

Renato Leal Binati

**AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA EM  
VINHOS DE ALTITUDE COM BACTÉRIAS  
ÁCIDO-LÁCTICAS AUTÓCTONES SELECIONADAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.  
Orientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis  
2015

---

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Binati, Renato Leal

Avaliação da fermentação maloláctica em vinhos de altitude com bactérias ácido-lácticas autóctones selecionadas / Renato Leal Binati ; orientador, Márcio José Rossi - Florianópolis, SC, 2015.  
111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biotecnologia. 3. Tecnologia Enológica. 4. Fermentação Maloláctica. I. Rossi, Márcio José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**“Avaliação da fermentação maloláctica em vinhos de altitude com bactérias ácido-lácticas autóctones selecionadas”**

Por

**Renato Leal Binati**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (002/BTC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



---

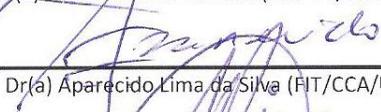
Dr(a) Márcio José Rossi (MIP/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



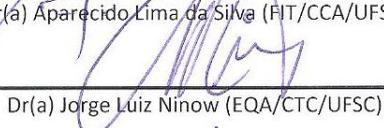
---

Dr(a) Gildo Almeida da Silva (CNPUV/EMBRAPA)



---

Dr(a) Aparecido Lima da Silva (FIT/CCA/UFSC)



---

Dr(a) Jorge Luiz Ninow (EQA/CTC/UFSC)



---

Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin  
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2015.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela confiança, carinho e apoio incondicional.

Ao meu irmão Flávio, pela companhia diária, discussões filosóficas e gemialidade.

Ao meu irmão Gustavo e minha cunhada Aline, pelo exemplo, parceria e alegria nos momentos de convívio.

Ao Dr. Márcio José Rossi, pela preciosa orientação, empenho e confiança na realização desse trabalho.

A todos os colegas dos Laboratórios de Bioprocessos, Microbiologia do Solo e Diversidade Microbiana, especialmente Anabel, Ana Carolina, Igor, Thays, David, Diana, Douglas, Fábio, pelo convívio, amizade e apoio; aos professores Admir, Cláudio e Rafael, pelo suporte na realização dos experimentos; e aos alunos Carlos e Jefferson, pela ajuda e empenho nas atividades realizadas.

Ao MSc. João Felippeto, por dividir comigo o conhecimento, experiência e entusiasmo no trabalho com os vinhos de altitude, e à Estela, pelo apoio total nas análises.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências e da Universidade Federal de Santa Catarina campus Florianópolis, pela oportunidade, aprendizado e estrutura oferecidos.

Ao CNPq, pelo financiamento da bolsa de mestrado.

A todos os familiares que, mesmo à distância, sempre confiaram e torceram por mim.

A todos os amigos que tornaram meus dias mais alegres, seja em Floripa, Curitiba ou Berlin.

À Deus, por ser a causa primária de todas as coisas.



*Der Wein ist die  
edelste Verkörperung  
des Naturgeistes.*  
(Friedrich Hebbel)

„O vinho é a  
mais nobre representação  
do espírito da natureza.“



## RESUMO

A fermentação maloláctica (FML) é o processo bioquímico de descarboxilação do ácido málico em ácido láctico, realizado por bactérias ácido-lácticas. Essa importante etapa no processo de vinificação traz como principais consequências a diminuição da acidez total do vinho, estabilização microbiológica e aporte de compostos relacionados ao aroma e sabor do produto. Nos vinhos finos de altitude da Serra Catarinense, que têm níveis elevados de acidez e pH reduzido, é essencial que a FML ocorra. No entanto, essas condições também tornam o ambiente restritivo para o crescimento bacteriano e dificilmente se consegue resultados satisfatórios com a fermentação espontânea, conduzida pelas próprias bactérias já presentes na vinificação. Com o objetivo de avaliar a FML em vinhos inoculados com bactérias isoladas da região de São Joaquim, foram obtidos 30 isolados a partir de amostras de borra de uma FML rápida, completa e espontânea que ocorreu em uma vinícola da região. Após etapas de caracterização morfológica, bioquímica e molecular, as bactérias R31, R34 e C2 foram escolhidas para ensaio de microvinificação. A produção dos inóculos foi realizada no meio de cultura ML, definido em um teste comparativo com outros cinco meios descritos na literatura. As culturas iniciadoras foram adicionadas em vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot. Nos vinhos Cabernet Sauvignon, após 45 dias a FML já havia sido finalizada em todos os vinhos inoculados com bactérias, enquanto no tratamento sem inoculação e em todos os tratamentos no Merlot, a FML não ocorreu dentro de 170 dias. A inoculação de bactérias ácido-lácticas foi um sucesso nos vinhos Cabernet Sauvignon e a explicação mais provável para a maior dificuldade nos vinhos Merlot é a interação entre algumas variáveis físico-químicas presentes na matriz extremamente complexa do vinho, que causaram perda da viabilidade celular e/ou da atividade maloláctica. Apesar de ter apresentado um crescimento mais lento, maior tempo para concluir a FML e ter gerado resultado positivo para produção de uma amina biogênica, a bactéria C2 atingiu os melhores resultados na análise sensorial dos vinhos. As bactérias R31 e R34 também produziram resultados sensoriais satisfatórios, de modo que os três isolados são indicados para uso em vinificações, além de novas investigações a respeito da FML.

**Palavras-chave:** Bactérias ácido-lácticas. Microvinificação. 16S-ARDRA. Análise sensorial.



## ABSTRACT

The malolactic fermentation (MLF) is the biochemical decarboxylation of malic acid to lactic acid, carried out by lactic acid bacteria. This important step in winemaking has as main consequences the decrease of the total acidity of the wine, microbiological stabilization and formation of compounds related to the wine aroma and taste. In the high-altitude wines from Serra Catarinense, which have high levels of acidity and low pH, the process is essential. However, these conditions also make a harsh environment for bacterial growth, and it is difficult to achieve satisfactory results with spontaneous fermentation conducted by the bacteria already present in the winemaking process. With the aim of evaluating the success of the MLF in wines inoculated with bacteria isolated from the region of São Joaquim, 30 isolates were obtained from a wine which has undergone spontaneous quick and complete MLF in a winery in this region. After morphological, biochemical and molecular characterization, the bacteria R31, R34 and C2 were chosen to the microvinification assay. The production of the inoculum was performed in culture medium ML, defined in a comparative test with five other media described in the literature. The starter cultures were added in Cabernet Sauvignon and Merlot wines. In Cabernet Sauvignon wines, after 45 days the MLF was completed in all wines inoculated with bacteria, while in the treatment without inoculation and in all treatments in Merlot the MLF did not occur within 170 days. The inoculation of lactic acid bacteria was successful in Cabernet Sauvignon wines and the most likely explanation for the difficulty in Merlot wines is the interaction between some physical and chemical variables present in the extremely complex wine matrix, which caused loss of cell viability and/or malolactic activity. Despite having experienced slower growth, took longer to complete the MLF and have generated positive result for the production of one biogenic amine, the bacteria C2 generated the best results in the sensory analysis of wine. The bacteria R31 and R34 also produced satisfactory sensory results, so that the three isolates are indicated for use in winemaking, and in new research about the MLF.

**Keywords:** Lactic Acid Bacteria. Microvinification. 16S-ARDRA. Sensory analysis.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Principais consequências da FML: estabilização microbiológica, desacidificação do vinho e alterações organolépticas (BARTOWSKY, 2005). ..... **25**
- Figura 2** - A descarboxilação do malato em lactato envolve o transporte ativo do ácido L-málico para dentro da célula e o transporte de ácido L-láctico para o espaço extracelular (BARTOWSKY, 2005). ..... **32**
- Figura 3** - Colônias em ágar MRS de um dos isolados bacterianos das borras de vinho. .... **62**
- Figura 4** - Microscopia de um isolado bacteriano obtido em borra de vinho, após coloração de Gram. .... **62**
- Figura 5** - Comparação entre a reação da catalase com o controle (esquerda) e um dos isolados bacterianos de borra de vinho (direita)... **63**
- Figura 6** - Crescimento dos 30 isolados bacterianos de borra de vinho no meio ML, após 7 dias de cultivo. Os resultados são a média de duas repetições e as barras representam o desvio padrão. As letras iguais indicam valores que não diferem entre si significativamente pelo teste de Scott Knott ( $p < 0,05$ ). ..... **63**
- Figura 7** – (A) Crescimento de colônias da bactéria C2 no meio DCM contendo ornitina; (B) Crescimento de colônias da bactéria R31 no meio DCM contendo lisina; (C) Crescimento de colônias da bactéria R34 no meio DCM contendo ornitina. .... **65**
- Figura 8** - Gel de eletroforese com o resultado da amplificação 8F-1541R de 1  $\mu$ L do DNA extraído por dois métodos. R15a, R26a e R31a foram extraídos pelo método do clorofórmio:álcool isoamílico; R15b e R26b foram extraídos pelo método da lise térmica. LM é o marcador de peso molecular e CN o controle negativo (água). .... **67**
- Figura 9** - Gel de eletroforese com o resultado da amplificação 8F-1541R do DNA extraído por dois métodos. R15a, R26a e R31a são amostras diluídas 10x de 1  $\mu$ L do DNA; R15b, R26b e R31b representam as reações de amplificação com 3  $\mu$ L do DNA, todos extraídos pelo método do clorofórmio:álcool isoamílico. R15c e R26c são os produtos da amplificação com 3  $\mu$ L do DNA, R15d e R26d da amplificação com 5  $\mu$ L, todos extraídos pelo método da lise térmica. LM é o marcador de peso molecular e CN o controle negativo (água). .... **68**
- Figura 10** - Gel de eletroforese com o resultado da amplificação 8F-1541R de 1  $\mu$ L do DNA diluído 10x, extraído pelo método de clorofórmio:álcool isoamílico, para 20 dos 30 isolados bacterianos de borra de vinho. LM é o marcador de peso molecular. .... **69**

<b>Figura 11</b> - Gel de eletroforese com o resultado da digestão com a enzima RSA do segmento 16S do gene rDNA amplificado do DNA dos isolados bacterianos de borra de vinho. ....	<b>71</b>
<b>Figura 12</b> - Gel de eletroforese com o resultado da digestão com a enzima HaeIII do segmento 16 S do gene rDNA amplificado do DNA dos isolados bacterianos de borra de vinho. ....	<b>72</b>
<b>Figura 13</b> - Crescimento do isolado C2 em seis diferentes meios de cultura, em função do tempo de cultivo. ....	<b>74</b>
<b>Figura 14</b> - Crescimento dos isolados R31, R34 e C2 no meio de cultura ML, em função do tempo de cultivo. ....	<b>76</b>
<b>Figura 15</b> - Cromatografia em papel para os vinhos Cabernet Sauvignon (A) antes da inoculação, (B) início da FML, (C) conclusão da FML e (D) FML ainda não iniciada. ....	<b>78</b>
<b>Figura 16</b> - Cromatografia em papel para os vinhos Merlot (A) antes da inoculação e (B) FML ainda não iniciada. ....	<b>79</b>
<b>Figura 17</b> - Médias dos atributos sensoriais avaliados para três repetições em vinhos Cabernet Sauvignon inoculados com diferentes BAL. Testemunha é o tratamento não inoculado. ....	<b>88</b>
<b>Figura 18</b> - Análise de componentes principais (PCA) para a avaliação sensorial dos vinhos Cabernet Sauvignon obtidos com diferentes BAL (R1, R34 e C2) para a FML. (A) Distribuição das variáveis avaliadas e (B) Distribuição dos tratamentos realizados. Testemunha é o tratamento não inoculado. ....	<b>91</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Fatores ambientais com efeitos importantes na fermentação maloláctica (GERTSEN-SCHIBBYE, 2012).....	<b>29</b>
<b>Tabela 2</b> - Composição (em g/L) do meio descarboxilase. ....	<b>47</b>
<b>Tabela 3</b> - Composição (em g/L) dos meios de cultura para produção dos inóculos.....	<b>53</b>
<b>Tabela 4</b> - Duração da FML, do momento da inoculação até a verificação do desaparecimento da mancha do ácido málico na cromatografia em papel.....	<b>79</b>
<b>Tabela 5</b> - Laudo analítico para os vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot antes da inoculação com as culturas iniciadoras. ....	<b>81</b>
<b>Tabela 6</b> - Laudo analítico de vinhos Cabernet Sauvignon após a finalização da FML. R31, R34 e C2 são os tratamentos com BAL, enquanto Inicial é o vinho antes da inoculação. Os dados são a média de três repetições e as letras iguais nas mesmas linhas indicam valores que não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )..	<b>86</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 16S-ARDRA** – Análise de restrição de DNA 16S-ribossômico amplificado
- ACAVITIS** – Associação Catarinense de Produtores de Vinhos Finos de Altitude
- ANOVA** – Análise de variância
- BAL** – Bactérias ácido-lácticas
- BML** – Bactérias malolácticas
- CTAB** – Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- DCM** – Meio descarboxilase
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP** – Desoxinucleotídeo
- EDTA** – Ácido etileno diamino tetracético
- EPAGRI** – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
- FML** – Fermentação maloláctica
- HPLC** – *High-performance liquid chromatography* (CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
- MLO** – Meio para *Leuconostoc oenos*, desenvolvido por Caspritz e Radler (1983)
- ML** – Meio de cultura desenvolvido por Krieger (1992)
- MRS** – Meio de cultura desenvolvido por de Man, Rogosa e Sharpe (1960)
- MZL** – Meio de cultura desenvolvido por Zhang e Lovitt (2005)
- MZLm** – Meio de cultura desenvolvido por Zhang e Lovitt (2005) modificado
- M25/25** – Meio de cultura desenvolvido por Henick-Kling e Krieger (2001)
- PCA** - Análise multivariada de componentes principais
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- RFLP** – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	23
2.1. Vinhos Finos de Altitude .....	23
2.2. Fermentação maloláctica .....	24
2.2.1. Bactérias ácido-lácticas .....	25
2.2.2. <i>Oenococcus oeni</i> .....	27
2.2.3. Fatores que influenciam a FML.....	27
2.2.4. Bioquímica da FML .....	31
2.2.5. Produção de aminas biogênicas.....	33
2.3. Seleção de bactérias para uso na vinificação .....	34
2.3.1. Isolamento de BAL.....	35
2.3.2. Identificação de BAL .....	36
2.3.3. Seleção de BAL.....	37
2.4. Produção de inóculos.....	39
3. OBJETIVOS .....	41
3.1. Geral .....	41
3.2. Específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	43
4.1. Amostras de borras de vinhos.....	43
4.2. Isolamento de bactérias ácido lácticas .....	43
4.3. Caracterização dos isolados.....	45
4.3.1. Morfologia das colônias .....	45
4.3.2. Coloração de Gram.....	45
4.3.3. Produção de catalase.....	45
4.3.4. Crescimento em meio líquido.....	46
4.3.5. Produção de aminas biogênicas.....	46
4.4. Perfil genotípico .....	48
4.4.1. Extração do DNA .....	48
4.4.2. Amplificação do gene rDNA 16S.....	50
4.4.3. Diferenciação celular por 16S-ARDRA .....	51
4.5. Produção de Inóculo .....	52
4.5.1. Definição do meio de cultura.....	52
4.5.2. Cinética de crescimento celular .....	53
4.5.3. Produção e acondicionamento dos inóculos .....	54
4.6. Microvinificações .....	55
4.6.1. Ativação dos inóculos.....	55
4.6.2. Fermentação maloláctica .....	56
4.6.3. Cromatografia em Papel .....	56

4.6.4. Análises Físico-Químicas.....	57
4.6.5. Análises Sensoriais.....	58
4.7. Análises Estatísticas .....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1. Bactérias ácido lácticas isoladas das borras de vinho.....	61
5.2. Caracterização dos isolados .....	61
5.2.1. Morfologia das colônias .....	61
5.2.2. Morfologia celular.....	62
5.2.3. Produção de catalase .....	63
5.2.4. Crescimento em meio líquido .....	63
5.2.5. Produção de aminas biogênicas.....	64
5.3. Perfil genotípico .....	66
5.3.1. Amplificação do gene rDNA 16S .....	66
5.3.2. Diferenciação celular por 16S-ARDRA.....	69
5.4. Produção de inóculo.....	74
5.4.1. Definição do meio de cultura .....	74
5.4.2. Cinética de crescimento celular.....	76
5.5. Microvinificações.....	77
5.5.1. Fermentação maloláctica.....	77
5.5.2. Análises físico-químicas .....	81
5.5.3. Análise sensorial .....	88
6. CONCLUSÕES .....	93
Sugestões de trabalhos futuros.....	94
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXO A.....	111

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de vinhos finos é relativamente recente no Brasil, em comparação com países europeus e com outros produtores do Novo Mundo, como Estados Unidos, Austrália e Argentina. Entretanto, o interesse por essa atividade tem se intensificado nos últimos anos, onde se verifica modernização das tecnologias empregadas e expansão das áreas dedicadas à vitivinicultura. Nesse cenário, a região da Serra Catarinense tem um grande potencial para a produção de vinhos de qualidade, onde as condições ambientais são bastante adequadas à maturação de variedades de uvas viníferas (denominadas também de uvas finas).

Após a fermentação alcoólica do mosto das uvas por leveduras para a produção de vinhos, geralmente também ocorre a fermentação maloláctica (FML). Essa fermentação era descrita geralmente como um processo complexo e ainda pouco compreendido, mas é uma importante etapa do processo de vinificação para a maioria dos vinhos tintos e alguns tipos de vinhos brancos, sobretudo aqueles produzidos em regiões mais frias. O principal resultado da FML é a conversão do ácido málico em ácido láctico. No entanto, as pesquisas mais recentes elucidaram uma série de outras transformações bioquímicas que estão envolvidas com o crescimento e atividade das bactérias ácido-lácticas (BAL), que são responsáveis pela FML. Observa-se com a FML uma redução na acidez total do vinho, aumento do pH, estabilização microbiológica e produção de compostos relacionados ao aroma e sabor do produto final.

A FML ocorre tradicionalmente de forma espontânea, realizada pela microbiota natural presente nas folhas da videira, solo, cachos de uva e nos equipamentos da vinícola. Todavia, existem alguns riscos inerentes a essa abordagem, como a demora excessiva para finalização do processo ou mesmo a não realização dessa fermentação. Isso pode ocorrer devido a condições muito estressantes no vinho para crescimento adequado das bactérias, além dos tratamentos sanitizantes utilizados na preparação do mosto, que podem eliminar ou reduzir muito a microbiota natural. Em outros casos, ao invés do crescimento esperado das BAL, pode-se verificar o desenvolvimento de bactérias acéticas e outros microrganismos indesejáveis, que aportam substâncias prejudiciais ao sabor do vinho e/ou à saúde do consumidor.

O conhecimento adquirido ao longo dos anos acerca da FML permitiu aos produtores de vinho desenvolver formas mais seguras de

controlar e até mesmo induzir a fermentação. A alternativa bastante estudada e difundida na Europa nas últimas décadas do século XX é a utilização dos chamados cultivos iniciadores (*starter*), que são linhagens de BAL selecionadas para aplicação direta no vinho. Elas são escolhidas pela capacidade de sobreviver no complexo ambiente do vinho e, além disso, pelos atributos positivos que podem aportar ao sabor e aroma. As vantagens dessa abordagem incluem um controle mais preciso do momento certo para realização da FML, garantia de alcançar um processo completo e mais rápido, inibição de bactérias indesejáveis por não conseguirem competir com o inóculo com elevada densidade celular, e produção de compostos associados ao aroma e sabor previsíveis e característicos de cada variedade.

No contexto brasileiro, a maioria das vinícolas ainda trabalha com FML espontânea. Aquelas que optam por realizar a inoculação precisam adquirir a cultura produzida por fabricantes europeus. Entretanto, enfrentam-se problemas como o custo elevado, perda de viabilidade das bactérias durante o transporte e difícil adaptação dos microrganismos nas condições dos vinhos daqui, diferentes da Europa. Nesse contexto, percebe-se a importância da pesquisa em microbiologia dos vinhos brasileiros, especificamente das bactérias lácticas, para que os produtores não precisem mais depender do crescimento espontâneo de bactérias e possam se beneficiar do uso de culturas iniciadoras apropriadas para realizar a FML.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Vinhos Finos de Altitude

De acordo com a Legislação Brasileira, “vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura” (Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988). Em 12 de novembro de 2004, a lei nº 10.970 adicionou a definição para Vinho Fino: “[...] elaborado mediante processos tecnológicos adequados que assegurem a otimização de suas características sensoriais e exclusivamente de variedades *Vitis vinifera* do grupo Nobres [...]”. Os denominados vinhos de mesa são aqueles produzidos a partir de uvas de origem americana e híbridas (*Vitis labrusca*, *Vitis bourquina*).

Atribui-se a chegada da viticultura ao Brasil à viagem exploratória portuguesa em 1531, que trouxe algumas variedades para cultivo na região de São Paulo, mas sem verificar continuidade. Apesar de atender às necessidades iniciais, o início de novos ciclos econômicos no Brasil esvaziou a mão de obra da região. A indústria vinícola brasileira verdadeiramente teve início com a vinda dos imigrantes italianos à Serra Gaúcha, entre 1870 e 1875. Essa continua sendo a principal região produtora de uvas e vinhos no país, embora se observe nas últimas décadas uma busca por novos *terroirs* brasileiros (MELLO, 2009; MELLO, 2013).

A história da vitivinicultura na Serra Catarinense iniciou há aproximadamente 15 anos, quando no final do século XX a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) constatou a adaptação de variedades de uvas finas nessa região. As condições climáticas do Planalto Serrano Catarinense são únicas em todo o território brasileiro e chamaram a atenção de empreendedores vitivinícolas para a elaboração de vinhos finos de alta qualidade. Após investimentos em implantação e pesquisas, hoje os vinhos catarinenses desfrutam de boa reputação nacional e internacional, inclusive com premiações em concursos (FREITAS, 2010; LOSSO, 2010).

Os chamados vinhos de altitude são produzidos com videiras plantadas entre 900 e 1400 m de altitude, nas regiões de São Joaquim, Campos Novos e Caçador, que integram a Associação Catarinense de Produtores de Vinhos Finos de Altitude (ACAVITIS). A altitude propicia um clima temperado seco, com maior amplitude térmica, temperaturas noturnas amenas, maior insolação, aeração constante, baixo índice pluviométrico na época de maturação e colheita do fruto,

permitindo um ciclo produtivo mais lento e uma maturação mais completa da uva, o que resulta em vinhos mais alcoólicos, encorpados, com coloração e aroma mais intensos em comparação aos demais produtos brasileiros (ROSIER *et al.*, 2004; FREITAS, 2010; LOSSO, 2010).

Com o fortalecimento da atividade vinícola na Serra Catarinense também se estabelece uma nova forma de atração de turistas para a região, e o “enoturismo” é uma grande aposta dos empreendedores locais. Para pequenas propriedades rurais familiares, a vitivinicultura é uma alternativa de boa rentabilidade econômica, permanente e com alto valor agregado. Essa atividade tem um grande impacto no desenvolvimento social e econômico das regiões onde está inserida, e as perspectivas para o futuro da vitivinicultura catarinense são ótimas (FREITAS, 2010; LOSSO, 2010).

## **2.2. Fermentação maloláctica**

A elaboração de vinho é um processo biotecnológico que envolve etapas de preparação do mosto de uvas, fermentação, estabilização, maturação e envase. A maioria dos livros que falam de maneira geral sobre a microbiologia do vinho considera apenas a presença da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação. No entanto, essa etapa é bastante complexa do ponto de vista ecológico e para alguns tipos de vinhos pode ser dividida em dois processos distintos. A primeira fermentação é chamada alcoólica e ocorre em todos os vinhos por ação das leveduras. A segunda é a fermentação maloláctica (FML), importante em vinhos de acidez elevada, especialmente tintos, efetuada por bactérias lácticas. Nas regiões mais frias, as uvas contêm naturalmente níveis mais elevados de ácidos orgânicos, tornando a redução da acidez mais importante (DAVIS *et al.*, 1985; COLAGRANDE, 1999; BARTOWSKY, 2005).

O processo consiste essencialmente em uma descarboxilação do ácido L-málico (dicarboxílico), resultando em ácido L-lático (monocarboxílico) e dióxido de carbono, tendo como consequência direta a redução da acidez total no vinho e um aumento de 0,1-0,2 unidades no pH. Adicionalmente, as bactérias responsáveis pelo processo também consomem alguns açúcares para seu crescimento e isso gera outros efeitos, como o realce de aromas varietais, devido à produção de compostos aromáticos a partir de precursores já presentes no mosto; e estabilização microbiológica, devido à remoção de possíveis

fontes de carbono para outros microrganismos. Os principais efeitos da FML estão ilustrados na Figura 1 (LAFON-LAFOURCADE, 1983; RADLER, 1986; BARTOWSKY, 2005).



Figura 1 - Principais consequências da FML: estabilização microbiológica, desacidificação do vinho e alterações organolépticas (BARTOWSKY, 2005).

A FML é considerada hoje em dia como essencial para quase todos os vinhos tintos e alguns brancos (LONVAUD-FUNEL, 1999). O interesse enológico nesse processo tem se intensificado devido às suas possíveis implicações na qualidade do vinho, tanto positivas quanto negativas. Além dos compostos relacionados com mudanças no perfil aromático do vinho, o metabolismo das bactérias também pode ser responsável por gerar substâncias que afetam a segurança alimentar do vinho, como aminas biogênicas e etil carbamato (ARAQUE *et al.*, 2009; ISABEL *et al.*, 2009; VILA-CRESPO *et al.*, 2010).

### 2.2.1. Bactérias ácido-lácticas

A ação de bactérias na fermentação do vinho foi primeiramente descrita há mais de um século, em estudos de Louis Pasteur e Hermann Müller-Thurgau, mas o estudo mais aprofundado desses microrganismos com vistas no melhoramento do processo data da segunda metade do

século XX (PASTEUR, 1873; MÜLLER-THURGAU, 1891; MÜLLER-THURGAU e OSTERWALDER, 1913; BARTOWSKY, 2005).

Os principais gêneros de bactérias associados à FML são *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Oenococcus* (LAFON-LAFOURCADE, 1983; WIBOWO *et al.*, 1985). Esses gêneros fazem parte do grupo das Bactérias Ácido-Lácticas (BAL), amplamente distribuídas em uma variedade de ambientes e caracterizadas pela produção de ácido láctico como principal produto catabólico da fermentação de hexoses (homofermentativas), ou uma mistura de ácido láctico, etanol, ácido acético e dióxido de carbono (heterofermentativas). Elas possuem forma de cocos ou de bacilos, são Gram-positivas, não produzem catalase, não apresentam motilidade, não formam esporos, são quimiorganotróficas e capazes de crescer sob condições anaeróbias (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2003; KRIEGER, 2005; KÖNIG e FRÖHLICH, 2009).

As BAL crescem *in vitro* normalmente em glucose, frutose e alguns outros carboidratos, mas no vinho predomina o crescimento mixotrófico, ou seja, envolve diferentes substratos como fonte de energia e carbono, incluindo pequenas quantidades de frutose/glucose e ácidos orgânicos. Além das fontes de carboidrato, também é necessário para o crescimento das BAL que sejam fornecidos aminoácidos e vitaminas (COSTELLO, 2005; ZHANG e LOVITT, 2006). Mais especificamente, denominam-se de bactérias malolácticas (BML) aquelas que utilizam o ácido málico como substrato. A partir do ácido cítrico, podem ser produzidos acetaldeído, ácido acético, diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol, compostos que podem ter considerável importância no sabor do vinho (KRIEGER, 2005). A produção de compostos do aroma e sabor do vinho e o aumento ou diminuição de intensidade de alguns atributos dependem diretamente das linhagens de bactéria que estão presentes (COSTELLO, 2005).

Apesar de geralmente desejado, o crescimento das BAL, entretanto, nem sempre é positivo para a qualidade do vinho. Conforme citado anteriormente, as próprias bactérias lácticas podem ser responsáveis pela produção de substâncias indesejáveis, prejudiciais ao gosto/aroma ou perigosas à saúde humana. Dentre os gêneros de BAL descritos no vinho, entende-se que alguns são preferíveis para conduzir a FML e alguns são menos aceitáveis. Características indesejadas usualmente são associadas com espécies dos gêneros *Pediococcus* e *Lactobacillus*, que crescem mais facilmente em pH superior a 3,5 (KRIEGER, 2005).

### **2.2.2. *Oenococcus oeni***

Na década de 1960 foi isolado pela primeira vez o organismo descrito como principal responsável pela FML, caracterizado por Ellen Garvie e denominado *Leuconostoc oenos* (GARVIE, 1967). Quase 30 anos depois, com a utilização de técnicas moleculares, Leon Dicks e colaboradores descreveram um novo gênero, *Oenococcus*, e reclassificaram o *Leuconostoc oenos* como *Oenococcus oeni*, a única espécie do gênero (DICKS *et al.*, 1995).

Por mais que outras espécies participem do processo da FML, no final a dominante é geralmente *O. oeni*, devido à melhor adaptação dessa espécie às difíceis condições do vinho, e por isso é o organismo que mais desperta o interesse enológico. Também se considera importante que *O. oeni* não degrada componentes necessários à qualidade do vinho como etanol, glicerol e ácido tartárico (DAVIS *et al.*, 1988; HENICK-KLING, 1988; LONVAUD-FUNEL *et al.*, 1991). Trata-se de uma bactéria acidofílica, capaz de crescer no vinho em pH 3,5 ou menor e na presença de álcool e sulfito. Abaixo de pH 3,1 e em concentrações altas desses fatores de inibição, entretanto, o crescimento será lento (KRIEGER, 2005). Assim como os outros membros do grupo das BAL, *O. oeni* é uma bactéria Gram-positiva, catalase negativa e microaerofílica. É heterofermentativa em relação à utilização da glucose, com produção de etanol, dióxido de carbono, ácido acético ou acetaldeído e ácido láctico (WOOD, 1961; BARTOWSKY, 2005; ZHANG e LOVITT, 2006).

Para cultivo em laboratório, geralmente se utilizam meios de cultura com pH entre 4,2 e 5,0, suplementados com suco de tomate ou maçã. É uma espécie com exigências nutricionais bastante complexas, que além de fontes de carbono e nitrogênio também precisa de vitaminas, íons minerais e aminoácidos (HENICK-KLING, 1988; POWELL *et al.*, 2005). O crescimento ocorre entre 20 e 30 °C e pode demorar de 5 a 7 dias para formar as primeiras colônias visíveis em placa de Petri. No microscópio, observam-se cadeias de dois a vinte cocos (VAN VUUREN *et al.*, 1991; POWELL *et al.*, 2005).

### **2.2.3. Fatores que influenciam a FML**

Os principais fatores que afetam o crescimento das BAL no vinho, e conseqüentemente a evolução da FML, podem ser separados

em três categorias distintas: composição físico-química associada a fatores ambientais no vinho; técnicas de vinificação e interação com outros microrganismos (KRIEGER, 2005). Dentro da primeira categoria, destacam-se temperatura, pH, concentração de etanol e SO<sub>2</sub>. Com relação à vinificação, a etapa de clarificação pode influenciar negativamente na FML devido à remoção de nutrientes e outras partículas bastante específicas que podem ser importantes ao metabolismo bacteriano, além da remoção das próprias bactérias. O uso de barris de madeira ou tanques de aço inoxidável também pode influenciar na presença de microrganismos. Na terceira categoria de fatores, a interação das BAL com as leveduras, fungos, bactérias acéticas, bacteriófagos e mesmo com outras bactérias do mesmo grupo pode resultar em relações de antagonismo, sinergismo ou em alguns casos pode não ter nenhum efeito relevante. Essa interação se dá na forma de competição por nutrientes ou liberação de substâncias que influenciam no crescimento. No caso particular das leveduras, algumas delas podem produzir altas concentrações de SO<sub>2</sub>, o que inibe as bactérias (COLAGRANDE, 1999; LONVAUD-FUNEL, 2002; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2003; KRIEGER, 2005).

O vinho é um ambiente bastante complexo e há um grande número de variáveis associado com o sucesso ou fracasso da FML, de modo que não existe nenhum procedimento padrão que garanta seu sucesso em todos os vinhos. É importante notar também que essas variáveis atuam em conjunto, ou seja, o efeito de cada uma delas não pode ser considerado separadamente. Isso torna bastante difícil para estabelecer valores de referência dos parâmetros físico-químicos, mas, de modo geral, podem ser recomendados níveis mais adequados, que permitem um crescimento bem sucedido das bactérias, conforme mostrado na Tabela 1. Em alguns casos, pode ser difícil produzir um vinho que atenda a esses parâmetros, por isso existem inóculos comerciais adaptados para diferentes condições e, nessas situações, seguir as recomendações do fabricante e escolher a melhor cultura é essencial. A aplicação de culturas compatíveis de inóculos bacterianos e de leveduras e utilização de barris de carvalho também são recomendadas (LOUBSER *et al.*, 2003; LOUBSER, 2005; GERTSEN-SCHIBBYE, 2012).

No entanto, às vezes mesmo em vinhos que aparentemente estão dentro dos níveis exigidos para estes principais parâmetros físico-químicos a FML não atinge o sucesso esperado. Existem outros fatores menos conhecidos que interferem no andamento da fermentação, mas

que não por isso tem um impacto menos relevante, e alguns deles serão descritos a seguir (LOUBSER, 2004).

Tabela 1 - Fatores ambientais com efeitos importantes na fermentação maloláctica (GERTSEN-SCHIBBYE, 2012).

<b>Parâmetro</b>	<b>Adequado</b>	<b>Moderado</b>	<b>Difícil</b>	<b>Extremo</b>
Álcool (%)	<13	13-15	15-17	>17
Temperatura (°C)	18-22	14-18 ou 22-24	10-14 ou 24-29	<10 ou >29
pH	>3,4	3,1-3,4	2,9-3,1	<2,9
SO <sub>2</sub> Livre (mg/L)	<8	8-12	12-15	>15
SO <sub>2</sub> Total (mg/L)	<30	30-40	40-60	>60

Os compostos fenólicos podem ter efeito positivo ou negativo no metabolismo das BAL, em dependência do composto em questão, concentração e da linhagem bacteriana (LOUBSER, 2005; LOMBARDI *et al.*, 2012). De fato, algumas publicações da Lallemand ([www.lallemand.com](http://www.lallemand.com)) indicam que os polifenóis, especialmente os taninos, podem exercer influência negativa sobre as BAL e serem os responsáveis pelas maiores dificuldades em algumas variedades de vinho. O efeito dos compostos fenólicos nas BAL seria a ocorrência de alterações na membrana citoplasmática e parede celular (LOUBSER, 2005; KRIEGER-WEBER, 2014).

Os polifenóis têm origem na própria uva (casca, semente e ráquis) e no carvalho do barril utilizado para a maturação (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2000), podendo ser divididos em dois grupos: flavonoides (antocianinas, flavonóis e flavanóis) e não-flavonoides (ácidos, aldeídos e alcoóis fenólicos). Os taninos são estruturas complexas formadas pela polimerização de alguns ácidos fenólicos e também de flavanóis (MACHEIX *et al.*, 1990). A quantidade total e a distribuição dos compostos entre as diferentes classes de polifenóis em um vinho dependem da variedade de uva utilizada (clima, solo, grau de maturação) e das técnicas de vinificação (tempo de maceração, maturação em carvalho) (REGUANT *et al.*, 2000; FREITAS, 2006; LACHMAN *et al.*, 2007).

Vários autores se dedicaram ao estudo do efeito dos diferentes compostos fenólicos sobre bactérias do vinho, quase sempre utilizando o *Oenococcus oeni* nos testes. Entre os ácidos fenólicos, geralmente o ácido gálico foi descrito como estimulante (VIVAS *et al.*, 1997;

REGUANT *et al.*, 2000), enquanto os ácidos hidroxicinâmicos (cafeico, ferúlico e p-cumárico) foram quase sempre relacionados com inibição das BAL (REGUANT *et al.*, 2000; CAMPOS *et al.*, 2003; LOUBSER, 2005). Em estudo de Figueiredo e colaboradores (2008), eles concluíram que os aldeídos fenólicos não possuem efeito no crescimento de *O. oeni* nas concentrações normalmente encontradas no vinho, porém, quando avaliados em concentrações maiores, inibiram significativamente o microrganismo testado. No grupo dos flavonóis, kaempferol exerceu efeito inibitório no *O. oeni* e miricetina não afetou o crescimento, enquanto quercetina ora teve efeito negativo (FIGUEIREDO *et al.*, 2008) ora efeito positivo (REGUANT *et al.*, 2000). Para os flavanóis, a epicatequina foi descrita como neutra, e catequina com efeito neutro (FIGUEIREDO *et al.*, 2008) ou estimulante (REGUANT *et al.*, 2000). Um grupo geralmente associado com efeito positivo sobre o crescimento das BAL foi o das antocianinas, pois podem ser metabolizadas por *O. oeni* e atuar como fonte de energia (VIVAS *et al.*, 1997; KRIEGER-WEBER, 2014), enquanto que o grupo dos taninos, que foi um dos mais amplamente estudados, tem efeito bastante tóxico contra as bactérias (VIVAS *et al.*, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; KRIEGER-WEBER, 2014).

A falta de nutrientes no vinho pode ser determinante para inibir o crescimento das BAL. A adição de suplementos nutricionais ao vinho pode resolver essa limitação, mas há que se cuidar para que apenas as bactérias desejadas sejam beneficiadas pelo aporte de nutrientes (LOUBSER, 2005). Um possível problema encontrado em tanques muito grandes é a compactação da borra (sedimentos de células mortas de leveduras, sementes, casca e polpa das uvas, cristais de tartarato), que precipita para o fundo do recipiente e pode também acumular células bacterianas e nutrientes. A solução pode ser agitar a borra regularmente, a fim de manter as bactérias e os nutrientes em suspensão (LOUBSER, 2005).

Resíduos de fungicidas, pesticidas e lizozimas, usados em diferentes etapas da vinificação para controlar contaminações indesejadas no vinho, podem exercer um efeito bastante inibitório sobre as bactérias, e por isso devem ser observados os momentos certos de aplicação desses produtos e inoculação de bactérias lácticas (BORDONS *et al.*, 1998; BAUER e DICKS, 2004; LOUBSER, 2005). A micro oxigenação pode ser benéfica para a FML, devido à leve agitação promovida pelo processo, mas quantidades excessivas de oxigênio são prejudiciais às bactérias e ao vinho (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1998; LOUBSER, 2005).

A quantidade de ácido málico presente no vinho, que difere entre as variedades de uva e também de uma safra para outra, pode afetar a FML, uma vez que em quantidades muito baixas (abaixo de 0,8 g/L) é mais difícil de iniciar o processo (LOUBSER, 2004). Os ácidos graxos também são componentes importantes da matriz do vinho. Enquanto o ácido oleico, um ácido graxo de cadeia longa, é essencial para o crescimento das BAL (BAUER e DICKS, 2004); os ácidos graxos de cadeia média podem ter impactos negativos e são produzidos no metabolismo de algumas leveduras (EDWARDS *et al.*, 1990; ALEXANDRE *et al.*, 2004).

A FML pode ser dificultada em alguns cultivares de uva, como Merlot e Chardonnay, provavelmente devido à diferença na concentração de compostos que afetam as BAL. Especial atenção tem sido dada à concentração dos compostos fenólicos, que podem explicar a maior dificuldade de conduzir a FML em algumas variedades tintas, como Merlot. O efeito inibitório de algumas leveduras e do teor de SO<sub>2</sub> nas BAL também é acentuado nessas cultivares mais difíceis (VIVAS *et al.*, 2000; LOUBSER *et al.*, 2003; KRIEGER-WEBER, 2014).

#### **2.2.4. Bioquímica da FML**

Há três mecanismos principais associados à reação de descarboxilação do ácido málico em ácido láctico, que de fato não é uma fermentação na definição exata do termo. Para *Oenococcus oeni*, essa conversão é realizada diretamente pela enzima malato descarboxilase, também chamada de enzima maloláctica, utilizando NAD<sup>+</sup> e Mn<sup>++</sup> como cofatores e sem intermediários (CASPRITZ e RADLER, 1983; KUNKEE, 1991; COSTELLO, 2005). Em outras espécies de BAL, existem duas possibilidades utilizando enzimas distintas. A reação pode ocorrer via piruvato, que posteriormente é reduzido em lactato, com ação combinada da enzima málica e da lactato desidrogenase; ou ainda via descarboxilação de oxaloacetato em piruvato e finalmente em lactato, empregando três diferentes enzimas, nomeadamente malato desidrogenase, oxaloacetato descarboxilase e L-lactato desidrogenase. A proporção entre essas reações depende do balanço redox e das fontes de energia presentes (KUNKEE, 1975; RADLER, 1986; ZHANG e LOVITT, 2006).

Apesar da conversão do ácido málico em ácido L-láctico ser energeticamente desfavorável, não gerar intermediários livres, não produzir diretamente energia na forma de ATP, não fornecer carbono

para vias biossintéticas, é importante notar que a fermentação maloláctica traz de fato vantagens para a célula do ponto de vista energético. Através da FML, *O. oeni* pode absorver alguns nutrientes e manter o pH intracelular adequado à atividade enzimática e ao crescimento, mesmo nos baixos valores do pH do meio (SALEMA *et al.*, 1996; BARTOWSKY, 2005; COSTELLO, 2005). Por meio de transporte mediado por enzimas específicas, o ácido L-málico entra na célula bacteriana. Para cada molécula de malato que entra na célula e sofre a descarboxilação para lactato, um próton ( $H^+$ ) sai da célula acompanhando esse lactato, que é transportado a favor do gradiente de concentração e, portanto, fornece a energia necessária para o deslocamento do  $H^+$ , conforme proposto por Henick-Kling (1986). A molécula de dióxido de carbono formada na reação de descarboxilação também é levada para o exterior da célula (COSTELLO, 2005).

O aumento resultante no pH intracelular acaba promovendo uma elevada força próton-motora ( $\Delta p$ ) através da membrana citoplasmática, que pode ser aproveitada para a geração de energia. A energia metabólica adicional é conservada na forma de ATP por enzimas ATPase localizadas na membrana, com rendimento de 1 ATP para cada 3  $H^+$  que entram na célula (COX e HENICK-KLING, 1989; KUNKEE, 1991) (Figura 2).

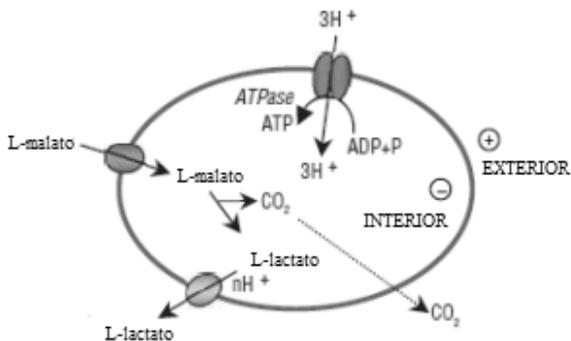


Figura 2 - A descarboxilação do malato em lactato envolve o transporte ativo do ácido L-málico para dentro da célula e o transporte de ácido L-láctico para o espaço extracelular (BARTOWSKY, 2005).

O ácido málico não serve como fonte única de energia para as bactérias, mas em condições de pH abaixo de 4,5 e limitada concentração de açúcares, essa forma adicional de geração de energia

proporcionada pela fermentação maloláctica é importante para aumentar o crescimento celular (RENAULT *et al.*, 1988; OLSEN *et al.*, 1991; GARCIA *et al.*, 1992; HENICK-KLING, 1993). Todas as BAL que possuem a enzima maloláctica podem aparentemente utilizar esse mecanismo (COX e HENICK-KLING, 1990).

### **2.2.5. Produção de aminas biogênicas**

As aminas biogênicas são substâncias comumente presentes em alimentos e bebidas fermentados, entre elas o vinho. Elas podem ser naturalmente encontradas em uvas, mas quando níveis mais elevados são detectados em vinhos, geralmente associa-se a produtos de baixa qualidade e elaborados com práticas defeituosas (MANFROI *et al.*, 2009). Em altas concentrações, elas podem ser tóxicas e causar efeitos adversos à saúde humana, como queda da pressão sanguínea, dores de cabeça, congestão nasal e/ou gastrointestinal, estresse respiratório e reações alérgicas. Em alguns países há limites estabelecidos na legislação para a concentração máxima desses compostos em certos alimentos (SILLA-SANTOS, 1996; STOCKLEY, 2004). A presença de etanol inibe sistemas de inativação fisiológica dos efeitos negativos dessas aminas no corpo humano. Por essa razão a preocupação com a detecção em vinho e outras bebidas alcoólicas é ainda maior (LONVAUD-FUNEL, 2001; GARDINI *et al.*, 2005).

Algumas aminas biogênicas podem ter impacto também do ponto de vista sensorial no vinho. Um enfraquecimento na percepção geral do sabor e um desagradável gosto amargo foram descritos em vinhos com altos níveis dessas substâncias (GLORIA, 2005).

Além das aminas já presentes, elas são produzidas pela descarboxilação enzimática de aminoácidos e algumas BAL são capazes de realizar essa reação (HENICK-KLING, 1993; LONVAUD-FUNEL, 2001; GUERRINI *et al.*, 2002). De maneira geral, assume-se que três requisitos são fundamentais para que haja produção de aminas no vinho: presença dos aminoácidos precursores; presença de microrganismos capazes de realizar a reação e condições ambientais permissíveis ao crescimento bacteriano e atividade enzimática (TEN BRINK *et al.*, 1990; GARDINI *et al.*, 2005). As bactérias lácticas podem metabolizar peptídeos liberados durante a autólise das leveduras e utilizar os aminoácidos como nutrientes e fonte de energia (LEITÃO, 2000). As principais aminas biogênicas associadas com o vinho são histamina, tiramina, putrescina e cadaverina, cujos precursores aminoácidos são

histidina, tirosina, arginina (com ornitina como intermediário) e lisina, respectivamente (GUERRINI *et al.*, 2002; BARTOWSKY, 2005).

### 2.3. Seleção de bactérias para uso na vinificação

A FML geralmente é esperada para começar espontaneamente no vinho logo após a finalização da fermentação alcoólica, mas também pode iniciar durante essa primeira fermentação ou sofrer um retardamento. As BAL estão presentes naturalmente nas folhas e ramos da videira, nas bagas de uva, no solo e também nos próprios equipamentos da vinícola. Devido às condições estressantes presentes no vinho e a composição bastante complexa dependente do tipo de uva, clima e técnicas de vinificação, a FML torna-se um processo imprevisível e nem sempre é possível atingir resultados satisfatórios com a fermentação espontânea. O processo pode demorar semanas ou até meses para estar completo, ocorrer em alguns barris/tanques e em outros não. É essencial também que se tenha um controle do vinho para evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis, como as bactérias acéticas. Os microrganismos deteriorantes podem aportar substâncias como ácido acético, etil acetato e diacetil, prejudiciais ao sabor do vinho. Outros problemas associados com o atraso na FML são o uso ineficiente dos tanques de fermentação e o adiamento da distribuição e venda desse vinho (NIELSEN e RICHELIEU, 1999; ZHANG e LOVITT, 2006; VILA-CRESPO *et al.*, 2010).

Há duas abordagens principais para controlar a FML: interferência em alguns dos fatores físico-químicos que influenciam o crescimento bacteriano ou a adição de inóculos bacterianos (VILA-CRESPO *et al.*, 2010). O enólogo pode favorecer o crescimento das BAL mantendo a temperatura mais elevada, adicionando menores quantidades de SO<sub>2</sub>, retardando a etapa de clarificação (KRIEGER, 2005). Uma prática comum em algumas vinícolas é a inoculação do vinho em processamento com vinhos ou borras em que essa etapa já foi concluída. No entanto, esse sistema não é recomendado, devido ao risco de fortalecimento de espécies indesejáveis e com características desconhecidas, e perda de características peculiares do vinho (KUNKEE, 1974; KRIEGER, 2005).

A alternativa mais adequada para induzir a FML é a inoculação de culturas de BAL selecionadas. O uso das culturas *starter* deve promover uma fermentação mais rápida e completa, diminuindo dessa forma a influência negativa que poderia ser causada pelo crescimento de

outras BAL e também bacteriófagos e, além disso, permite uma seleção da linhagem efetivamente responsável pelo processo, gerando resultados mais previsíveis (SOZZI *et al.*, 1982; ORDUÑA *et al.*, 2001; POZO-BAYÓN *et al.*, 2005). É interessante isolar bactérias da própria região produtora dos vinhos onde elas serão inoculadas, pois a adaptação das linhagens a determinado ambiente promove uma maior qualidade no produto e mantém as características peculiares de cada região (IZQUIERDO *et al.*, 2004).

A seleção dessas bactérias geralmente é realizada a partir de vinhos que sofreram fermentação espontânea, visando encontrar entre a própria diversidade indígena aquelas que apresentem melhor resultado quanto à cinética da fermentação, devido à tolerância às condições limitantes do vinho, como pH, temperatura, teor de etanol e de SO<sub>2</sub>. Também é necessário investigar a produção de compostos interessantes para o aroma e o sabor e de compostos que possam ser indesejáveis (LAFON-LAFOURCADE, 1975; DAVIS *et al.*, 1985; KRIEGER, 2005).

O protocolo de seleção de bactérias maloláticas para posterior uso na vinificação normalmente segue uma ordem definida de passos, que essencialmente passa por: escolha de vinhos que passaram por uma completa e adequada fermentação espontânea; isolamento e purificação das bactérias presentes nesses vinhos; triagem com base em aspectos específicos do metabolismo bacteriano; aplicação de técnicas para diferenciação e identificação dos isolados; e ensaios de microvinificação para comparação de desempenho em análises físico-químicas e sensoriais (BOU e POWELL, 2005).

### **2.3.1. Isolamento de BAL**

As técnicas de microbiologia clássica são utilizadas para isolar e cultivar bactérias que estejam presentes no mosto ou vinho e também para quantificar as BAL nas amostras. A maioria das bactérias que crescem em vinho pode ser cultivada em meios nutritivos que atendam satisfatoriamente seus requisitos nutricionais. Entretanto, as técnicas clássicas podem requerer até 14 dias para gerar resultados, período muito longo quando o objetivo for monitorar a dinâmica populacional e houver necessidade de realizar alguma operação enológica para corrigir problemas. Para melhorar esse controle da FML hoje estão disponíveis técnicas de biologia molecular, mais rápidas e eficientes (GUEIMONDE

e SALMINEN, 2004; PINZANI *et al.*, 2004; CONSTANTINI *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2011).

O isolamento de bactérias envolve técnicas de plaqueamento, para separar as bactérias presentes no vinho. Devido ao grande número de microrganismos que pode estar presente na amostra, possivelmente seja necessário realizar diluições sucessivas, a fim de obter uma separação melhor entre as colônias. Conforme mencionado anteriormente, são empregados meios de cultivo ricos em nutrientes devido às complexas exigências nutricionais das BAL. Após o crescimento, as colônias isoladas são repicadas sucessivamente em novas placas visando à purificação. Os isolados purificados seguem adiante no processo de seleção (BOU e POWELL, 2005).

### **2.3.2. Identificação de BAL**

Após o isolamento de bactérias que estavam presentes no vinho, é preciso verificar se os isolados são de fato diferentes entre eles. Tradicionalmente, a identificação das BAL era realizada por técnicas clássicas baseadas nos fenótipos, a partir de características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Entretanto, para as BAL no vinho, essas análises podem apresentar resultados ambíguos, devido a grande similaridade entre as bactérias que crescem no mesmo ambiente, sob as mesmas condições (DELLAGLIO *et al.*, 1994; VANDAMME *et al.*, 1996; RODAS *et al.*, 2003; AXELSSON, 2004). O uso de técnicas moleculares pode substituir ou complementar as metodologias clássicas, obtendo-se resultados mais confiáveis e com poder discriminante maior (ZAPPAROLI *et al.*, 1998; SOHIER *et al.*, 1999; de VUYST e VANCANNEYT, 2007).

A diferenciação entre as BAL pode ser feita utilizando a técnica de 16S-ARDRA (Análise de restrição de DNA 16S-ribossômico amplificado). O princípio do método é o corte da região amplificada por enzimas de restrição em diferentes posições da sequência, gerando um perfil de fragmentos característico para cada isolado. A amplificação desta região do DNA emprega iniciadores específicos na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e a separação dos fragmentos é feita em géis de eletroforese. O 16S-ARDRA pode ser amplamente utilizado para diferenciação de BAL, pois combina rapidez, especificidade, simplicidade e sensibilidade (RODAS *et al.*, 2003).

Para a identificação mais precisa das BAL, utiliza-se o sequenciamento do DNA. Os genes do DNA ribossômico, assim como

para a 16S-ARDRA, são os alvos mais frequentemente utilizados, pois essa região tem sequências específicas para cada espécie. Iniciadores específicos de PCR são empregados para amplificar os genes da região que codifica a subunidade 16S do ribossomo, que são posteriormente sequenciados e comparados com sequências disponíveis em bases de dados (AMANN *et al.*, 1995; BARTOWSKY, 2005; COENYE *et al.*, 2005). Essa metodologia já foi utilizada com sucesso para identificação de BAL (SATO *et al.*, 2001; du PLESSIS *et al.*, 2004; CAPELLO *et al.*, 2010; SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

É importante acrescentar nesse ponto que o conhecimento obtido com a aplicação das ferramentas de biologia molecular pode ajudar bastante a entender melhor a genética, bioquímica e fisiologia das BAL e, por consequência, melhorar a qualidade do vinho. No entanto, não há interesse, pelo menos por enquanto, de utilizar tecnologias de DNA recombinante visando à aplicação de plantas e microrganismos geneticamente modificados na vinificação (BARTOWSKY, 2005).

### 2.3.3. Seleção de BAL

As bactérias isoladas, purificadas e diferenciadas umas das outras nos passos anteriormente descritos precisam passar ainda por uma série de testes, para garantir que são viáveis e adequadas para a condução da FML em vinhos. Os isolados precisam ser capazes de sobreviver e crescer no ambiente do vinho; não devem gerar nenhuma substância que prejudique sua qualidade e, preferencialmente, devem exercer um efeito positivo no perfil sensorial do produto final. Além dessas características de impacto no vinho, é importante verificar a viabilidade de produção dessas bactérias em processos industriais de maior escala (HENICK-KLING *et al.*, 1989; BOU e POWELL, 2005).

Na seção anterior sobre os fatores que afetam o crescimento das BAL, foi exposto que alguns parâmetros físico-químicos são de especial importância no comportamento das BAL. As bactérias mais adequadas para emprego como culturas iniciadoras devem ser capazes de resistir às condições de pH, temperatura, teor de álcool e sulfito encontrados no vinho. Se elas não puderem manter a viabilidade frente a esse ambiente, são descartadas do processo de seleção (BOU e POWELL, 2005; COUCHENEY *et al.*, 2005).

Algumas espécies de bactérias lácticas produzem substâncias que podem ser prejudiciais à qualidade do vinho e/ou à saúde humana. As aminas biogênicas fazem parte desse grupo, e a detecção da produção

desses compostos é de grande relevância. Como a produção das aminas bioativas é dependente da linhagem, protocolos de detecção são incluídos nos critérios de seleção. As bactérias isoladas que sejam capazes de produzir aminas biogênicas são desconsideradas para o restante das etapas de seleção (LE JEUNE *et al.*, 1995; BOU e POWELL, 2005; VIGENTINI *et al.*, 2009).

Os procedimentos industriais para a produção dos inóculos podem expor as células a diversos estresses químicos e ambientais, e nem todos os isolados serão capazes de suportar esse processo. No entanto, para que se tenha viabilidade na utilização de inóculos bacterianos comerciais para a promoção da fermentação maloláctica, é importante que se consiga produzir a biomassa bacteriana em grande escala (BOU e POWELL, 2005).

Os mecanismos moleculares que explicam as diferenças de comportamento entre as cepas de *O. oeni* ainda são pouco entendidos. Diversos genes possivelmente envolvidos com a sobrevivência e crescimento no vinho já foram descritos, mas, apesar disso, ainda não são capazes de explicar as diferenças. Os plasmídeos são fontes importantes de diversidade genética e fenotípica e a presença deles em bactérias ácido-lácticas pode conferir vantagens adaptativas em relação ao crescimento e metabolismo. Geralmente estão associados às culturas iniciadoras utilizadas na indústria alimentícia e podem ser a razão de sua superioridade. A predominância de alguns plasmídeos em cepas de culturas iniciadoras e em bactérias autóctones que realizam com sucesso a FML indica que eles podem contribuir para a adaptação dessas bactérias (MILLS *et al.*, 2006; FAVIER *et al.*, 2012).

Após a sobrevivência e proliferação das bactérias quando inoculadas no vinho, espera-se que elas sejam capazes de realizar a fermentação maloláctica. Para verificar a velocidade com que as bactérias conduzem a descarboxilação do ácido málico e quais os impactos sensoriais gerados pelo crescimento delas, são feitos ensaios de microvinificação. Os vinhos produzidos com inoculação de bactérias são comparados com outros sem adição de inóculos. A partir de análises físico-químicas, avalia-se o impacto dos isolados bacterianos em alguns parâmetros importantes do produto, como redução do pH e acidez total. A produção de compostos que influenciam no aroma e sabor é um quesito de extrema importância na seleção das bactérias. Por isso, a etapa de análise sensorial é decisiva na escolha de qual das linhagens isoladas tem o maior potencial para tornar-se um inóculo comercial (IZQUIERDO *et al.*, 2004; BOU e POWELL, 2005; VIGENTINI *et al.*, 2009).

## 2.4. Produção de inóculos

Vários aspectos da preparação das BAL para cultivos *starter* podem ser melhorados, mas ainda não se entende completamente os requerimentos nutricionais desses organismos. No passado foram utilizados meios de cultura baseados em sucos de uva ou maçã, mas a dificuldade na obtenção e armazenamento de fontes frescas desses sucos torna o processo caro e pouco confiável, pois alterações na qualidade do suco podem interferir significativamente na velocidade de crescimento e rendimento das células. Posteriormente, passou-se a empregar meios de cultivo sintéticos, preparados a partir de ingredientes de qualidade atestada. Com os meios sintéticos se alcança maior rendimento na produção de biomassa e células com viabilidade e atividade maloláctica superiores (KRIEGER *et al.*, 1992; ZHANG e LOVITT, 2006).

Há dois grupos principais de fatores a serem considerados na produção dos inóculos: os que influenciam no crescimento e viabilidade celular e aqueles que podem afetar a atividade maloláctica. Busca-se idealmente um meio que possibilite a obtenção de elevado rendimento em biomassa e que mantenha alta atividade enzimática do complexo maloláctico (ZHANG e LOVITT, 2006).

O cultivo com mais de uma fonte de carbono é a melhor maneira de aumentar a produtividade no crescimento das BAL para a produção de cultivos *starter* (SALOU *et al.*, 1991; SALOU *et al.*, 1994; ZHANG e LOVITT, 2005). É obtida uma maior produção de biomassa quando se utilizam misturas de glucose/frutose como fonte de energia. O crescimento e a atividade maloláctica também são estimulados na presença de ácido málico (LOUBIERE *et al.*, 1992; PASSOS *et al.*, 2003; ZHANG e LOVITT, 2005).

A velocidade da reação de descarboxilação do ácido L-málico está diretamente relacionada com a atividade específica da enzima maloláctica e a densidade de células presentes no vinho, por isso é importante inocular uma grande quantidade de células. Usualmente, é necessário que a concentração de células atinja  $1 \times 10^6$  células/mL, para que se observe um metabolismo significativo do malato (KRIEGER *et al.*, 2000). O momento da recuperação das células também é um importante fator para otimizar a FML.

Tradicionalmente encontravam-se no mercado culturas de bactérias vendidas na forma líquida, congelada ou liofilizada. Às vezes, é necessária uma etapa de reativação/aclimatação dessas culturas antes

da inoculação, para aumentar a viabilidade. Esse processo envolve uma sequência de passos e pode ser bastante trabalhoso. Atualmente, culturas para inoculação direta no vinho se tornaram disponíveis. Elas são produzidas com uma pré-aclimatação visando à sobrevivência no ambiente do vinho, para manter a viabilidade e atividade maloláctica após adição direta (LAFON-LAFOURCADE, 1983; KRIEGER, 2005).

Conforme explicado em um manual da Lallemand sobre a FML, para que se tenha um controle bem-sucedido dessa etapa no processo de vinificação, é importante entender os mecanismos relacionados ao crescimento e atividade maloláctica das bactérias responsáveis, selecionar a cultura mais indicada de acordo com o produto esperado e aplicar os procedimentos adequados para que a inoculação seja eficiente e a bactéria desejada efetivamente domine a FML.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar bactérias maloláticas com potencial para utilização como culturas iniciadoras a fim de promover a fermentação malolática em vinhos finos da região da Serra Catarinense.

#### **3.2. Específicos**

- a) Coletar amostras de borras dos vinhos da região da Serra Catarinense;
- b) Isolar BAL presentes nas amostras;
- c) Caracterizar as bactérias isoladas quanto a aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares;
- d) Selecionar meios de cultura e produzir inóculos das BAL;
- e) Aplicar as BAL em microvinificações e realizar análises físico-químicas e sensoriais dos vinhos, visando à comparação entre as bactérias.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioprocessos, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina em Florianópolis, entre 2013 e 2015.

### **4.1. Amostras de borras de vinhos**

Foi utilizada a borra de uma vinícola da região de São Joaquim - SC, uma das pioneiras na Serra Catarinense, que geralmente enfrenta problemas para iniciar a FML e nunca havia obtido sucesso com a utilização de inóculos comerciais de BAL em sua produção. Durante a vinificação das uvas na safra de 2012, com variedades Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Touriga Nacional e Sangiovese, foi observada nessa vinícola a ocorrência de FML rápida, completa e de maneira espontânea, ou seja, com bactérias da própria região. O que também chamou a atenção foi a eficiência da fermentação, sem aumento prejudicial da acidez volátil nem produção de aromas indesejáveis. As borras do vinho foram fornecidas para o Laboratório de Bioprocessos para o desenvolvimento deste projeto. Elas foram inicialmente condicionadas e armazenadas em quatro condições diferentes: liofilizada e mantida à -20 °C; congelada à -20 °C; refrigerada (4-8 °C) e mantida à temperatura ambiente.

### **4.2. Isolamento de bactérias ácido lácticas**

O isolamento de bactérias foi realizado com o emprego de técnicas clássicas de semeadura em placa contendo meio nutritivo. As amostras de borra do vinho nas quatro condições diferentes de armazenamento foram primeiramente diluídas em tubos contendo 9 mL de solução salina (0,9% de NaCl), para facilitar a separação dos microrganismos. No primeiro tubo de diluição foi adicionado 1 mL da amostra inicial de borra e homogeneizado resultando numa diluição de 10 vezes. Para o tubo seguinte foi transferido 1 mL do primeiro tubo e homogeneizado. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes, até atingir uma diluição de 10.000 vezes. A partir de cada um desses tubos, foi retirado 0,1 mL e inoculado em placa de Petri contendo meio de

cultura, espalhado com auxílio de alça de Drigalski. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 7-15 dias. O crescimento das BAL é favorecido quando incubadas em atmosfera enriquecida com dióxido de carbono. Assim, as placas foram mantidas dentro de jarras de anaerobiose (modelo GasPak, Permution) (BOU e POWELL; 2005; CONSTANTINI *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2011).

O meio de cultura utilizado foi uma variação do ágar MRS (de MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960), onde crescem bem quase todas as BAL. Como sua versão original não é seletiva, a fim de estimular o crescimento apenas das BAL foi feita adição de suco de tomate a 10% (v/v) e cisteína a 0,05% (m/v), e reduziu-se o pH para tornar o meio mais seletivo (de MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960; WIBOWO *et al.*, 1985; BOU e POWELL, 2005; CONSTANTINI *et al.*, 2009). Assim, a formulação final continha (g/L): peptona 10, extrato de carne 8, extrato de levedura 4, glucose 20, Tween 80 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2, MgSO<sub>4</sub> 0,2, MnSO<sub>4</sub> 0,05, citrato de amônio 2, acetato de sódio 5, cisteína 0,5, ágar 20, além de 100 mL de suco de tomate. Utilizou-se suco de tomate da marca La Pastina, diluído 1:1 com água destilada, centrifugado por 10 minutos a 4.856 x g (Centrífuga NT 820, Novatecnica) e em seguida o sobrenadante foi congelado, o qual foi adicionado durante o preparo do meio de cultura. O pH foi ajustado para 5,0 e o meio esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Após o período de crescimento das bactérias nas placas, as colônias visíveis foram coletadas e transferidas para novas placas de Petri, nas quais foi realizada inoculação por estriamento com utilização de alça de platina, a fim de purificar as colônias e obter bactérias isoladas. A incubação foi conduzida da mesma forma. O processo foi repetido até se obter apenas um isolado bacteriano em cada placa. A manutenção dos isolados foi realizada por transferências periódicas em meio MRS e armazenamento em geladeira a 4 °C.

Além dos isolados obtidos dessas amostras de borra do vinho, também foi utilizada outra bactéria que foi isolada no início de 2013, da borra de vinho da mesma vinícola em que foi verificada fermentação maloláctica completa. A bactéria foi confirmada como pertencente à espécie *Oenococcus oeni* a partir de reações de PCR com utilização de iniciadores específicos para tal espécie (BARTOWSKY e HENSCHKE, 1999). Ela recebeu o código C2 e as condições de crescimento e armazenamento em placa foram as mesmas descritas para os demais isolados.

### **4.3. Caracterização dos isolados**

#### **4.3.1. Morfologia das colônias**

Para confirmar características típicas de bactérias lácticas e também contribuir para a diferenciação dos isolados, as colônias bacterianas foram observadas com auxílio de lupa estereoscópica. As seguintes características foram analisadas: tamanho, cor, forma, bordos, elevação, superfície, consistência, transparência e brilho. Normalmente espera-se que sob as mesmas condições de temperatura, pH e composição do meio de cultivo, as bactérias formem colônias de aspecto constante e que possam fornecer informações adicionais para sua identificação.

#### **4.3.2. Coloração de Gram**

As bactérias lácticas estão todas incluídas no grupo das Gram-positivas. Os isolados foram submetidos à coloração diferencial de Gram, utilizando-se para isso culturas novas crescidas em placas com meio MRS. O protocolo para a coloração foi seguido de acordo com o descrito por Tortora e colaboradores (2006). O procedimento consistiu de etapa de preparo de esfregaço fixado em chama, aplicação do corante básico e de solução de iodo, descoloração com solvente orgânico e por fim tratamento com corante de contraste, para diferenciar as células com capacidade de reter o primeiro corante daquelas que não conseguem. A observação das células coradas foi feita com auxílio de microscópio óptico em aumento de 1000x em objetiva de imersão (Primo Star, Zeiss). Além da coloração, foram observados também as dimensões, a forma e os arranjos formados pelas células.

#### **4.3.3. Produção de catalase**

O mecanismo pelo qual as células conseguem eliminar o peróxido de hidrogênio tóxico (ânion peróxido  $O_2^{-2}$ ) também é utilizado para diferenciar entre grupos de bactérias. Os microrganismos desenvolveram enzimas capazes de neutralizar a ação tóxica do  $H_2O_2$ , sendo a catalase e a peroxidase as duas principais. A primeira gera água e oxigênio como produtos finais, enquanto a segunda apenas água. A atividade da catalase pode ser então facilmente detectada pela liberação

de bolhas de ar quando as colônias bacterianas entram em contato com o peróxido de hidrogênio (TORTORA *et al.*, 2006).

O teste da catalase foi realizado com o preparo de uma solução a 3% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Com uso de uma pipeta de Pasteur, colocou-se uma gota dessa solução em uma lâmina de microscopia e em seguida uma colônia bacteriana foi espalhada sobre a gota com auxílio de alça de platina. Foi observado por alguns segundos se havia ou não formação de bolhas de ar. Uma placa com a bactéria *Escherichia coli* foi utilizada como controle positivo da reação, já que esta bactéria produz a catalase. As bactérias lácticas usam a peroxidase para eliminar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de modo que o teste deve ser negativo para produção de catalase.

#### 4.3.4. Crescimento em meio líquido

Para as etapas posteriores de produção dos inóculos para aplicação nas microvinificações, é essencial que as bactérias isoladas sejam capazes de crescer satisfatoriamente. Com o objetivo de verificar essa capacidade, os isolados foram inoculados em tubos contendo o meio ML, que foi o escolhido para a produção dos inóculos bacterianos, conforme descrito no item 4.5.1. A partir de placas contendo as culturas isoladas, algumas colônias foram coletadas com utilização de alça bacteriológica e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL do meio. Os tubos foram incubados em estufa a 30 °C por 7 dias, sendo na sequência realizada leitura de densidade óptica com espectrofotômetro (BEL Photonics 1105) em comprimento de onda 660 nm, a fim de comparar o crescimento entre os isolados.

#### 4.3.5. Produção de aminas biogênicas

Para os isolados que foram selecionados para os testes de microvinificação, foi realizado um *screening* qualitativo em placas para verificação da capacidade de descarboxilação de aminoácidos para produção de aminas biogênicas, de acordo com o protocolo descrito por Bover-Cid e Holzapfel (1999). Muitos métodos já foram descritos para detecção qualitativa e quantitativa da produção de aminas biogênicas por microrganismos, mas esse foi escolhido devido a sua simplicidade, adequação aos objetivos do trabalho e boa correlação com o nível de detecção avaliado no procedimento quantitativo com HPLC (BOVER-CID e HOLZAPFEL, 1999).

O protocolo consiste de uma etapa inicial de ativação das culturas, a fim de promover a indução da enzima responsável pela descarboxilação. As bactérias teste foram subcultivadas nove vezes no meio descarboxilase (DCM), adaptado para conter 0,1% de cada aminoácido precursor (Tabela 2). Foram utilizados os aminoácidos L-tirosina, L-histidina monoclóridrato, L-ornitina monoclóridrato e L-lisina monoclóridrato. Para o primeiro subcultivo, algumas colônias foram transferidas das placas para os tubos contendo o meio líquido. Os tubos foram incubados em estufa a 30 °C por 4 dias, e posteriormente 1 mL das células em suspensão foi transferido para o próximo tubo contendo o meio DCM, sendo esse procedimento repetido mais sete vezes.

Tabela 2 - Composição (em g/L) do meio descarboxilase.

<b>Componente</b>	<b>Etapa de Ativação</b>	<b>Etapa de Screening</b>
Triptona	10	5
Extrato de levedura	5	5
Extrato de carne	8	5
Cloreto de sódio	2,5	2,5
Glucose	20	0,5
Tween 80 <sup>®</sup>	1	1
MgSO <sub>4</sub>	0,2	0,2
MnSO <sub>4</sub>	0,05	0,05
FeSO <sub>4</sub>	0,04	0,04
Citrato de amônio	2	2
Tiamina	0,01	0,01
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	2
CaCO <sub>3</sub>	0,1	0,1
Piridoxal-5-Fosfato	0,05	0,05
Aminoácido	1	10
Púrpura de bromocresol	-	0,06
Ágar	-	20
pH	5,3	5,3

Os meios de cultura foram esterilizados por 15 minutos a 121 °C.

A partir do nono subcultivo, foram retirados 0,1 mL de cada tubo e inoculados em placa contendo o meio DCM sólido. Os cultivos foram feitos em duplicata e divididos em cinco grupos, com cada um dos quatro aminoácidos e o controle sem adição de aminoácidos. As placas

foram incubadas por 10 dias a 30 °C. O resultado positivo para a reação de descarboxilação é observado por mudança de cor ao redor das colônias. O meio contém o indicador púrpura de bromocresol, que apresenta coloração amarelada em pH ácido e muda para roxo em resposta a produção das aminas biogênicas, que são mais alcalinas do que os aminoácidos inicialmente incluídos no meio. A tirosina apresenta baixa solubilidade, deixando o meio com aspecto turvo e granuloso, em comparação com os demais que ficaram transparentes. A produção de tiramina é observada então pela formação de um halo mais límpido ao redor da colônia, e não pela mudança de cor.

#### **4.4. Perfil genotípico**

##### **4.4.1. Extração do DNA**

Existem diversos métodos descritos na literatura para a extração do DNA das BAL isoladas de vinho. Alguns autores relataram a utilização de diferentes *kits* comerciais, seguindo os protocolos de cada fabricante (DELAHERCHE *et al.*, 2004; PINZANI *et al.*, 2004; NEELEY *et al.*, 2005; PRAMATEFTAKI *et al.*, 2012; PETRI *et al.*, 2013), mas geralmente o uso de *kits* envolve custos maiores. Em outros estudos utilizaram-se métodos mais tradicionais para extração de DNA, baseados na purificação pela aplicação sucessiva de solventes como fenol, clorofórmio, álcool isoamílico, isopropanol e etanol, em diferentes concentrações e combinações (REGUANT e BORDONS, 2003; CAPPELLO *et al.*, 2008; VIGENTINI *et al.*, 2009; BORNEMAN *et al.*, 2012). Em nosso laboratório, geralmente se utiliza o método da lise térmica (HAGEN *et al.*, 2002) para extrair o DNA de colônias de bactérias em placas. Entretanto, como o crescimento das BAL mostrou-se muito lento nas placas e as colônias formadas eram muito pequenas, decidiu-se testar também o método do clorofórmio:álcool isoamílico (AUSUBEL *et al.*, 1992) para extrair o DNA a partir de culturas dos isolados em meio líquido, a fim de verificar qual dos dois protocolos era o mais adequado às necessidades do projeto.

O método de lise térmica é mais simples e rápido. Numa primeira etapa, uma colônia bacteriana foi transferida da placa com auxílio de alça bacteriológica para um microtubo de 0,2 mL contendo 100 µL de água ultrapura. Em seguida o tubo foi aquecido a 100 °C por 5 minutos e centrifugado a 13.000 x g (Centrífuga SL-2000, spinlab) por 3

minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo microtubo de 0,2 mL e armazenado em congelador a -20 °C.

O protocolo da extração com clorofórmio:álcool isoamílico é mais complexo e demorado, mas geralmente resulta em DNA mais puro e de melhor qualidade. A primeira etapa envolve a lise das células, que foram coletadas de tubos com meio líquido ao invés de placas. Com uso de micropipetador, 1 mL do cultivo líquido foi transferido para microtubo de 1,5 mL e centrifugado por 15 minutos a 9.660 x g (Centrífuga MiniSpin®, eppendorf). Formou-se um *pellet* com as células no fundo do tubo e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se ao tubo 200 µL do tampão de lise e o *pellet* foi macerado com uso de pistilo, e mais 400 µL do tampão foram adicionados. O tampão de lise era composto de 2% de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), 1,4 mol/L de cloreto de sódio, 20 mmol/L de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e 100 mmol/L de Tris em pH 8,0. Para evitar a ação de DNases, preparou-se o tampão em pH 8,0, acima da faixa de atividade dessas enzimas, e aplicou-se EDTA para quelar alguns cátions divalentes que atuam como cofatores.

A fim de proteger o DNA da oxidação, adicionou-se ainda ao tubo 1,2 µL de β-mercaptoetanol, dentro de capela de exaustão (ROMANO e BRASILEIRO, 1999; JARA *et al.*, 2008; MAMLOUK *et al.*, 2011). Misturou-se gentilmente e o tubo foi deixado no congelador até o congelamento completo, sendo em seguida deixado por 5 minutos em banho-maria a 65 °C. Esse ciclo de congelamento/aquecimento foi repetido mais uma vez. Em seguida o microtubo foi deixado a 65 °C por 60 minutos.

A separação das proteínas ocorreu por extração com mistura de álcool isoamílico e clorofórmio. Um volume de 600 µL com mistura de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 24:1 foi adicionado em cada tubo, que foi misturado por inversão durante 5 minutos e centrifugado por 15 minutos a 9.660 x g (Centrífuga MiniSpin®, Eppendorf). Formaram-se duas fases distintas, das quais a fase superior aquosa (acima da interface branca) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Mediu-se o volume transferido e adicionou-se a mesma quantidade de isopropanol gelado para precipitação do DNA. O tubo foi homogeneizado por inversão e deixado no congelador a -20 °C por 24 horas. No dia seguinte, o tubo foi retirado do congelador e centrifugado a 9.660 x g por 5 minutos, após o qual se formou um *pellet* no fundo do tubo e o sobrenadante foi descartado. Para a lavagem, adicionaram-se 500 µL de etanol 70% (v/v) gelado e o tubo foi invertido algumas vezes

para homogeneização. Centrifugou-se novamente por 5 minutos a 9.660 x g e o sobrenadante foi descartado. A secagem foi feita deixando-se os microtubos abertos por 20 minutos, de cabeça para baixo sobre papel-toalha, dentro da capela de fluxo laminar. Por fim, o *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de água ultrapura e armazenado em congelador a -20 °C.

#### 4.4.2. Amplificação do gene rDNA 16S

Para as etapas posteriores de tratamento com enzimas de restrição, foi realizada amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do ribossomo. Inicialmente foi feita a comparação entre a amplificação do DNA extraído por cada um dos dois métodos explicados anteriormente, a fim de decidir qual o melhor deles e também otimizar a concentração de DNA a ser utilizado na reação de PCR.

A amplificação foi feita com a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando-se os iniciadores 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1541R (5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 3') (DUHAMEL *et al.*, 2002). No microtubo para realização da reação foram adicionados 1 µL do DNA genômico, 2,5 µL (1x) do tampão específico para as condições da enzima polimerase, 0,75 µL (3 mmol/L) do cloreto de magnésio, também necessário à atividade enzimática, 2,5 µL (0,2 mmol/L) da mistura de desoxinucleotídeos (dNTPs), 1 µL (5 pmol) de cada um dos dois iniciadores, 0,25 µL (1 U) da Taq DNA Polimerase (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 16 µL de água ultrapura, para completar 25 µL no volume final. Os microtubos foram posicionados no termociclador (Mastercycler® Personal, Eppendorf) e as condições de amplificação foram: 3 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 90 segundos a 72 °C, e extensão final por 7 minutos a 72 °C (ARMAS, 2011).

A fim de comparar os dois métodos de extração, primeiramente foi feita a amplificação com 1 µL de DNA dos isolados R15, R26 e R31, escolhidos de forma aleatória para esse teste. O DNA dos dois primeiros foi extraído por ambos os métodos e do R31 apenas pelo método do clorofórmio:álcool isoamílico. Na reação de amplificação também foi preparado um controle negativo, no qual se adicionou água ao tubo no lugar do DNA, de modo a verificar se havia alguma contaminação nos reagentes da PCR. A partir dos resultados dessa primeira amplificação, fez-se uma nova reação com as mesmas amostras, mas com

concentrações diferentes do DNA. Para o material obtido a partir do método clorofórmio:álcool isoamílico, foi feita a reação com 1  $\mu\text{L}$  do DNA diluído 10x em água ultrapura e com 3  $\mu\text{L}$  do DNA sem diluição, a fim de verificar se a concentração ou diluição do DNA melhoraria a qualidade da amplificação. Para as amostras da lise térmica, optou-se por testar apenas maiores quantidades de DNA, e a amplificação foi realizada utilizando-se 3 e 5  $\mu\text{L}$  do DNA sem diluir.

Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados em gel de eletroforese. Preparou-se o gel a 1% de agarose, dissolvendo-se 0,5 g da agarose em 50 mL do tampão TAE 1x (50 mmol/L de Tris-HCl pH 8,8; 50 mmol/L de ácido acético glacial; 25 mmol/L de EDTA) em frasco Erlenmeyer. A mistura foi aquecida no aparelho de micro-ondas até completa dissolução da agarose e posteriormente resfriada com água corrente, antes de ser vertida na cuba de eletroforese (Scie-Plas) até a solidificação. Para aplicação do produto de PCR, primeiramente foi preparada uma mistura contendo 4  $\mu\text{L}$  do DNA, 2  $\mu\text{L}$  do tampão de carregamento e 2  $\mu\text{L}$  do corante SYBR Green<sup>®</sup>. Os 8  $\mu\text{L}$  foram aplicados no gel, a cuba foi preenchida com tampão TAE 1x e o processo de eletroforese foi conduzido por 30-50 minutos em condições de 80 V, 160 mA e 18 W (Consort EV-222, Cleaver Scientific Ltd). Para comparar o tamanho do produto amplificado formado em cada reação, em um dos poços nos géis foi aplicado um marcador de peso molecular. Na comparação entre os métodos de extração, foi utilizado o marcador Low DNA Mass Ladder (Life Technologies, New York, EUA) e na análise de 16S-ARDRA empregou-se o 100 bp DNA Ladder (Promega, California, EUA). Ao fim do processo, o gel foi visualizado em um transiluminador UV (Illuminator, Kasvi), onde se puderam notar as bandas de DNA corado.

#### **4.4.3. Diferenciação celular por 16S-ARDRA**

A técnica de 16S-ARDRA (Análise de restrição de DNA 16S-ribossômico amplificado) foi utilizada como ferramenta para diferenciar entre os isolados bacterianos, seguindo os procedimentos adotados por Rodas e colaboradores (2003). Para isso, os produtos de amplificação do gene rDNA 16S foram submetidos à digestão com enzimas de restrição. Foram adicionados em microtubo de 0,2 mL: 10  $\mu\text{L}$  do DNA amplificado; 2  $\mu\text{L}$  do tampão específico de cada enzima; 1  $\mu\text{L}$  da enzima e completou-se com 17  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Os tubos foram

deixados *overnight* a 37 °C. Foram feitos tratamentos com cinco enzimas de restrição diferentes: HindIII (isolada de *Haemophilus influenzae*, sequência de reconhecimento A\_/AGCTT, produz extremidades coesivas); AluI (*Arthrobacter luteus*, AG/CT, extremidades cegas); RSA (*Rhodopseudomonas sphaeroides*, GT/AC, extremidades cegas); PVUI (*Proteus vulgaris*, CGAT/\_CG, extremidades coesivas) e HaeIII (*Haemophilus aegyptius*, GG/C, extremidades cegas). Os fragmentos de restrição foram analisados em gel de agarose a 1,5% com duração de 90 minutos, visualizados em transiluminador UV (Illuminator, Kasvi) e digitalizados em fotodocumentador (ChemiDoc MP, Bio-Rad). A comparação entre as bandas formadas na restrição de cada um dos isolados para as cinco enzimas foi feita com auxílio do programa GelComparII (Applied Maths).

## 4.5. Produção de Inóculo

### 4.5.1. Definição do meio de cultura

Para aplicação dos isolados bacterianos na etapa de microvinificação, foi necessário obter uma grande quantidade de células em meio líquido. Para a produção desses inóculos, testaram-se seis meios de cultura descritos na literatura, visando selecionar aquele que promovesse o crescimento com maior velocidade, além de estimular a atividade maloláctica das células. Para o teste desses meios foi utilizado apenas o isolado C2.

Os meios testados foram os seguintes: MRS, MLO (CASPRITZ e RADLER, 1983), MZL (ZHANG e LOVITT, 2005), MZLm (adaptado de ZHANG e LOVITT, 2005), ML (KRIEGER, 1992) e M25/25 (HENICK-KLING e KRIEGER, 2001). A composição dos meios está apresentada na Tabela 3.

O procedimento de esterilização adotado foi a autoclavagem por 15 minutos a 121 °C. Algumas colônias foram transferidas das placas para tubos contendo caldo MRS, e após 5 dias de crescimento foi feita a inoculação a 1% (v/v) para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de cada um dos meios de cultura. Os frascos foram incubados em agitador tipo *shaker* a 28 °C e agitação de 125 rpm (Incubadora TE-421, Tecnal Equipamentos para Laboratórios). Os cultivos foram feitos em triplicata, e preparou-se também um frasco não inoculado para cada um dos meios testados, a fim de acompanhar o crescimento pela

absorbância medida em espectrofotômetro (BEL Photonics 1105) em comprimento de onda 660 nm. As amostragens foram feitas durante 6 dias a cada 12 ou 24 horas, com retirada de alíquotas de 4 mL.

Tabela 3 - Composição (em g/L) dos meios de cultura para produção dos inóculos.

<b>Componente</b>	<b>MRS</b>	<b>MLO</b>	<b>MZL</b>	<b>MZLm</b>	<b>ML</b>	<b>M25/25</b>
Glucose	20	10	5	5	10	25
Frutose	-	5	5	5	10	25
L-Ácido málico	-	-	-	-	2	2
Extrato de levedura	4	5	5	0,5	4	4
Extrato de carne	8	-	-	0,5	4	8
Peptona	10	-	-	0,5	10	10
Triptona	-	10	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub>	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,39
MnSO <sub>4</sub>	0,05	0,05	0,01	0,01	0,05	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	-	-	-	5	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	5	5	-	5
Citrato de amônio	2	3,5	-	-	-	-
Cloreto de amônio	-	-	2	2	-	-
Acetato de sódio	5	-	-	-	-	-
Tween 80 <sup>®</sup>	1	1	-	-	1	-
Cisteína	0,5	0,5	-	-	-	-
Suco de tomate	100	100	-	-	-	-
pH	5,0	4,8	4,5	4,5	4,5	4,5

#### 4.5.2. Cinética de crescimento celular

Com o meio de cultura definido com base no crescimento do isolado C2, foi realizado um estudo prévio da cinética de crescimento dos demais isolados que seriam utilizados nos testes de microvinificação, pois o momento no qual as células são coletadas é bastante importante para o sucesso posterior da FML.

Da mesma forma feita anteriormente, retirou-se 1 mL de um cultivo líquido em tubos de ensaio e inoculou-se em 100 mL de meio de cultura em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. O ensaio foi realizado em triplicata, e a incubação foi feita em agitador tipo *shaker* a 28 °C e agitação de 125 rpm (Incubadora TE-421, Tecnal). Amostras foram

coletadas a cada 24 horas para medição da densidade óptica em comprimento de onda 660 nm no espectrofotômetro (BEL Photonics 1105).

A partir da conversão dos valores de densidade óptica em logaritmos naturais, plotou-se um gráfico em função do tempo (h). A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foi obtida pela determinação do coeficiente angular da regressão linear com melhor ajuste dos dados, que representa a fase exponencial de crescimento do microrganismo (DORAN, 1995). Foi calculado o valor de  $\mu_{\text{máx}}$  para o crescimento do isolado C2 nos seis diferentes meios de cultura do teste anterior e nesse ensaio da cinética de crescimento celular.

#### 4.5.3. Produção e acondicionamento dos inóculos

Definidos o meio de cultura e o tempo de crescimento para cada bactéria, a próxima etapa foi a produção dos inóculos propriamente ditos. Para esses primeiros testes visando a seleção da melhor bactéria, optou-se por produzir o inóculo na forma líquida. Foi feito um aumento sucessivo de escala, em que, primeiramente, colônias foram transferidas das placas para tubos com 10 mL de meio. Após alguns dias de crescimento, as células foram passadas para frascos de Erlenmeyer com 100 mL e em seguida 200 mL do meio selecionado, sempre com incubação a 28-30 °C e agitação de 125 rpm (Incubadora TE-421, Tecnal).

A biomassa bacteriana obtida foi separada e concentrada em solução tampão. O objetivo desse procedimento foi tanto para evitar o efeito dos componentes do meio de cultura nas características organolépticas do vinho, quanto para que as bactérias fossem obrigadas a se desenvolver apenas com os nutrientes presentes no vinho. O protocolo foi adaptado de um método de preparação de culturas *starter* descrito por Semon e colaboradores (2001). Os cultivos em meio líquido foram separados em frascos esterilizados de 50 mL e centrifugados por 25 minutos a 2.000 x g (3.850 rpm) (Centrífuga NT 820, Novatecnica). Após o descarte do sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes com solução de tampão fosfato (50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), centrifugando por 15 minutos a 2.000 x g (3.850 rpm) (Centrífuga NT 820, Novatecnica). A biomassa foi então ressuspensa no tampão fosfato e armazenada em refrigeração até o momento da inoculação.

## 4.6. Microvinificações

Os vinhos foram elaborados em pequena escala e foram realizadas duas microvinificações de 18 kg para duas variedades de uva (Cabernet Sauvignon e Merlot) cultivadas na região e provenientes de um único vinhedo, colhidas em 2014.

Inicialmente, as bagas da uva, que estavam mantidas a 5 °C, foram separadas da ráquis no desengaçador. A seguir, as bagas inteiras foram colocadas em recipientes de aço inoxidável de 40 L, munidos com válvula de Müller, onde foi adicionado dióxido de enxofre, na quantidade de 40 mg/L, sob a forma de metabissulfito de potássio. Sequencialmente, o mosto foi submetido a uma maceração pré-fermentativa a frio durante 15 horas, com o objetivo de elevar naturalmente a temperatura até 20 °C. Após este período, foram adicionadas leveduras secas ativas (*Saccharomyces cerevisiae*) para uma concentração final de 0,20 g/L de mosto e o nutriente para leveduras Fermaid K (Lallemand, Canadá) na dosagem de 0,15 g/L. As leveduras utilizadas foram diferentes para as duas variedades de uva. No Merlot adicionou-se o produto Lalvin QD 145 (selecionadas na região do Dão, Portugal) e para o Cabernet Sauvignon foi utilizado Lalvin ICV D 254 (selecionadas em Côtes de Rhône, França), ambos produzidos pela Lallemand.

O tempo de maceração fermentativa foi de dez dias, com duas remontagens diárias. A fermentação alcoólica foi realizada em ambiente com temperatura controlada por meio de um sistema automatizado, mantendo a temperatura entre 23 °C a 25 °C. Concluída a fermentação alcoólica, foi feita a descuba (separação entre o meio sólido e líquido) e os vinhos acondicionados em garrafões com capacidade para 10 litros, plenamente atestados e munidos com válvulas de Müller para aguardar o início da segunda fase do experimento.

### 4.6.1. Ativação dos inóculos

Os inóculos na forma líquida em tampão fosfato foram ativados seguindo-se instruções do manual publicado pela Lallemand, referência no fornecimento de insumos para a indústria de vinhos. Segundo esse manual, as preparações líquidas devem ser empregadas logo após a abertura dos frascos e podem permanecer até dois dias mantidas a temperatura ambiente entre a produção e a inoculação. No caso do

inóculo líquido, é necessária uma etapa de aclimação e pré-ativação das bactérias a fim de aumentar a viabilidade. A cultura preparada em tampão fosfato foi adicionada a uma taxa de 10% (v/v) em uma mistura contendo 50% (v/v) de um vinho finalizado, da mesma variedade de uva, 25% (v/v) de água destilada e 25% (v/v) de suco de maçã. O pH foi ajustado para 3,5 e o meio mantido a 22 °C por 24 horas (SPECHT, 2005). Para o tratamento controle (sem inoculação) foi preparada a mesma mistura para ser adicionada ao vinho, mas com adição de tampão fosfato esterilizado ao invés do cultivo bacteriano. No dia seguinte, os inóculos aclimatados foram adicionados a uma taxa de 5% (v/v) às garrafas contendo o vinho, seguindo os tratamentos definidos para a fermentação maloláctica.

#### **4.6.2. Fermentação maloláctica**

Foram realizados exatamente os mesmos procedimentos para os vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot. Distribuíram-se os 20 litros de vinho em garrafas de vidro de 750 mL esterilizadas e aplicaram-se cinco tratamentos para o estudo da etapa de fermentação maloláctica. Foram inoculadas separadamente duas bactérias isoladas das borras obtidas neste trabalho e a bactéria C2. Em outro tratamento testou-se a interação entre os dois isolados, e também foi preparado o tratamento controle. Foram utilizadas quatro repetições (garrafas) para cada um dos tratamentos. Após a inoculação das bactérias, as garrafas foram fechadas com rolhas de silicone e mantidas em incubadora biológica a 20 °C, durante o tempo necessário para conclusão da FML. Quando se verificou que a fermentação estava concluída, foi feita novamente a adição de metabissulfito de potássio ao vinho, em quantidades suficientes para um teor final de 35 mg/L de SO<sub>2</sub> livre, e as garrafas foram armazenadas a 15 °C, até a conclusão de todas as análises.

#### **4.6.3. Cromatografia em Papel**

A fim de acompanhar a evolução da fermentação maloláctica, a técnica mais simples, e que possibilita aos vinicultores verificarem de forma qualitativa a ocorrência da fermentação maloláctica antes do engarrafamento, é a cromatografia em papel. Essa técnica é baseada na separação de alguns dos ácidos orgânicos presentes no vinho e a

visualização da conversão do ácido málico em ácido láctico (DAUDT, 1971).

Para realizar o chamado método de Kunkee (1968), utilizou-se o papel Whatman n°1, cortado em tiras retangulares de 25,5 cm de comprimento. Foi traçada uma linha a uma altura de 3 cm da borda inferior do papel. A amostra de vinho foi transferida para o ponto de partida sobre essa linha em um volume de aproximadamente 10 µL. A mancha da amostra no papel foi seca com auxílio de uma pistola de ar quente. O papel foi fixado pela extremidade superior na tampa da cuba de cromatografia já com o solvente. A base inferior do papel ficou em contato com o solvente, que se deslocou por capilaridade em direção à extremidade superior. O solvente foi preparado com 50 mL de água destilada, 100 mL de n-butanol, 50 mL de ácido acético e 0,1 g do indicador azul de bromofenol a 1% (m/v). Após 6-8 horas, o papel foi retirado da cuba e deixado em contato com ar à temperatura ambiente *overnight* para secagem.

No dia seguinte, o fundo do papel seco ficou com coloração azul e foi possível visualizar as manchas amareladas correspondentes a três dos principais ácidos orgânicos presentes no vinho: tartárico, málico e láctico. Foram utilizadas soluções-padrão do ácido málico, a fim de comparar a altura da mancha no cromatograma contendo essa solução-padrão e no cromatograma contendo a amostra. O ácido tartárico está presente na mancha mais inferior, enquanto o ácido láctico corresponde à mancha mais próxima da extremidade superior e o ácido málico representa a mancha do meio. A evolução da FML foi acompanhada pelo desaparecimento da mancha do ácido málico e aumento na intensidade da mancha correspondente ao ácido láctico. Essa análise foi realizada semanalmente com todas as garrafas de vinho, tanto Cabernet Sauvignon quanto Merlot, até a verificação de que a FML estava concluída. Essa é uma análise qualitativa, na qual o desaparecimento da mancha do ácido málico dá a certeza de que a FML foi finalizada.

#### **4.6.4. Análises Físico-Químicas**

As análises físico-químicas foram realizadas nos vinhos obtidos a partir da etapa de microvinificação imediatamente antes da inoculação com as bactérias e após o final da FML. O laudo analítico foi obtido para as amostras de todos os tratamentos testados na inoculação de bactérias, utilizando três repetições de cada. Todos os procedimentos têm como referência o Manual de Métodos de Análises de Bebidas e

Vinagres do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1986).

A primeira análise realizada foi a determinação de Anidrido Sulfuroso Livre, Combinado e Total, pelo Método Rakini. Esse método consiste na aspiração do SO<sub>2</sub> livre e combinado presente na amostra e reação com peróxido de hidrogênio, após a qual o ácido sulfúrico formado é titulado com hidróxido de sódio. A Acidez Total Titulável foi medida pela neutralização dos ácidos tituláveis da amostra com solução de hidróxido de sódio. A Acidez Volátil foi determinada pela titulação também com hidróxido de sódio do destilado obtido a partir do aquecimento da amostra no aparelho de Cazenave-Ferré, onde aconteceu a separação dos ácidos voláteis do restante da amostra.

O pH dos vinhos foi medido diretamente com pHmetro (Quimis Q400 AS) e a densidade relativa com densímetro (Alla Brasil 4949-07). Mediu-se o Grau Alcoólico Real por densimetria através de alcoômetro (Incoterm 5529), após a destilação do vinho previamente alcalinizado. A análise dos Açúcares Redutores foi feita pelo Método de Fehling, para quantificar os açúcares que restaram no vinho após as fermentações. O vinho foi previamente descolorido e utilizado para titular uma mistura dos reagentes Fehling A, Fehling B e água destilada sob aquecimento. O Índice de Polifenóis Totais foi medido por absorvância da luz em comprimento de onda 760 nm, após a reação fenólica com reagente Folin-Ciocalteu. A medição do Índice de Cor Total também foi feita por absorvância da luz em espectrofotômetro (Biospectro SP22), nos comprimentos de onda 420, 520 e 620 nm.

#### **4.6.5. Análises Sensoriais**

Para a análise sensorial estavam presentes três degustadores com ampla experiência na avaliação de vinhos, além do próprio autor desse trabalho de mestrado, todos devidamente treinados quanto aos critérios de avaliação. Foram avaliados atributos visuais, do olfato e do gosto, através da ficha oficial de degustação adotada pela Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), que encontra-se no Anexo A. Os parâmetros avaliados foram a limpidez e aspecto visual; intensidade, nitidez e qualidade olfativa; intensidade, nitidez, qualidade e persistência do gosto e o aspecto global.

A análise sensorial foi realizada em sala com boa iluminação e temperatura ambiente. As amostras de três replicatas de cada um dos tratamentos de inoculação nos vinhos Cabernet Sauvignon (R31, R34,

R31+R34, C2 e testemunha sem inoculação) foram servidas em taças de cristal de 250 mL, distribuídas em ordem aleatória e identificadas apenas com uma numeração simples.

#### **4.7. Análises Estatísticas**

Foi feita análise estatística dos dados relacionados ao experimento de crescimento dos 30 isolados bacterianos no meio ML e dos resultados das análises físico-químicas e sensoriais dos vinhos obtidos com a inoculação de bactérias. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software livre R-Project (R Core Team, 2013). As médias dos valores das replicatas de cada parâmetro foram separadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para o teste de crescimento dos isolados e pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para o laudo físico-químico. Nos testes de seleção do meio de cultivo para produção dos inóculos e cinética de crescimento foi feita a análise de regressão linear utilizando-se o software Microsoft Excel. Para os dados da análise sensorial foi realizada a análise multivariada de componentes principais (PCA), utilizando o software Statistica 7.0.



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Bactérias ácido lácticas isoladas das borras de vinho**

Todas as colônias bacterianas que cresceram nas placas de isolamento apresentaram aspecto semelhante, tanto macroscopicamente quanto na observação microscópica. Apenas a partir da borra mantida em temperatura ambiente ocorreu crescimento de leveduras. Nas placas estriadas com amostras das borras refrigerada e liofilizada cresceram apenas bactérias, enquanto as da borra congelada não houve formação de nenhum tipo de colônia. A formação das colônias de bactérias foi lenta, aparecendo a partir do quinto dia de incubação e necessitando de até 14 dias para obterem-se colônias maiores. Foi selecionada pelo menos uma colônia de cada placa para ser submetida a novas inoculações a fim de obter as culturas puras. Após sucessivas passagens para placas novas foram obtidos 30 isolados bacterianos, nomeados com os códigos R4, R6, R7, R8, R11, R15, R16, R17, R21, R23 e R25 a R44.

As formas diferentes de acondicionamento das borras foram para aumentar as chances de manter vivas as bactérias responsáveis pela excelente FML ocorrida no vinho de uma das vinícolas de São Joaquim em 2012. Entretanto, a baixa diversidade morfológica observada, além de confirmar o ambiente restritivo do vinho, e do próprio meio de cultura, pode significar que a maioria dos trinta isolados possa ser o mesmo indivíduo. Essa constatação, se por um lado aumenta o risco de não se conseguir isolar as bactérias responsáveis pela FML ocorrida no vinho de 2012, por outro, indica que o processo de fermentação possa ter sido apenas realizado por uma espécie microbiana, e não um grupo. Isso torna o processo de produção e aplicação posterior do inóculo mais fácil de ser realizado, quando em escala comercial.

### **5.2. Caracterização dos isolados**

#### **5.2.1. Morfologia das colônias**

Tanto as colônias observadas nas placas do primeiro estriamento quanto das consideradas isoladas apresentaram características morfológicas semelhantes, não deixando de ser coerente com o esperado de bactérias lácticas. Todos apresentaram cor branca, forma circular puntiforme, bordos e superfície lisos, consistência cremosa, aparência

brilhante. Quanto à elevação, algumas colônias eram um pouco mais convexas que outras, mas a diferença foi pequena. Em relação ao tamanho, houve alguns isolados com colônias maiores do que outras, mas todas elas podem se encaixar na descrição de puntiformes. A Figura 3 mostra um exemplo das colônias formadas pelos isolados bacterianos.



Figura 3 - Colônias em ágar MRS de um dos isolados bacterianos das borras de vinho.

### 5.2.2. Morfologia celular

Conforme esperado para bactérias lácticas, todos os isolados apresentaram coloração roxa após a reação de Gram e foram classificados como Gram positivos. O tamanho e o arranjo das células também foram semelhantes para todos, com presença de pequenos cocos arranjados em cadeias, descrição característica para *Oenococcus oeni*, a bactéria mais comumente encontrada no vinho. Na Figura 4 pode-se observar a microscopia de um dos isolados, e que é representativa dos demais.



Figura 4 - Microscopia de um isolado bacteriano obtido em borra de vinho, após coloração de Gram.

### 5.2.3. Produção de catalase

Confirmando outra característica típica de bactérias lácticas, o resultado para produção de catalase foi negativo para todos os isolados. Na Figura 5 pode-se observar a comparação do resultado do controle positivo (*Escherichia coli*), com formação de bolhas de gás, e do resultado negativo de um dos trinta isolados.



Figura 5 - Comparação entre a reação da catalase com o controle (esquerda) e um dos isolados bacterianos de borra de vinho (direita).

### 5.2.4. Crescimento em meio líquido

Com relação ao crescimento em meio líquido foi possível observar diferenças entre os isolados (Figura 6).

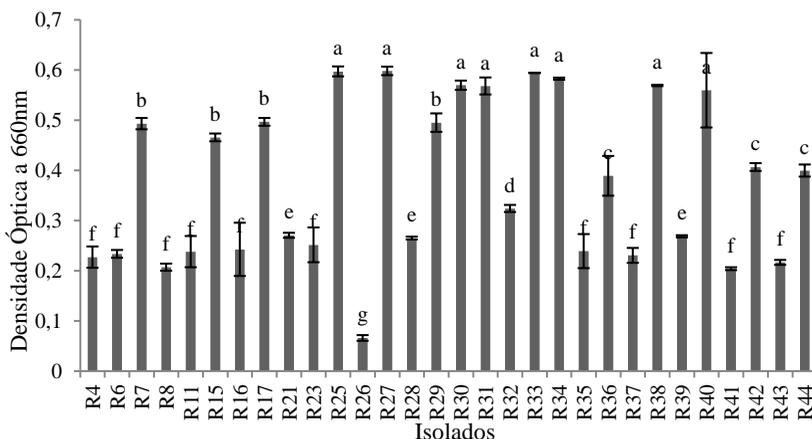


Figura 6 - Crescimento dos 30 isolados bacterianos de borra de vinho no meio ML, após 7 dias de cultivo. Os resultados são a média de duas repetições e as barras representam o desvio padrão. As letras iguais indicam valores que não diferem entre si significativamente pelo teste de Scott Knott ( $p < 0,05$ ).

Como podem ser observados na Figura 6, todos os isolados foram capazes de crescer no meio líquido selecionado para a produção dos inóculos (meio ML), mas alguns tiveram uma maior produção de biomassa durante a incubação, conforme os valores da densidade óptica a 660 nm após 7 dias. Embora o principal objetivo tenha sido verificar se os isolados cresciam de fato nesse meio, também se verificou que os isolados R25, R27, R30, R31, R33, R34, R38 e R40 tiveram um crescimento semelhante e maior do que os demais microrganismos. O isolado R26 apresentou crescimento significativamente menor do que todos os outros. Apesar de terem sido formados 7 grupos distintos pelos resultados do crescimento no meio líquido, as características morfológicas e fisiológicas são pouco eficazes na diferenciação entre as BAL, e por isso foram realizados os testes de genotipagem.

### 5.2.5. Produção de aminas biogênicas

Diferentemente dos testes anteriores, o *screening* da produção de aminas biogênicas foi feito apenas com os isolados selecionados para os testes de microvinificação, que foram R31, R34 e C2, conforme explicado adiante na seção 5.3.2. Após 10 dias de incubação nos meios contendo os diferentes aminoácidos, as placas foram observadas na lupa estereoscópica a fim de verificar a mudança de coloração ao redor das colônias, em resposta à produção das aminas biogênicas. O isolado R31 foi capaz de crescer nas placas contendo ornitina, histidina e lisina, mas não conseguiu crescer na placa com tirosina; enquanto as bactérias C2 e R34 conseguiram crescer na presença dos quatro aminoácidos. Entretanto, os isolados R31 e R34 não produziram aminas biogênicas a partir desses aminoácidos, uma vez que não houve mudança da cor do meio ao redor das colônias. Toda a superfície das placas continuou com a mesma coloração amarelada do início do experimento. Para o isolado C2, observou-se mudança de cor apenas na formulação contendo a ornitina, o meio adquiriu tonalidade bastante roxa e diferente dos demais, que continuaram amarelados. Isso indica que houve produção de substâncias capazes de alcalinizar o meio e provavelmente trata-se da amina biogênica putrescina, produzida a partir da ornitina. Na Figura 7 está ilustrada uma imagem para cada isolado, mostrando o crescimento das colônias com e sem mudança na coloração do meio.

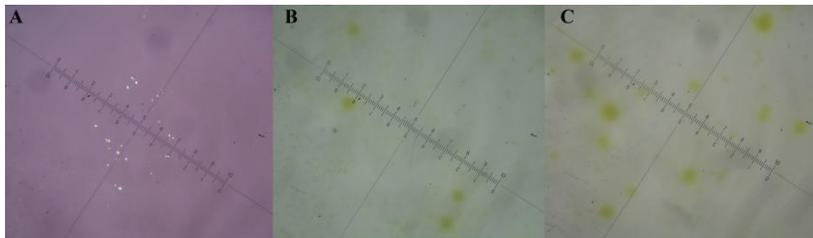


Figura 7 – (A) Crescimento de colônias da bactéria C2 no meio DCM contendo ornitina; (B) Crescimento de colônias da bactéria R31 no meio DCM contendo lisina; (C) Crescimento de colônias da bactéria R34 no meio DCM contendo ornitina.

No estudo feito por Bover-Cid e Holzapfel (1999), que aprimoraram o método qualitativo de detecção de produção de aminas biogênicas, uma série de espécies diferentes de BAL e enterobactérias foi testada. A atividade descarboxilase foi presente em algumas espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Entre os gêneros *Carnobacterium* e *Enterococcus*, todos os isolados testados tiveram resultado positivo para a produção de pelo menos uma das aminas biogênicas analisadas, enquanto para *Pediococcus*, *Weissella* e *Oenococcus* não houve nenhum isolado produtor. A amina biogênica mais presente foi a tiramina, produzida por 40% das BAL testadas nesse estudo. Pequenas quantidades de cadaverina, putrescina e histamina foram produzidas principalmente por espécies de *Lactobacillus*. É importante notar que o resultado negativo no *screening* em meio produzido em laboratório é um bom indicativo do comportamento geral das bactérias, mas não garante que quando crescendo no vinho elas também não produzam aminas biogênicas, já que as bebidas fermentadas são sistemas mais complexos e um grande número de fatores influenciam o crescimento e atividade microbiana (BOVER-CID e HOLZAPFEL, 1999).

Em outro estudo conduzido por Moreno-Arribas e colaboradores (2003), o potencial para produzir tiramina, histamina e putrescina foi investigado para várias espécies de BAL e algumas culturas maloláticas iniciadoras comerciais. Houve produção de tiramina por isolados de *Leuconostoc* e de putrescina por isolados de *Lactobacillus*, mas histamina não foi produzida por nenhum microrganismo testado. Para as espécies de *Oenococcus* e para as culturas comerciais não foi detectada produção de nenhuma das aminas analisadas. Eles concluíram, em concordância com outros autores, que a produção de aminas

biogênicas é dependente do isolado testado e não é específica da espécie.

Uma investigação mais ampla foi feita por Landete e colaboradores (2007), que analisaram a produção de aminas biogênicas (histamina, tiramina, feniletilamina, putrescina, cadaverina e triptamina) por isolados de BAL, bactérias acéticas e leveduras. Nenhuma das bactérias acéticas nem leveduras produziram nenhuma das aminas analisadas, enquanto as BAL foram capazes de produzir histamina, tiramina, feniletilamina e putrescina. Para o organismo de maior interesse no vinho, *Oenococcus oeni*, quase todos os isolados testados produziram histamina e apenas um produziu putrescina. Os autores concluíram que os níveis de histamina, tiramina e feniletilamina encontrados no vinho são devidos exclusivamente à ação das BAL, enquanto a presença de putrescina, cadaverina e triptamina não pode ser atribuída a nenhum grupo de microrganismos e possivelmente está relacionada com a composição das uvas.

Vinte e seis isolados de *Oenococcus oeni* foram testados em outro estudo para a capacidade de produzir aminas biogênicas seguindo o mesmo protocolo desenvolvido por Bover-Cid e Holzapfel (1999) que foi utilizado neste trabalho. Oito desses isolados produziram histamina e tiramina no meio sintético e alguns deles foram então inoculados em vinho, produzido com três leveduras *Saccharomyces cerevisiae* distintas. Apenas dois isolados produziram histamina e tiramina também no vinho. Os resultados permitiram aos autores concluir que a capacidade de produção de histamina e tiramina está relacionada com o isolado bacteriano e a composição do vinho, que por sua vez é dependente da levedura empregada e da extensão do contato entre a bactéria e levedura (ROSI *et al.*, 2009).

### 5.3. Perfil genotípico

#### 5.3.1. Amplificação do gene rDNA 16S

Pelos dois métodos de extração foi possível obter DNA de qualidade, conforme comprovado pela amplificação desse material. Entretanto, pelo método de extração com clorofórmio:álcool isoamílico foi obtido maior quantidade de DNA do que pelo método de lise térmica. Por isso, escolheu-se o primeiro para ser feito para todos os isolados, uma vez que é mais interessante ter amostras com maior concentração de DNA para a etapa de 16S-ARDRA.

Nas imagens a seguir estão mostrados os géis de eletroforese para a comparação das extrações, com bandas correspondentes a diferentes concentrações do DNA extraído pelos dois métodos. Na Figura 8 está o gel correspondente à primeira amplificação. No primeiro poço, da esquerda para a direita, foi colocado o controle negativo, no qual conforme esperado não houve amplificação e por isso não há bandas visíveis; nos três poços seguintes, tem-se o DNA dos isolados R15, R26 e R31 extraídos pelo método clorofórmio:álcool isoamílico, respectivamente. Houve uma boa amplificação dos dois primeiros, mas a reação de amplificação não foi bem-sucedida para o R31, possivelmente devido à concentração muito alta da amostra, em que não apenas o DNA, mas substâncias que podem inibir a reação de PCR estão em maior quantidade. No quinto poço está o DNA do R15 e no sexto poço do R26, extraídos pelo método da lise térmica. Não apareceu nenhuma banda correspondente ao DNA amplificado, e nesse caso possivelmente devido à quantidade insuficiente de DNA. No último poço está o marcador de peso molecular.

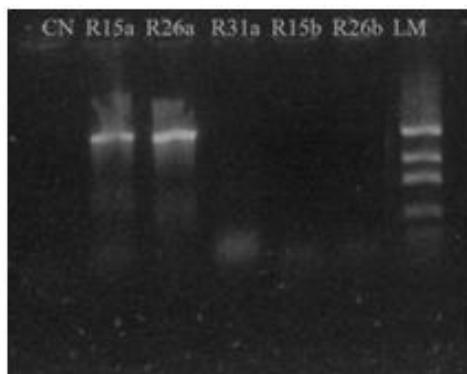


Figura 8 - Gel de eletroforese com o resultado da amplificação 8F-1541R de 1  $\mu$ L do DNA extraído por dois métodos. R15a, R26a e R31a foram extraídos pelo método do clorofórmio:álcool isoamílico; R15b e R26b foram extraídos pelo método da lise térmica. LM é o marcador de peso molecular e CN o controle negativo (água).

Em seguida foi feita uma nova amplificação, com concentrações diferentes do mesmo DNA aplicado na reação anterior. Quando há pouco DNA presente, não aparecem bandas de amplificação devido à falta de material, e quando há muito DNA na amostra, por outro lado, pode ocorrer inibição da reação de amplificação. A Figura 9 mostra o

gel de eletroforese resultante dessa nova amplificação onde a primeira coluna à esquerda é o marcador de peso molecular. Na sequência, estão a amplificação do DNA de R15 diluído, R15 concentrado, R26 diluído, R26 concentrado, R31 diluído e R31 concentrado, extraídos pelo método de clorofórmio:álcool isoamílico. Foi possível notar que para as três amostras de DNA, a diluição aperfeiçoou a reação de amplificação, uma vez que apareceram bandas bem nítidas e fortes, enquanto que para as reações com maior quantidade de DNA não ocorreu amplificação. Nas próximas quatro colunas estão as amplificações do DNA extraído pela lise térmica: R26 3  $\mu$ L, R26 5  $\mu$ L, R15 3  $\mu$ L e R15 5  $\mu$ L. Comprovou-se que na reação anterior não houve amplificação devido à falta de DNA, pois nas novas condições, com adição de maior quantidade da amostra, apareceram bandas relativas à amplificação, mais fortes quando foi adicionado 5  $\mu$ L do DNA do que com 3  $\mu$ L. No último poço ficou o controle negativo.

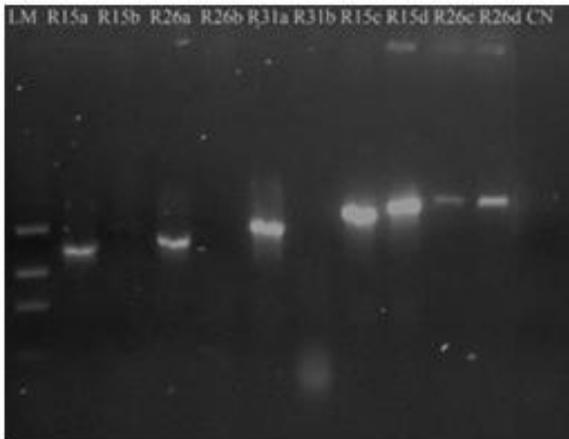


Figura 9 - Gel de eletroforese com o resultado da amplificação 8F-1541R do DNA extraído por dois métodos. R15a, R26a e R31a são amostras diluídas 10x de 1 $\mu$ L do DNA; R15b, R26b e R31b representam as reações de amplificação com 3  $\mu$ L do DNA, todos extraídos pelo método do clorofórmio:álcool isoamílico. R15c e R26c são os produtos da amplificação com 3  $\mu$ L do DNA, R15d e R26d da amplificação com 5  $\mu$ L, todos extraídos pelo método da lise térmica. LM é o marcador de peso molecular e CN o controle negativo (água).

Pelos resultados apresentados, conclui-se que através do método de clorofórmio:álcool isoamílico é possível extrair maior quantidade de

DNA, que é necessário para as análises posteriores, de modo que foi o método utilizado para todos os demais isolados. Ainda, alterou-se no protocolo de amplificação para a utilização de 1  $\mu$ L do DNA diluído 10x em água ultra-pura, pois resultou em bandas mais fortes e com menos rastros de corrida no gel para duas das amostras testadas (R15 e R26) e, em uma delas a reação apenas ocorreu quando o DNA foi diluído (R31).

Na Figura 10 estão ilustrados os géis de eletroforese resultantes da reação de amplificação para o DNA de outros 20 dos isolados bacterianos, utilizando essa metodologia aperfeiçoada. Eles demonstram que os protocolos de extração do DNA e amplificação do fragmento 16S rDNA foram realmente adequados aos isolados obtidos do vinho, pois resultaram em bandas de amplificação fortes, nítidas, na mesma faixa de tamanho e sem rastros de amplificações inespecíficas ou excesso de material.

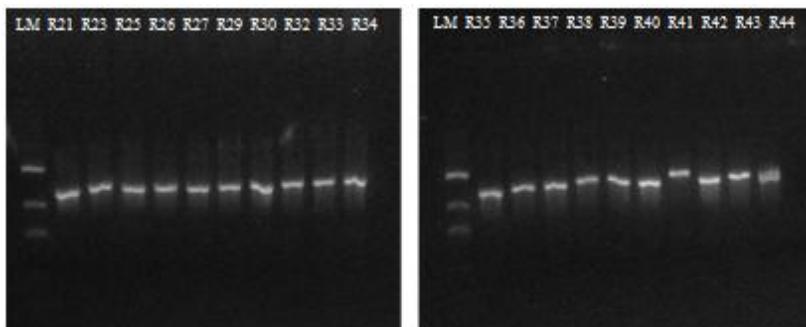


Figura 10 - Gel de eletroforese com o resultado da amplificação 8F-1541R de 1  $\mu$ L do DNA diluído 10x, extraído pelo método de clorofórmio:álcool isoamílico, para 20 dos 30 isolados bacterianos de borra de vinho. LM é o marcador de peso molecular.

### 5.3.2. Diferenciação celular por 16S-ARDRA

A análise dos géis de eletroforese com as amostras resultantes da digestão com as enzimas PVUI, HindIII e AluI do DNA amplificado mostrou um perfil semelhante para todas as bactérias isoladas. Com a PVUI, não houve fragmentação do DNA, formando-se apenas uma banda no gel para cada um dos isolados, todas na mesma altura e correspondendo ao tamanho do fragmento inteiro de DNA. Na restrição com as enzimas HindIII e AluI, elas encontraram apenas uma sequência

com o sítio específico no DNA e houve um corte único, que gerou exatamente os mesmos dois fragmentos para todos os isolados. Esses resultados não estão mostrados, pois não permitem fazer nenhum tipo de diferenciação entre os isolados, apenas comprovando que todos os isolados têm sequências muito parecidas de DNA.

A partir da análise dos fragmentos obtidos com as enzimas RSA e HaeIII foi possível dividir os isolados em três grupos. Analisando primeiramente a restrição com a RSA, pode-se observar na Figura 11 que houve corte em dois pontos da sequência de DNA de todos os isolados, com a formação de três fragmentos de tamanhos distintos. Os dois fragmentos maiores tem entre 400 e 500 pb, enquanto o fragmento menor está entre 300 e 400 pb. Com a utilização do programa GelComparII, dividiram-se os isolados em dois grupos, devido a pequenas diferenças no tamanho dos fragmentos. Todos os isolados possuem as mesmas sequências de reconhecimento da enzima em posições semelhantes dentro do gene codificador da subunidade 16S do ribossomo, mas possivelmente devido a adições ou deleções de alguns nucleotídeos nesse trecho do DNA ocorreu a diferença no tamanho dos fragmentos. Um grupo é formado pelos isolados R4, R6, R8, R11, R15, R17, R21, R23, R25, R26, R27, R28, R29, R30, R32, R33, R34, R35, R37, R39, R40, R42, R43, R44 e C2; o outro grupo tem o R7, R16, R31, R36, R38 e R41 (Figura 11).

Na restrição com a enzima HaeIII, novamente estavam presentes dois fragmentos do gene com a sequência específica de reconhecimento da enzima. Percebe-se na Figura 12 a formação também de três fragmentos de restrição para todos os isolados. O fragmento maior está compreendido na faixa entre 500 e 600 pb, enquanto os dois menores têm um tamanho aproximado de 300 pb. Provavelmente devido aos mesmos motivos citados anteriormente, houve formação de fragmentos menores para alguns dos isolados e eles foram novamente divididos em dois grupos pelo programa GelComparII. Em um dos grupos ficaram todos os mesmos membros do grupo maior definido pela enzima RSA, mais o R7 e R38. No outro grupo estão R16, R31, R36 e R41 (Figura 12).

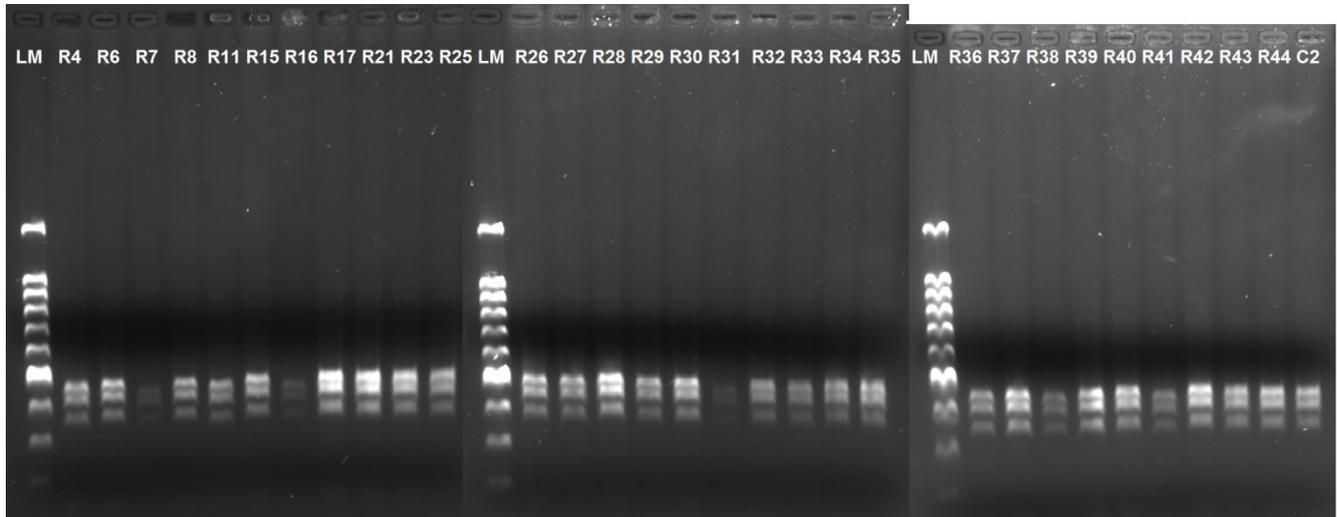


Figura 11 - Gel de eletroforese com o resultado da digestão com a enzima RSA do segmento 16S do gene rDNA amplificado do DNA dos isolados bacterianos de borra de vinho.

Grupo I: R4, R6, R8, R11, R15, R17, R21, R23, R25, R26, R27, R28, R29, R30, R32, R33, R34, R35, R37, R39, R40, R42, R43, R44, C2.

Grupo II: R7, R16, R31, R36, R38, R41.

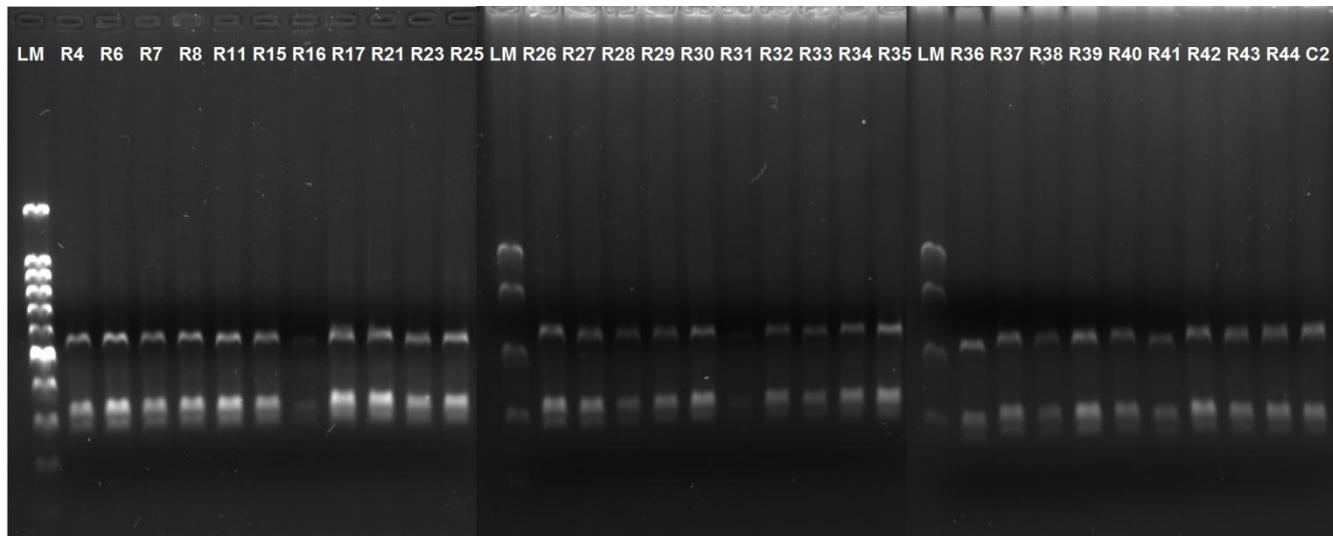


Figura 12 - Gel de eletroforese com o resultado da digestão com a enzima HaeIII do segmento 16 S do gene rDNA amplificado do DNA dos isolados bacterianos de borra de vinho.

Grupo I: R4, R6, R7, R8, R11, R15, R17, R21, R23, R25, R26, R27, R28, R29, R30, R32, R33, R34, R35, R37, R38, R39, R40, R42, R43, R44, C2.

Grupo II: R16, R31, R36, R41.

Levando em consideração as reações de restrição do segmento 16S do gene rDNA com as cinco diferentes enzimas de restrição, especialmente RSA e HaeIII, os isolados bacterianos foram divididos em três grupos. O primeiro grupo contém os isolados R4, R6, R8, R11, R15, R17, R21, R23, R25, R26, R27, R28, R29, R30, R32, R33, R34, R35, R37, R39, R40, R42, R43, R44 e C2. O segundo grupo está constituído por R16, R31, R36 e R41. Os isolados R7 e R38 formam um terceiro grupo, uma vez que na restrição com RSA ficaram junto ao segundo grupo e na restrição com HaeIII estavam no primeiro grupo. Para a etapa de microvinificação, optou-se por levar um representante de cada um dos dois primeiros grupos, juntamente com o isolado C2, que já havia sido utilizado em duas microvinificações com sucesso na FML, podendo ser considerado um controle positivo para o experimento. Como tecnicamente não há diferença entre os isolados pertencentes a um mesmo grupo, poder-se-ia escolher de forma aleatória as duas bactérias para a próxima etapa no vinho. Uma vez que os isolados R31 e R34 fazem parte do grupo com os maiores valores para a densidade óptica no ensaio de crescimento em meio líquido e pertencem aos diferentes grupos formados pela análise 16S-ARDRA, foram selecionados para a produção de inóculo e adição ao vinho.

No estudo desenvolvido por Rodas e colaboradores (2003), que foi a primeira descrição na literatura da utilização da técnica 16S-ARDRA para identificação de espécies de BAL isoladas do vinho, o método foi capaz de discriminar 32 das 36 espécies de referência testadas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Weissella*. Os autores utilizaram as enzimas MseI, BfaI e AluI e aplicaram a técnica para identificar 376 isolados de BAL provenientes de amostras de vinho. Eles concluíram que o protocolo descrito permite uma rápida e confiável identificação em nível de espécie da maioria das bactérias presentes no processo de vinificação, mas apresenta uma limitação quando os organismos apresentam uma grande homologia na sequência do rDNA 16S.

Em um trabalho desenvolvido com bactérias lácticas isoladas de vinícolas japonesas, Sato e colaboradores (2000) utilizaram a técnica de RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) do segmento rDNA 16S para tentar identificá-las. Entre as 12 espécies de referência utilizadas (dos gêneros *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*), *Oenococcus oeni* pôde ser diferenciada de todas as demais pelo perfil de restrição com a enzima HaeIII. Em seguida os autores realizaram novamente a restrição com HaeIII e com AccII para o DNA de 44 isolados de *O. oeni* isoladas de vinho tinto,

encontrando um perfil idêntico para todas elas. Eles concluíram então que os isolados de *O. oeni* não apresentam variação interespecífica e a técnica pode ser útil para distinguir esse microrganismo dos demais encontrados no vinho.

## 5.4. Produção de inóculo

### 5.4.1. Definição do meio de cultura

O resultado do crescimento do isolado C2, com base nas leituras de densidade óptica, nos seis diferentes meios de cultura ao longo de 6 dias está mostrado na Figura 13.

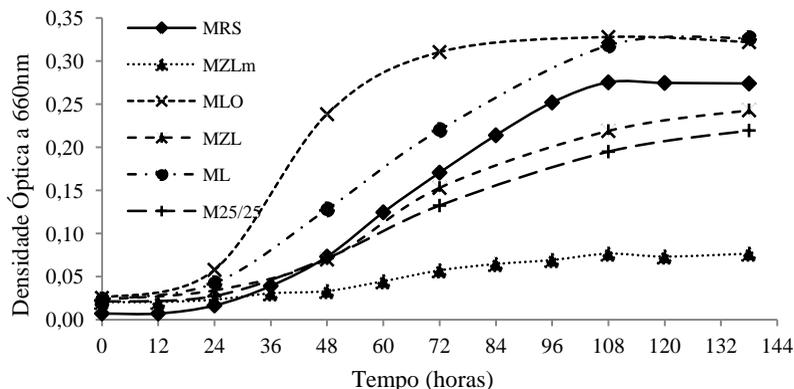


Figura 13 - Crescimento do isolado C2 em seis diferentes meios de cultura, em função do tempo de cultivo.

Com exceção do meio MZLm, todos os demais forneceram as condições necessárias para o crescimento satisfatório da bactéria. Após os 6 dias de crescimento, as formulações MLO e ML foram as que propiciaram a maior quantidade final de biomassa produzida, apesar de no meio ML ter sido necessário um dia a mais para alcançar tal valor. As velocidades máximas específicas de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) foram: 0,048  $h^{-1}$  no meio MRS; 0,023  $h^{-1}$  no MZLm; 0,059  $h^{-1}$  no MLO; 0,033  $h^{-1}$  no MZL; 0,046  $h^{-1}$  no ML e 0,040  $h^{-1}$  no M25/25.

Com o meio MLO foi observada a maior velocidade e em 3 dias a bactéria alcançou a fase estacionária de crescimento. A menor velocidade e menor produção de biomassa foram verificados no meio

MZLm. Nos demais meios o valor de  $\mu_{\text{máx}}$  ficou próximo, um pouco maior para o MRS e ML em relação ao MZL e M25/25. O crescimento no meio ML foi melhor do que no MRS, pois a quantidade de biomassa produzida no final foi superior. O objetivo desse teste foi escolher o meio que propiciasse o maior crescimento bacteriano e no menor tempo possível, para a produção de grande quantidade de células que seriam inoculadas no vinho. Portanto, em vista dos resultados o meio escolhido seria o MLO. Entretanto, além de grande quantidade de biomassa com alta viabilidade, também é necessário que as células mantenham a atividade maloláctica ativa, para poderem realizar com sucesso a FML (GONZÁLEZ *et al.*, 2011).

Maicas e colaboradores (2000) estudaram diferentes meios de cultura para o crescimento bacteriano antes da inoculação no vinho e também concluíram que MLO era o meio que oferecia as melhores condições de crescimento para *O. oeni* em laboratório. Porém, o estudo mostrou que as células preparadas no meio MLO falharam na realização da FML quando inoculadas no vinho, enquanto as células que cresceram em outros meios mantiveram sua atividade maloláctica e conseguiram completar a fermentação no vinho.

Outros estudos mais antigos também haviam chegado a essa conclusão, de que as células perdem sua resistência natural às condições adversas do vinho e falham como culturas iniciadoras da FML quando crescidas no meio MLO (KRIEGER *et al.*, 1993; HENICK-KLING, 1995). Entretanto, nenhum dos autores apresentou quais os componentes do meio são responsáveis por essa perda da atividade maloláctica. Pode-se tentar no futuro um planejamento experimental com mudanças na composição do meio MLO para o crescimento de culturas iniciadoras e em seguida testes de microvinificação, a fim de tentar manter o crescimento rápido sem prejudicar a atividade maloláctica. Outra possibilidade para uma produção industrial seria agregar etapas de crescimento no meio MLO com crescimento em outro meio, de forma a tentar recuperar essa resistência das células às condições do vinho sem perder o bom rendimento e crescimento rápido atingido no MLO.

Devido a essas considerações, foi selecionado o meio ML para ser utilizado na produção dos inóculos bacterianos para a etapa de microvinificação. Os autores do artigo no qual esse meio foi sugerido afirmam que a melhor velocidade de crescimento, rendimento da biomassa e atividade maloláctica são alcançados com o crescimento das bactérias em meio contendo frutose e glucose como as fontes de carbono e com adição de L-malato. Eles testaram diferentes concentrações desses

componentes para chegar assim à composição final do meio adotado nesse estudo (KRIEGER *et al.*, 1992).

#### 5.4.2. Cinética de crescimento celular

Foram feitos pré-cultivos em meio ML dos isolados R31, R34 e C2, que foram selecionados para os testes de microvinificação, a fim de verificar o comportamento durante o crescimento. Os resultados da leitura de absorbância a 660 nm estão mostrados na Figura 14.

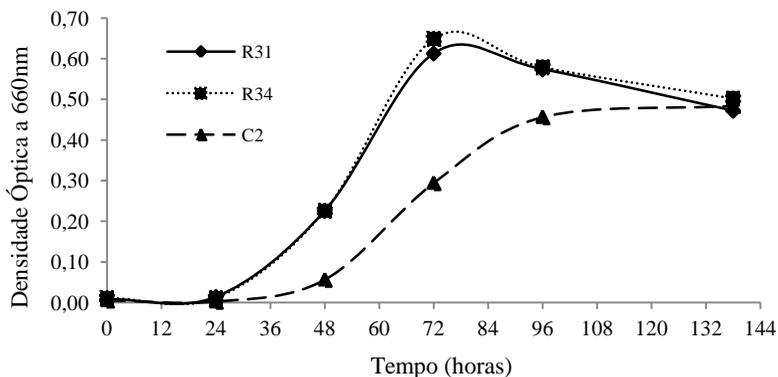


Figura 14 - Crescimento dos isolados R31, R34 e C2 no meio de cultura ML, em função do tempo de cultivo.

O isolado C2 teve comportamento parecido com o teste anterior e entre o quarto e quinto dias atingiu o máximo de crescimento. Os isolados R31 e R34 atingiram o valor máximo em torno do terceiro dia, após o qual a biomassa começou a diminuir. Os valores calculados para  $\mu_{\text{máx}}$  foram:  $0,079 \text{ h}^{-1}$  para o isolado R31;  $0,085 \text{ h}^{-1}$  para R34 e  $0,044 \text{ h}^{-1}$  para C2. Os dois primeiros apresentaram valores bastante semelhantes para a velocidade máxima específica de crescimento e significativamente superior ao isolado C2. O valor de  $\mu_{\text{máx}}$  é constante e característico de um mesmo microrganismo quando cultivado no mesmo meio e nas mesmas condições. Observando-se o teste anterior para seleção do melhor meio de cultivo, nota-se que o valor de  $\mu_{\text{máx}}$  calculado para C2 no meio ML foi  $0,046 \text{ h}^{-1}$ , ou seja, concordante com o encontrado nesse novo teste.

Não existe um consenso na literatura sobre qual o melhor momento para a coleta das células, mas sabe-se que a escolha da fase de crescimento no qual a biomassa será separada do meio de cultivo para preparo do *starter* para inoculação no vinho tem influência na viabilidade celular e no desempenho da atividade maloláctica (KRIEGER *et al.*, 1992). Kole e colaboradores (1982) mostraram que as culturas centrifugadas obtidas no meio da fase logarítmica de crescimento apresentaram a maior viabilidade. Em um estudo de Krieger e Hammes (1988), foi concluído que as células coletadas entre 12 e 24 horas após o início da fase estacionária tiveram melhor sobrevivência e atividade maloláctica do que as células coletadas antes. Já no estudo de 1992, Krieger e colaboradores mostraram que a atividade maloláctica das células foi maior bem no início da fase estacionária. Em trabalho conduzido por Beaman (2011), foi testada a atividade maloláctica das células coletadas no começo, meio e final da fase logarítmica de crescimento e começo e final da fase estacionária. Os resultados mostraram que apenas não ocorreu a fermentação maloláctica com as células coletadas no início da fase exponencial, e que não houve diferença estatística significativa entre a atividade maloláctica das células coletadas em todas as outras fases testadas, ou seja, da metade da fase exponencial ao final da fase estacionária.

Neste trabalho, optou-se por coletar as células para preparo dos inóculos no início da fase estacionária do crescimento. Os isolados R31 e R34 tiveram o crescimento interrompido para o acondicionamento na solução-tampão após 3 dias de crescimento, enquanto C2 teve um dia a mais de incubação e foi retirado no quarto dia.

## **5.5. Microvinificações**

### **5.5.1. Fermentação maloláctica**

A evolução da FML foi acompanhada semanalmente pela cromatografia em papel. Não estão mostrados todos os resultados, mas nas Figuras 15 e 16 estão ilustrados alguns exemplos representativos do que foi observado nos tratamentos com o vinho Cabernet Sauvignon e com o Merlot, respectivamente. A mancha mais próxima à extremidade superior corresponde ao ácido láctico e a mancha abaixo indica a presença do ácido málico. No caso dos vinhos Merlot, apareceu ainda uma terceira mancha, posicionada mais próxima à extremidade inferior, que representa o ácido tartárico. Nos vinhos Cabernet Sauvignon foi

observado ao longo do tempo o desaparecimento da mancha do ácido málico e aumento na intensidade da mancha do ácido láctico, procedimento que demonstra o início e conclusão da FML. A fermentação foi realizada com sucesso nos quatro tratamentos com inoculação das bactérias, ou seja, nos vinhos que foram inoculados com os isolados R31, R34 e C2 sozinhos e também na inoculação conjunta de R31 e R34. Apenas no tratamento controle, sem adição de inóculo bacteriano, não houve nenhuma mudança nos resultados da cromatografia durante o experimento e pode-se concluir também que não ocorreu a FML espontaneamente. Nos vinhos Merlot, os resultados da cromatografia mostraram-se constantes durante todo o experimento e indicam que a FML não foi iniciada em nenhum dos tratamentos. Na Tabela 4 está indicada a duração da FML para todos os tratamentos.

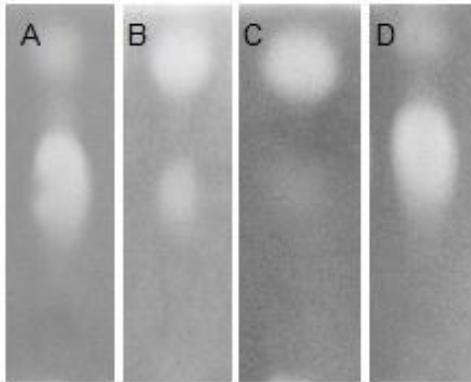


Figura 15 - Cromatografia em papel para os vinhos Cabernet Sauvignon (A) antes da inoculação, (B) início da FML, (C) conclusão da FML e (D) FML ainda não iniciada.

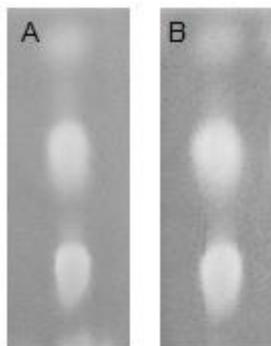


Figura 16 - Cromatografia em papel para os vinhos Merlot (A) antes da inoculação e (B) FML ainda não iniciada.

Tabela 4 - Duração da FML, do momento da inoculação até a verificação do desaparecimento da mancha do ácido málico na cromatografia em papel.

<b>Inóculo</b>	<b>Cabernet Sauvignon</b>	<b>Merlot</b>
R31	30 dias	Não iniciou
R34	30 dias	Não iniciou
C2	45 dias	Não iniciou
R31 + R34	30 dias	Não iniciou
Sem inoculação	Não iniciou	Não iniciou

Com relação apenas ao tempo que demorou a conclusão da FML, vemos que nos vinhos Cabernet Sauvignon não houve diferença entre os isolados R31 e R34. A interação entre eles não causou inibição nem estímulo da atividade maloláctica, uma vez que a FML teve a mesma duração que para os isolados inoculados separadamente. Para o isolado C2 foi necessário um tempo maior para a conclusão da FML, o que sugere que essa bactéria teve uma adaptação mais difícil às condições do vinho ou os processos de produção e reativação do inóculo afetaram de forma negativa a viabilidade e/ou atividade maloláctica das células dessa bactéria, em comparação com as outras duas. O fato de não ter ocorrido a FML no tratamento sem inoculação de bactérias durante toda a avaliação (após 170 dias o experimento foi finalizado e parou-se de realizar a cromatografia em papel), comprova que os vinhos da Serra Catarinense têm condições bastante difíceis para o crescimento bacteriano e que a dependência da fermentação espontânea caracteriza-

se de fato num grande desafio para os vinicultores da região. A inoculação com bactérias isoladas da própria região alcançou o objetivo esperado de realização da FML de forma rápida e completa e pode ser uma solução viável para o problema.

Entre os vinhos Merlot, observou-se que não ocorreu a FML em nenhum dos tratamentos. De acordo com a literatura, algumas variedades de uva, especialmente Merlot, oferecem naturalmente maior resistência ao desenvolvimento das bactérias para realização da FML. Em comunicação direta com a Dra. Sibylle Krieger-Weber, diretora da pesquisa com bactérias de importância enológica na Lallemand, foi confirmado que enólogos do mundo todo têm encontrado dificuldade na indução da fermentação maloláctica em vinhos Merlot e algumas pesquisas estão em andamento a respeito desse tema.

Em um relatório de 2003 sobre um projeto de investigação dos fatores que afetam a FML em vinhos da África do Sul, concluiu-se pelos resultados que na maioria das demais variedades de vinho tinto se consegue realizar a FML mais facilmente do que em Merlot. Os autores sugeriram a adição de suplementos nutricionais específicos para culturas bacterianas e em alguns casos na pesquisa deles essa adição foi benéfica para a conclusão da FML (LOUBSER *et al.*, 2003). A partir dessas considerações, após 60 dias do início do experimento foi realizada a adição de nutrientes para bactérias lácticas Fermoplus Malolactique (AEB Latino Americana), na concentração de 0,15 g/L, em todos os tratamentos dos vinhos Merlot. Entretanto, os resultados da cromatografia em papel continuaram mostrando que não houve evolução da FML, até 60 dias após a adição dos nutrientes, ou seja, 120 dias após o início do experimento. Loubser e colaboradores (2003) haviam considerado que essa suplementação com nutrientes não garante o início da FML em todos os casos e que especialmente em vinhos com baixo pH e concentração elevada de SO<sub>2</sub> a adição de nutrientes pode não ter nenhum efeito. Esse é o caso dos vinhos Merlot obtidos pela microvinificação nesse trabalho, conforme mostrado na discussão dos resultados das análises físico-químicas na próxima seção.

Uma nova intervenção foi feita nos vinhos Merlot 125 dias após a inoculação dos vinhos. Foi realizado um processo de remontagem, no qual o conteúdo das garrafas foi completamente transferido para uma nova garrafa de vidro de 750 mL esterilizada e logo em seguida novamente colocado na garrafa inicial. O procedimento foi feito com duas das quatro repetições para cada um dos tratamentos. O objetivo foi homogeneizar o conteúdo das garrafas para descompactar a borra formada no fundo e assim manter os nutrientes e as bactérias em

suspensão, assim como promover a micro-oxigenação do vinho, pois esses processos podem ter efeitos positivos na FML. Em nova cromatografia feita 45 dias após essa remontagem, observou-se que não houve nenhuma mudança, ou seja, 170 dias após a inoculação dos vinhos não ocorreu a fermentação e possivelmente não haja mais bactérias viáveis nas garrafas do Merlot, pelo contato com as condições desse vinho. Também é possível que as bactérias já não estivessem mais viáveis desde o início da inoculação e esses procedimentos posteriores de adição de nutrientes e homogeneização não fariam diferença. O experimento foi finalizado e não foram realizadas novas cromatografias após esse período.

### 5.5.2. Análises físico-químicas

Imediatamente antes da distribuição dos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot para as garrafas de vidro, onde foram realizadas as inoculações, foram feitas as análises físico-químicas. O laudo analítico para as amostras iniciais dos dois vinhos está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Laudo analítico para os vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot antes da inoculação com as culturas iniciadoras.

<b>Análise</b>	<b>Cabernet Sauvignon</b>	<b>Merlot</b>
Acidez volátil (meq/L)	4,36	5,56
Acidez total (meq/L)	82,63	97,71
Açúcares redutores (g/L)	5,04	5,04
SO <sub>2</sub> livre (mg/L)	0,992	2,992
SO <sub>2</sub> combinado (mg/L)	3,552	15,536
pH	2,78	2,56
Densidade do vinho (kg/m <sup>3</sup> )	993,00	993,00
Teor alcoólico (°GL)	10,40	10,50
Índice de Polifenóis Totais (mg/L Eag)	2.710	1.980
Cor 420 nm	0,537	0,368
Cor 520 nm	0,739	0,649
Cor 620 nm	0,151	0,088
Índice de Cor Total	1,427	1,105
Teor de Cor	0,727	0,567

A diferença observada na acidez total entre os dois vinhos pode estar relacionada ao ácido tartárico. Como observado na cromatografia em papel, a mancha relativa ao ácido tartárico apareceu apenas nos vinhos Merlot e esse ácido tem uma influência marcante na acidez total. Apesar de não poder ser considerada a única causa da maior dificuldade do desenvolvimento das bactérias lácticas, a maior acidez total do Merlot em relação ao Cabernet Sauvignon tem influência quando interagindo com os outros fatores. A presença maior de ácidos pode potencializar a ação antibiótica exercida pelo  $\text{SO}_2$ .

Com relação aos quatro fatores principais que influenciam na evolução da FML, ou seja, temperatura, pH, teor alcoólico e concentração de  $\text{SO}_2$ , observa-se que apenas o pH está na faixa considerada de extrema dificuldade para o desenvolvimento bacteriano, conforme a literatura. A temperatura dos dois vinhos foi mantida em 20 °C, valor considerado ótimo para as bactérias. O teor alcoólico dos dois vinhos também estava adequado, em torno de 10,5 °GL. A concentração total de  $\text{SO}_2$  é a soma do  $\text{SO}_2$  livre com o combinado, e observa-se que tanto para o Cabernet Sauvignon quanto para o Merlot esse valor ficou abaixo de 30 mg/L e o teor de  $\text{SO}_2$  livre foi menor do que 8 mg/L, ou seja, dentro das condições favoráveis. O pH parece ser o maior desafio encontrado pelas bactérias, uma vez que está bem abaixo do valor ótimo para o crescimento bacteriano. Na literatura geralmente se considera que o pH abaixo de 2,9 oferece condições críticas às bactérias malolácticas, e os resultados da análise mostraram pH de 2,78 para o vinho Cabernet Sauvignon e 2,56 para o Merlot. Essas condições bastante ácidas são típicas dos vinhos de altitude.

Os quatro parâmetros principais não devem ser analisados de forma separada, uma vez que o efeito deles no vinho depende da atuação em conjunto. Valores muito baixos de pH acabam potencializando o efeito prejudicial do  $\text{SO}_2$  sobre as bactérias, como já mencionado. Como o pH do Merlot foi menor do que o Cabernet Sauvignon e o nível de  $\text{SO}_2$  total foi maior, a interação desses dois fatores pode ser uma das explicações para a falha da FML nos vinhos Merlot. As mesmas bactérias foram inoculadas na mesma quantidade nos dois vinhos, então por algum efeito inibidor das condições físico-químicas do Merlot elas não foram capazes de se desenvolver como ocorreu no Cabernet Sauvignon.

Algumas cepas de levedura também podem afetar indiretamente a FML. O esgotamento dos nutrientes e a produção de substâncias tóxicas são formas de a levedura impactar negativamente o crescimento das BAL. De acordo com as fichas técnicas das leveduras empregadas

(Lallemand), a Lalvin ICV D 254 (utilizada para o Cabernet Sauvignon) possui uma exigência considerada média por nitrogênio assimilável, enquanto a Lalvin QD 145 (Merlot) uma exigência entre média e alta, de forma que a segunda pode ter deixado menos nutriente disponível para as bactérias. Quanto à produção de acidez volátil, a cepa QD 145 é responsável por muito baixa produção e a cepa ICV D 254 tem produção moderada. No entanto, nos resultados das análises observa-se que a acidez volátil nos vinhos Merlot foi maior do que nos Cabernet Sauvignon.

O SO<sub>2</sub> combinado tem um menor efeito antibacteriano, a maior ação sobre as bactérias é exercida pelas formas de SO<sub>2</sub> livre, dentre as quais o SO<sub>2</sub> molecular é a forma mais ativa e com o maior efeito antimicrobiano. Sua concentração aumenta com a diminuição do pH e aumento na temperatura e teor alcoólico. Há uma equação que relaciona a concentração de SO<sub>2</sub> molecular com a concentração de SO<sub>2</sub> livre e o pH do vinho (Equação 1) (KRIEGER-WEBER, 2014).

$$[SO_2\text{molecular}] = [SO_2\text{livre}] / (10^{(pH-1,81)} + 1) \quad (1)$$

Onde as concentrações de SO<sub>2</sub> são utilizadas em mg/L. Para o vinho Merlot o valor calculado para a concentração do SO<sub>2</sub> molecular foi 0,45 mg/L e para o Cabernet Sauvignon foi apenas 0,10 mg/L. O nível considerado letal para as bactérias do vinho está na faixa de 0,30-0,50 mg/L, mostrando que essa condição físico-química (pH e SO<sub>2</sub>) seja o fator responsável pela inibição das bactérias inoculadas no Merlot (KRIEGER-WEBER, 2014).

O teor de SO<sub>2</sub> sofre influência também de uma série de compostos que estão presentes no vinho e agem combinando-se com o dióxido de enxofre e dessa forma reduzem sua influência sobre as bactérias. Seria muito difícil quantificar todas essas substâncias, mas, pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que a redução do nível de SO<sub>2</sub> foi maior nos vinhos Cabernet Sauvignon do que no Merlot. Uma possibilidade para reduzir a concentração de SO<sub>2</sub> seria o processo de dessulfitação, utilizado para reduzir os teores de SO<sub>2</sub> de mostos armazenados, que consiste no aquecimento do líquido através de vapor de água a uma temperatura de 90 °C, causando a volatilização do SO<sub>2</sub>. O procedimento é feito num complexo de serpentinas onde ocorre a troca de calor entre os fluxos de entrada e saída do mosto. Contudo, a prática da dessulfitação modificaria a estrutura dos componentes voláteis do vinho, especialmente o álcool.

Uma alternativa viável seria diminuir o  $\text{SO}_2$  que é adicionado na forma de metabissulfito, mas aumentar-se-ia o risco de possibilitar o crescimento de microrganismos prejudiciais ao vinho. Seria possível realizar um estudo para relacionar o nível de acidez do vinho com a concentração de metabissulfito que pode ser adicionada sem prejudicar a adaptação da cultura inoculada e a evolução da FML. Vale destacar que mesmo com esse protocolo não se poderia garantir o sucesso da fermentação em todos os casos, mas neste estudo parece ser um fator de bastante relevância.

Em condições específicas, certas cepas de leveduras são também capazes de produzir altas concentrações de  $\text{SO}_2$ , uma explicação que ajudaria a corroborar as observações anteriores sobre o efeito do enxofre nos vinhos Merlot. Considerando as informações técnicas das leveduras empregadas, tanto Lalvin QD 145 quanto Lalvin ICV D 254 são consideradas cepas de baixa produção de  $\text{SO}_2$ , mas na ficha da ICV D 254 ainda consta que ocorre forte consumo de  $\text{SO}_2$  durante a fermentação, o que possivelmente ajudou a deixar o nível de dióxido de enxofre menor nos vinhos Cabernet Sauvignon. Outra informação presente apenas na descrição da cepa Lalvin ICV D 254 diz que essa levedura é fortemente recomendada pela sua compatibilidade com a fermentação maloláctica, o que está de acordo com os resultados encontrados na presente investigação, uma vez que a FML foi concluída de forma satisfatória nos vinhos Cabernet Sauvignon produzidos com essa levedura.

Outro fator da composição físico-química que pode ter relação com as diferenças no crescimento e metabolismo das bactérias e no resultado da FML nos vinhos Merlot e Cabernet Sauvignon é o perfil polifenólico (BAUER e DICKS, 2004). No presente experimento, a microvinificação seguiu praticamente o mesmo protocolo para as duas variedades de uva, com diferença apenas na levedura inoculada, e não houve maturação em barril de carvalho. Portanto, a diferença no conteúdo de polifenóis deveu-se às uvas e ao metabolismo das leveduras.

A partir da análise feita com o reagente Folin-Ciocalteu realizada nos vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot, o único resultado que se pode inferir é que o teor de polifenóis totais nos vinhos Merlot é menor, não há informação quanto ao perfil fenólico dos vinhos. Em um estudo de Lucena e colaboradores (2010), o nível de polifenóis totais e também de alguns compostos específicos foi medido em oito vinhos da região Nordeste do Brasil. Apesar do clima e solo serem muito diferentes da Serra Catarinense, é interessante observar a comparação

entre um vinho da variedade Merlot e dois de Cabernet Sauvignon. Na análise do conteúdo fenólico total, as concentrações foram similares para os três vinhos, com o Merlot em posição intermediária entre os dois Cabernet Sauvignon. Entretanto, em relação ao teor de antocianinas, que conforme citado na literatura tem influência positiva na atividade das BAL, o vinho Merlot apresentou menos da metade da concentração dos outros dois.

Uma avaliação mais ampla foi feita por Granato e colaboradores (2010), que compararam o conteúdo fenólico em 26 vinhos produzidos em diferentes regiões do Brasil, entre eles 10 Cabernet Sauvignon e 6 Merlot. Houve uma variação muito grande nas concentrações de polifenóis totais, antocianinas e flavonoides entre os vinhos da mesma variedade. Fazendo-se uma média entre os valores dos vinhos da mesma variedade, o resultado das três concentrações foi maior para os vinhos Merlot, o que difere do resultado descrito no outro artigo e neste trabalho.

Uma investigação mais recente foi conduzida apenas com vinhos Merlot, produzidos na região da Serra e da Campanha Gaúchas, estado do Rio Grande do Sul. O vinho produzido na Serra apresentou um teor alcoólico e pH mais baixos e acidez total mais elevada, características típicas dos vinhos de altitude. Com relação ao conteúdo fenólico, quando comparado aos demais o vinho Merlot produzido na Serra teve um índice de polifenóis totais mais baixo, com concentrações maiores de antocianinas e menores de taninos (DAUDT e FOGAÇA, 2013).

Como na maioria dos estudos existentes na literatura as antocianinas são favoráveis à FML enquanto os taninos são desfavoráveis, poder-se-ia pensar que no nosso caso a fermentação seria mais fácil no Merlot do que no Cabernet Sauvignon, ao contrário do que foi observado, levando em conta apenas a influência dos polifenóis. No entanto, essas considerações são apenas especulações, uma vez que não houve acesso às concentrações de cada um dos grupos de compostos fenólicos nos vinhos produzidos nesse trabalho, e como citado anteriormente essa interação varia muito de acordo com a cepa bacteriana, polifenol e concentração.

Devido à complexidade do vinho e as inúmeras variáveis que afetam o crescimento microbiano (pH, concentração de  $\text{SO}_2$ , falta de nutrientes, interação com as leveduras, composição dos polifenóis, entre outros), não se pode atribuir a dificuldade encontrada aqui com os vinhos Merlot a apenas um dos parâmetros ambientais e físico-químicos. Pode ter ocorrido sinergia entre vários fatores, que contribuíram para que as bactérias não conseguissem se desenvolver

adequadamente, enquanto as dificuldades não foram tão impeditivas nos vinhos Cabernet Sauvignon e a FML pôde ser concluída rapidamente.

Após a conclusão da FML em todas as garrafas dos vinhos Cabernet Sauvignon, com exceção do controle sem inoculação, foram feitas novamente todas as análises físico-químicas, em três das quatro replicatas de cada tratamento. Os valores médios de cada um dos parâmetros analisados foram utilizados para comparar as diferentes bactérias inoculadas entre si e verificar as alterações causadas pela FML em relação às análises iniciais antes da inoculação. Os resultados estão mostrados na Tabela 6, junto com os resultados obtidos antes da inoculação. Não foram realizadas novas análises físico-químicas nos vinhos Merlot, uma vez que não ocorreu a FML.

Tabela 6 - Laudo analítico de vinhos Cabernet Sauvignon após a finalização da FML. R31, R34 e C2 são os tratamentos com BAL, enquanto Inicial é o vinho antes da inoculação. Os dados são a média de três repetições e as letras iguais nas mesmas linhas indicam valores que não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>Análise</b>	<b>R31</b>	<b>R34</b>	<b>R31+ R34</b>	<b>C2</b>	<b>Inicial</b>
Acidez volátil (meq/L)	8,12 <sup>a</sup>	7,96 <sup>a</sup>	9,00 <sup>a</sup>	7,65 <sup>a</sup>	4,36 <sup>b</sup>
Acidez total (meq/L)	68,74 <sup>a</sup>	66,31 <sup>a</sup>	70,09 <sup>a</sup>	71,43 <sup>a</sup>	82,63 <sup>a</sup>
Açúcares redutores (g/L)	3,50 <sup>ab</sup>	3,69 <sup>ab</sup>	3,37 <sup>b</sup>	3,08 <sup>b</sup>	5,04 <sup>a</sup>
SO <sub>2</sub> livre (mg/L)	7,05 <sup>a</sup>	7,11 <sup>a</sup>	5,98 <sup>a</sup>	8,13 <sup>a</sup>	0,992 <sup>b</sup>
SO <sub>2</sub> combinado (mg/L)	14,77 <sup>a</sup>	14,77 <sup>a</sup>	12,85 <sup>a</sup>	13,10 <sup>a</sup>	3,552 <sup>b</sup>
pH	2,91 <sup>a</sup>	2,97 <sup>a</sup>	2,89 <sup>a</sup>	2,89 <sup>a</sup>	2,78 <sup>a</sup>
Densidade do vinho (kg/m <sup>3</sup> )	995,67 <sup>a</sup>	997,67 <sup>a</sup>	996,00 <sup>a</sup>	998,33 <sup>a</sup>	993,00 <sup>a</sup>
Teor alcoólico (°GL)	10,77 <sup>a</sup>	10,80 <sup>a</sup>	10,67 <sup>a</sup>	10,47 <sup>a</sup>	10,40 <sup>a</sup>
Índice de Polifenóis Totais (mg/L Eag)	2.470 <sup>a</sup>	2.590 <sup>a</sup>	2.560 <sup>a</sup>	2.550 <sup>a</sup>	2.710 <sup>a</sup>
Cor 420 nm	0,45 <sup>b</sup>	0,46 <sup>ab</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,43 <sup>b</sup>	0,54 <sup>a</sup>
Cor 520 nm	0,52 <sup>b</sup>	0,54 <sup>b</sup>	0,52 <sup>b</sup>	0,52 <sup>b</sup>	0,74 <sup>a</sup>
Cor 620 nm	0,13 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>
Índice de Cor Total	1,10 <sup>b</sup>	1,14 <sup>b</sup>	1,09 <sup>b</sup>	1,06 <sup>b</sup>	1,43 <sup>a</sup>
Teor de Cor	0,85 <sup>a</sup>	0,86 <sup>a</sup>	0,84 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	0,73 <sup>b</sup>

Pode-se observar que os resultados foram bastante semelhantes para os quatro tratamentos e de fato não houve diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros avaliados. Do ponto de vista apenas das alterações físico-químicas causadas no vinho, conclui-se que não ocorreram diferenças entre as três bactérias selecionadas para a microvinificação e essas análises não permitem determinar qual delas seria a mais adequada para a utilização como cultura iniciadora.

Em comparação com os mesmos parâmetros avaliados antes da inoculação das BAL, descrito como Inicial na Tabela 6, percebem-se algumas alterações causadas no vinho pela FML. Apesar de estatisticamente não haver diferença, percebe-se pelos valores das médias que houve diminuição na acidez total e leve aumento no pH, que são as principais consequências da descarboxilação enzimática do ácido málico em ácido láctico. Essas alterações são bastante sutis e normalmente espera-se que o pH tenha uma elevação em torno de 0,2. A acidez volátil aumentou, causada pelo consumo de açúcares residuais com produção de ácido acético no metabolismo bacteriano, mas manteve-se dentro do limite estabelecido em legislação. O valor máximo definido para a acidez total é de 130,0 meq/L e para a acidez volátil é 20,0 meq/L, portanto esses dois parâmetros estão adequados, assim como o teor alcoólico, que deve estar entre 10,0 e 13,0 °GL (BRASIL, 1988a).

Outro efeito desejável da FML é a estabilização microbiológica, causada pelo consumo de açúcares pelas bactérias malolácticas e diminuição da concentração disponível para crescimento de outros microrganismos. De fato, houve diminuição na concentração de açúcares redutores. Os teores de SO<sub>2</sub> livre e combinado estão maiores do que na análise inicial, mas isso ocorreu devido à adição de metabissulfito logo após a finalização da FML, também visando conter o crescimento de microrganismos contaminantes. O limite máximo estabelecido na legislação para a concentração do anidrido sulfuroso total é de 350 mg/L, portanto todos os vinhos estão ainda bem abaixo do limite. Houve diferença significativa em alguns parâmetros relacionados à cor do vinho, mas esse comportamento está pouco relacionado com o metabolismo bacteriano e tem sua explicação nas relações de concentração entre taninos e antocianinas e reações de polimerização e oxidação. Nos demais parâmetros houve pouco ou nenhum efeito do crescimento bacteriano. Esses resultados mostram que levando em consideração apenas os aspectos físico-químicos, as três bactérias utilizadas podem ser consideradas adequadas para inoculação dos vinhos de altitude para realização da fermentação maloláctica.

### 5.5.3. Análise sensorial

A realização da fermentação maloláctica pelas bactérias inoculadas apresentou efeitos sobre os parâmetros sensoriais nos vinhos Cabernet Sauvignon. Uma comparação entre os cinco diferentes tratamentos está mostrada na Figura 17. Os pesos dos atributos sensoriais foram convertidos em uma escala de 0 a 1 e representados no diagrama com uma visão ampliada na faixa entre 0,6 e 0,9, sendo que nesse tipo de gráfico os valores menores estão mais próximos ao centro do radar e os valores maiores nas extremidades dos eixos.

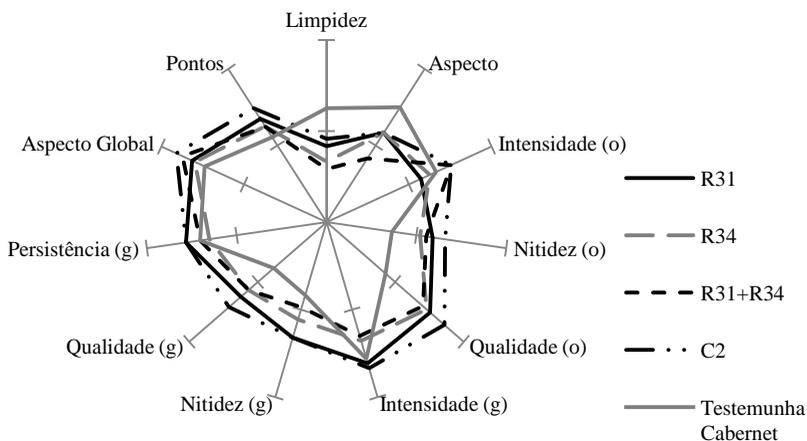


Figura 17 - Médias dos atributos sensoriais avaliados para três repetições em vinhos Cabernet Sauvignon inoculados com diferentes BAL. Testemunha é o tratamento não inoculado.

Podem-se destacar os atributos de qualidade, tanto olfativa quanto gustativa, o aspecto global e a soma geral dos pontos, que colocaram claramente os vinhos inoculados a frente do vinho sem inoculação. A qualidade está relacionada com o grau de aceitação do vinho, se ele apresenta características agradáveis ao paladar e ao olfato. O aspecto global avalia o equilíbrio, tipicidade, sensação tátil e ausência de defeitos no vinho, e representa a percepção geral do degustador. Nos critérios de nitidez, em que se considera um vinho nítido quando

apresenta perfume e/ou gosto único, sem alterações organolépticas que atrapalhem a percepção, também todos os vinhos inoculados tiveram avaliações melhores. A soma final dos pontos leva em consideração os pesos diferenciados que cada atributo possui, sendo que os critérios de qualidade são os que impactam de forma mais significativa a pontuação final.

A amostra que não recebeu a inoculação de bactérias e na qual mesmo após 170 dias de início do experimento não houve a FML espontânea, destacou-se nos atributos visuais, que são a limpidez e o aspecto. Uma possível explicação é que nos vinhos inoculados houve crescimento bacteriano para a realização da FML e isso causou uma maior turvação do vinho, diminuindo as notas na avaliação visual. De fato, todos os vinhos avaliados receberam notas menores no quesito de limpidez do que no aspecto visual. No entanto, é necessário considerar que os vinhos avaliados ainda não estavam prontos e precisariam passar ainda por etapas de estabilização e clarificação, que diminuiriam a turbidez e melhorariam esses atributos visuais.

Nos atributos de intensidade olfativa e gustativa deve-se avaliar a grandeza da percepção dos aromas e gostos no vinho, independentemente da condição de preferência pessoal do avaliador. Sendo assim, este atributo deve ser meramente indicativo do nível de percepção global dos diferentes aromas presentes no vinho, levando em conta o nível de impacto sensorial individual a cada membro do painel. No gráfico percebe-se que o vinho sem inoculação ficou em posições intermediárias entre os outros tratamentos nesses dois critérios, entretanto nos comentários escritos pelos degustadores na ficha de avaliação fica claro que as sensações intensas que eles demonstraram estavam relacionadas a defeitos organolépticos. O atributo de persistência avalia quanto tempo o vinho evolui na boca, seja com uma sensação boa ou ruim. Assim como na intensidade, na avaliação da persistência todos os vinhos receberam notas elevadas e próximas entre si, com a amostra sem inoculação em posições intermediárias.

Com relação às diferenças entre os tratamentos testados, pode-se afirmar que as bactérias R31 e C2 destacaram-se mais do que R34 e a interação entre R31 e R34. A bactéria R34 teve um desempenho mais relevante nos critérios de intensidade gustativa e olfativa e no aspecto visual, nos quais teve uma avaliação melhor e mais próxima dos demais tratamentos. Nos outros critérios, essa bactéria se posicionou de modo geral de maneira inferior às demais. A interação entre R31 e R34 teve seu melhor resultado na intensidade olfativa e teve a segunda melhor avaliação no aspecto global. De fato, relatou-se nos comentários dos

jurados que os vinhos produzidos com essa interação possuíam notadamente mais aromas frutados, que geralmente tendem a agradar na percepção final, mesmo que em outros critérios a percepção não tenha sido tão favorável. A bactéria R31 teve boas avaliações nos critérios visuais e gustativos, mas foi inferior à C2 nos atributos do olfato. O melhor desempenho geral foi observado para o isolado C2, que obteve nota maior ou igual aos outros isolados em todos os critérios avaliados. Essa bactéria teve avaliações bastante positivas nos critérios de intensidade e qualidade, tanto olfativa quando gustativa, bem como na apreciação global. Como esses atributos tem maior peso sobre a nota final, consequentemente C2 acabou tendo a melhor avaliação geral entre os tratamentos testados.

Apesar dos melhores resultados do ponto de vista sensorial, o isolado C2 demorou mais para realizar a FML, apresentou crescimento mais lento no meio de cultura e foi o único que produziu (qualitativamente e em meio de cultura) amina biogênica. Os isolados R31 e R34 apresentaram crescimento mais rápido na fase de produção do inóculo e concluíram a FML em tempo 50% menor do que C2, com uma análise sensorial bastante positiva. Assim, os três isolados são indicados para utilização em vinificações.

Para confirmar algumas observações e mostrar de forma mais clara as correlações entre as variáveis, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) (BORGHEZAN *et al.*, 2011), mostrada na Figura 18.

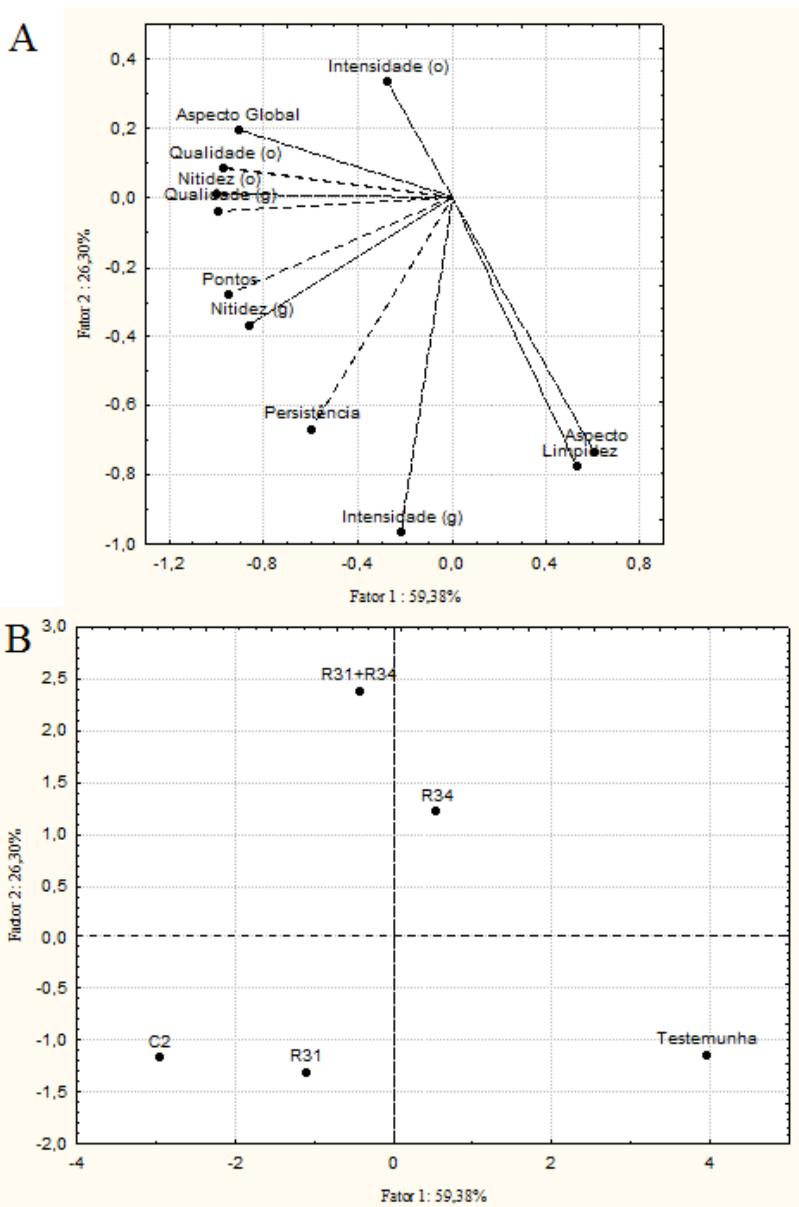


Figura 18 - Análise de componentes principais (PCA) para a avaliação sensorial dos vinhos Cabernet Sauvignon obtidos com diferentes BAL (R1, R34 e C2) para a FML. (A) Distribuição das variáveis avaliadas e (B) Distribuição dos tratamentos realizados. Testemunha é o tratamento não inoculado.

O gráfico mostra que nesse painel de avaliação sensorial os atributos visuais (aspecto e limpidez) ficaram em posição oposta aos critérios de qualidade e aspecto global, confirmando que mesmo a avaliação mais baixa dos vinhos inoculados quanto ao visual, devido à presença de turbidez, não influenciou muito na aceitação geral. O aspecto visual e a limpidez apresentaram uma elevada correlação entre eles, de 0,91, enquanto para o aspecto visual/aspecto global e para a limpidez/qualidade olfativa os coeficientes de correlação foram bastante negativos, de -0,71 e -0,63, respectivamente. A intensidade gustativa e a persistência tiveram um padrão semelhante de percepção pelos avaliadores (correlação de 0,81), porém a persistência esteve mais relacionada com os atributos de nitidez enquanto a intensidade gustativa foi avaliada de forma mais parecida com os aspectos visuais.

Os critérios de nitidez olfativa e gustativa tiveram coeficiente de correlação bastante elevada com as respectivas qualidades olfativa e gustativa (0,98 e 0,91, respectivamente). A soma geral de pontos teve correlações maiores de 90% com os dois critérios de qualidade e nitidez, tanto olfativa quanto gustativa. A apreciação global dos vinhos teve a maior correlação com os aspectos sensoriais do olfato, um pouco menor com os critérios do paladar e correlação negativa com a avaliação visual.

O fator 1 foi capaz de explicar 59,38% da variação dos dados e o fator 2 somou mais 26,30% das alterações percebidas, correspondendo juntos a 85,68% das variações sensoriais avaliadas nos vinhos Cabernet Sauvignon obtidos com a inoculação das BAL. No gráfico B da Figura 18, observa-se o posicionamento dos tratamentos testados. Confirmando as avaliações do gráfico em radar, pode-se perceber que o tratamento testemunha teve destaque nos atributos visuais. A inoculação com a bactéria R34 gerou avaliações intermediárias, um pouco melhor no aspecto visual. A interação entre R31 e R34 se destacou nos critérios olfativos e na apreciação global, enquanto que R31 esteve entre as melhores notas nos quesitos gustativos e conseguiu boa pontuação final. Em geral, os vinhos produzidos com inoculação da bactéria C2 tiveram a melhor avaliação, com destaque nos atributos de qualidade e nitidez.

## 6. CONCLUSÕES

- A diversidade de BAL em borra de vinhos de altitude é baixa, o que corrobora a dificuldade da FML ocorrer espontaneamente;
- No caso de se utilizar borras de vinhos como inóculo de BAL, elas devem ser conservadas sob refrigeração (8-10 °C), ou, quando possível, por liofilização;
- Devido às muitas características morfológicas compartilhadas pelas BAL, análises moleculares são importantes para diferenciação e triagem de isolados. É interessante analisar ainda as características bioquímicas e cinéticas;
- Avaliações físico-químicas e sensoriais comprovaram o sucesso da inoculação de BAL nos vinhos da variedade Cabernet Sauvignon. Também se confirmou a dificuldade de realização da FML espontânea. Ficou claro que a inoculação com BAL é a alternativa adequada para solução desse problema, frequente nos vinhos finos produzidos na Serra Catarinense;
- Os isolados C2, R31 e R34 são indicados para inoculação em vinhos de altitude para realização da FML;
- A falha na FML nos vinhos Merlot mostrou que somente a inoculação não é uma garantia de sucesso.

### **Sugestões de trabalhos futuros**

- Otimizar o meio de cultura e as condições de produção dos inóculos bacterianos e realizar testes em biorreator;
- Comparar a atividade maloláctica das culturas bacterianas coletadas em diferentes fases de crescimento e em distintas concentrações;
- Testar diferentes métodos de conservação dos inóculos com relação à estabilidade, viabilidade das células e manutenção da atividade maloláctica;
- Comparar diferentes momentos de inoculação no vinho e a interação das bactérias com diferentes linhagens de leveduras comerciais.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, H.; COSTELLO, P. J.; REMIZE, F.; GUZZO, J.; GUILLOUX-BENATIER, M. **Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni interactions in wine: Current knowledge and perspectives.** *International Journal of Food Microbiology*, v.93, p.141-154, 2004.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. **Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation.** *Microbiological Reviews*, v.59, p.143-169, 1995.
- ARAQUE, I.; GIL, J.; CARRETÉ, R.; BORDONS A.; REGUANT, C. **Detection of arc Genes related with the Ethyl Carbamate Precursors in wine lactic acid bacteria.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.5, p.1841-1847, 2009.
- ARMAS, R. D. **Degradação do tetracloreto por consórcios bacterianos em reator horizontal de leito fixo.** Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology.** John Willey & Sons Inc., Inglaterra, 1992.
- AXELSSON, L. T. **Lactic acid bacteria: classification and physiology.** In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (Salminen, S. *et al.*). Marcel Dekker, Estados Unidos da América, p.1-66, 2004.
- BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. **Use of a polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic fermentation bacterium *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) in grape juice and wine samples.** *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v.5, p.39-44, 1999.
- BARTOWSKY, E. J. ***Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena.** *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v.11, p.174-187, 2005.
- BAUER, R.; DICKS, L. M. T. **Control of malolactic fermentation in wine: A review.** *South African Journal of Enology and Viticulture*, v.25, n.2, p.74- 88, 2004.

BEAMAN, W. L. **Effect of Cell Density and Growth Phase on Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni***. Tese apresentada para o Honors Research Program, Universidade de Cornell, Faculdade de Agricultura e Ciências da Vida, 2011.

BORDONS, A.; CARME-MASQUE, M.; VIDAL, M. **Isolation and selection of malolactic bacteria and effect of pesticides**. In: *The Management of Malolactic Fermentation and Quality of Wine*, (Lallemand Technical Meeting). Itália, p.51-56, 1998.

BORGHEZAN, M.; PIT, F. A.; GAVIOLI, O.; MALINOVSKI, L. I.; SILVA, A. L. **Efeito da área foliar sobre a composição da uva e a qualidade sensorial dos vinhos da variedade Merlot (*Vitis vinifera* L.) cultivada em São Joaquim, SC, Brasil**. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, v.26, n.1, p.01-09, 2011.

BORNEMAN, A. R.; McCARTHY, J. M.; CHAMBERS, P. J.; BARTOWSKY, E. J. **Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways**. *BMC Genomics*, v.13, p.373, 2012.

BOU, M.; POWELL, C. **Strain Selection Techniques**. In: *Malolactic Fermentation in Wine* (Morenzoni, R). Lallemand Inc., Canadá, p.49-56, 2005.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. **Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria**. *International Journal of Food Microbiology*, v.53, p.33-41, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 76, de 26 de Novembro de 1986**. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 nov. 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n.º 229, de 25 de Outubro de 1988**. Aprova as Normas referentes a Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 31 out. 1988a.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 7.678, de 8 de Novembro de 1988**. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 9 nov. 1988b.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 10.970, de 12 de Novembro de 2004.** Altera dispositivos da Lei no 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 16 nov. 2004.

CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; HOGG, T. A. **Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*.** *Journal of Applied Microbiology*, v.94, p.167–174, 2003.

CAPPELLO, M. S.; STEFANI, D.; GRIECO, F.; LOGRIECO, A.; ZAPPAROLI, G. **Genotyping by Amplified Fragment Length Polymorphism and malate metabolism performances of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Primitivo wine.** *International Journal of Food Microbiology*, v.127, p.241–245, 2008.

CAPPELLO, M. S.; ZAPPAROLI, G.; STEFANI, D.; LOGRIECO, A. **Molecular and biochemical diversity of *Oenococcus oeni* strains isolated during spontaneous malolactic fermentation of Malvasia Nera wine.** *Systematic and Applied Microbiology*, v.33, p.461–467, 2010.

CASPRITZ, G.; RADLER, F. **Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria.** *Journal of Biological Chemistry*, v.258, p.4907–4910, 1983.

COENYE, T.; GEVERS, D.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. **Towards a prokaryotic genomic taxonomy.** *FEMS Microbiological Reviews*, v.29, p.147–167, 2005.

COLAGRANDE, O. **Wine Production.** In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation* (Flickinger, M. C.). John Wiley & Sons Inc., Estados Unidos da América, p.2677–2693, 1999.

CONSTANTINI, A.; GARCÍA-MORUNO, E.; MORENO-ARRIBAS, M. V. **Biochemical Transformations Produced by Malolactic Fermentation.** In: *Wine Chemistry and Biochemistry* (Moreno-Arribas, M. V. e Polo, M. C.). Springer Science+Business Media, Estados Unidos da América, p.27–57, 2009.

COSTELLO, P. **The Chemistry of Malolactic Fermentation.** In: *Malolactic Fermentation in Wine* (Morenzoni, R.). Lallemand Inc., Canadá, p.25–36, 2005.

COUCHENEY, F.; DESROCHE, N.; BOU, M.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; DULAU, L.; GUZZO, J. **A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters.** *International Journal of Food Microbiology*, v.105, p.463–470, 2005.

COX, D. J.; HENICK-KLING, T. **Chemiosmotic energy from malolactic fermentation.** *Journal of Bacteriology*, v.171, p.5750–5752, 1989.

COX, D. J.; HENICK-KLING, T. **A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malo-lactic enzyme systems.** *American Journal of Enology and Viticulture*, v.41, p.215–218, 1990.

DAUDT, C. E. **Determinação da Fermentação Malolática em Vinhos pela Cromatografia em Papel.** *Revista do Centro de Ciências Rurais*, v.1, n.3, p.81-94, 1971.

DAUDT, C. E.; FOGAÇA, A. O. **Phenolic compounds in Merlot wines from two wine regions of Rio Grande do Sul, Brazil.** *Food Science and Technology*, v.33, n.2, p.355-361, 2013.

DAVIS, C. R.; WIBOWO, D.; ESCHENBRUCH, R.; LEE, T. H.; FLEET, G. H. **Practical implications of malolactic fermentation. A review.** *American Journal of Enology and Viticulture*, v.36, n.4, p.290-301, 1985.

DAVIS, C. R.; WIBOWO, D.; LEE, T. H.; FLEET, G. H. **Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance.** *American Journal of Enology and Viticulture*, v.39, p.137–142, 1988.

DELAHERCHE, A.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. **Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and ‘ropy’ *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction.** *Journal of Applied Microbiology*, v.97, p.910–915, 2004.

DELLAGLIO, F.; de ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M. C.; JANSSENS, D. **Caractéristiques générales des bactéries lactiques.** In: *Bactéries Lactiques* (de Roissart, H. et al.). Lorica, França, p.25-116, 1994.

DICKS, L. M. T.; DELLAGLIO, F.; COLLINS, M. D. **Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corríg.] gen. nov.,**

**comb. nov.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.45, p.395–397, 1995.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press Limited, Inglaterra, 439 p., 1995.

DUHAMEL, M. S. D.; WEHR, L. Y.; HOMA, R.; SEEPERSAD, D.; DWORATZEK, S.; COX, E. E.; EDWARDS, E. A. **Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride**. *Water Research*, v.36, p.4193–4202, 2002.

EDWARDS, C. G.; BEELMAN, R. B.; BARTEY, C. E.; McCONNELL, A. L. **Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.41, p.48–56, 1990.

FAVIER, M.; BILHÈRE, E.; LONVAUD-FUNEL, A.; MOINE, V.; LUCAS, P. M. **Identification of pOENI-1 and Related Plasmids in *Oenococcus oeni* Strains Performing the Malolactic Fermentation in Wine**. *PLoS ONE*, v.7, n.11, p.1–12, 2012.

FIGUEIREDO, A. R.; CAMPOS, F.; FREITAS, V.; HOGG, T.; COUTO, J. A. **Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii***. *Food Microbiology*, v.25, p.105–112, 2008.

FREITAS, C. A. **Qualidade nas alturas**. *Agropecuária Catarinense*, v.23, n.3, p.19–24, 2010.

FREITAS, D. M. **Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis vinifera*) tintas em diferentes ambientes**. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos, Universidade de Santa Maria, 2006.

GARCIA, M. J.; ZUNIGA, M.; KOBAYASHI, H. **Energy production from L-malic acid degradation and protection against acidic external pH in *Lactobacillus plantarum* CECT 220**. *Journal of General Microbiology*, v.138, p.2519–2524, 1992.

GARDINI, F.; ZACCARELLI, A.; BELLETTI, N.; FAUSTINI, F.; CAVAZZA, A.; MARTUSCELLI, M.; MASTROCOLA, D.; SUZZI, G. **Factors influencing biogenic amine production by a strain of**

***Oenococcus oeni* in a model system.** *Food Control*, v.16, p.609–616, 2005.

GARVIE, E. I. ***Leuconostoc oenos* sp. nov.** *Journal of General Microbiology*, v48, p.431–438, 1967.

GERTSEN-SCHIBBYE, S. **Malolactic fermentation seminar.** *Webinar with the Northern Grapes Project*, 2012.

GLORIA, M. B. A. **Bioactive amines.** In: *Handbook of food science, technology and engineering* (Hui, Y. H.). CRC Press, Austrália, p.38, 2005.

GONZÁLEZ, R.; MUÑOZ, R; CARRASCOSA, A. V. **Production of Wine Starter Cultures.** In: *Molecular Wine Microbiology* (Carrascosa, A. V. *et al.*). Academic Press, Estados Unidos da América, p.279-302, 2011.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. **Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics.** *LWT - Food Science and Technology*, v.43, p.1542-1549, 2010.

GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. **Methods of analyzing gut microbiota.** In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen, S. *et al.*). Marcel Dekker Inc., Estados Unidos da América, p.365–374, 2004.

GUERRINI, S.; MANGANI, S.; GRANCHI, L.; VINCENZINI, M. **Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*.** *Current Microbiology*, v.44, p.374–378, 2002.

HAGEN, R. M.; GAUTHIER, Y. P.; SPRAGUE, L. D.; VIDAL, D. R.; ZYSK, G.; FINKE, E. J.; NEUBAUER, H. **Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues.** *Journal of Clinical Pathology – Molecular Pathology*, v.55, n.6, p.398-400, 2002.

HENICK-KLING, T. **Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus plantarum* in wine.** Tese de Doutorado apresentada à University of Adelaide, 1986.

HENICK-KLING, T. **Yeast and bacterial control in winemaking.** In: *Modern Methods of Plant Analysis, New Series* (Linskens, H. F. e Jackson, J. F.). Springer Verlag, Alemanha, v.6, p.296-316, 1988.

- HENICK-KLING, T.; SANDINE, W. E.; HEATHERBELL, D. A. **Evaluation of malolactic bacteria isolated from Oregon wines.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, p.2010–2016, 1989.
- HENICK-KLING, T. **Malolactic fermentation.** In: *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet, G. H.). Harwood Academic Publishers, Inglaterra, p. 289–326, 1993.
- HENICK-KLING, T. **Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation.** *Journal of Applied Bacteriology Supplement*, v.79, p.29S–37S, 1995.
- HENICK-KLING, T.; KRIEGER, S. **Synthetic media for the production of malolactic starter cultures.** United States Patent, US 6,284,518 B1. 2001.
- ISABEL, L.; SANTAMARÍA, P.; TENORIO, C.; GARITO, P.; GUTIERREZ, A. R.; LÓPEZ, R. **Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines.** *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.19, n.9, p.1005-1012, 2009.
- IZQUIERDO, P. M.; GARCÍA, E.; MARTÍNEZ, J.; CHACÓN, J. L. **Selection of lactic bacteria to induce malolactic fermentation in red wine of cv. Cencibel.** *Vitis*, v.43, p.149-153, 2004.
- JARA, C.; MATEO, E.; GUILLAMÓN, J. M.; TORIJA, M. J.; MAS, A. **Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods.** *International Journal of Food Microbiology*, v.128, p.336–341, 2008.
- KOLE, M.; ALTOSAAR, I.; DUCK, P. **Pilot scale production and preservation of a new malolactic culture *Leuconostoc oenos* 44.40 for use in secondary wine fermentation.** *Biotechnology Letters*, v.4, p.695-700, 1982.
- KÖNIG, H; FRÖHLICH, J. **Lactic Acid Bacteria.** In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (König, H.). Springer Verlag, Alemanha, p.3-29, 2009.
- KRIEGER, S. A; HAMMES, W. P. **Biologischer Säureabbau im Wein unter Einsatz von Starterkulturen.** *Der Deutsche Weinbau*, v.25, p.1152–1154, 1988.

KRIEGER, S. A.; HAMMES, W. P.; HENICK-KLING, T. **Effect of medium composition on growth rate, growth yield, and malolactic activity of *Leuconostoc oenos* LoZH1-t7-1.** *Food Microbiology*, v.9, p.1–11, 1992.

KRIEGER, S. A.; HAMMES, W. P.; HENICK-KLING, T. **How to use malolactic starter cultures in the winery.** *Australian & New Zealand Wine Industry Journal*, v.8, p.153-160, 1993.

KRIEGER, S. A.; LEMPERLE, E.; ERNST, M. **Management of malolactic fermentation with regard to flavor modification in wine.** *5th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenology*, Austrália, 2000.

KRIEGER, S. **The History of Malolactic Bacteria in Wine.** In: *Malolactic Fermentation in Wine* (Morenzoni, R). Lallemand Inc., Canadá, p.15-24, 2005.

KRIEGER-WEBER, S. **Wine matrix – known and less known impact factors.** *International ML School, Lallemand Malolactic Fermentation Education*, França, 2014.

KUNKEE, R. E. **Simplified chromatographic procedure for detection of Malolactic Fermentation.** *Wines & Vines*, p.23-24, 1968.

KUNKEE, R. E. **Malolactic fermentation and winemaking.** In: *The Chemistry of Winemaking* (Webb, A. D.). American Chemical Society, Estados Unidos da América, p.151–170, 1974.

KUNKEE, R. E. **A second enzymatic activity for decomposition of malic acid by malo-lactic bacteria.** In: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food* (Carr, J. G. e Whiting, G. C.). Academic Press, Inglaterra, p. 29–42, 1975.

KUNKEE, R. E. **Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making.** *FEMS Microbiology Reviews*, v.88, p.55–72, 1991.

LACHMAN, J.; SULC, M.; SCHILLA, M. **Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine-making process.** *Food Chemistry*, v.103, p.802-807, 2007.

LAFON-LAFOURCADE, S. **Factors of the malo-lactic fermentation of wines.** In: *Lactic Acid Bacteria in Food and Beverages* (Carr, J. G. et al.). Academic Press, Inglaterra, p.43–53, 1975.

LAFON-LAFOURCADE, S. **Wine and brandy**. In: *Biotechnology* (Reed, G.). Verlag Chemie, Alemanha, p.81-163, 1983.

LANDETE, J. M.; FERRER, S.; PARDO, I. **Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine**. *Food Control*, v.18, p.1569–1574, 2007.

LE JEUNE, C.; LONVAUD-FUNEL, A.; TEN BRINK, B.; HOFSTRA, H.; VAN DER VOSSEN, J. M. B. M. **Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test**. *Journal of Applied Bacteriology*, v.78, p.316–326, 1995.

LEITÃO, M. C.; TEIXEIRA, H. C.; BARRETO CRESPO, M. T.; SAN ROMÃO, M. V. **Biogenic amines occurrence in wine. Amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni***. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.2780–2784, 2000.

LOMBARDI, S. J.; TREMONTE, P.; SUCCI, M.; TESTA, B.; PANNELLA, G.; TIPALDI, L.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R.; IORIZZO, M. **Effect of Phenolic Compounds on the Growth and L-Malic Acid Metabolism of *Oenococcus oeni***. *Journal of Life Sciences*, v.6, p.1225-1231, 2012.

LONVAUD-FUNEL, A.; JOYEUX, A.; LEDOUX, O. **Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non isotopic DNA probes**. *Journal of Applied Bacteriology*, v.71, p.501–508, 1991.

LONVAUD-FUNEL, A. **Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine**. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.76, p.317-331, 1999.

LONVAUD-FUNEL, A. **Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria**. *FEMS Microbiology Letters*, v.199, p.9–13, 2001.

LONVAUD-FUNEL, A. **Lactic acid bacteria in winemaking: Influence on sensorial and hygienic quality**. *Progress in Industrial Microbiology*, v.36, p.231-262, 2002.

LOSSO, F. B. **A Produção de Vinhos Finos de Altitude na Região Vitivinícola de São Joaquim (SC): Uma Alternativa para o Turismo?** Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Turismo e Hotelaria ao Programa de Mestrado Acadêmico *Stricto*

*Sensu* em Turismo e Hotelaria, Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Educação de Balneário Camboriú, 2010.

LOUBIERE, P.; SALOU, P.; LEROY, M. J.; LINDLEY, N. D.; PAREILLEUX, A. **Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures.** *Journal of Bacteriology*, v.174, p.5302–5308, 1992.

LOUBSER, P. A.; du PLESSIS, H. W.; AUGUSTYN, O. P. H. **Investigation of factors affecting malolactic fermentation in wine.** *Final Report*, p.1-11, 2003.

LOUBSER, P. A. **Familiarise yourself with Malolactic Fermentation.** *Wynboer Technical Yearbook*, v.5, p.32-33, 2004.

LOUBSER, P. A. **Environmental Factors Affecting Malolactic Fermentation.** In: *Malolactic Fermentation in Wine* (Morenzoni, R). Lallemand Inc., Canadá, p.71-76, 2005.

LUCENA, A. P. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; MACIEL, J. A. C.; TAVARES, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. **Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines.** *Journal of Food Composition and Analysis*, v.23, p.30–36, 2010.

MACHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Phenolic compounds in fruit processing.** In: *Fruit Phenolics*. CRC Press, Estados Unidos da América, p.1–91 e 323–332, 1990.

MAICAS, S.; PARDO, I.; FERRER, S. **The effects of freezing and freeze-drying of *Oenococcus oeni* upon induction of malolactic fermentation in red wine.** *International Journal of Food Science and Technology*, v.35, p.75-79, 2000.

MAMLOUK, D.; HIDALGO, C.; TORIJA, M.; GULLO, M. **Evaluation and optimization of bacterial genomic DNA extraction for no-culture techniques applied to vinegars.** *Food Microbiology*, v.28, p.1374-1379, 2011.

de MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. **A medium for the cultivation of lactobacilli.** *Journal of Applied Bacteriology*, v.23, p.130–135, 1960.

MANFROI, L.; SILVA, P. H. A.; RIZZON, L. A.; SABAINI, P. S.; GLÓRIA, M. B. A. **Influence of alcoholic and malolactic starter**

**cultures on bioactive amines in Merlot wines.** *Food Chemistry*, v.116, p. 208–213, 2009.

MELLO, C. E. C. **A história do vinho no Brasil.** *Revista Adega*. Editora Inner, 2009. Disponível em: <http://revistaadega.uol.com.br/Edicoes/61/artigo191123-1.asp>. Acesso em agosto de 2013.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2012.** *Comunicado Técnico 137*. Embrapa Uva e Vinho, 2013.

MILLS, S.; McAULIFFE, O. E.; COFFEY, A.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. **Plasmids of lactococci – genetic accessories or genetic necessities?** *FEMS Microbiology Reviews*, v.30, p.243–273, 2006.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C.; JORGANES, F.; MUÑOZ, R. **Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine.** *International Journal of Food Microbiology*, v.84, p.117–123, 2003.

MÜLLER-THURGAU, H. **Ergebnisse neuer Untersuchungen auf den Gebiete der Weinbereitung.** *Weinbau und Weinhandel*, v.9, p.421–428, 1891.

MÜLLER-THURGAU, H.; OSTERWALDER, A. **Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen.** *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 2.Abt, v.36, p.129–338, 1913.

MUÑOZ, R.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; DE LAS RIVAS, B. **Lactic Acid Bacteria.** In: *Molecular Wine Microbiology* (Carrascosa, A. V. et al.). Academic Press, Estados Unidos da América, p.191–226, 2011.

NEELEY, E. T.; PHISTER, T. G.; MILLS, D. A. **Differential Real-Time PCR Assay for Enumeration of Lactic Acid Bacteria in Wine.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.12, p.8954–8957, 2005.

NIELSEN, J. C.; RICHELIEU, H. **Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.740–745, 1999.

OLSEN, E. B.; RUSSELL, J. B.; HENICK-KLING, T. **Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis of energy derivation from malolactic fermentation.** *Journal of Bacteriology*, v.173, p.6199–6206, 1991.

ORDUÑA, M. R.; PATCHETT, M. L.; LIU, S. Q.; PILONE, G. J. **Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.1657-1662, 2001.

PASSOS, F. V.; FLEMING, H. P.; HASSAN, H. M.; McFEETERS, R. F. **Effect of malic acid on the growth kinetics of *Lactobacillus plantarum*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.63, p.207–211, 2003.

PASTEUR, L. **Études sur le Vin.** 2ª Edição, Savy, França, 1873.

PETRI, A.; PFANNEBECKER, J.; FRÖHLICH, J.; KÖNIG, H. **Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR.** *Food Microbiology*, v.33, p.48-54, 2013.

PINZANI, P.; BONCIANI, L.; PAZZAGLI, M.; ORLANDO, C.; GUERRINI, S.; GRANCH, L. **Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR.** *Letters in Applied Microbiology*, v.38, p.118–124, 2004.

du PLESSIS, H.; DICKS, L.; LAMBRECHTS, M.; PRETORIUS, I.; du TOIT, M. **Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines.** *International Journal of Food Microbiology*, v.91, p.19-29, 2004.

POWELL, C.; VAN ZANDYCKE, S.; DEGRÉ, R. **The Microbiology of Malolactic Fermentation.** In: *Malolactic Fermentation in Wine* (Morenzoni, R). Lallemand Inc., Canadá, p.37-48, 2005.

POZO-BAYÓN, M. A.; ALEGRÍA, E. G.; POLO, M. C.; TENORIO, C.; MARTÍN-ALVAREZ, P. J.; CALVO DE LA BANDA, H. T.; RUIZ-LARREA, F.; MORENO-ARRIBAS, M. V. **Wine volatile and amino acid composition alter malolactic fermentation: effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.22, p.8729-8735, 2005.

PRAMATEFTAKI, P. V.; METAFA, M.; KARAPETROU, G.; MARMARAS, G. **Assessment of the genetic polymorphism and biogenic amine production of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Greek red wines.** *Food Microbiology*, v.29, p.113-120, 2012.

- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Áustria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2013.
- RADLER, F. **Microbial biochemistry**. *Experientia*, v.42, p.884–893, 1986.
- REGUANT, C.; BORDONS, A.; AROLA, L.; ROZÈS, N. **Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine**. *Journal of Applied Microbiology*, v.88, p.1065-1071, 2000.
- REGUANT, C.; BORDONS, A. **Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation**. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, p.344–353, 2003.
- RENAULT, P.; GAILLARDIN, C.; HESLOT, H. **Role of malolactic fermentation in lactic acid bacteria**. *Biochimie*, v.70, p.375–379, 1988.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. *Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley and Sons Ltd, Estados Unidos da América, 1998.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Phenolic compounds**. In: *Handbook of Enology*, v. 2. Wiley, Inglaterra, p.129–183, 2000.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. **Microbiología del vino. Vinificaciones**. In: *Tratado de Enología*. Edición Hemisferio Sur, França, p.151-155, 2003.
- RODAS, A. M.; FERRER, S.; PARDO, I. **16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine**. *Systematic and Applied Microbiology*, v.26, p.412-422, 2003.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. **Extração de DNA de plantas**. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, v.2, n.9, p.40-43, 1999.
- ROSI, I.; NANNELLI, F.; GIOVANI, G. **Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae***. *LWT - Food Science and Technology*, v.42, p.525–530, 2009.

ROSIER, J. P.; BRIGHENTI, E.; SCHUCK, E.; BONIN, V. **Comportamento da variedade Cabernet Sauvignon cultivada em vinhedos de altitude em São Joaquim – SC.** In: *Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*. Brasil, 2004.

SALEMA, M.; LOLKEMA, J. S.; SAN ROMAO, M. V.; LOUREIRO DIAS, M. C. **The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation.** *Journal of Bacteriology*, v.178, p.3127–3132, 1996.

SALOU, P.; LEROY, M. J.; GOMA, G.; PAREILLEUX, A. **Influence of pH and malate–glucose ratio on the growth kinetics of *Leuconostoc oenos*.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.36, p.87–91, 1991.

SALOU, P.; LOUBIERE, P.; PAREILLEUX, A. **Growth and energetics of *Leuconostoc oenos* during co-metabolism of glucose with citrate or fructose.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, p.1459–1466, 1994.

SÁNCHEZ, A.; RODRÍGUEZ, R.; COTON, M.; COTON, E.; HERRERO, M.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. **Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider.** *Food Research International*, v.43, p.2101–2107, 2010.

SATO, H.; YANAGIDA, F.; SHINOHARA, T.; YOKOTSUKA, K. **Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16s rRNA Genes in Lactic Acid Bacteria Isolated from Red Wine.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.90, n.3, p.335–337, 2000.

SATO, H.; YANAGIDA, F.; SHINOHARA, T.; SUZUKI, M.; SUZUKI, K.; YOKOTSUKA, K. **Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan.** *FEMS Microbiology Letters*, v.202, n.1, p. 109–114, 2001.

SEMON, M. J.; EDWARDS, C. G.; FORSYTH, D.; CO DINN, C. **Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*.** *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v.7, p.52–59, 2001.

SILLA-SANTOS, M. H. **Biogenic amines: their importance in foods.** *International Journal of Food Microbiology*, v.29, p.213–231, 1996.

SOHIER, D.; COULON, J.; LONVAUD-FUNEL, A. **Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis***. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49, p.1075-1081, 1999.

SOZZI, T.; GNAEGI, F.; D'AMICO, N.; HOSE, H. **Difficultés de fermentation malolactique du vin dues a des bacteriophages de *Leuconostoc oenos***. *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, v.14, p.17-23, 1982.

SPECHT, G. **Guidelines for using commercial strains**. In: *Malolactic Fermentation in Wine* (Morenzoni, R). Lallemand Inc., Canadá, p.81-84, 2005.

STOCKLEY, C. S. **Can histamine in wine cause adverse reactions for consumers?** *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, v.77, p.79-82, 2004.

TEN BRINK, B. L.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H. M. L. J.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. **Occurrence and formation of biologically amines in food**. *International Journal of Food Microbiology*, v.11, p.73-84, 1990.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. **Microbiologia**. 8ª edição, 1ª reimpressão, Artmed, Porto Alegre, 2006.

VAN VUUREN, H. J. J.; DICKS, L. M. T. ***Leuconostoc oenos*: A review**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.44, p.99-112, 1991.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; de VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. **Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics**. *Microbiological Reviews*, v.60, n.2, p.407-438, 1996.

VIGENTINI, I.; PICOZZI, C.; TIRELLI, A.; GIUGNI, A.; FOSCHINO, R. **Survey on indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from red wines of Valtellina, a cold climate wine-growing Italian area**. *International Journal of Food Microbiology*, v.136, p.123-128, 2009.

VILA-CRESPO, J.; RODRIGUEZ-NOGALES, J. M.; FERNANDÉZ-FERNANDÉZ, E.; HERNANZ-MORAL, M. C. **Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions**. In: *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* (Méndez-Vilas, A.). Formatex Research Center, Espanha, p. 920-929, 2010.

VIVAS, N.; LONVAUD-FUNEL, A.; GLORIES, Y. **Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium.** *Food Microbiology*, v.14, p.291–300, 1997.

VIVAS, N.; AUGUSTIN, M.; LONVAUD-FUNEL, A. **Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus Oeni* (*Leuconostoc Oenos*, 8413).** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p.1675-1678, 2000.

de VUYST, L.; VANCANNEYT, M. **Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria.** *Food Microbiology*, v.24, p.120–127, 2007.

WIBOWO, D.; ESCHENBRUCH, R.; DAVIS, C. R.; FLEET, G. H.; LEE, T. H. **Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review.** *American Journal of Enology and Viticulture*, v.36, n.4, p.302–313, 1985.

WOOD, W. A. **Fermentation of carbohydrates and related compounds.** In: *The Bacteria* (Gunsalus, I. C. e Stanier, R. Y.). Academic Press, Estados Unidos da América, p. 59–149, 1961.

ZAPPAROLI, G.; TORRIANI, S.; PESENTE, P.; DELLAGLIO, F. **Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine.** *Letters in Applied Microbiology*, v.27, n.5, p.243-246, 1998.

ZHANG, D.; LOVITT, R. W. **Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures.** *Journal of Applied Microbiology*, v.99, p.565–572, 2005.

ZHANG, D.; LOVITT, R. W. **Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.81, p.1130-1140, 2006.

## ANEXO A

## FICHA DE DEGUSTAÇÃO

Degustador: \_\_\_\_\_

Data:   

Amostra N°		1 Safra:					2 Safra:					3 Safra:					4 Safra:					5 Safra:				
Tipo de Vinho																										
Descritores		Excelente	Muito Bom	Bom	Regular	Insuficiente	Excelente	Muito Bom	Bom	Regular	Insuficiente	Excelente	Muito Bom	Bom	Regular	Insuficiente	Excelente	Muito Bom	Bom	Regular	Insuficiente	Excelente	Muito Bom	Bom	Regular	Insuficiente
Visual	Limpidez	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1	5	4	3	2	1
	Aspecto	10	8	6	4	2	10	8	6	4	2	10	8	6	4	2	10	8	6	4	2	10	8	6	4	2
Olfato	Intensidade	8	7	6	4	2	8	7	6	4	2	8	7	6	4	2	8	7	6	4	2	8	7	6	4	2
	Nitidez	6	5	4	3	2	6	5	4	3	2	6	5	4	3	2	6	5	4	3	2	6	5	4	3	2
	Qualidade	16	14	12	10	8	16	14	12	10	8	16	14	12	10	8	16	14	12	10	8	16	14	12	10	8
Gosto	Intensidade	8	7	6	4	2	8	7	6	4	2	8	7	6	4	2	8	7	6	4	2	8	7	6	4	2
	Nitidez	6	5	4	3	2	6	5	4	3	2	6	5	4	3	2	6	5	4	3	2	6	5	4	3	2
	Qualidade	22	19	16	13	10	22	19	16	13	10	22	19	16	13	10	22	19	16	13	10	22	19	16	13	10
	Persistência	8	7	6	5	4	8	7	6	5	4	8	7	6	5	4	8	7	6	5	4	8	7	6	5	4
Aspecto Global		11	10	9	8	7	11	10	9	8	7	11	10	9	8	7	11	10	9	8	7	11	10	9	8	7
Total de Pontos		Soma:																								

Amostra 1: \_\_\_\_\_

Amostra 2: \_\_\_\_\_

Amostra 3: \_\_\_\_\_

Amostra 4: \_\_\_\_\_

Amostra 5: \_\_\_\_\_