

ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE VISEU

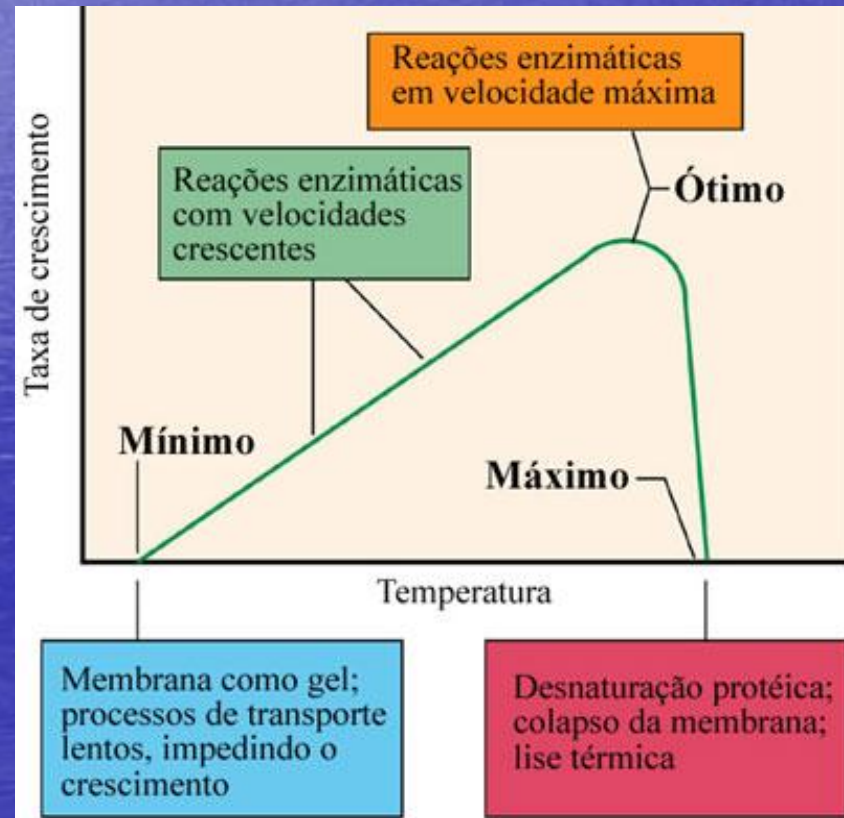
**Curso Técnico Superior Profissional Em
Viticultura e Enologia
MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA**

ANTÓNIO PINTO

2018/2019

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
- Microrganismos e temperatura de crescimento:
 - Temperatura mínima, óptima e máxima.



MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- **RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**
- **Efeito da temperatura no crescimento das leveduras:**
 - **As leveduras vínicas podem crescer num intervalo amplo de temperaturas – 10°C a 40°C.**
 - **A temperatura a que a fermentação alcoólica é conduzida, afecta:**
 - **Velocidade de crescimento das leveduras;**
 - **A duração da fermentação;**
 - **As espécies dominantes durante a fermentação;**
 - **Extensão e a natureza das reacções bioquímicas que as leveduras produzem;**
 - **A composição química e organoléptica (qualidade sensorial) dos vinhos produzidos.**

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
- Efeito da temperatura no crescimento das leveduras:

- Velocidade de crescimento:

- Durante a fermentação alcoólica, a velocidade de crescimento das leveduras aumenta, com o aumento da temperatura;

- As velocidades máximas de crescimento, ocorrem geralmente entre as temperaturas de 20°C a 25°C;

- Quando a temperatura ultrapassa os 30°C, a *S. cerevisiae*, aumenta a sua sensibilidade ao etanol e a fermentação pode parar prematuramente;

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- **RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**
- **Efeito da temperatura no crescimento das leveduras:**
 - **Velocidade de crescimento:**
 - **As técnicas de refrigeração são muito importantes, para o controlo das temperaturas;**
 - **Vinhos tintos são geralmente fermentados entre 20 e 30 °C;**
 - **Vinhos brancos são geralmente fermentados entre 10 e 20 °C (promove-se a produção e a retenção de aromas interessantes);**
 - **Seleccção e uso de estirpes de *S. cerevisiae*, com boas velocidades de crescimento a tão baixas temperaturas.**

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
- Efeito da temperatura no crescimento das leveduras:
 - Leveduras dominantes durante a fermentação:
 - *Kloeckera apiculata* domina as fermentações entre 10° e 20 °C (Leveduras não *Saccharomyces*)
 - *S. cerevisiae* é a espécie dominante a 30°C;
 - A temperaturas de 25°C as leveduras *Candida stellata* e *K. apiculata* começam a morrer após o 3º dia da fermentação;
 - *S. cerevisiae* continua a ser a espécie dominante a 25°C e mantendo-se até ao final da fermentação;
 - As leveduras Não *Saccharomyces* tendem a dominar as fermentações a temperaturas inferiores a 20°C;
 - As *Saccharomyces* dominam a temperaturas superiores a 20°C.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

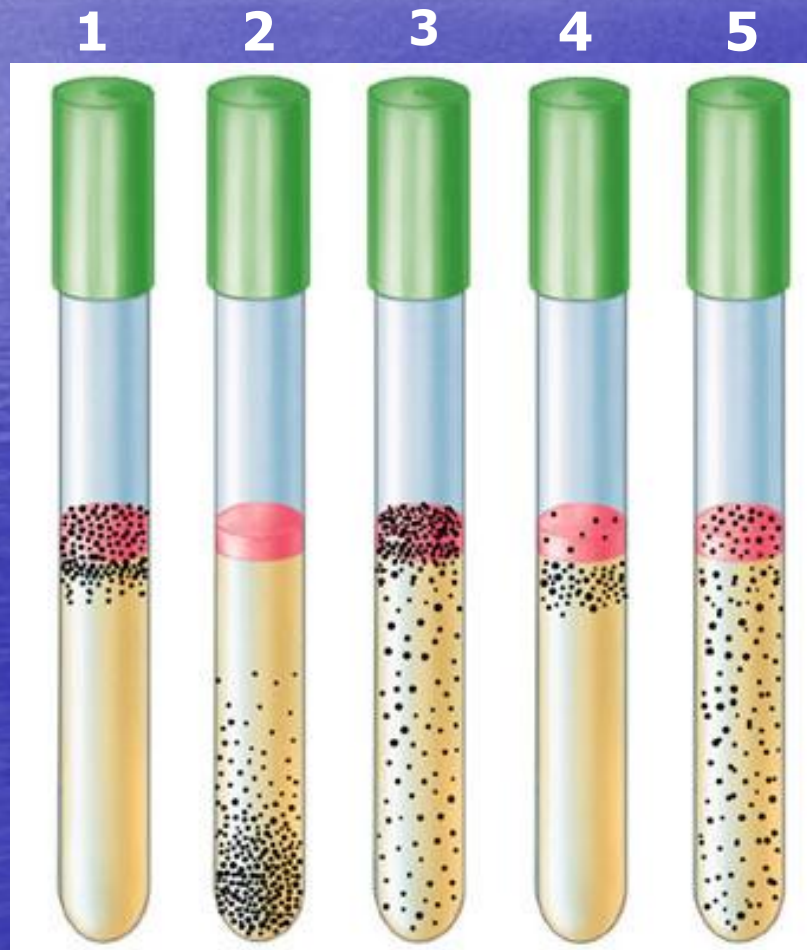
- RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
- Efeito da temperatura no crescimento das leveduras:
 - Composição química e organoléptica (qualidade sensorial) dos vinhos produzidos:
 - Leveduras das espécies de *K. apiculata*; *C. stellata* e outras espécies não-saccharomyces produzem quantidades maiores de substâncias voláteis (produtos secundários) que a espécie *S. cerevisiae*;
 - Estes produtos secundários, tais como álcoois superiores, ésteres e acetaldeídos interferem na qualidade dos vinhos produzidos;
 - Os açúcares metabolizados pelas leveduras não-saccharomyces não são convertidos em tão altas concentrações de Etanol.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- **RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**
- **Efeito da temperatura no crescimento das leveduras:**
 - **Composição química e organoléptica (qualidade sensorial) dos vinhos produzidos:**
 - Assim os vinhos produzidos a partir de fermentações, a baixas temperaturas, são menos alcoólicos e com características sensoriais diferentes;
 - Isto porque a baixas temperaturas (inferiores a 20 °C) dominam as leveduras não – *saccharomyces* que possuem um potencial de qualidade diferente da *S. cerevisiae*;
 - Sugere-se assim, o uso combinado de Leveduras não – *saccharomyces* e de *saccharomyces* para a obtenção de vinhos aromáticos (frutados) e com bom teor alcoólico.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
- Resposta dos Microrganismos ao Oxigénio (O₂)



MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- **RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**
- **Resposta dos Microrganismos ao Oxigénio (O₂)**

- Aeróbios:

- 1- Obrigatórios:** requerem oxigénio para crescimento e este serve de aceitador final de electrões.
- 3- Aeróbios Facultativos:** Crescem tanto na presença como na ausência de O₂ (Leveduras na ausência oxigénio fermentam e na sua presença respiram).
- 4- Microaerofílicos:** requerem baixa concentração de O₂ .

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- **RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**
- **Resposta dos Microrganismos ao Oxigénio (O_2)**

- **Anaeróbios:** Utilizam como aceitador final de electrões substâncias diferentes do oxigénio.

2- **Obrigatórios:** Só crescem na ausência de oxigénio. A presença de oxigénio causa-lhe danos letais.

5- **Aerotolerantes:** não necessitam de O_2 para o crescimento, mas podem crescer na sua presença.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

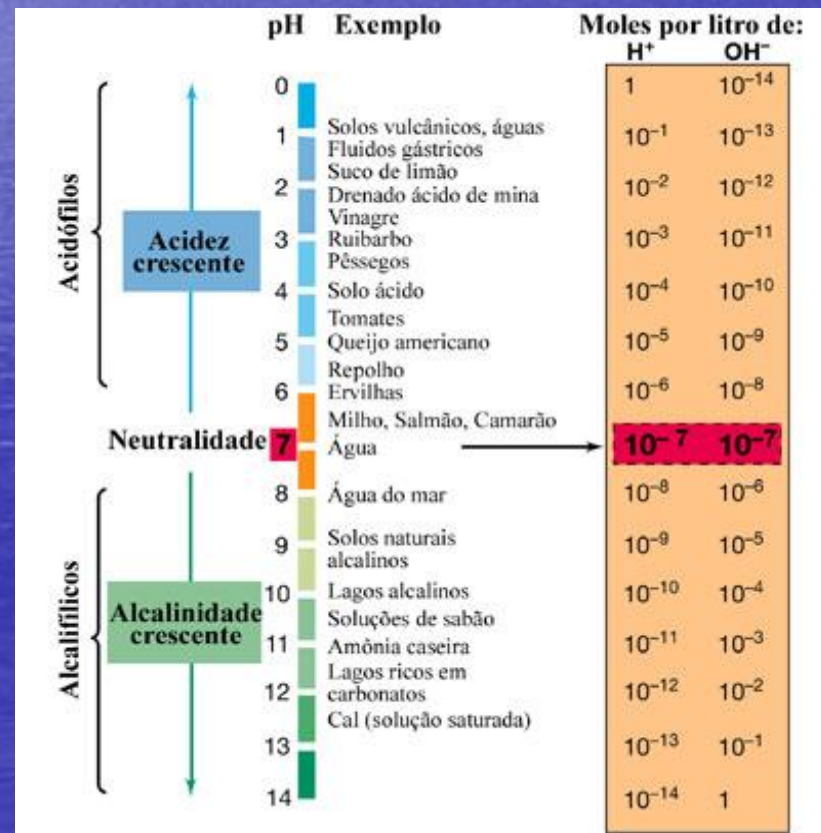
- **RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**
- **Resposta das leveduras vínicas ao Oxigénio (O_2):**
 - **Arejamento (remontagens):**
 - **A fermentação alcoólica não é possível em condições de anaerobiose estrita;**
 - **A presença de oxigénio dissolvido no mosto é importante para a multiplicação das leveduras e para o arranque da fermentação;**
 - **Depois de iniciada a fermentação as leveduras já não necessitam do oxigénio;**

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- **RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**
- **Resposta das leveduras vínicas ao Oxigénio (O₂):**
 - **Arejamento (remontagens):**
 - **O Oxigénio pode ser um factor estimulante, mas também inibitório da fermentação (Efeito de Pasteur);**
 - **Oxigénio em excesso pode desviar a fermentação e portanto a produção de álcool. Os açúcares seriam respirados e não fermentados;**
 - **O processo respiratório promove o aumento do número de células (produção de biomassa) e os açúcares seriam transformados em ATP, água e CO₂ , em vez de álcool.**

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
- Resposta dos Microrganismos ao pH:



MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

Intervalos de pH para vários microrganismos
Adaptado de ICMSF (1980)

	Valores mínimos de pH	Valores máximos de pH
Bactérias Gram negativas:		
<i>Acetobacter acidophilum</i>	2,8	4,3
<i>Acalligenes faecallis</i>	6,4	9,7
<i>Escheríchia coli</i>	4,4	9,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6	8,0
<i>Salmonella spp.</i>	4,0-4,5	8,0-9,6
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	1,0	9,8
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,8	11,0
Bactérias Gram positivas:		
<i>Bacillus cereus</i>	4,9	9,3
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5,2	9,2
<i>Clostridium botulinum</i>	4,7	8,5
<i>Enterococcus spp.</i>	4,8	10,6
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3,8	7,2
<i>Lactobacillus spp.</i>	3,8-4,4	7,2
<i>Streptococcus lactis</i>	4,3-4,8	9,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	9,8

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- Intervalos de pH para vários microrganismos
 - Adaptado de ICMSF (1980)

	Valores mínimos de pH	Valores máximos de pH
Leveduras:		
<i>Candida spp.</i>	1,5-2,3	8,8
<i>Saccharomyces spp.</i>	1,5-2,4	8,6-9,0
<i>Schizosacharomyces octosporus</i>	5,5	7,0
<i>Hanseniaspora melligeri</i>	1,5	Nd.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,5	Nd.
<i>Zigossacharomyces bailli</i>	1,8	Nd.
 Bolores:		
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,6	9,3
<i>Penicillium spp.</i>	1,6 -1,9	9,3-11,1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,8	11,1

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- **RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**
- **Resposta dos Microrganismos ao pH:**
 - Os microrganismos conseguem crescer num intervalo de pH, bastante largo: 1-11.
 - A generalidade dos microrganismos cresce melhor a valores de pH próximos da neutralidade (6,6-7,5).
 - Os bolores e as leveduras possuem intervalos de crescimento de pH, maiores do que as bactérias.
 - Os bolores e as leveduras são, em geral, mais tolerantes aos valores baixos de pH, que as bactérias.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- **RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS**
- **Resposta dos Microrganismos ao pH:**
 - **Dentro dos fungos, as leveduras são mais tolerantes aos valores baixos de pH, do que os bolores.**
 - **Dentro das bactérias podemos afirmar que em geral, as bactérias Gram negativas são mais tolerantes, aos valores baixos do pH, que as Gram positivas.**
 - **Dentro das bactérias Gram positivas, são as bactérias lácticas, que conseguem crescer a pH mais baixos (*Lactobacillus* pH de 3.8). Indicador importante para o arranque da fermentação malo-láctica (vinhos tintos). Outras bactérias lácticas apresentam mínimos de pH de 3.2**

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

- RECORDANDO ALGUNS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
- Resposta das Leveduras vínicas ao pH:
 - *S. cerevisiae* tende a diminuir a sua velocidade de fermentação quando o pH baixa de 3.5 para 3.0.
 - pH do mosto à volta dos 3.5 favorece o desenvolvimento de *S. cerevisiae*.
 - As leveduras não-saccharomyces parecem ser também favorecidas por valores de pH de 3.5.
 - A importância das correcções ácidas do mosto (ácido tartárico), para baixar o pH para valores que promovam o crescimento das leveduras Saccharomyces.

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

Mosto da Uva como Substrato de Microrganismos

- O sumo da uva (mosto) apresenta uma composição química e física que permite fornecer os nutrientes necessários ao crescimento de variados microrganismos, em particular da leveduras:
 - Fontes de energia: a energia contida nos compostos químicos orgânicos (açúcares fermentáveis— 125-250 g/l, constituídos por Glucose e Frutose);
 - Fontes de carbono: Carbono de origem orgânica constituinte dos compostos ricos energia;
 - Fontes de azoto: os mostos possuem proteínas, péptidos, aminoácidos livres e azoto inorgânico (iões de amónio – NH_4^+);

MICROBIOLOGIA ENOLÓGICA

Mosto da Uva como Substrato de Microrganismos

- Vitaminas: os mostos possuem suficientes concentrações de vitaminas (tiamina, inositol, ácido pantoténico, biotina, etc);**
- Sais minerais;**
- pH: ácido (3 - 4,5), dependendo das concentrações de ácido tartárico e málico;**
- Actividade de água: valores de a_w adequados ao crescimento;**

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Diversidade e importância dos microrganismos enológicos

Grupo de Microrganismos	Importância e significado
LEVEDURAS	Fermentação alcoólica; alterações defeituosas; autólise; desacidificação; efeito Killer (leveduras assassinas).
Bactérias lácticas	Fermentação maloláctica; alterações defeituosas; autólise.
Bactérias acéticas	Alterações defeituosas; amuos de fermentação.
Bolores	Vinhos botritizados; alterações defeituosas; sabor a rolha.
Bactérias esporuladas	Alterações defeituosas nos vinhos.
Actinomicetos	Odor terra e a rolha.
Virus	Paragens da fermentação maloláctica.

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana - LEVEDURAS (Vinificação):

ProDessert®

Leveduras Encapsuladas

O que é?

- Na vinificação de vinhos de colheita tardia, nem sempre é simples parar a fermentação, quando se atinge o teor de açúcar pretendido.
- Na generalidade, este bloqueio é obtido através do arrefecimento e/ou trasfega ao abrigo do ar, filtração e posterior adição de dióxido de enxofre (SO_2 livre = 50-60 mg/L).
- A utilização de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* encapsuladas facilita a remoção da levedura do vinho e consequente bloqueio da fermentação, sendo deste modo, uma ferramenta simples e eficaz para a produção deste tipo de vinhos.

Vantagens

- **Facilidades de uso:** as leveduras encapsuladas são introduzidas no meio em sacos de rede permeáveis.
- **Melhoria da filtrabilidade:** a dupla camada de alginato de cálcio evita a saída das leveduras do interior da cápsula.
- **Controlo preciso do tempo de permanência:** facilidade e eficácia no bloqueio da fermentação alcoólica (remoção dos sacos) quando se atinge a concentração de açúcares residuais desejada.
- **Diminuição dos teores de dióxido de enxofre** a aplicar ao vinho.
- **Simplificação/melhoria do processo produtivo.**

A Proenol desenvolveu este produto para facilitar a produção de vinhos de colheita tardia.

Levedura encapsulada seca activa
Saccharomyces cerevisiae

ProDessert®

ProDessert® é adicionado ao mosto em sacos permeáveis, podendo ser retirado quando for atingido o nível desejado de açúcar residual.

Como a levedura permanece encapsulada em dupla camada de alginato, a fermentação é facilmente interrompida.

Esquema de utilização

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana - LEVEDURAS (Vinificação):

Dose de aplicação

- 100 g/hL de mosto.

Rehidratação/Aplicação

RECOMENDAÇÕES PARA APLICAÇÃO:

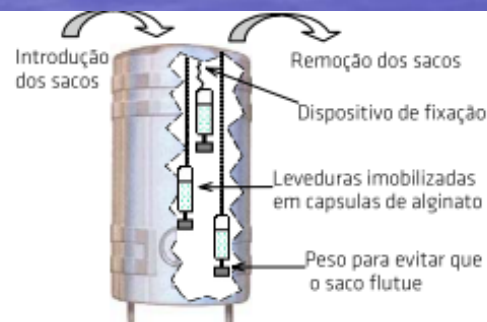
- SO_2 Livre <15mg/L.

REHIDRATAÇÃO:

1. Retirar o **ProDessert**® da temperatura de armazenamento ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) e aguardar que atinja a temperatura ambiente. Esta etapa evita um choque térmico durante a rehidratação.
2. Introduzir o **ProDessert**® nos sacos de rede, próprios para o efeito (máx. 5 Kg/saco).
3. Preparar a solução de rehidratação (solução com 40 g/L de açúcar) a uma temperatura de 37°C . O volume de solução deverá ser 5 vezes superior ao peso das esferas.
4. Aguardar 4-5h antes da inoculação.
5. O diferencial de temperatura entre o **ProDessert**® e o mosto não deverá ser superior a 10°C .

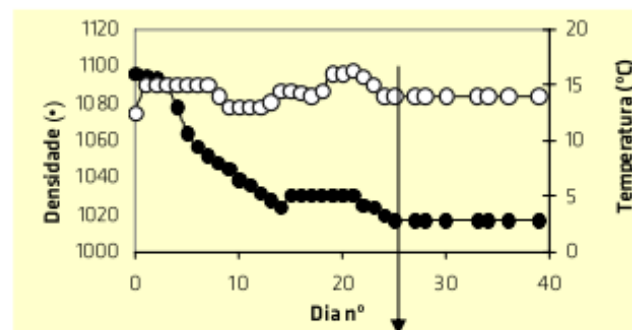
APLICAÇÃO:

1. Após as 4-5h de rehidratação, introduzir no mosto os sacos de rede contendo o **ProDessert**®.
2. No caso da introdução de vários sacos num depósito, estes deverão ser distribuídos a diferentes alturas.
3. É recomendado aplicar um peso na parte inferior dos sacos para evitar que estes flutuem. Os sacos deverão ser agitados várias vezes ao dia para libertar o CO_2 acumulado à volta das esferas.
4. O **ProDessert**® deverá permanecer no vinho até se obter a concentração de açúcares residuais pretendida.



ProDessert® nas Adegas

Aplicação de **ProDessert**® na região de Gers, Sudoeste de França, casta Gros-Manseng.



Remoção de **ProDessert**® a 50g/L Açúcares Residuais

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana - LEVEDURAS (Vinificação):

Embalagem/Armazenamento

- O **ProDessert**[®] apresenta-se em embalagens de 1Kg e deve ser conservado a uma temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Juntamente com o produto são fornecidos sacos de rede para a aplicação do produto.
- O prazo de validade de **ProDessert**[®] é de 6 meses.

Qualidade, Segurança e Ambiente

- Não contém Organismos Geneticamente Modificados, não foi produzido a partir dos mesmos e não inclui substâncias com origem nos referidos organismos.
- Não tratado por radiação ionizante.
- Não contém as substâncias alérgicas referidas na Directiva 2007/68/CE.
- Está conforme os Regulamentos CE 479/2008 e 606/2009.
- Está conforme o Codex Enológico Internacional,

O fabricante garante a qualidade dos seus produtos vendidos na embalagem de origem. As informações contidas nos documentos são fundamentadas nos nossos conhecimentos actuais e no resultado de ensaios efectuados com grande preocupação de objectividade; a sua adaptação a cada caso particular, assim como as consequências de circunstâncias de cada tratamento não comprometem a nossa responsabilidade.

Especificações Técnicas

Definição

Leveduras encapsuladas desidratadas.

Descrição

Leveduras *Schizosaccharomyces* imobilizadas em alginato de cálcio. As leveduras imobilizadas têm origem em culturas isoladas da uva.

Aplicação

Auxiliar tecnológico para a produção de vinhos de “colheita tardia”.

Características Analíticas

Parâmetros	Especificações
Sólidos	> 86 %
Metais pesados (expresso em chumbo)	< 10 mg/Kg ^(a)
Arsénio	< 3 mg/Kg ^(a)
Chumbo	< 5 mg/Kg ^(a)
Cádmio	< 1 mg/Kg ^(a)
Mercúrio	< 2,4 mg/Kg ^(a)
Leveduras viáveis	> 10 ⁹ ufc/g
Bactérias aeróbias mesófilas	< 10 ³ ufc/g
Bolores	< 10 ³ ufc/g
Coliformes	< 10 ufc/g
E.coli	Ausência em 1 g

^(a) Valores referentes à matéria seca

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana – Leveduras (Desacidificação biológica -Fermentação malo-alcoólica)

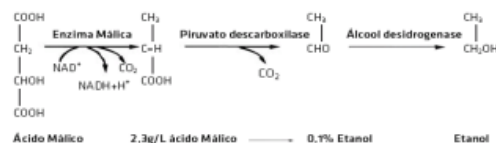
ProMalic®

- A experiência na imobilização de microrganismos permitiu à Proenol o desenvolvimento da tecnologia para a produção, encapsulação e secagem da *Schizosaccharomyces pombe* em esferas com dupla camada de alginato.
- Esta tecnologia permite que após a introdução do **ProMalic®** no mosto/vinho a levedura desempenhe a sua actividade fermentativa dentro da cápsula, através da entrada de substratos e saída de metabolitos da esfera, garantindo que a levedura permanece no interior da cápsula durante a sua utilização.
- O controlo do tempo de permanência da *Schizosaccharomyces pombe* no mosto/vinho é fundamental para se retirar partido das qualidades desta estirpe, porque a presença prolongada da levedura no mosto/vinho poderá originar a produção de aromas indesejáveis.

Vantagens

- Controlo preciso e simples da desacidificação parcial ou total.** As esferas são facilmente removidas do mosto/vinho quando se atinge a acidez pretendida.
- Valorização da fracção aromática e frescura dos vinhos** devido à ausência de produção de ácido láctico.
- Capacidade de desacidificação mesmo em casos de acidez elevada.**
- Método menos “invasivo” do que a desacidificação química,** valorizando as características organolépticas do vinho.
- A dupla camada de alginato** das esferas evita a saída das leveduras para o mosto/vinho.
- Aplicação em mosto ou vinho.**

FERMENTAÇÃO MALO-ALCOÓLICA:



A Proenol desenvolveu este produto para a desacidificação biológica de mostos e vinhos

Levedura encapsulada seca activa *Schizosaccharomyces pombe*

O ProMalic® apresenta-se como uma ferramenta inovadora para o controlo da acidez em mostos e vinhos.

A *Schizosaccharomyces pombe* tem uma forte capacidade de degradação do ácido málico produzindo álcool através da fermentação malo-alcoólica.

A encapsulação da levedura em dupla camada de alginato permite o controlo da presença da levedura no meio e uma redução total ou parcial da acidez, visto que o ProMalic® é facilmente retirado do mosto/vinho quando se atinge a acidez pretendida.

A ausência de produção de ácido láctico realça a fracção aromática dos vinhos.

- Retirar os sacos da solução e introduzi-los no mosto tendo em atenção que a diferença de temperatura entre a solução de rehidratação e o mosto não deverá ser superior a 10°C.

REHIDRATAÇÃO – APLICAÇÃO EM VINHO:

- Retirar o ProMalic® da temperatura de armazenamento (4±2°C) e aguardar que este atinja a temperatura ambiente.
- Introduzir o ProMalic® nos sacos de rede fornecidos com o produto. **Cuba:** Máx. 5kg/saco. **Barrica:** Máx. 85kg/saco.
- Preparar uma solução de rehidratação/aclimatização a 30°C com 1/3 de vinho a desacidificar e 2/3 de água. O volume de solução deverá ser 5 vezes superior ao peso do ProMalic®. Adicionar 40g/L de açúcar.
- Imergir na solução os sacos de rede com o ProMalic®. Aguardar 12-17h. É aconselhável iniciar o protocolo no final do dia para inoculação do ProMalic® no vinho no início do dia seguinte.
- Retirar os sacos com o produto da solução e introduzi-los no vinho tendo em atenção que a diferença de temperatura entre a solução de rehidratação/aclimatização e o vinho não deverá ser superior a 10°C.

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana – Leveduras (Desacidificação biológica -Fermentação malo-alcoólica)

Como utilizar?

- O **ProMalic®** poderá ser aplicado no mosto no início da fermentação alcoólica ou em vinho, sendo fornecido com sacos de rede para a aplicação em cubas ou barricas.
- A aplicação em mosto requer uma etapa prévia de rehidratação e a aplicação em vinho requer uma etapa prévia de rehidratação/aclimatização.
- Para a aplicação em vinho o sulfuroso livre deverá ser corrigido para 30mg/L, antes de inocular o produto.

DOSE DE APLICAÇÃO: 100 g/hL

REHIDRATAÇÃO – APLICAÇÃO EM MOSTO:

1. Retirar o **ProMalic®** da temperatura de armazenamento ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) e aguardar que este atinja a temperatura ambiente.
2. Introduzir o **ProMalic®** nos sacos de rede fornecidos com o produto. **Cuba:** Máx. 5kg/saco. **Barrica:** Máx. 85kg/saco.
3. Preparar a solução de rehidratação com 40 g/L de açúcar a 27°C , tendo em conta que o volume de solução deverá ser 5 vezes superior ao peso das esferas.
4. Imergir os sacos de rede com **ProMalic®** e aguardar 4-5h.

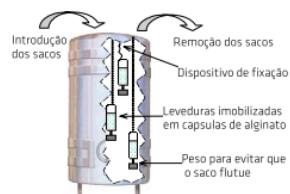
Conselhos de utilização

- No caso da introdução de vários sacos num depósito, estes deverão ser distribuídos a diferentes alturas.
- É recomendada a utilização de um peso na parte inferior dos sacos para evitar que estes flutuem.
- Os sacos deverão ser agitados periodicamente para libertarem o CO_2 acumulado no exterior das esferas.
- O **ProMalic®** deverá permanecer no mosto/vinho até se obter a concentração de málico ou acidez total pretendida

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana – Leveduras (Desacidificação biológica -Fermentação malo-alcoólica)

Esquema de utilização

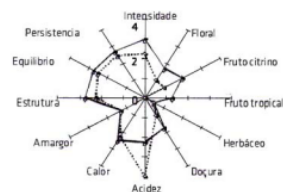


ProMalic® nas Adegas

Aplicação do **ProMalic®** em mosto da casta Azal na Região dos Vinhos Verdes. O objectivo da aplicação do **ProMalic®** era proceder a uma degradação parcial do ácido málico. Quando se atingiu a concentração de málico pretendida retirou-se o **ProMalic®** do mosto de forma a parar a desacidificação.

	Antes da aplicação	Depois da aplicação
Ph	3,12	3,34
Ac. Total (g/L)*	11,2	7,2
Ac. Málico (g/L)	8,4	2,4

* Expresso em ácido tartárico



(---) Controlo; (---) Aplicação do **ProMalic®**

O consumo de málico poderá variar em função das características do mosto/vinho e da extensão da desacidificação:

- 0,4-1g/L/Dia em mostos,
- 0,05-0,1g/L/Dia em vinhos.

A cinética em vinhos é inferior à cinética em mostos, devido às condições mais adversas para a levedura (álcool mais elevado).

Embalagem/Armazenamento

- Embalagens de 1Kg fornecidas com sacos de rede para aplicação do produto e deve ser conservado a uma temperatura de 4±2°C.
- Após abertura da embalagem o produto deverá ser utilizado imediatamente.

Especificações Técnicas

Definição

Leveduras encapsuladas desidratadas.

Descrição

Leveduras *Schizosaccharomyces pombe* imobilizadas em alginato de cálcio. As leveduras imobilizadas têm origem em culturas isoladas da uva.

Aplicação

Auxiliar tecnológico para a desacidificação de mostos e vinho.

Características Analíticas

Parâmetros	Especificações
Sólidos	> 86 %
Metais pesados (expresso em chumbo)	< 10 mg/Kg ^(a)
Arsénio	< 3 mg/Kg ^(a)
Chumbo	< 5 mg/Kg ^(a)
Cádmio	< 1 mg/Kg ^(a)
Mercurio	< 2,4 mg/Kg ^(a)
Leveduras viáveis	> 10 ³ ufc/g
Bactérias aeróbias mesófilas	< 10 ³ ufc/g
Bolores	< 10 ³ ufc/g
Coliformes	< 10 ufc/g
E.coli	Ausência em 1 g

^(a) Valores referentes à matéria seca

Qualidade, Segurança e Ambiente

- Não contém Organismos Geneticamente Modificados, não foi produzido a partir dos mesmos e não inclui substâncias com origem nos referidos organismos.
- Não tratado por radiação ionizante.
- Não contém as substâncias alergénicas referidas na Directiva 2007/68/CE.
- Está conforme os Regulamentos CE 479/2008 e 606/2009.
- Está conforme o Codex Enológico Internacional

O fabricante garante a qualidade dos seus produtos vendidos na embalagem de origem. As informações contidas nos documentos são fundamentadas nos nossos conhecimentos actuais e no resultado de ensaios efectuados com grande preocupação de objectividade; a sua adaptação a cada caso particular, assim como as consequências de circunstâncias de cada tratamento não comprometem a nossa responsabilidade.



Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana – Bactérias Lácticas (Fermentação malo-láctica)

Aplicações

- O kit de bactérias **ALPHA 1-Step®** oferece uma cultura de bactérias lácticas muito eficaz, que promove a fermentação maloláctica (FML) em vinho tinto, rosé e branco numa ampla gama de condições de vinificação.
- Através de um pequeno protocolo de aclimatização, utilizando a espécie *Oenococcus oeni* e uma mistura de activadores, obtemos um inóculo de **ALPHA 1-Step®** com a bactéria aclimatizada e o seu metabolismo activo.

Propriedades Enológicas e Microbiológicas

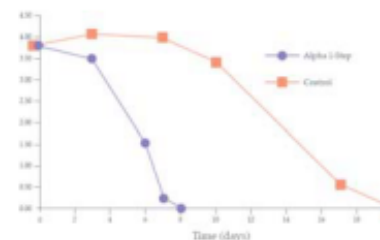
- Estirpe de bactéria **Alpha**: seleccionada pelo Institut Technique du Vin (ITV) em França, a partir de fermentações malolácticas espontâneas que mostraram boa actividade de fermentação.
- Tolerância ao álcool: até 14%.
- Boa implementação.
- Tolerância de Ph > 3.2.
- Boa actividade a baixa temperatura.
- Tolerância ao SO₂ : até 50 mg/L de total, 10mg/L de livre.
- Baixa produção de acidez volátil.
- Sem produção de aminas biogénicas.
- FML Cinética: rápida.

Modo de utilização



Realçar o Frutado

Resultados do ensaio



Cinética da degradação de ácido málico num vinho branco de 2004, após inoculação com 1-Step ALPHA (pH 3.2, álcool 13%, T- SO₂<15 ppm, 19°C).

Embalagem

- Bactéria para inoculação de 100 hL, 500 hL ou 1000 hL de vinho.
- Os sacos contendo o activador e a bactéria não podem ser utilizados em separado.

Armazenamento

Embalagem fechada, selada de origem: O produto pode ser armazenado até 18 meses a 4°C e até 30 meses a -18°C.

Embalagem aberta: Uma vez aberta, os sacos com o activador e

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana – Bactérias Lácticas (Fermentação malo-láctica)

Modo de utilização

Nota: consulte a tabela abaixo para volumes líquidos, de acordo com o tamanho do KIT utilizado.

FASE DE REHIDRATAÇÃO:

- Dissolva o conteúdo da saqueta "Activador" em água potável (sem cloro) entre os 18-25°C.
- Adicione o conteúdo da saqueta "Bactéria" e dissolva gentilmente enquanto agita.
- Aguarde durante 20min.

FASE DE ACLIMATIZAÇÃO:

- Misture a preparação contendo a **ALPHA 1-Step®** (activador e bactéria) com vinho, com um pH>3.5 e temperatura entre os 17-25°C.
- Aguarde 18-24h.

INOCULAÇÃO:

- Inocule o vinho com a cultura aclimatizada.
- Mantenha a temperatura entre os 17-25°C.
- Verifique a actividade da FML (degradação do ácido málico de cada 2-4 dias).

KIT	Fase de Rehidratação	Fase de Aclimação	Fase de Inoculação
Alpha			
100hL	Dissolva o KIT ALPHA em 10L de água.	Misture o KIT ALPHA (10L) com 10L de vinho.	Inocule 100hL de vinho com a cultura ALPHA (20L).
500hL	Dissolva o KIT ALPHA em 50L de água.	Misture o KIT ALPHA (50L) com 50L de vinho.	Inocule 500hL de vinho com a cultura ALPHA (100L).
1000hL	Dissolva o KIT ALPHA em 100L de água.	Misture o KIT ALPHA (100L) com 100L de vinho.	Inocule 1000hL de vinho com a cultura ALPHA (200L).

armazenado até 18 meses a 4°C e até 30 meses a -18°C.

Embalagem aberta: Uma vez aberta, os sacos com o activador e com a bactéria devem ser usados de imediato.

Qualidade, Segurança-Ambiente

- Não contém Organismos Geneticamente Modificados, não foi produzido a partir dos mesmos e não inclui substâncias com origem nos referidos organismos.
- Não tratado por radiação ionizante.
- Não contém as substâncias alérgicas referidas na Directiva 2007/68/CE.
- Está conforme o Codex Enológico Internacional, versão em vigor.

O fabricante garante a qualidade dos seus produtos vendidos na embalagem de origem. As informações contidas nos documentos são fundamentadas nos nossos conhecimentos actuais e no resultado de ensaios efectuados com grande preocupação de objectividade: a sua adaptação a cada caso particular, assim como as consequências de circunstâncias de cada tratamento não comprometem a nossa responsabilidade.



Travessa das Lages n° 267, Apartado 547 4405-194 Canelas, VNG
T. 227 150 840 – F. 227 150 849 – proenol@proenol.com – www.proenol.com

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana – Leveduras Vínicas + Bactérias Lácticas (Misturas)

Há mais de 20 anos que a Lallemend selecciona da Natureza as melhores leveduras e bactérias para a enologia. Agora, e como resultado de diversos programas de investigação e ensaios a nível mundial, a Lallemend desenvolveu os Kit DUO, novas soluções integradas para controlar e realizar a FA e FML.

Dependendo das condições do mosto, do estilo de vinho desejado e das castas a vinificar, determinaram-se as alianças mais eficazes entre estirpes de levedura e bactéria, assim como o protocolo de vinificação mais adaptado.

Aplicação

- Em todos os países produtores da casta Merlot, a FML é um processo difícil. Não há dados concretos que expliquem o porquê do crescimento de bactérias lácticas ser tão desfavorável. Contudo foram verificados alguns factores que possivelmente explicam a inibição da MLF desta casta: a constituição polifenólica do vinho, carência de alguns aminoácidos, o impacto de algumas práticas enológicas, entre outros.
- A forma de ultrapassar estas dificuldades está na escolha da melhor sinergia Levedura/Bactéria compatível para estas condições.

Propriedades Enológicas e Microbiológicas

ESTIRPE DE LEVEDURA *SACHAROMYCES CEREVISAE*

Seleccionada pela Lallemend, pela sua capacidade de **potenciar aromas frutados**, de fruta madura, compota, avelã e frutos secos, e pelo seu potencial em facilitar a FML.

Características:

- Factor *Killer* sensível.
- Fase lag curta.
- Taxa de fermentação moderada.
- Produção de SO₂ baixa.
- Produção de H₂S moderada.
- Tolerância ao álcool até 16%.
- Necessidade moderada em azoto.
- Temperatura de fermentação recomendada: 15-30°C.

ESTIRPE DE BACTÉRIA *OENOCOCCUS OENI*

Seleccionada pela Lallemend, pela sua **excelente performance em vinhos de características difíceis e pela sua capacidade de enaltecer um perfil frutado e varietal**.

Características:

- Fase lag curta.
- Assegura uma FML rápida e eficaz.
- Não produz aminas biogénicas.
- Baixa produção de acidez volátil.
- Tolerância ao SO₂: Máximo 60ppm Total.

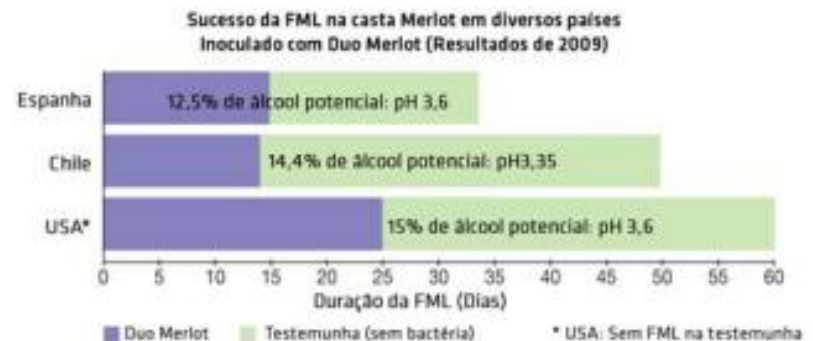
ESTIRPE DE BACTÉRIA *OENOCOCCUS OENI*

Seleccionada pela Lallemend, pela sua **excelente performance em vinhos de características difíceis e pela sua capacidade de enaltecer um perfil frutado e varietal**.

Características:

- Fase lag curta.
- Assegura uma FML rápida e eficaz.
- Não produz aminas biogénicas.
- Baixa produção de acidez volátil.
- Tolerância ao SO₂: Máximo 60ppm Total.

A COMBINAÇÃO DESTES DOIS MICRORGANISMOS permite uma FML rápida e fiável na casta Merlot.



Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana – Leveduras Vínicas + Bactérias Lácticas (Misturas)

A sinergia para assegurar a fermentação

Kits de fermentação Levedura/Bactéria
Saccharomyces cerevisiae/*Oenococcus oeni*



Condições de vinificação que devem ser respeitadas para obter os melhores resultados de aplicação Duo Merlot®:

- Álcool potencial <16% Vol.
- pH >3.2

Protocolo de inoculação sequencial (Após FA)

1. Adição de Levedura:

Rehidratar a levedura seca seleccionada de acordo com as instruções. Recomendamos a utilização de um nutriente de rehidratação (**Go-Ferm Protect**®).

2. Nutrição Recomendada da Levedura:

Recomendamos a adição de um nutriente complexo (como o **Fermaid**®) a 1/3 da FA.

3. Adição da Bactéria e controlo da FML:

- No sentido de facilitar a FML recomendamos a adição de **OptiRed**® no vinho após a FA e antes da adição da bactéria.
- Rehidratar uma embalagem de bactérias liofilizadas em 20 vezes o seu peso de água limpa e sem cloro, a 20°C por um período máximo de 15 minutos.
- Para inocular, adicione a suspensão directamente ao vinho no final da fermentação alcoólica, em seguida agitar suavemente para distribuir as bactérias e minimizar a captação de oxigénio.
- Controlar o ácido málico.
- Estabilizar o vinho após o final da FML.

Protocolo de Co-inoculação (24-48h após a aplicação de levedura)

1. Adição de Levedura:

- Rehidratar a levedura seca seleccionada de acordo com as instruções. Recomendamos a utilização de um nutriente de rehidratação (**Go-Ferm Protect**®).

2. Nutrição Recomendada da Levedura:

Recomendamos a adição de um nutriente complexo (**Fermaid**®) a 1/3 da FA.

3. Adição da Bactéria e controlo da FML:

Depende da adição de SO₂ no esmagamento:

- Sulfitagem <5g/hL: Aguardar 24 horas.
- Sulfitagem 5-8g/hL: Aguardar 48 horas.
- Sulfitagem >8g/hL: Não aconselhamos a co-inoculação.
- Adicione a suspensão directamente ao mosto/vinho a fermentar.
- Controlar a temperatura do mosto, que deve respeitar os seguintes parâmetros:
 - <30°C no momento de inoculação da bactéria (álcool <5%).
 - <25°C quando o álcool >12%.
- Controlar o ácido málico e acidez volátil.

Nota: Se a FML ocorrer durante a FA e for observado um aumento da acidez volátil, adicionar 2g/hL de sulfuroso e/ou Lisowine (150-200mg/L).

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Produtos enológicos de origem microbiana – Leveduras Vínicas + Bactérias Lácticas (Misturas)

Embalagem

- Kit disponível para a inoculação de **25hL** de vinho.

Armazenamento/Manuseamento

Embalagem fechada, selada de origem, ao abrigo da luz num lugar seco e sem odores. **Embalagem aberta**: utilizar rapidamente.

Qualidade, Segurança-Ambiente

- Não contém Organismos Geneticamente Modificados, não foi produzido a partir dos mesmos e não inclui substâncias com origem nos referidos organismos.
- Não tratado por radiação ionizante.
- Não contém as substâncias alérgicas referidas na Directiva 2007/68/CE.
- Está conforme os Regulamentos CE 479/2008 e 606/2009.
- Está conforme o Codex Enológico Internacional, versão em vigor.

O fabricante garante a qualidade dos seus produtos vendidos na embalagem de origem. As informações contidas nos documentos são fundamentadas nos nossos conhecimentos actuais e no resultado de ensaios efectuados com grande preocupação de objectividade; a sua adaptação a cada caso particular, assim como as consequências de circunstâncias de cada tratamento não comprometem a nossa responsabilidade.



Travessa das Lages n.º 267, Apartado 547 4405-194 Canelas, VNG
T. 227 150 840 - F. 227 150 849 - proenol@proenol.com - www.proenol.com

A sinergia para assegurar a fermentação

Kits de fermentação Levedura/Bactéria
Saccharomyces cerevisiae/Oenococcus oeni

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

- **LEVEDURAS** - Características gerais:
- Fungos unicelulares (algumas são parecidas com os bolores, porque desenvolvem hifas - pseudohifas que formam um micélio designado por pseudomicélio. (*Candida*, exp.)
- Células de forma Oval, Alongadas, Elípticas ou Esféricas, com tamanhos entre 5 e 8 micrómetros, ou maiores 10 a 12 micrómetros.
- As células nas culturas velhas tendem a ter tamanhos mais reduzidos.
- Algumas produzem pigmentos que variam da cor creme, a rosa ou vermelho.
- Crescem num intervalo largo de pH. Algumas crescem em meios com mais de 20 % de Etanol e com 55- 65 % de açúcares.
- Algumas produzem esporos de natureza sexuada – Ascósporos e de natureza vegetativa – Blastósporos e Clamidósporos.
- Reproduzem-se sexuadamente por ascósporos e vegetativamente por Blastósporos, Clamidósporos, Fissão binária e Gemulação.
- Apresentam fase Teleomórfica – Desenvolvem estruturas de natureza sexuada – Formas perfeitas
- Apresentam fase Anamórfica – Desenvolvem estruturas de natureza assexuada ou vegetativa – Formas Imperfeitas

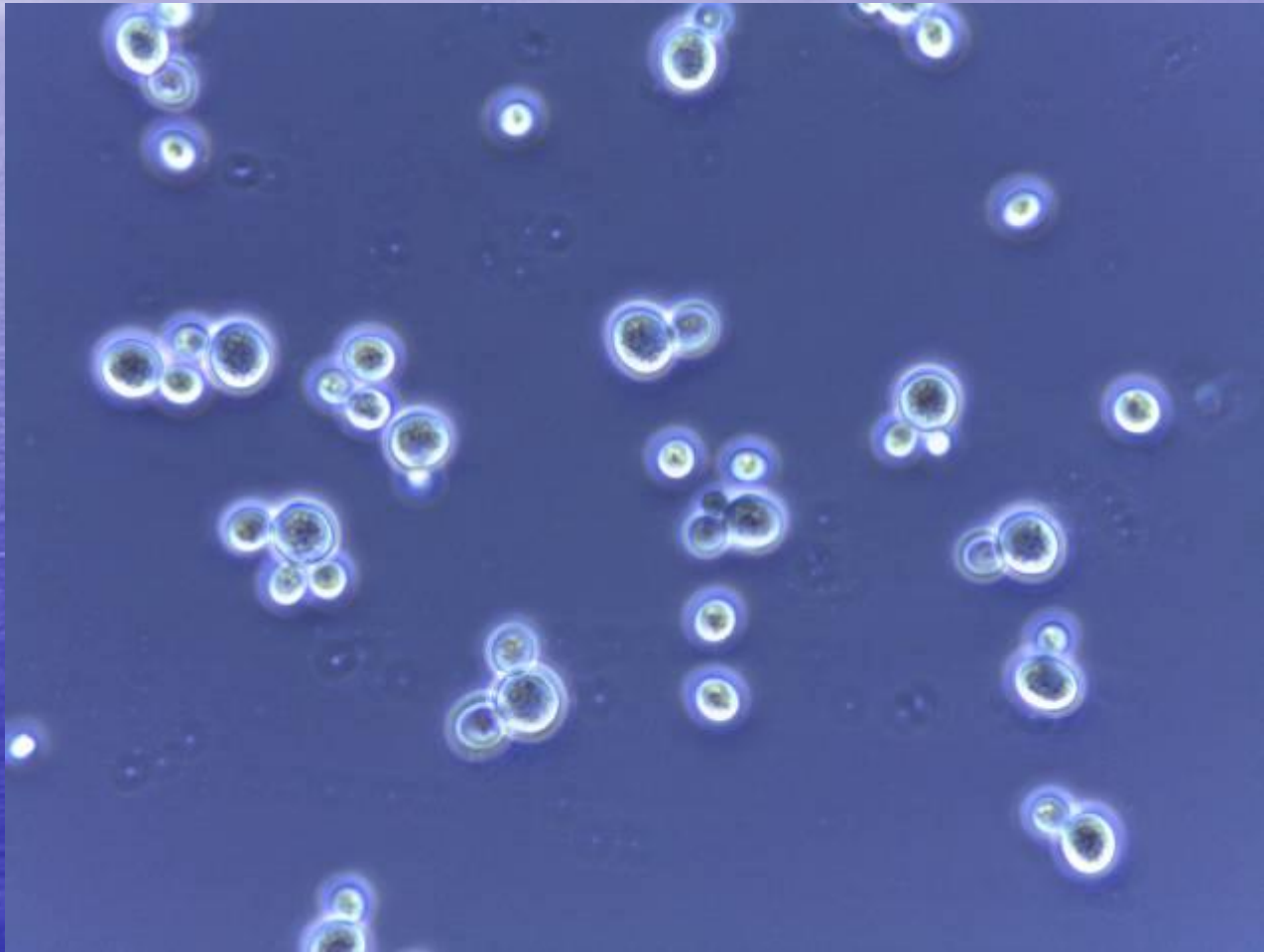
Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Saccharomyces spp. (Mic. Fotónico x1000.Pinto, 2012)



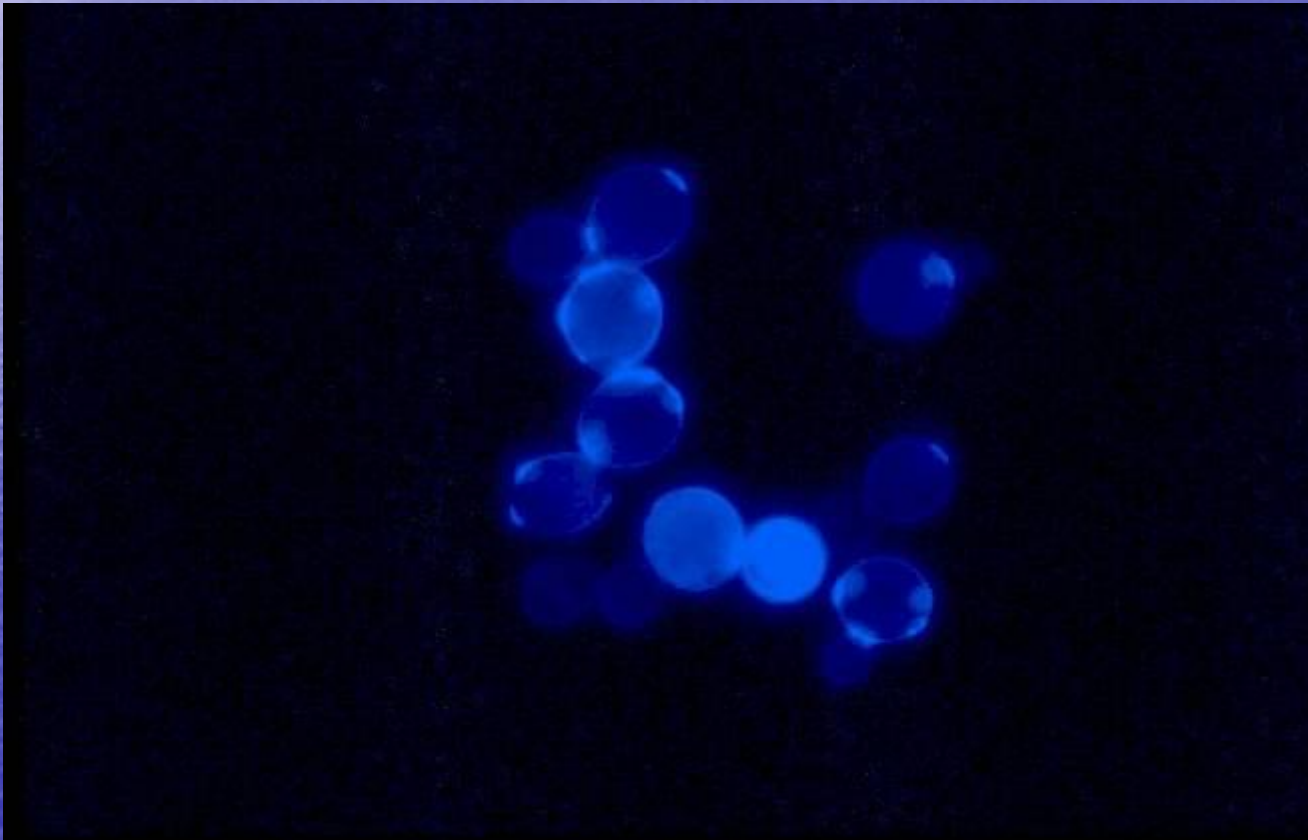
Principais Microrganismos com Interesse Enológico

Saccharomyces spp. (Mic. Fotónico, C. de Fase x1000, Pinto, 2012)



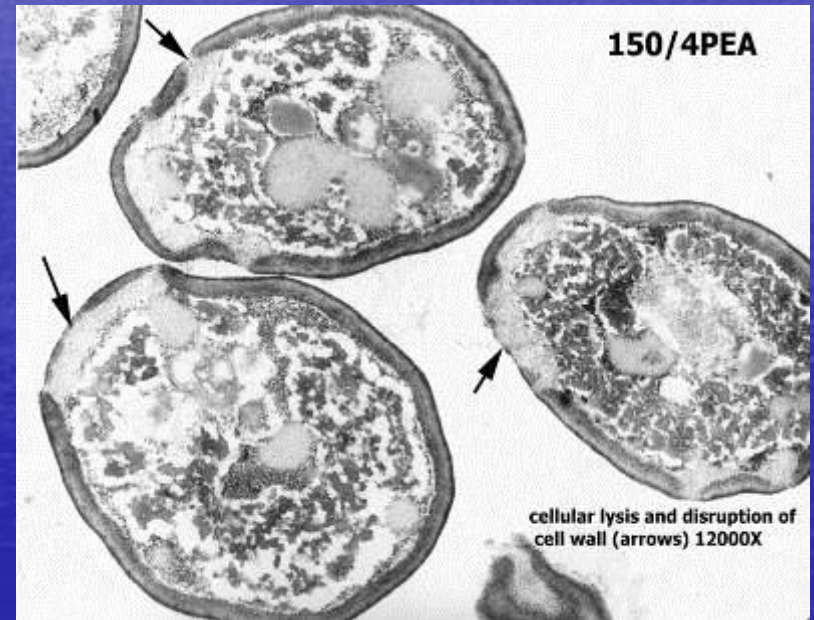
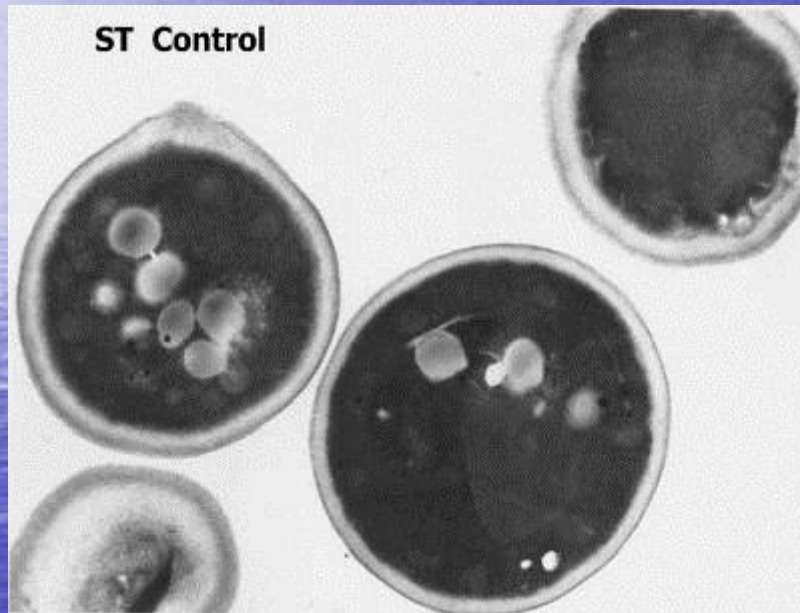
Principais Microrganismos com Interesse Enológico

- *Saccharomyces spp.* (Mic. Fotónico de Fluorescência, x1000)



Principais Microrganismos com Interesse Enológico

- *Saccharomyces spp.* (Mic. Electrónico)

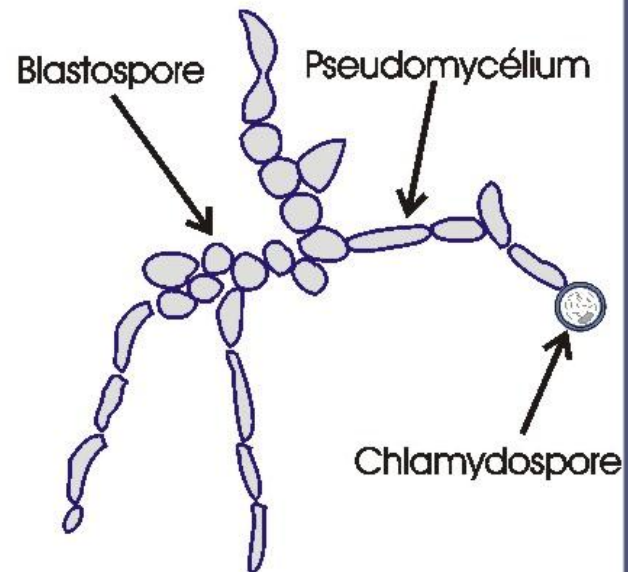


Principais Microrganismos com Interesse Enológico

(Pseudomicelio, blastósporos e clamidosporos, Mic. Fotónico)



R. Moreda - Lycée Docteur Lacroix - Narbonne



Candida albicans x400
Observation milieu RAT.

Principais Microrganismos com Interesse Enológico

- Consoante são classificadas e identificadas numa fase ou na outra, pode implicar pertencerem a géneros e espécies diferentes:
- *Hanseniaspora* é o género Teleomórfico do género *Kloeckera*
- *Dekkera* é o género Teleomórfico do género *Brettanomyces*
- Classificação:
- Reino - Fungi
- Subdivisão - *Ascomycotina*:
- (Reprodução sexuada - Ascósporos. Reprodução vegetativa por fissão ou por gemulação).
- Subdivisão *Deuteromycotina*:
- (Leveduras imperfeitas - reprodução vegetativa por gemulação ou por blastósporos ou clamidósporos)

Processos Metabólicos das Leveduras

- **Metabolismo fermentativo dos açúcares: Conversão dos açúcares a etanol, CO₂ e outros produtos (Fermentação alcoólica).**
- **Composição nutritiva dos mostos depende:**
 - **Casta;**
 - **Data da vindima;**
 - **Factores edáfo - climáticos (tipo de solo e clima);**
 - **Altitude e exposição solar;**
 - **Tratamentos fitossanitários;**
 - **Fertilização;**
 - **Rega.**

Processos Metabólicos das Leveduras

- **Composição nutritiva média dos mostos para vinhos de mesa**
- Açúcares:
 - Açúcares totais – 140 a 250 g/L (Glucose e Frutose) – Exoses: C6
 - Pentoses: C5 (baixas concentrações e não são metabolizáveis pelas leveduras *Saccharomyces*)
- **Substâncias azotadas:**
 - Os teores destas substâncias são muito importantes para a actividade das leveduras – pode haver mostos com excesso ou com deficiência em substâncias azotadas
- Interferem na actividade das leveduras a dois níveis:
 - **No número de células produzido - grandeza da população de leveduras**
 - **Na regulação do fluxo de carbono durante a glicólise**

Processos Metabólicos das Leveduras

- Valores de 0,44 a 0,50 g/L expressos em azoto amoniacal, são considerados necessários para se garantir boas taxas de crescimento das leveduras durante a fermentação.
- Tem-se verificado que a utilização das substâncias azotadas pelas leveduras, ocorre nas fases iniciais da fermentação – antes da produção de concentrações de álcool de 5%.
- As substâncias azotadas mais frequentemente encontradas são:
 - Azoto orgânico (aminoácidos): alanina, arginina, aspartato, glutamato, glutamina, prolina e trionina
 - A prolina não consegue ser utilizado pelas leveduras, durante o processo fermentativo.
 - Azoto inorgânico: Azoto amoniacal
 - A deficiência nas substâncias azotadas pode comprometer o arranque das fermentações (recorre-se ao fosfato de amónio, ou a suplementos à base de Aminoácidos)

Processos Metabólicos das Leveduras

- Factores de crescimento: (factores de sobrevivência):
- Esteróis e ácidos gordos insaturados – fundamentais na manutenção da integridade e portanto da funcionalidade da membrana citoplasmática das leveduras.
- Outros nutrientes:
- Fosfatos, vitaminas e sais minerais: Normalmente em quantidades suficientes nos mostos, para garantir o normal crescimento das leveduras e portanto o desenrolar da fermentação alcoólica.

Processos Metabólicos das Leveduras

- **Metabolismo dos açúcares**

- **Glicólise ou Via Metabólica de Embden – Meyerhof:**

- Trata-se da via metabólica para a utilização dos açúcares (glucose ou frutose) pelas leveduras (*Saccharomyces*);
- Ocorre no citoplasma das células das leveduras;
- É independente do Oxigénio;
- A **glicólise** é a sequência metabólica de várias reacções enzimáticas, na qual a glicose é transformada, produzindo duas moléculas de Ácido pirúvico (piruvato) e dois equivalentes reduzidos de NAD⁺.
 - $1 \text{ glicose} + 2 \text{ NAD} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ Pi} \rightarrow 2 \text{ NADH} + 2 \text{ ácido pirúvico} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+$

Podemos dividir a glicólise em duas etapas:

Processos Metabólicos das Leveduras

- **Glicólise (Continuação)**

- 1ª Etapa:

- A primeira reacção consiste na fosforilação da glicose com um gasto energético de uma molécula de ATP, dando origem a glicose-6-fosfato – Activação da glicose;
- Esta reacção é catalizada pela enzima Hexoquinase (Glucoquinase) e é irreversível. Regulador da glicólise;
- A fosforilação da glicose na primeira reacção impede que esta saia da célula novamente. Ao adicionar um grupo fosfato à glicose, ela torna-se um molécula carregada negativamente e é impossível atravessar passivamente a membrana celular para o exterior;
- Ao manter a glicose aprisionada dentro da célula a glicólise é garantida;
- Na segunda reacção, catalizada pela enzima Fosfoglucoase Isomerase, a glucose-6-fosfato é convertida em frutose-6-fosfato.

Processos Metabólicos das Leveduras

- **Glicólise (Continuação)**
- Na terceira reacção, a célula investe outra molécula de ATP para fosforilar a frutose-6-fosfato e convertê-la em frutose-1,6-bifosfato. Esta reacção é catalisada pela enzima Fosfofrutoquinase;
- Esta é também uma reacção irreversível e de controlo desta via metabólica;
- Na quarta reacção a frutose-1,6-bifosfato é clivada (partida em duas trioses: gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato);
- Esta reacção é catalizada pela enzima Aldolase. O gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxiacetona fosfato são isómeros facilmente interconvertíveis;
- Na quinta reacção a dihidroxiacetona fosfato é convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela enzima Triosefosfato Isomerase;
- Até esta fase (na 1ª etapa) nenhuma energia foi armazenada ou produzida, antes pelo contrário, duas moléculas de ATP foram investidas nas reacções de fosforilação;
- A 1ª etapa é consumidora de energia;

Processos Metabólicos das Leveduras

- **Glicólise (Continuação)**

2ª Etapa:

Na primeira reacção desta etapa, a sexta no seguimento da etapa anterior, cada gliceraldeído-3-fosfato é oxidado pelo NAD^+ (e o NAD^+ passa a NADH) e fosforilado por um fosfato inorgânico, dando origem a 1,3-Bifosfoglicerato(1,3 BPG);

Esta reacção é catalizada pela enzima Gliceraldeidofosfato desidrogenase;

Na sétima reacção catalizada pela enzima fosfogliceratoquinase, a 1,3 BPG atrnsfere um grupo fosfato para uma molécula de ADP dando origem a uma molécula de ATP e a 3-fosfoglicerato;

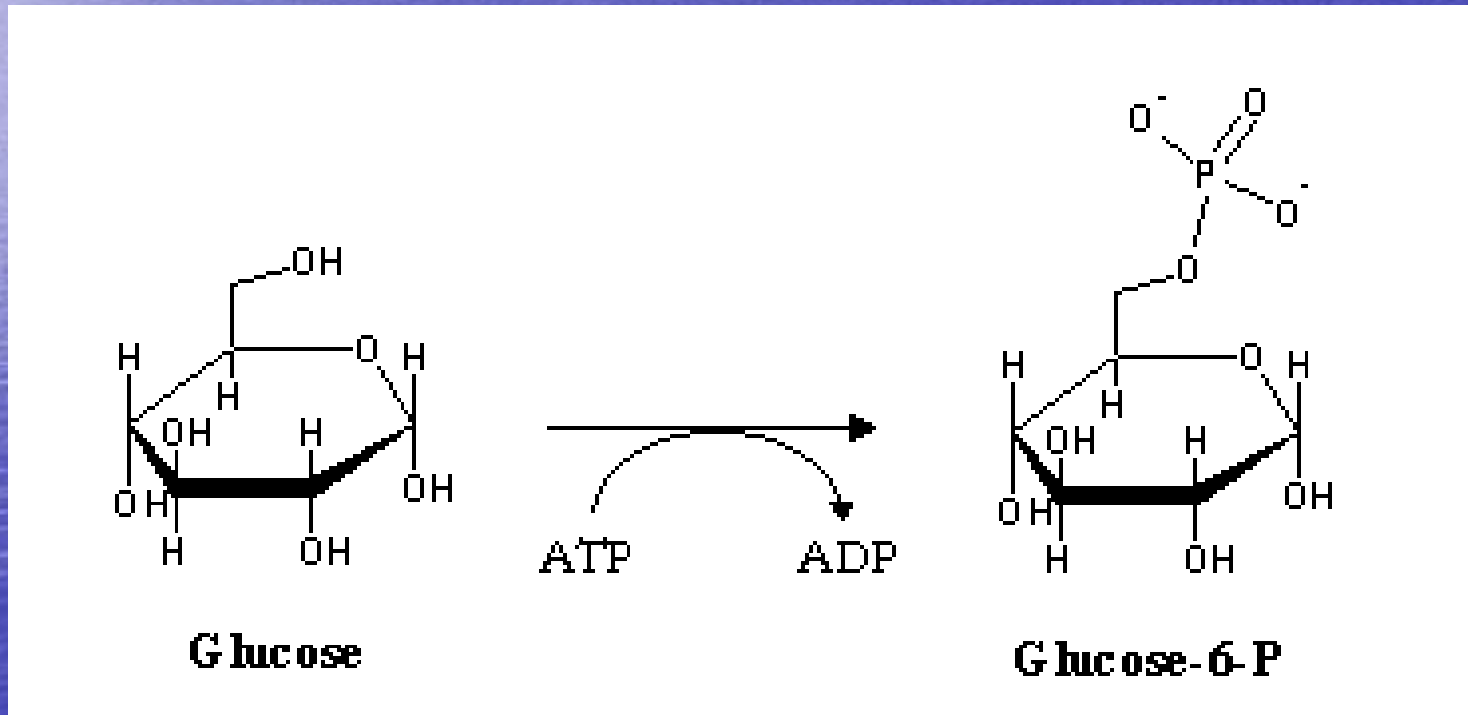
Na oitava reacção, ocorre a transferência do grupo fosfato (3-fosfoglicerato tem o grupo fosfato na posição 3 (carbono 3), a enzima Fosfoglicerato mutase muda a posição desse grupo fosfato para a posição 2 (carbono 2), dando origem a 2-fosfoglicerato;

Processos Metabólicos das Leveduras

- **Glicólise (Continuação)**
- Na nona reacção ocorre uma desidratação, catalizada pela enzima Enolase. Portanto o 2-fosfoglicerato é desidratado formando uma molécula de água e fosfoenolpiruvato;
- Na décima reacção, e última desta via metabólica, ocorre a transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para uma molécula de ADP, formando-se então outra molécula de ATP e piruvato.
- Esta reacção é catalizada pela enzima Piruvatoquinase;
- Tendo em conta que por cada molécula de gliceraldeído-3-fosfato se produzem duas moléculas de ATP, na Glicólise são produzidos ao todo 4 ATPs e gastos 2 ATP;
- Assim, o saldo ou balanço energético da Glicólise é de 2 moléculas de ATP por molécula de glicose utilizada;

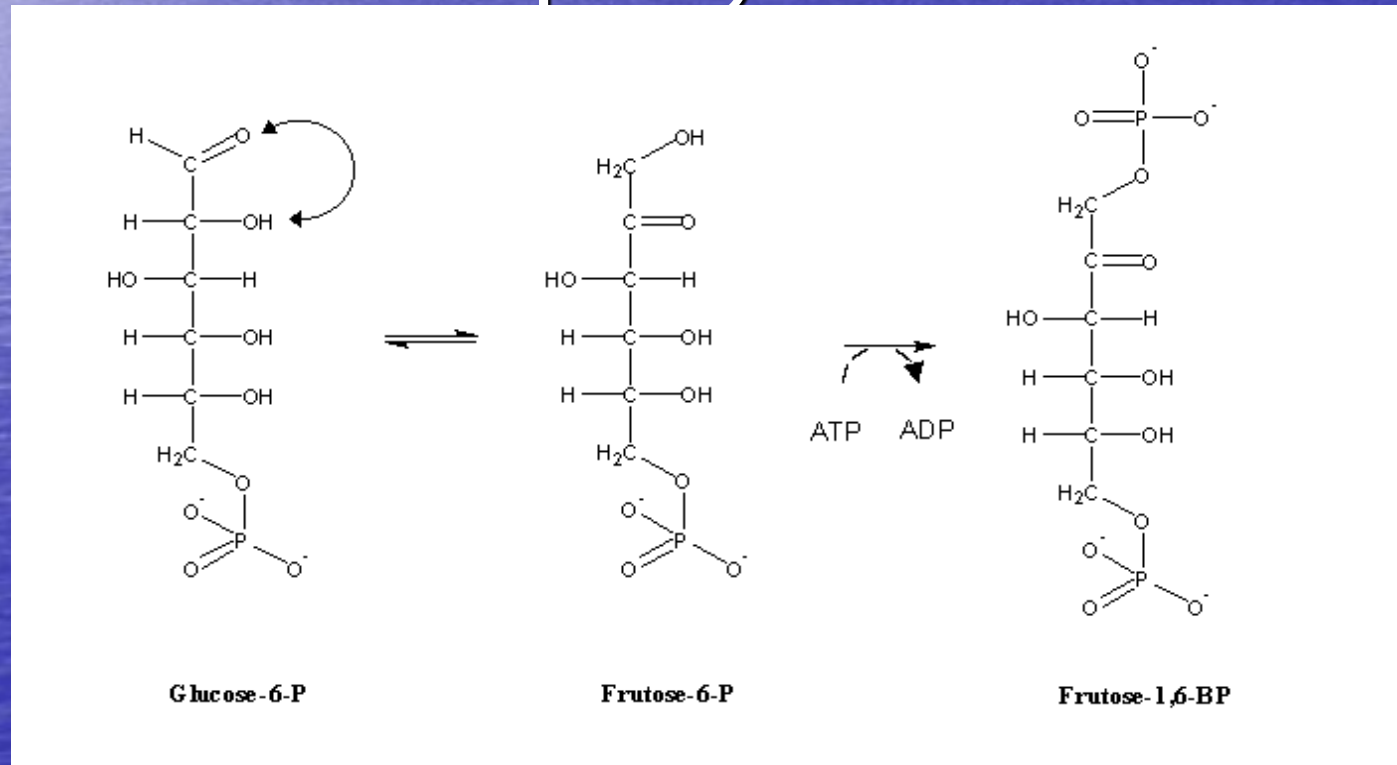
Processos Metabólicos das Leveduras

- Glicólise (Continuação)
- Fosforilação da Glucose: (Enzima hexoquinase)



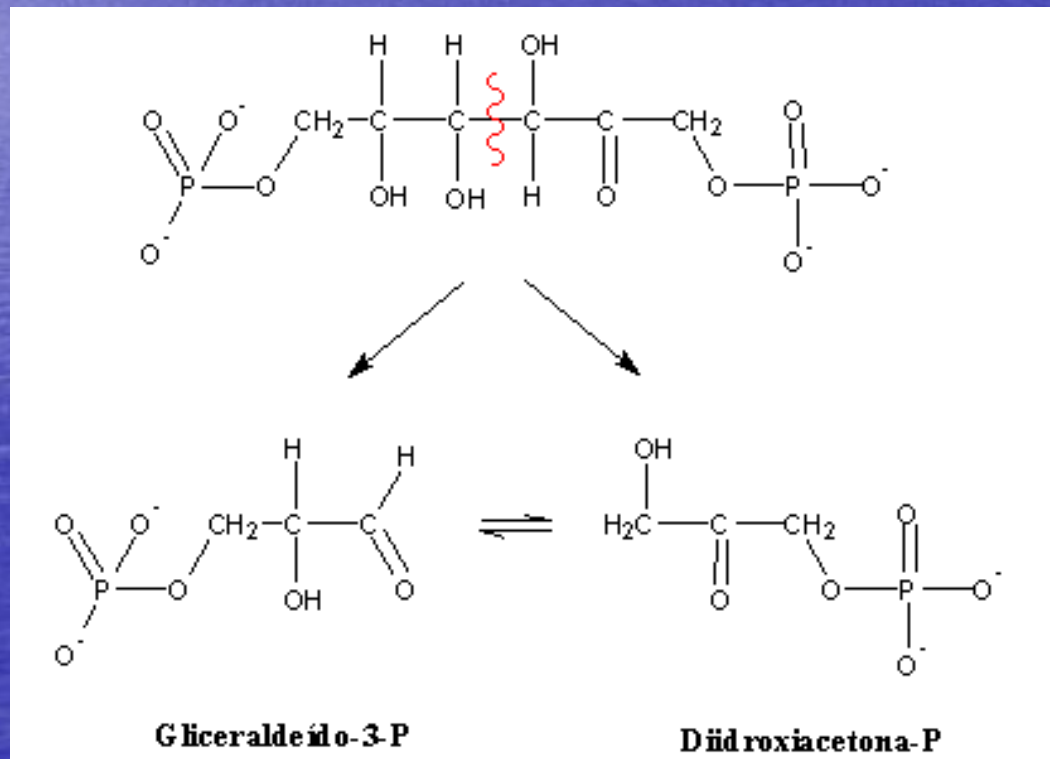
Processos Metabólicos das Leveduras

- **Glicólise (Continuação)**
- **Isomerização da Glucose 6-P a Frutose 6-P e Fosforilação da Frutose 6-P a Frutose 1-6 Bifosfato: (Fosfoglucose isomerase e Fosfofrutoquinase)**



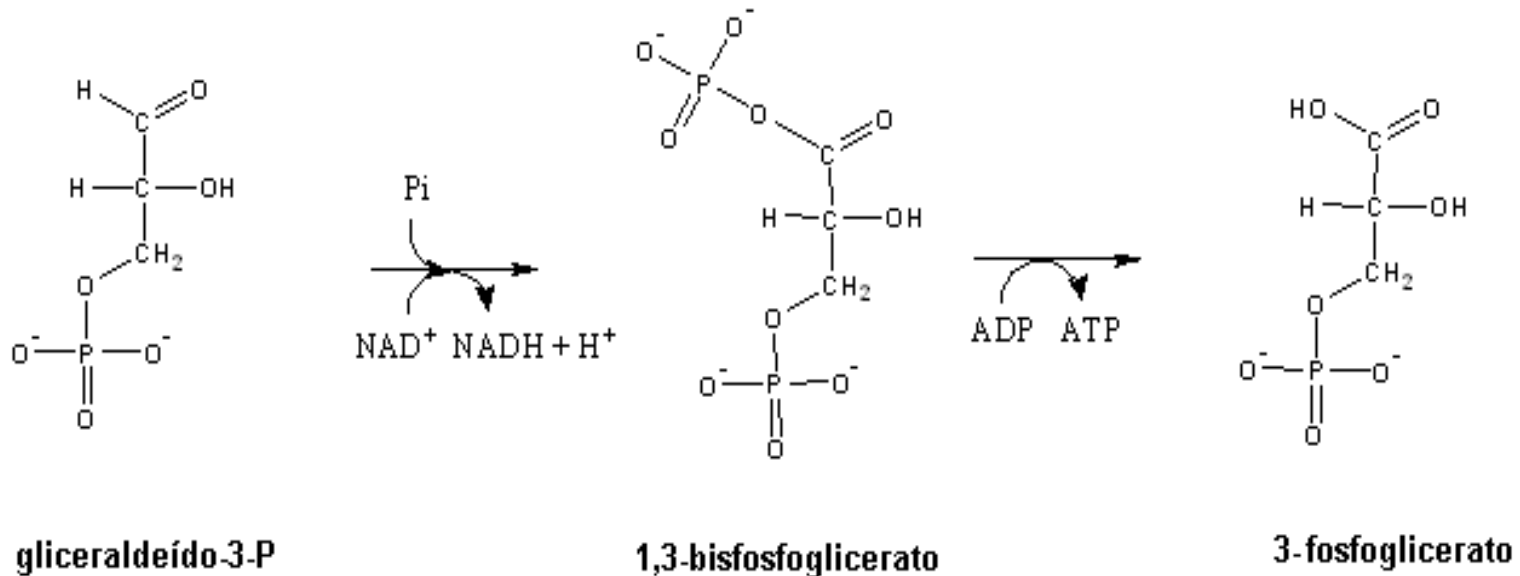
Processos Metabólicos das Leveduras

- **Glicólise (Continuação)**
- **Clivagem da Frutose 1-6 Bifosfato para dar uma molécula de gliceraldeído 3-P e outra de Dihidroxiacetona-P. (Enzima Aldolase)**



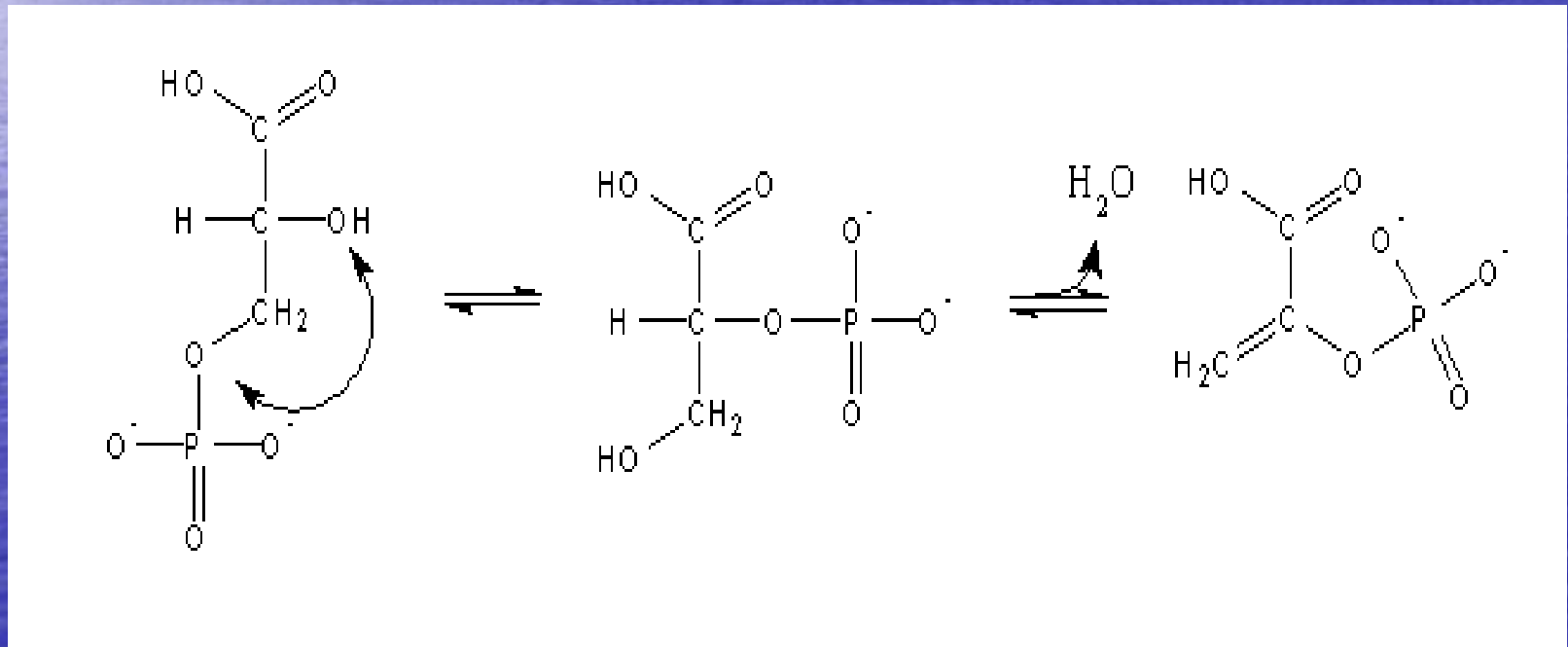
Processos Metabólicos das Leveduras

- **Glicólise** (gliceraldeído-3-fosfato é oxidado pelo NAD^+ (e o NAD^+ passa a NADH) e fosforilado por um fosfato inorgânico, dando origem a 1,3-Bifosfoglicerato **Continuação**)
- Cada (1,3 BPG). (Gliceraldeidofosfato desidrogenase). Produz-se ATP e 3-fosfoglicerato (Fosfogliceratoquinase).



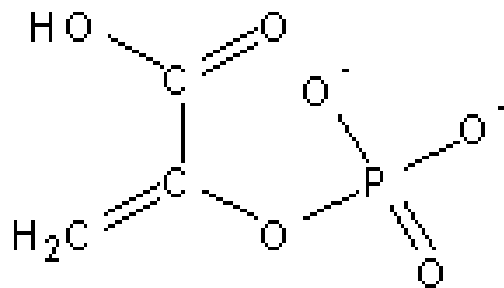
Processos Metabólicos das Leveduras

- Glicólise (Continuação)
- O 3-fosfoglicerato é isomerizado a 2-fosfoglicerato (Fosfoglicerato mutase), que depois de desidratado (i.e. perder H_2O) dá origem a fosfoenolpiruvato (Enolase).

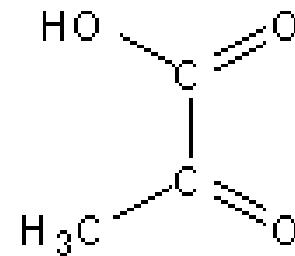
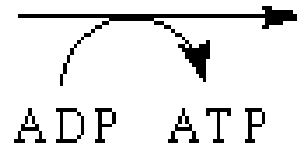


Processos Metabólicos das Leveduras

- **Glicólise (Continuação)**
- **Transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato para uma molécula de ADP, formando-se então outra molécula de ATP e piruvato (Piruvatoquinase).**



Fosfoenolpiruvato



Piruvato

Processos Metabólicos das Leveduras

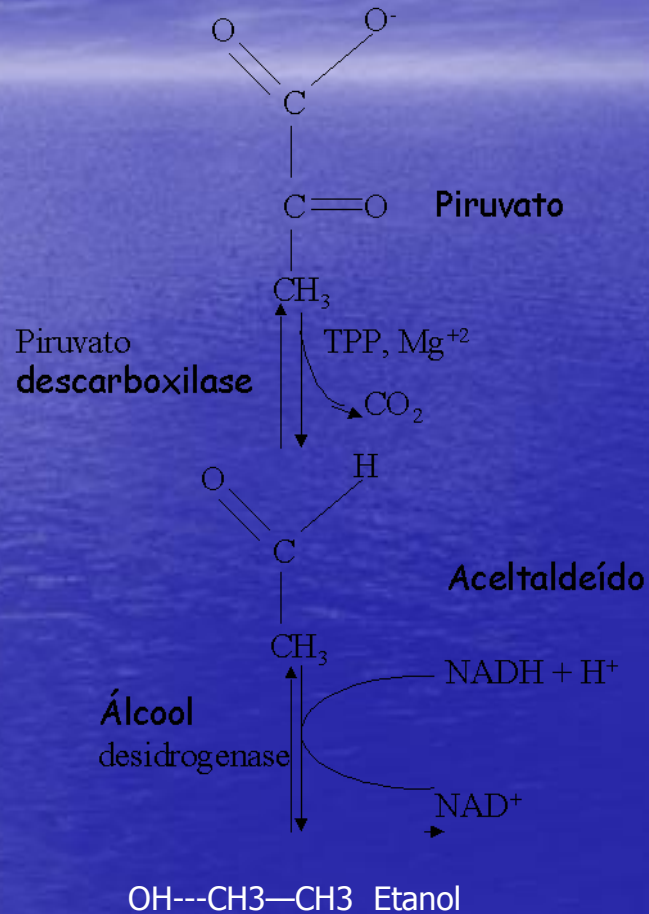
- O piruvato, em condições aeróbias é transformado em acetil-CoA (acetil coenzima A), um dos intermediários no ciclo de Krebs e convertido em ATP, H₂O e CO₂ na fosforilação oxidativa, em que o NADH fornece electrões para a cadeia transportadora de electrões;
- Em condições anaeróbias, o piruvato é utilizado noutras vias metabólicas. O NADH transfere os seus electrões, para um aceitador final de electrões, que é um composto orgânico proveniente da degradação da glucose. É o que se denomina fermentação;
- Neste caso concreto a Fermentação Alcoólica;

Processos Metabólicos das Leveduras

- **Fermentação Alcoólica:**
- Num primeiro passo, o piruvato sofre uma descarboxilação. Uma reacção irreversível catalisada pela enzima Piruvato descarboxilase. Esta reacção é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A Piruvato descarboxilase requer Mg^{2+} e tem uma coenzima firmemente ligada, a tiamina pirofosfato (TPP), formando-se acetaldeído ou aldeído acético.
- No segundo passo, através da acção da enzima Álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, com a transferência de electrões do NADH, produzido na glicólise e consequente regeneração do NAD^{+} para que a glicólise não pare.
- A equação geral da fermentação alcoólica é:
- $$\text{Glicose} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} \longrightarrow 2 \text{ etanol} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Processos Metabólicos das Leveduras

Fermentação Alcoólica



Processos Metabólicos das Leveduras

Principais produtos da fermentação alcoólica:

- Álcool e CO_2 , para além da energia química – ATP.

Produtos secundários da fermentação alcoólica:

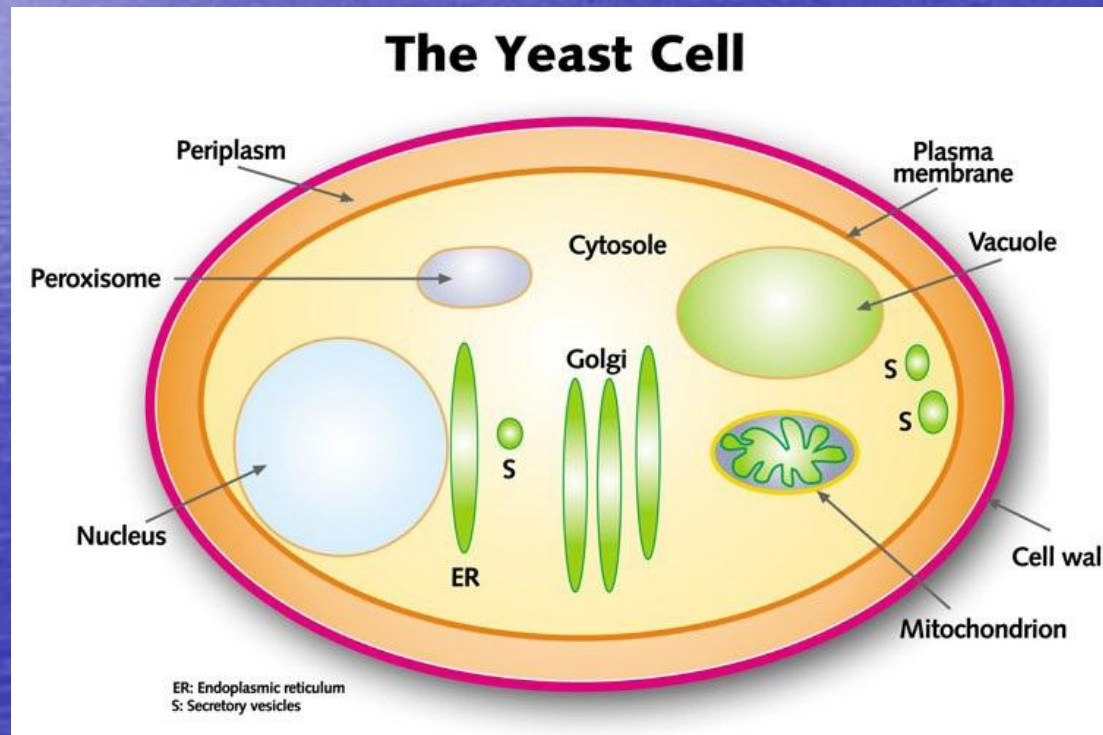
- Glicerol – proveniente de fermentação glicero-pirúvica.
- Cerca de 8% dos açúcares seguem esta via fermentativa:
 - A Dihidroxiacetona-fosfato é reduzida a Glicerol-3-fosfato.
 - O Glicerol-3-fosfato é depois desfosforilado (perde o grupo fosfato) e transforma-se em glicerol.
 - Esta fermentação secundária é potenciada pelo uso do sulfuroso nas fermentações.

Processos Metabólicos das Leveduras

- Produtos secundários da fermentação alcoólica:
 - No início da fermentação também se forma Glicerol, pelo facto de que nesta fase, as enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase terem pouca expressão.
 - Outros produtos secundários, além do glicerol:
 - ácido acético, ácido succínico, diacetil, acetoína, butanediol.

Ultra Estrutura das Leveduras

- Citologia das Leveduras:
- Como célula eucariótica apresenta as seguintes estruturas (esquema):



Ultra Estrutura das Leveduras

- **Parede celular:**
- Estrutura localizada externamente à membrana citoplasmática.
- Representa cerca de 15 a 25% do peso seco da célula.
- Constituída essencialmente por polissacáridos.
- Estrutura rígida que confere forma constante à célula, mas possuidora de alguma elasticidade.
- Confere protecção e integridade à célula (os protoplastos são imediatamente lisados (destruídos) em água.
- Não se trata de uma estrutura inerte: trata-se de uma estrutura dinâmica e multifuncional – sede de constituintes químicos que participam na conjugação sexual, floculação, factor “Killer e local de diversas enzimas.

Ultra Estrutura das Leveduras

- **Parede celular - Composição química:**
- **Os principais componentes: Glucanas (60%), manoproteínas (25-50%) e quitina (1-2%).**
- **3 tipos de Glucanas:**

1º tipo:

- **Insolúveis em água, em bases e em ácidos;**
- **Apresenta um aspecto fibroso (me);**
- **DP (graus de polimerização) – 1500 unidades de glucose;**
- **Responsável pela rigidez da parede;**
- **Associado à quitina.**

Ultra Estrutura das Leveduras

- **Parede celular - Composição química:**

2º tipo:

- Insolúveis em água, mas solúveis em bases;
- Apresenta um aspecto amorfo (me)(pouco ramificadas);
- DP – cerca de 1500 unidades de glucose;
- Responsável pela elasticidade da parede celular;
- Serve de ancoragem às manoproteínas (subst. reserva).

3º tipo:

- Solúveis em água e extraídas por ácido acético;
- Apresenta um aspecto amorfo (muito ramificadas);
- DP – 140 unidades de glucose;
- Serve de ligação entre os outros componentes da parede;
- Serve de local de recepção para o factor Killer.

Ultra Estrutura das Leveduras

- **Parede celular - Composição química:**
- **Manoproteínas:**
 - Compostos constituídos por cerca de 90% de manose (hexose) e 10% de péptidos (fracção proteica);
 - Apresentam peso molecular elevado (20.000 a mais de 450.000 Da);
- **Quitina:**
 - Polissacárido complexo com azoto (N- acetilglucosamina);
 - Principalmente localizada nas zonas de cicatrização das gémulas;
 - Parece ter um função vital para as leveduras (a inibição da sua síntese torna as leveduras inviáveis depois da gemulação).

Ultra Estrutura das Leveduras

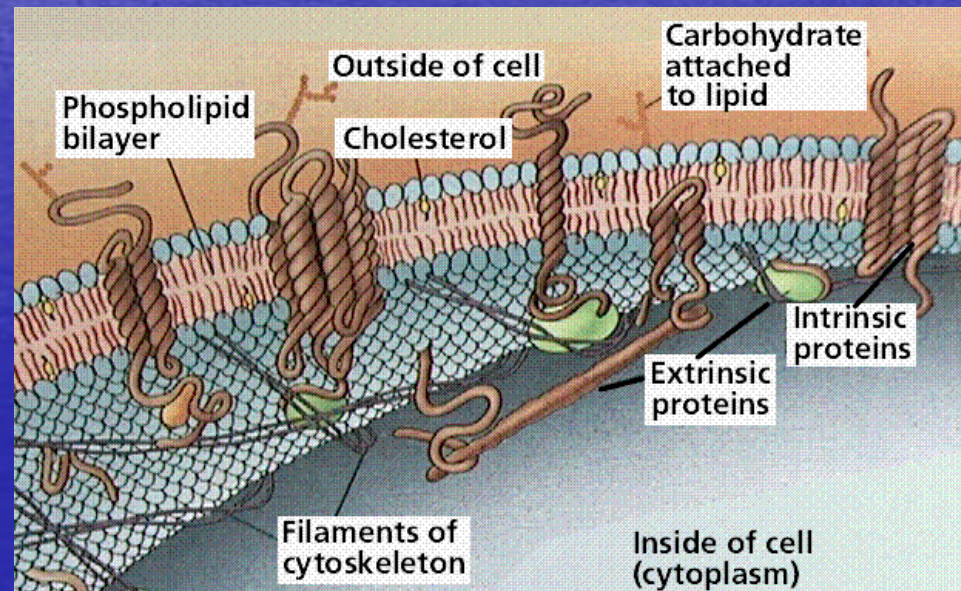
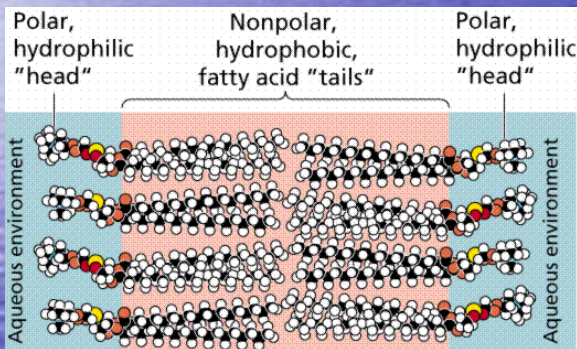
- **Parede celular - Composição química:**
- **Diversas enzimas associadas ou localizadas no espaço periplásmico:**
 - **Frutofuranosidase:** catalisa hidrólise da sacarose em glucose e frutose;
 - **Outras enzimas** que participam tanto na síntese dos constituintes da parede durante o crescimento e a gemulação, como na sua degradação (autólise).

A composição química da parede celular é dinâmica:

- **A proporção dos seus constituintes modifica-se conforme os nutrientes e a idade das células:** as glucanas aumentam com o teor de açúcares; as células mais velhas são mais ricas em glucanas e em quitina; as células jovens são mais ricas em manoproteínas.

Ultra Estrutura das Leveduras

- Membrana citoplasmática:
- Esquema:



Ultra Estrutura das Leveduras

- **Membrana citoplasmática (composição química):**
 - Basicamente constituída por lípidos (fosfolípidos, 40%) e proteínas (50%);
 - Muitas pequenas quantidades de glucanas e mananas;
 - Fosfolipídios (ésteres do glicerol e ácidos gordos) possuindo uma extremidade hidrofóbica (não polar) e outra hidrofílica (polar, com afinidade para a água);
 - Proteínas e glicoproteínas compreendendo pesos moleculares entre 10.000 e 120.000 Da)
 - Proteínas intrínsecas: que atravessam toda a espessura da membrana – interferem activamente com as zonas hidrofóbicas (cadeias hidrocarbonadas dos ácidos gordos);
 - Proteínas extrínsecas – que se encontram ligadas às proteínas intrínsecas do lado interno e externo da membrana.
 - Esteróis – O principal é o ergosterol: participa na fluidez da membrana.

Ultra Estrutura das Leveduras

- **Membrana citoplasmática (Funções):**
 - Constitui uma barreira semipermeável e selectiva entre o exterior e o interior da célula;
 - A sua riqueza em proteínas (enzimas permeases), garantem o transporte selectivo dos nutrientes para o interior da célula;
 - Local de síntese dos componentes da parede celular (glucanas e quitina);
 - Local de receptores celulares específicos que permitem às leveduras reagir a vários estímulos exteriores (hormonas sexuais ou variações na concentração de nutrientes).

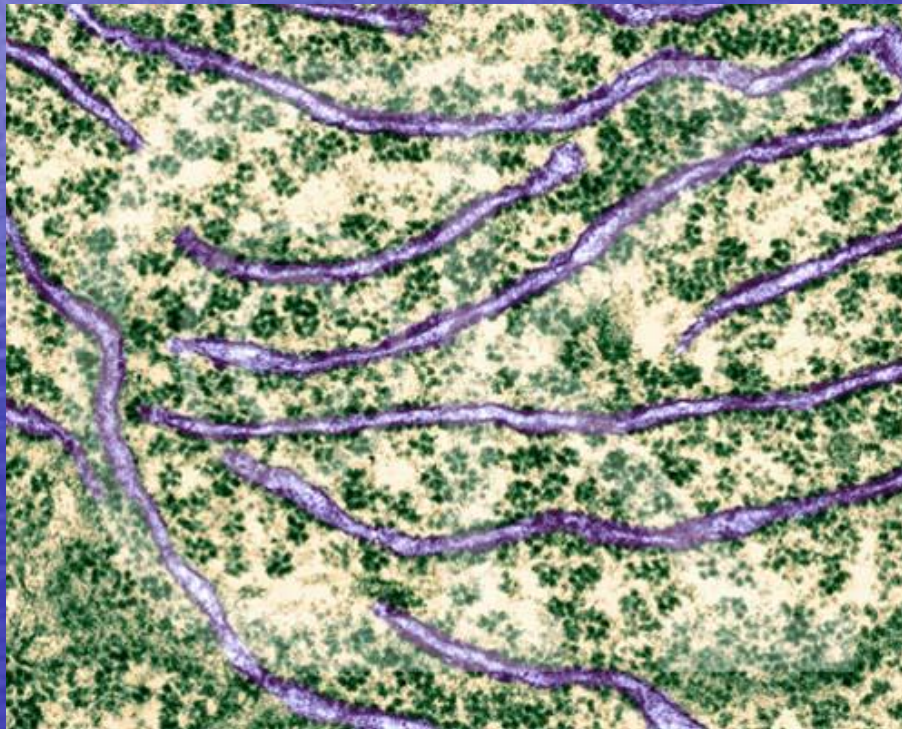
Ultra Estrutura das Leveduras

O Citoplasma e organelos:

- O citoplasma ou citosol é o líquido fluido da célula compreendido entre a membrana citoplasmática, a membrana nuclear e as membranas envolventes dos organelos celulares: retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, vacúolos e mitocôndrias;
- O citosol compreende uma solução tamponada, com um pH de 5 a 6, contendo diversas enzimas solúveis, glicogénio e os ribossomas;
- Como enzimas do citoplasma, além de outras, encontram-se as que intervêm na glicólise e na fermentação alcoólica;
- Os ribossomas, constituídos por ácidos ribonucleicos e por proteínas – são os locais da síntese proteica da célula e podem agrupar-se formando os polissomas (tradução dos mRNA).

Ultra Estrutura das Leveduras

- Retículo endoplasmático:
- Liso (sem ribosomas) e rugoso (com ribosomas)

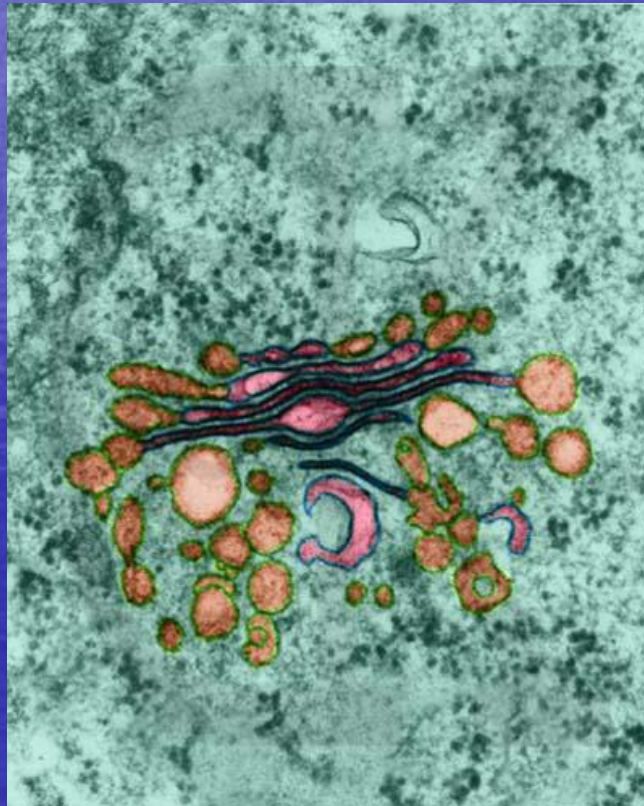


Ultra Estrutura das Leveduras

- **Retículo endoplasmático:**
- O retículo endoplasmático (RE) é constituído por um sistema de membranas duplas que se encontra ligado à membrana citoplasmática e à membrana nuclear, sendo uma extensão desta;
- A sua principal função é garantir a direcção correcta do destino das proteínas que são sintetizadas nos ribosomas associados (RE rugoso);
 - Estas proteínas têm 3 destinos possíveis (para os vacúolos, para a membrana citoplasmática ou para o exterior).
- **Os Vacúolos e Aparelho de Golgi:**
- São considerados com componentes de um sistema interno de membranas, cuja função principal é o fluxo de substâncias destinadas a serem armazenadas ou a serem excretadas.

Ultra Estrutura das Leveduras

- Aparelho de Golgi:

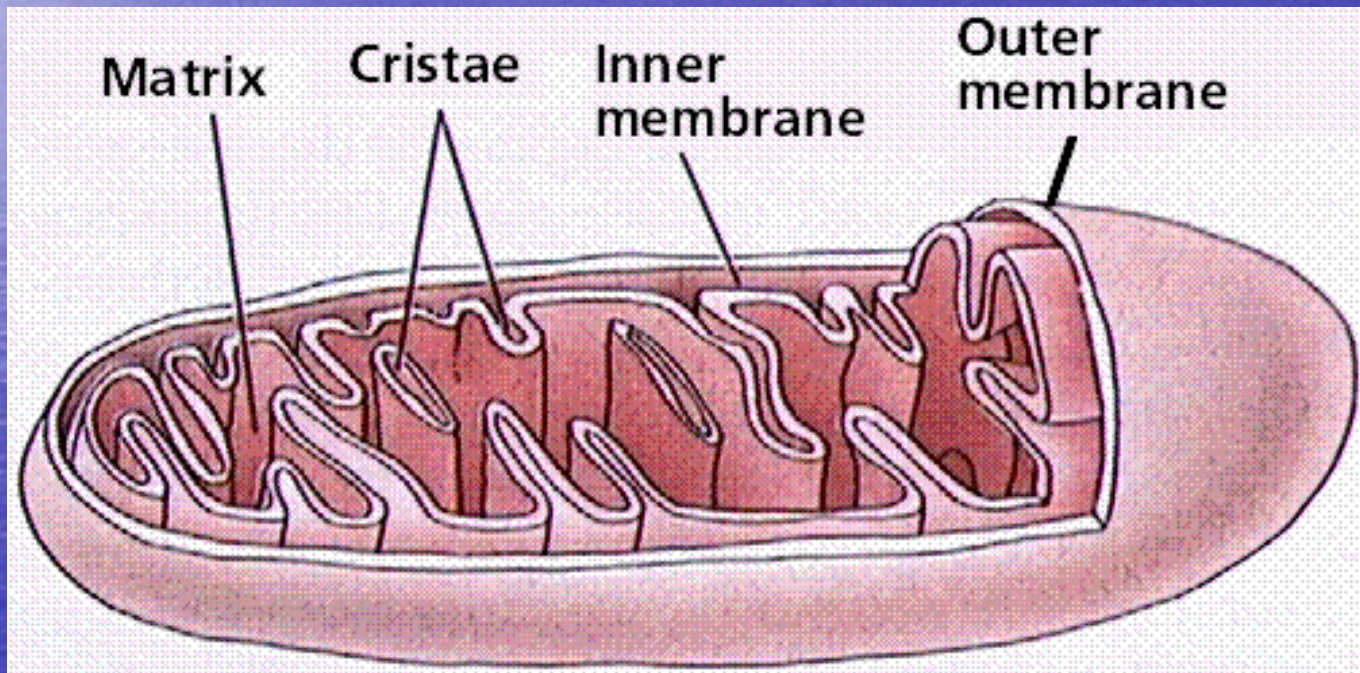


Ultra Estrutura das Leveduras

- **Mitocondrias:**
- Organelos de forma esférica ou alongada, distribuídos na periferia da célula;
- São envoltos por um sistema de duas membranas, onde a interna forma pregas características;
- Em aerobiose cada célula de levedura contém cerca de 50 mitocondrias;
- Em anaerobiose observa-se uma redução e degeneração destas estruturas;
- Os mitocondrias contêm enzimas implicadas na síntese dos fosfolípidos e dos esteróis;
- Possuem DNA próprio – DNA mitocondrial.
- A sua principal função é a respiração celular – Ciclo de Krebs na matriz mitocondrial e a fosforilação oxidativa na membrana interna.

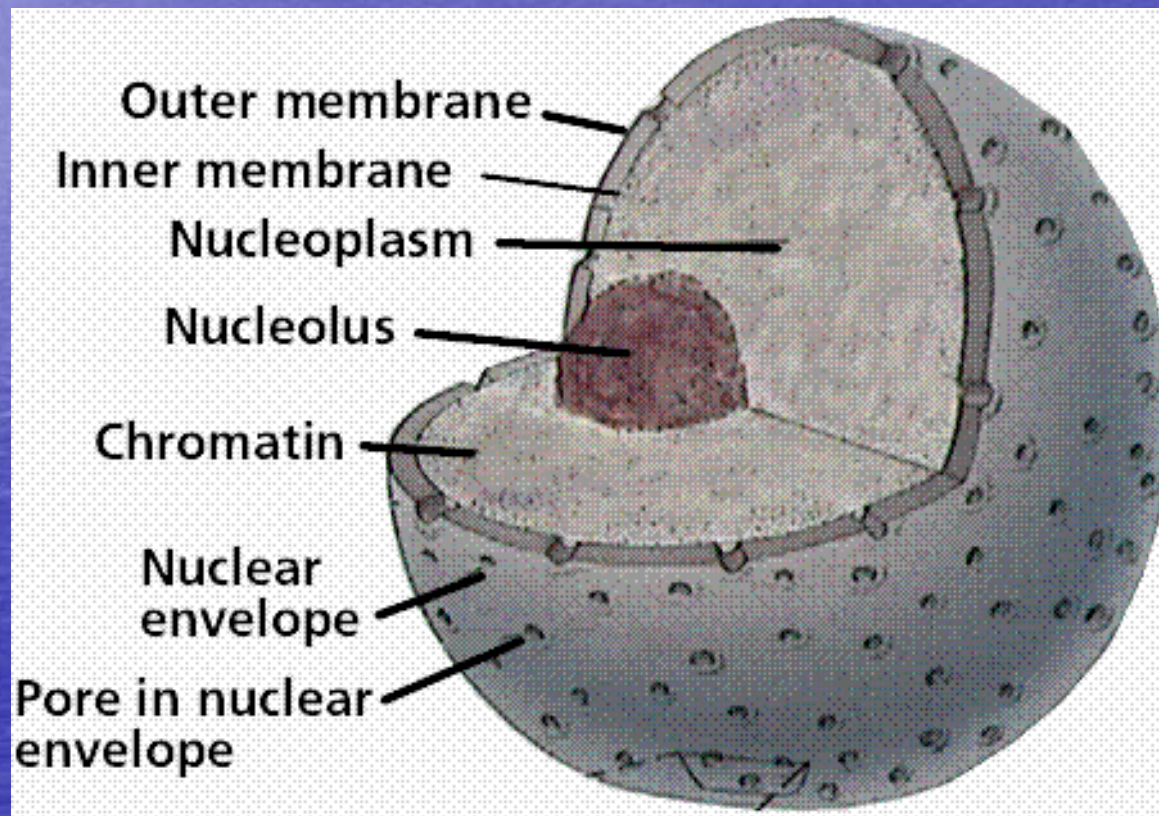
Ultra Estrutura das Leveduras

- **Mitocondrias:**



Ultra Estrutura das Leveduras

- Núcleo:



Ultra Estrutura das Leveduras

- **Núcleo:**
 - Estrutura com forma esférica com 1 a 2 micrómetros de diâmetro;
 - Envolto por uma dupla membrana ligada ao RE;
 - Estas membranas possuem poros por onde é possível a troca de pequenas proteínas entre o núcleo o citoplasma;
 - O nucleolo parte central do núcleo, onde se realiza a síntese dos RNA ribossomais;
 - Contém a cromatina (moléculas de DNA associado a proteínas –histonas, formando os genes);
 - Existe um plasmídeo no núcleo (molécula circular de DNA com 6 kpb), apresentando 50 a 100 cópias por célula;
 - Principal função é a divisão celular e a transmissão das características hereditárias.