precursores de tióis do tipo cisteinilado e, conseqüentemente, a sua conversão intracelular em tióis voláteis (Figura 6).

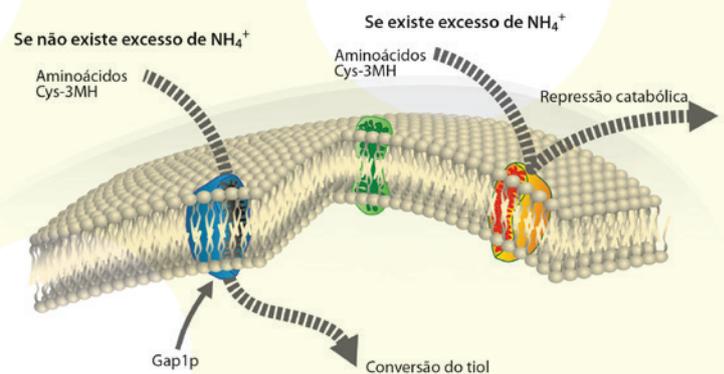


Figura 6. Transporte de aminoácidos Cys-3MH na membrana celular de levedura através da proteína de transporte Gap1p e repressão catabólica na presença de azoto inorgânico excessivo no mosto.

Em termos de produção de tióis, como é mostrado na figura 7, os tióis 3-MH e 3-MHA apresentam valores mais baixos quando o DAP é utilizado. Esta observação, feita no laboratório assim como à escala-piloto, levou à implementação de uma estratégia para nutrição azotada durante a FA, com a adição de somente nutrientes orgânicos, divididos entre o início da FA e a 1/3 da FA.

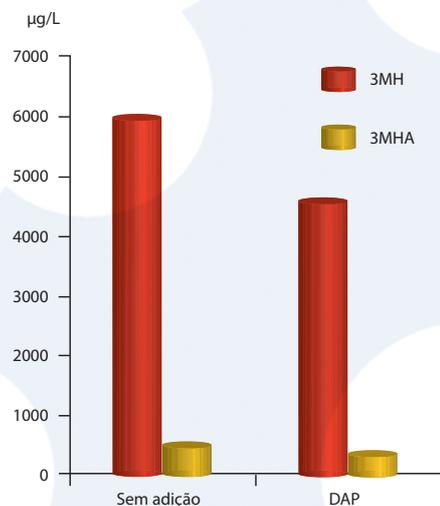
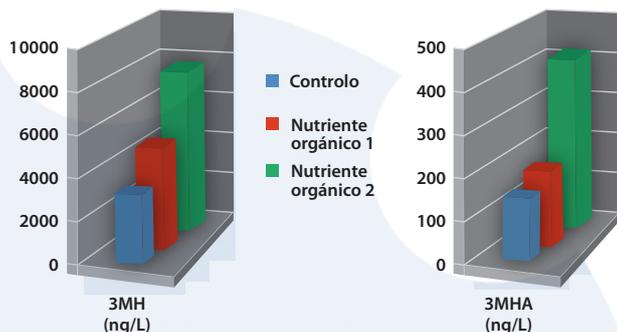


Figura 7. Concentração de tióis em Sauvignon (Gers, França 2004) com adição de DAP (de Schneider *et al.* 2008)

RESULTADOS

Duas fórmulas diferentes de nutrientes orgânicos foram testadas em uvas Colombard, que são muito ricas em precursores de tióis. Observando os resultados na libertação de 3-MH e o acetato de 3-MH, confirmamos o impacto positivo da nutrição orgânica na conversão e revelação de tióis. (Figura 8a e 8b).

Na figura 9 abaixo, as diferenças são muito significativas: um painel profissional de provadores preferiu claramente a nutrição orgânica, que origina vinhos mais complexos e intensos com uma maior persistência aromática.



Figuras 8a e 8b. Concentração de tióis (3-MH e 4-MMP) em Colombard (França, 2014) com nutrientes orgânicos diferentes em comparação com uma testemunha de fermentação (sem estratégia nutricional).

3. Impacto da fonte de azoto no perfil sensorial do vinho

Em todos os testes, conseguimos salienta a influência positiva do nutriente orgânico no perfil sensorial do vinho, principalmente quando comparado com a nutrição inorgânica, como, a adição de DAP.

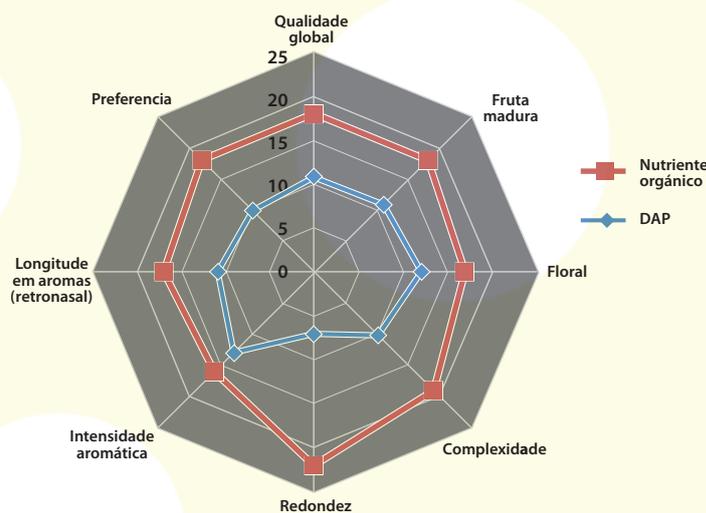


Figura 9. Perfil sensorial de um Viognier de 2012 de Côte du Rhône (França) comparando nutrição orgânica e inorgânica

UMA PALAVRA DO NOSSO ESPECIALISTA

José Manuel Guillamón



José Manuel Guillamón foi Professor Assistente na Faculdade de Enologia em Tarragona (1994-2007), Espanha, e, atualmente é professor Investigador no Instituto de Agroquímica y Tecnología De Alimentos (IATA-CSIC) em Valência, Espanha. A sua atividade de investigação tem-se focado no metabolismo das leveduras enológicas durante a fermentação alcoólica, com especial ênfase em dois

tópicos: metabolismo de azoto e fermentações a baixas temperaturas. Tem fornecido informações importantes sobre o impacto de cada fonte de azoto puro no crescimento das leveduras, atividade fermentativa e produção aromática. José Manuel Guillamón é o autor de 90 artigos científicos, orador convidado em 30 congressos nacionais e internacionais, supervisor de 10 teses de doutoramento, 3 patentes (2 delas transferidas para a indústria), assim como mais de 25 artigos em jornais técnicos de vinhos.

A disponibilidade de azoto é importante na vinificação: regula a formação da biomassa das leveduras e, por sua vez, a taxa de fermentação e o tempo de conclusão da fermentação. Além disso, a natureza e a quantidade de azoto em mostos de uva também afetam a síntese dos aromas de fermentação e a produção dos aromas varietais (libertação de tióis). A indústria enológica gere as fermentações carenciadas em azoto através da adição de diferentes preparações azotadas. Contudo, é importante conhecer o impacto da concentração e da fonte de azoto adicionado na atividade de fermentação e na produção aromática, bem como, a melhor forma de realizar estas adições.

Embora a disponibilidade de azoto na fase estacionária não tenha qualquer efeito no crescimento das leveduras, as adições nesta fase de fermentação estimulam a taxa fermentativa e têm um grande impacto na síntese de aromas. No entanto, nesta fase de fermentação, a adição de azoto orgânico origina elevadas concentrações de ésteres de acetato de etilo, sendo estes os principais compostos que atribuem notas frutadas e florais aos vinhos. Assim, a combinação de diferentes estirpes de leveduras enológicas com diferentes concentrações e fontes de azoto podem ser usadas para obter perfis aromáticos novos e originais.

Durante a produção de vinho espumante, a nutrição de azoto ótima durante a preparação do pé-de-cuba normalmente é suficiente para assegurar as exigências de azoto durante a segunda fermentação em garrafa, e para assegurar o bom desenvolvimento deste processo. Mais uma vez, o uso de azoto orgânico no pé-de-cuba reforça a produção do aroma durante a segunda fermentação.

EM SÍNTESE

Leveduras enológicas requerem determinados elementos essenciais para transformar o mosto em vinho: açúcares, vitaminas e minerais, algum oxigénio, e também muito importante, uma concentração suficiente em Azoto Facilmente Assimilável. Este tipo de azoto (NFA) é composto por aminoácidos, alguns pequenos peptídeos e amónio que pode ser utilizado pelas células das leveduras não apenas para completar a fermentação, mas também para desenvolver plenamente o perfil sensorial do vinho. Muitos mostos têm carência em azoto. O tipo de nutriente utilizado e o momento da sua adição são cruciais no desenvolvimento da FA.

Foi demonstrado que nutrientes orgânicos, cujos aminoácidos, peptídeos e proteínas contêm azoto provenientes das células de leveduras autolisadas presentes no Fermaid O™, por exemplo, adicionados no início da fermentação e a 1/3 da FA, são a melhor estratégia para atingir uma FA regular e completa e para maximizar o potencial sensorial do vinho.

CONTACTE-NOS

Lallemand França/Suíza/China

Lallemand SAS

fb.france@lallemand.com

Tel: +33.5.62.74.55.55

Lallemand Itália

fb.italia@lallemand.com

Tel: +39 (0) 45 51 25 55

Lallemand Península Ibérica

wine@lallemand.com

Tel: (+34) 914126747

Lallemand Alemanha, Austria, Grécia, Hungria, Israel, Chipre, Malta, Polónia

fb.eurocenter@lallemand.com

kburger@lallemand.com

Tel/Fax: (+43) 27 35 80 147

Ferment Croácia, Eslovénia, Macedónia, România, Rússia, Sérvia, Moldávia, Ucrânia

nmaslek@lallemand.com

Tel : (+385) 98 30 24 62

Lallemand Escandinávia y Reino Unido

sigrid@lallemand.com

Tel: +45 5357 2280

Lallemand Norteamérica, México, Japón, Taiwán

gspecht@lallemand.com

Lallferm S.A. Chile, Argentina, Uruguay, Brasil, Ecuador, Colombia

pcarriles@lallemand.com

Tel: +54 (261) 425 67 89

Lallemand Austrália, Nueva Zelândia

australiaoffice@lallemand.com

Tel: 61 (8) 276 1200

Lallemand Sudáfrica

ploubser@lallemand.com

Tel: +27 21 913 7555

Lallemand – um dos principais produtores de leveduras e bactérias enológicas selecionadas da natureza, e seus nutrientes, e motor de desenvolvimento de aplicações enzimáticas específicas – é uma empresa privada, organizada em divisões que operam em todo o mundo. A Divisão de Enologia, sediada em Toulouse, França, tem como principal foco a investigação e desenvolvimento, tanto internamente como em colaboração com centros de investigação de renome.

