

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA FERMENTAÇÃO
MALOLÁTICA DE VINHOS

Giovanni Colussi da Luz

CAXIAS DO SUL

2018

Giovanni Colussi da Luz

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA FERMENTAÇÃO
MALOLÁTICA DE VINHOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray

CAXIAS DO SUL

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

L979s Luz, Giovanni Colussi da, 1991-
Seleção de bactérias para fermentação malolática de vinhos / Giovanni
Colussi da Luz. – 2018.
122 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare.

Coorientação: Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna.

1. Vinho e vinificação. 2. Fermentação. 3. Bactérias. I. Delamare, Ana
Paula Longaray, orient. II. Laguna, Sérgio Echeverrigaray, coorient. III.
Título.

CDU 2. ed.: 663.2

Índice para o catálogo sistemático:

1. Vinho e vinificação	663.2
2. Fermentação	663.14/.16
3. Bactérias	561.23

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Paula Fernanda Fedatto Leal – CRB 10/2291

GIOVANNI COLUSSI DA LUZ

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PARA FERMENTAÇÃO MALOLÁTICA DE VINHOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Longaray Delamare
Coorientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23 DE FEVEREIRO DE 2018.

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Longaray Delamare

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

AGRADECIMENTOS

Ao vô Arlindo[†] e vó Udila[†] pelo aprendizado, apoio, auxílio, dedicação e empenho para que eu me tornasse o que sou hoje. Gostaria que vocês pudessem compartilhar desse momento comigo. Amo vocês!!

À minha mãe Silvane e meu irmão Nataniel pela ajuda incondicional.

À minha filha canina BiLL por sempre estar ao meu lado e pelo amor instintivo. Eu te amo! ♥

Aos meus amigos: Daniel e Daniela por serem presentes em todos os momentos. Em especial ao meu amigo Daniel pelo apoio e correção dos erros da vida!

À minha banca de acompanhamento, Professor Aldo e Professora Mirian pelas excelentes contribuições.

Aos colegas de laboratório pela ajuda, conselhos e momentos de angústia compartilhados.

À Elsia e Gilmar por me ajudarem e me tratarem como um filho. E à Lais por me chamar de “maninho”.

Agradeço também à CAPES pela bolsa integral de mestrado e aos demais órgãos de fomento à pesquisa FAPERGS e CNPq, bem como a Universidade de Caxias do Sul.

Agradeço a todos por entenderem minhas ausências, por festejarem ao meu lado as pequenas e as grandes conquistas deste itinerário e, sobretudo, por acreditarem desde o princípio que tudo isso era possível. Obrigado!

*...A hero is an ordinary individual who finds strength
to resist despite devastating obstacles!*

Christopher Reeve

RESUMO

Os vinhos brasileiros, principalmente do Rio Grande do Sul, apresentam, muitas vezes, elevada acidez decorrente da maturação diferente das uvas. Esta acidez é determinada por altas concentrações de ácido málico. Para atenuar a acidez fixa nos vinhos, os mostos são submetidos à fermentação malolática durante ou seguidamente a fermentação alcoólica. Na prática enológica, essa fermentação representa problemas, ocorrendo de forma descontrolada e em muitos casos não chegando a finalizar. Ainda que muitas vezes eficiente, a fermentação malolática espontânea, dependente das bactérias presentes na uva ou na cantina, varia de fermentação para fermentação e de ano para ano, sendo hoje um dos pontos críticos no processo de vinificação. Estirpes de *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus* sp., espécies de bactérias lácticas, são predominantes nesse processo fermentativo. Os parâmetros como pH, dióxido de enxofre (SO₂), conteúdo alcoólico e temperatura são os mais importantes que afetam o desempenho dessas bactérias no vinho. Outras espécies bacterianas podem adicionar características indesejáveis no produto final, como a produção de amins bioativas, odor impertinente e bacteriocinas que inibem a fermentação malolática. Esse trabalho visou a seleção e identificação de bactérias lácticas nativas de vinícolas da Serra Gaúcha. Foram isoladas 34 bactérias provenientes de amostras de vinhos que se encontravam em fase de fermentação malolática, e dessas, apenas 16 foram classificadas como lácticas, pois apenas essas apresentaram características de catalase negativa, Gram positivas e imóveis. Nem todas as 16 bactérias obtiveram bom crescimento em meio líquido. O ensaio fermentativo de glicose com avaliação da produção de ácido e gás demonstraram que alguns isolados não acidificaram e nem produziram gás. Já o teste de fermentação de carboidratos, que utilizou 14 carboidratos, constatou que as bactérias possuem preferência em metabolizar dissacarídeos e monossacarídeos. Nos testes fermentativos em mosto sintético, alguns isolados conseguiram alterar significativamente o pH, reduzindo a acidez, porém não apresentaram turbidez. A fermentação malolática nesse experimento foi acompanhada qualitativamente em cromatografia de papel e, mesmo com problemas de crescimento, alguns isolados conseguiram efetuar uma boa fermentação malolática. Com relação à avaliação da sensibilidade ao metabissulfito de potássio (K₂S₂O₅), diferentes níveis de pH e diferentes concentrações de etanol, os isolados desenvolveram-se melhor nas concentrações mais baixas de K₂S₂O₅ e em graduação alcóolica menor. Os níveis de pH próximos a 3,5 foram os preferidos para o desenvolvimento bacteriano. A existência da microvinificação em vinho sintético com grau etanólico de 10%, apenas por quatro isolados que demonstraram boa fermentação malolática em mosto, certificou que quanto menor a concentração de álcool, menor também é a interferência na fermentação. Nesse experimento avaliou-se a degradação málica quali/quantitativamente, com utilização de cromatografia de papel e kit enzimático. Houve alteração de pH, comprovando a conversão do ácido málico em láctico por todos os isolados. A classificação final dos isolados os enquadraram com as espécies *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus plantarum*.

Palavras-chave: *Oenococcus oeni*, vinho, fermentação malolática.

ABSTRACT

Brazilian wines, mainly from Rio Grande do Sul, often have high acidity due to the different maturation of the grapes. This acidity is determined by high concentrations of malic acid. In order to attenuate the fixed acidity in the wines, the musts are subjected to malolactic fermentation during or after the alcoholic fermentation. In oenological practice, this fermentation represents problems, occurring in an uncontrolled way and in many cases not coming to an end. Although often efficient, spontaneous malolactic fermentation, depending on the bacteria present in the grape or canteen, varies from fermentation to fermentation and from year to year, and is now one of the critical points in the winemaking process. Strains of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus* sp., Species of lactic bacteria, are predominant in this fermentation process. Parameters such as pH, sulfur dioxide (SO₂), alcohol content and temperature are the most important that affect the performance of these bacteria in wine. Other bacterial species may add undesirable characteristics to the final product, such as the production of bioactive amines, impertinent odor and bacteriocins that inhibit malolactic fermentation. This work aimed at the selection and identification of native lactic bacteria from the Serra Gaúcha wineries. A total of 34 bacteria were isolated from samples of malolactic fermentation, of which only 16 were classified as lactic acid. Not all 16 bacteria obtained good growth in liquid medium. The fermentative glucose test with evaluation of acid and gas production showed that some isolates did not acidify or produce gas. Already the carbohydrate fermentation test, which used 14 carbohydrates, found that the bacteria have a preference in metabolizing disaccharides and monosaccharides. In the fermentative tests in synthetic wort, some isolates were able to significantly alter the pH, reducing the acidity, but did not present turbidity. The malolactic fermentation in this experiment was accompanied qualitatively in paper chromatography and, even with growth problems, some isolates were able to effect a good malolactic fermentation. With respect to the evaluation of the sensitivity to potassium metabisulphite (K₂S₂O₅), different pH levels and different concentrations of ethanol, the isolates were better developed at lower concentrations of K₂S₂O₅ and lower alcoholic strength. PH levels near 3.5 were preferred for bacterial development. The existence of microvinification in synthetic wine with 10% ethanolic degree, only by four isolates that demonstrated good malolactic fermentation in must, certified that the lower the alcohol concentration, the lower the interference in the fermentation. In this experiment, the degradation was evaluated qualitatively / quantitatively, using paper chromatography and enzymatic kit. There was a change in pH, confirming the conversion of malic acid to lactic acid by all isolates. The final classification of the isolates included the species *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum*.

Key-words: *Oenococcus oeni*, wine, malolactic fermentation.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	6
SUMÁRIO	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE QUADROS.....	11
LISTA DE FIGURAS	12
NOMENCLATURA.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 O VINHO	18
2.2 A FERMENTAÇÃO MALOLÁTICA E A PRODUÇÃO DE VINHOS	20
2.3 BACTÉRIAS RESPONSÁVEIS PELA FML.....	24
2.3.1 ESPÉCIES DE BACTÉRIAS LÁTICAS	26
2.4 METABOLISMO DE BAL NO VINHO	33
2.5 INTERFERÊNCIAS NA FML.....	37
2.5.1 DEMAIS FATORES INTERFERENTES.....	40
2.6. INTERAÇÕES ENTRE POPULAÇÕES	41
2.6.1 OUTROS MICROORGANISMOS E BAL	41
2.6.2 BACTERIÓFAGOS.....	42
2.7 SELEÇÃO DE BAL PARA A FERMENTAÇÃO E CULTURAS STARTER.....	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 COLETA, ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS ..	49
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS ISOLADAS	52
3.2.1 TESTES BIOQUÍMICOS.....	52
3.3 CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO	53
3.4 FERMENTAÇÕES DE CARBOIDRATOS E ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO	54
3.4.1 TESTE DE FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS	54
3.4.2 FERMENTAÇÃO EM MOSTO SINTÉTICO	55

3.4.3 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS	58
3.4.4 MICROVINIFICAÇÕES E AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO	59
3.5 CLASSIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	61
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 COLETA, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO	64
4.2 TESTE DE CATALASE	68
4.3 COLORAÇÃO DE GRAM.....	68
4.4 TESTE DE MOBILIDADE CELULAR.....	71
4.5 CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO	72
4.6 FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS	74
4.7 FERMENTAÇÃO EM MOSTO SINTÉTICO	75
4.8 CRESCIMENTO DOS ISOLADOS EM DIFERENTES PH, CONCENTRAÇÕES DE ETANOL E K₂S₂O₅	82
4.9 MICROVINIFICAÇÕES DE ISOLADOS COM POTENCIAL DE FML.....	84
4.10 CLASSIFICAÇÃO DOS ISOLADOS SELECIONADOS	90
5 CONCLUSÕES.....	95
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	96
7 REFERÊNCIAS.....	97
8 ANEXOS	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações sensoriais que podem ser produzidas nos vinhos pelas BAL.	35
Tabela 2. Escalas de pH, concentração de etanol e metabissulfito de potássio utilizados no ensaio.....	58
Tabela 3. Amostras coletadas com a descrição de variedades, e descrição dos microrganismos identificados.	65
Tabela 4. Bactérias isoladas das amostras de vinhos – teste de catalase e coloração de Gram.	69
Tabela 5. Características microscópicas e macroscópicas de isolados bacterianos catalase negativo e Gram positivos.....	70
Tabela 6. Avaliação do mosto sintético após fermentação de dez dias com isolados bacterianos.....	79
Tabela 7. Crescimento dos isolados em diferentes condições enológicas (pH, concentrações de K ₂ S ₂ O ₅ e graduação alcóolica).	82
Tabela 8. Variações de pH dos vinhos após fermentação dos isolados.....	86
Tabela 9. Classificação final dos isolados e da bactéria comercial.	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies de BAL isoladas a partir de uvas, mostos e vinhos.	27
Quadro 2. Resultados da fermentação de carboidratos e manitol em placa de cultura.	74
Quadro 3. Relação dos isolados selecionados até o experimento de caracteres enológicos. ..	83
Quadro 4. Caracterização completa das linhagens obtidas neste trabalho.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de descarboxilação do ácido málico.....	21
Figura 2. Conversão de ácido L-Málico em L-Lático com liberação de CO ₂	22
Figura 3. Movimentos de prótons associados com a conversão málica para ácido lático e liberação de CO ₂	23
Figura 4. Dinâmica das populações de BAL durante a produção de vinhos.	28
Figura 5. Imagem em alta resolução (microscopia de varredura) de <i>Oenococcus oeni</i>	29
Figura 6. Possíveis rotas bioquímicas e subprodutos da FML.	34
Figura 7. Mapa dos municípios onde se localizam as vinícolas que foram visitadas para a coleta das amostras e o número de amostragens obtidas.	49
Figura 8. Distribuição (%) de vinícolas de acordo a diferentes métodos analíticos para a detecção de fermentação malolática.	67
Figura 9. Microscopia de alguns dos isolados bacterianos de vinho.....	69
Figura 10. Características morfológicas de alguns isolados.....	71
Figura 11. Crescimento em meio líquido dos isolados bacterianos.	73
Figura 12. Cromatografia de papel, demonstrando a capacidade de fermentação malolática dos isolados em mosto sintético.	77
Figura 13. Comparação entre crescimento em meio líquido YEPD e mosto sintético.....	81
Figura 14. Cromatografia demonstrando a eficiência da FML em vinho sintético (8%).....	87
Figura 15. Cromatografia demonstrando a eficiência FML em vinho sintético (10%).....	87
Figura 16. Degradação de ácido málico em fermentação malolática executada pelos isolados COM, GLAC03, GLAC06, GLAC11 e GLAC28, em vinho sintético com conteúdo inicial de 10g/L de ácido málico.	89
Figura 17. Árvore estabelecida pelo método de Máxima Verossimilhança com <i>Bootstrap</i> de 500 réplicas.....	91

NOMENCLATURA

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
16S	Subunidade 16S do RNA ribossomal/ribossômico
AA	Aminoácidos
ACPI	2-Acetil-1-pirrolina
ACTPI	2-acetil-tetrahidropiridina
ATM	Atmosfera
ATP	Trifosfato de adenosina
BAL	Bactéria láctica
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
D-	Dextrogiro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>et al</i>	E colaboradores
ETOH	Etanol/álcool etílico
ETPI	2-Etiltetrahidropiridina
FML	Fermentação malolática
g	Gramas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HSO ⁻³	Íon bissulfito/Sulfito de hidrogênio
IBRAVIN	Instituto brasileiro do vinho
K ₂ S ₂ O ₅	Metabissulfito de potássio
L	Litro
L-	Levogiro
log	Logarítmo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MleP	Malato permease
MLO	<i>Medium for Leuconostoc</i>
N.R.	Não relatado
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina + hidrogênio (forma reduzida)
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₃	Amônia
n°	Número

O_2^{-2}	Ânion peróxido
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
rDNA	DNA ribossomal/ribossômico
R_f	Fator de retenção
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
S	Enxofre
SO_2	Dióxido de enxofre/anidrido sulfuroso
sp.	Epíteto específico
spp.	Todas as espécies dentro do gênero
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
YEPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>
α	Alfa
β	Beta
Δp	Diferença de potencial

1 INTRODUÇÃO

Os vinhos brasileiros, em especial os da Serra Gaúcha, caracterizam-se por apresentar alta acidez decorrente da maturação incompleta das uvas. Esta acidez é demarcada por elevadas concentrações de ácido málico e demais ácidos, e para reduzi-la, os mostos são submetidos à fermentação malolática ao longo ou após a fermentação alcoólica. Enquanto a transformação dos açúcares em etanol é realizada por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), a bioconversão de ácido málico em ácido láctico é processada por bactérias lácticas, dentre as quais a mais importante é *Oenococcus oeni*.

A eficiência da fermentação malolática depende de vários fatores que interferem com o desenvolvimento e fisiologia bacteriana, entre os quais a presença de sulfito livre, acidez total, concentração de ácido málico, teor alcoólico do vinho, presença de açúcares redutores, entre outros. Além disso, a falta de informação das técnicas adequadas e erros de processo em vinícolas também resultam na ineficácia da fermentação.

Na prática enológica da região, a execução da fermentação malolática representa um problema quando as bactérias são inoculadas, pela ausência de preparo do inóculo adequado e quando as bactérias são nativas do vinho e pela falta de acompanhamento adequado da fermentação. Em consequência, os vinhos podem apresentar elevado conteúdo de ácido málico que determina acidez elevada e instabilidade do produto final, podendo resultar inclusive em fermentações maloláticas após o envase.

As condições edafoclimáticas e fitossanitárias peculiares da Serra Gaúcha fazem com que a maior parte das vinícolas utilize altas concentrações de sulfito (>150mg/L) no início da fermentação alcoólica para evitar problemas oxidativos enzimáticos e o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Porém, a atividade antimicrobiana deste produto, quando adicionado antes ou durante a fermentação alcoólica, leva com frequência à inibição ou retardo da fermentação malolática.

Tentativas de utilização de bactérias lácticas selecionadas na Europa nem sempre têm se mostrado eficazes e a maior parte das vinícolas utilizam a fermentação malolática espontânea (bactérias já presentes na cantina), já que as espécies no mercado são limitadas e o seu custo é elevado. A fermentação malolática espontânea, dependente das bactérias presentes na uva e dentro da cantina, variando de fermentação para fermentação e de ano para ano. É importante ressaltar que nem todas as espécies de bactérias lácticas agregam características interessantes ao vinho. Muitas espécies ou até mesmo estirpes dentro de uma espécie produzem componentes que depreciam a qualidade da bebida.

A escolha de variantes eficientes e de requisitos para uma boa fermentação malolática executada por bactérias nativas, acaba fazendo com que esse processo seja um desafio. Quando as bactérias não são nativas, ou seja, são inoculadas, a preparação inadequada do inóculo, um erro grave cometido por parte da indústria vinícola, contribui para a ineficácia da fermentação malolática e, conseqüentemente, aumenta os gastos, já que o custo de estirpes comerciais é elevado.

O isolamento de bactérias potenciais para esse processo fermentativo é importante não somente pelo que agrega ao vinho, como por exemplo a redução da acidez gustativa e o sabor; mas também instiga a melhora e/ou reavaliação dos

procedimentos técnicos empregados na indústria para a inoculação dessas bactérias e para o devido acompanhamento desta fermentação, bem como o desenvolvimento de novas metodologias que consigam salientar os atributos regionais do vinho gaúcho.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo, a seleção e a identificação de bactérias de fermentações maloláticas isoladas de fermentações espontâneas realizadas em vinícolas da região serrana do Rio Grande do Sul e determinar sua tolerância a sulfito e a etanol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O vinho

A produção de vinho pode ser considerada como uma das tecnologias mais antigas da humanidade, precedendo inclusive a produção de pão (RIBÉREAU-GAYON, 1985). Os primeiros indícios do consumo do vinho aconteceram há cerca de 7.000 anos, na região do Mediterrâneo. Relatos históricos indicam o uso medicinal do vinho pelo homem há mais de 2.000 anos. Antigas civilizações como a dos romanos, egípcios, gregos e hindus utilizavam o vinho como um remédio para o corpo e para a alma (LOVATO & WAGNER, 2014).

Registros apontam que, no Rio Grande do Sul, a videira foi introduzida por volta de 1.626 pelo jesuíta, natural de Buenos Aires, Roque Gonzáles, na cidade de São Nicolau, na fase que antecedeu os Sete Povos das Missões (VALDUGA, 2007).

Já na região da Serra Gaúcha, a viticultura foi implementada pelos imigrantes italianos no fim do século XIX, conquistando prestígio no século XX. Tornou-se uma das fontes do crescimento da economia na região, não apenas pela geração de renda, mas também porque oportunizou outras atividades que ampliaram a renda e construção de espaço (FALCADE, 2004).

O Rio Grande do Sul é o maior produtor de uvas do Brasil, concentrando em 2016 mais de 300 milhões de quilos de uvas, e na produção de vinhos foi responsável por mais de 107 milhões de litros. No total, o Estado comercializou cerca de 92,1

milhões de litros de vinhos e espumantes em 2016 para países como Chile, Argentina, Portugal, Itália, França e outros, majoritariamente. No ano de 2017, mais de 303 milhões de litros de vinhos, entre vinhos viníferas e comuns, foram produzidos. Além disso, os vinhos de mesa são os mais apreciados, sendo que em 2016 comercializou-se 166 milhões de litros entre empresas do próprio Rio Grande do Sul (IBRAVIN, 2016).

O vinho é considerado uma bebida de constituição complexa, devido às transformações químicas, físicas, biológicas e enzimáticas que transcorrem em seu processamento (RIZZON & MIELE, 2006). Inúmeros são os fatores aptos a afetar a qualidade de um vinho, entre eles podem ser citados: a variedade de uva, o perfil do solo, as variações climáticas, o manejo da planta e o processo de vinificação (SÁNCHEZ & DOKOOZLIAN, 2005).

A composição química do vinho tem papel primordial, pois participa diretamente nas suas características sensoriais como cor, sabor e adstringência. Os principais compostos encontrados em cultivares de *Vitis vinifera* são os ácidos fenólicos, as antocianinas, os taninos e o resveratrol, que passam da planta para a bebida (ZOCICHE, 2009).

De um modo geral, o processo de produção de vinhos envolve duas fermentações consecutivas: (a) a fermentação alcoólica e (b) a fermentação malolática (FML). Os microrganismos envolvidos nestes dois processos fermentativos são responsáveis por um complexo de biotransformações de carboidratos, substâncias aminadas, sulfuradas, entre outras precursoras encontradas no mosto da uva. Conjuntamente, estas modificações, adicionam características organolépticas ao produto final. Por consequência, a condução adequada das fermentações alcoólica e

malolática são de fundamental importância na qualidade do vinho (RIBÉREAU-GAYON *et al*, 2006). O papel desses microrganismos fermentadores na formação do aroma foi pressuposto por Pasteur em 1876 e sustentado por diversos pesquisadores que o sucederam (TONET, 2007).

2.2 A fermentação malolática e a produção de vinhos

O avanço da tecnologia que ocorreu principalmente na segunda metade do século XX resultou em progressos significativos no conhecimento da bioquímica e das interações de leveduras, bactérias lácticas (BAL) e outros organismos no decorrer do processo de vinificação (ALCAIDE-HIDALGO, *et al* 2008). O processo biológico da vinificação é assim o resultado de uma sequência de transformações bioquímicas pela ação de múltiplas enzimas de diferentes microrganismos, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, que são responsáveis pela fermentação alcoólica, principal parte do processo, e de bactérias lácticas (predominantemente *Oenococcus oeni*), as quais são responsáveis por um seguimento secundário, a fermentação malolática (FML) (HERVÉ *et al*, 2004; ALCAIDE-HIDALGO, 2008). Por definição, a FML corresponde à degradação do ácido málico até ácido láctico por determinadas bactérias, com uma atenuação da acidez que suaviza o paladar; ela é indispensável para os vinhos tintos, e menos generalizada em vinhos brancos. Em função de distintos fatores, contudo, os produtos com ela obtidos podem ser sensivelmente diferenciados (RIBÉREAU-GAYON, 2001). A reação química fundamental da fermentação malolática é a transformação de ácido málico em ácido láctico pela enzima malolática (Figura 1).

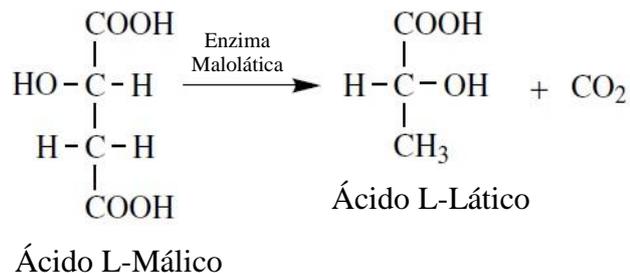


Figura 1. Reação de descarboxilação do ácido málico.

Fonte: Adaptado de Ribéreau-Gayon *et al*, 2006.

A conversão do ácido málico em ácido láctico é a única intervenção bacteriana efetivamente buscada na vinificação (MIGUEL, 2011). A descarboxilação do ácido L-málico é facilitada pela enzima malolática antes do lactato ser conduzido para fora da célula. Esse processo é regulado pela proteína malolática regulatória. A FML tecnicamente não é considerada uma fermentação (BETTERIDGE *et al*, 2015), visto que a denominação de fermentação se refere a processos que ocorrem na ausência de oxigênio, com a transformação de matérias orgânicas (carboidratos) em outras, liberando energia. A FML ainda é descrita como um processo complexo e pouco compreendido (BINATI, 2015), mas na sua reação, a descarboxilação do ácido L-málico para o ácido L-lático é uma conversão que requer NAD^+ e Mn^{+2} como cofatores (Figura 2) (BETTERIDGE *et al*, 2015).

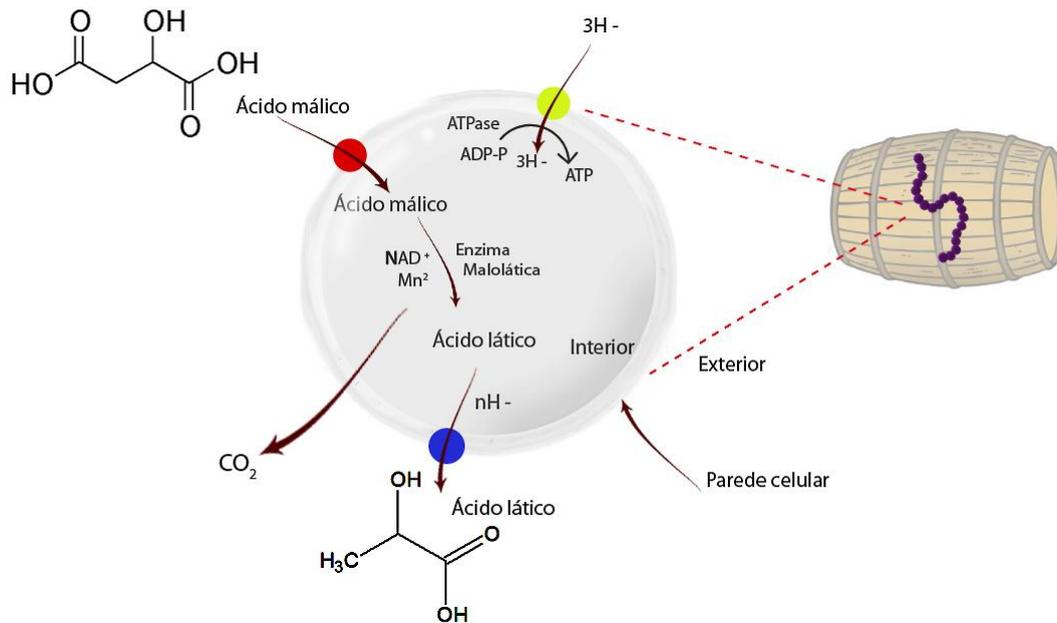


Figura 2. Conversão de ácido L-Málico em L-Lático com liberação de CO₂.

Fonte: Adaptado de Betteridge *et al*, 2015.

A fermentação alcoólica comumente precede a FML, já que as leveduras são superiormente adaptadas ao mosto, o qual contém alta concentração de açúcares (>210g/L) e baixo pH (3,0 a 3,3) (CARVALHO, 2011). A FML é substancial para a qualidade dos vinhos tintos. Pelo contrário, é preciso evitá-la em certos vinhos brancos secos, estimados pela sua frescura e pelo aroma (MIGUEL, 2011).

Com relação ao progresso da FML, podemos evidenciar que a energia metabólica disponível para a célula, que pode ser utilizada para diferentes funções como transporte, anabolismo e crescimento celular, está diretamente relacionada à força promovida pela diferença de potencial (Δp), gerada pela translocação de prótons através da membrana citoplasmática, com produção de energia (ATP) na bomba de prótons (em específico na proteína de membrana ATPsintase) que gera moléculas

energéticas durante o fluxo de H^+ gerado na conversão málica (HENICK-KLING, 1986).

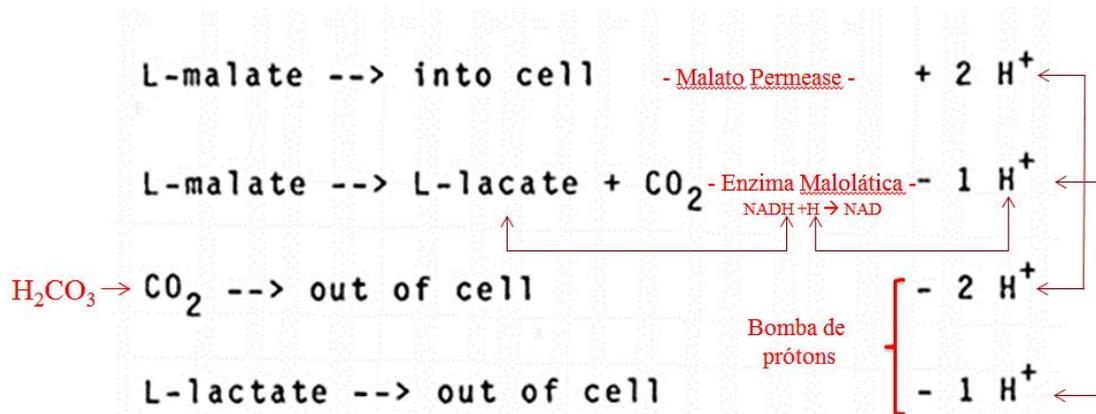


Figura 3. Movimentos de prótons associados com a conversão málica para ácido láctico e liberação de CO₂.

Fonte: Adaptado de Henick-kling, 1986.

O fluxo de prótons pode ser explicado pela Figura 3, onde demonstra que quando o ácido málico disponível no meio entra na célula pela Malato permeasse (MleP), carrega consigo um total de dois prótons H^+ que ficam disponíveis no interior celular aumentando a acidez no citosol. Com a conversão málica para ácido láctico através da ação da enzima malolática, com auxílio da coenzima NADH+H e cofator manganês, ocorre a oxidação desse NADH+H, sendo que um de seus prótons é utilizado para formar ácido láctico que foi descarboxilado (liberou uma molécula de CO_2), e o outro próton fica disponível no citosol. Após a formação de ácido láctico, liberação de CO_2 e aumento de número de prótons no interior celular, o produto dessa reação (ácido láctico) sai da célula pela mesma enzima que proporcionou a entrada do ácido málico, carregando consigo um próton. Já o CO_2 , funde-se com os dois prótons que entraram com o ácido málico, no início do processo, formando ácido carbônico (H_2CO_3). O ácido carbônico sai da célula pelo gradiente de potencial, por difusão simples pela

membrana. Quando no meio externo, dissocia-se em dois prótons $H^+ + CO_2$. A liberação dessas moléculas de CO_2 é o que gera a produção gasosa observada nessa etapa do processo de vinificação.

A dinâmica de prótons que resultou na saída do ácido láctico e ácido carbônico promove um Δp positivo, visto que entraram dois prótons na célula e saíram três. Essa diferença de gradiente promove a ação da ATPsintase pelo aumento do pH externo, forçando esses prótons a retornarem para dentro da célula. A cada três prótons que passam pela ATPsintase, gera-se então, uma molécula energética (ATP).

Pode-se dizer que o benefício energético celular não está diretamente ligado à conversão ácido-málica, mas sim à dinâmica e movimento de prótons (que acabam por sere movimentos organizados e com saldo positivo) concomitante à FML.

Além do decréscimo na acidez, pela conversão málica, a FML produz mudanças nas características organolépticas e acresce a estabilidade microbiológica dos vinhos. A modificação do sabor percebida após a FML deve-se ao ácido láctico, por ser menos hostil que o ácido málico (SILVA, 2005).

2.3 Bactérias responsáveis pela FML

O *Department of Viticulture and Enology* (2014), da Universidade da Califórnia, classifica como bactérias lácticas os microrganismos Gram positivos, de morfologia celular elipsoidal a cocos esféricos, muitas vezes encontrados em pares ou

em cadeias, imóveis, catalase negativa e aeróbicos para microaerofílicos (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

As bactérias lácticas também podem ser classificadas em três grupos relacionados ao modo como catabolizam carboidratos. Tais grupos assemelham-se por degradarem apenas hexoses, mas se distinguem pelo modo como a cadeia carbônica desses carboidratos é metabolizada (GOMES, 2009).

Dentre os grupos, o denominado homofermentativos obrigatórios, os carboidratos são convertidos quase que unicamente em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof (Glicólise) (COSTA, 2006; RIBÉREAU-GAYON *et al*, 2006; GOMES, 2009).

Já o grupo chamado de heterofermentativos obrigatórios, utiliza a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase para a fermentação de hexoses. Em condições de anaerobiose, hexoses são transformadas em quantidades equimolares de lactato, etanol e/ou acetato, gás carbônico e ATP (KANDLER, 1983; KANDLER & WEISS, 1986; GOMES, 2009).

O último grupo é chamado de heterofermentativos facultativos. Organismos relativos a esse grupo são capazes de fermentar hexoses de forma semelhante ao grupo homofermentativo. Porém, sob condições reduzidas de glicose, algumas espécies podem converter as hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol (KANDLER, 1983; KANDLER & WEISS, 1986). Devido ao pH de alguns vinhos ser baixo, não ocorre a transformação da glicose pela via heterofermentativa e devido à sua escassez, provavelmente a fermentação malolática é a única via para *O. oeni* produzir ATP pela dinâmica de prótons concomitante, através da ATPsintase (BARTOWSKY, 2005).

2.3.1 Espécies de bactérias lácticas

No decurso do processo de vinificação, as populações nativas de bactérias lácticas diversificam-se quantitativa e qualitativamente (LONVAUD-FUNEL, 1999). As espécies mais relevantes de BAL isoladas do processo de vinificação são: *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. hilgardii*, *Lb. brevis*, *Lb. confusus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus damnosus* e *O. oeni* (Quadro 1) (RIBÉRAU-GAYON *et al*, 2006). Estudos de bactérias lácticas em vinhos também já relataram o isolamento de *Weissella paramesenteroides* (BAE *et al*, 2005), *Weissella uvarum* (NISIOTOU *et al*, 2014), dentre outras espécies desse mesmo gênero. Habitualmente estas populações sofrem um declínio rápido e permanecem em número reduzido, podendo não se desenvolver até ao final da fermentação alcoólica (REGUANT *et al*, 2005).

Quadro 1. Espécies de BAL isoladas a partir de uvas, mostos e vinhos.

<u>Heterofermentativos</u>	<u>Heterofermentativos Facultativos</u>	<u>Homofermentativos</u>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lb. buchnerii</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Pc. damnosus</i>
<i>Lb. collinoides</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Pc. dextranicus</i>
<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. homohoichii</i>	<i>Pc. inopinatus</i>
<i>Lb. fructivorans</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Pc. parvutus</i>
<i>Lb. hilgardii</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Pc. pentosaceus</i>
<i>Lb. kunkeei</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Pediococcus spp.</i>
<i>Lb. sanfranciscensis</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lb. zaeae</i>	<i>Lb. jensenii</i>
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	<i>Lb. nagelli</i>	<i>Lb. mali</i>
<i>Leuconostoc spp.</i>	<i>Lb. diolivorans</i>	<i>Lb. vini</i>
<i>Weissella confusa</i>		
<i>W. paramesenteroides</i>		
<i>Oenococcus oeni</i>		
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>		
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>		

Fonte: Adaptado de Swiegers *et al*, 2005.

Excepcionalmente, pode ocorrer uma multiplicação rápida de células na fermentação alcoólica. Posteriormente a esta fase de latência, onde a duração depende das características do vinho, as células começam a multiplicar-se e entram na fase exponencial de reprodução, atingindo populações de 10^6 a 10^8 UFC/ml (Figura 4), sendo unicamente constituídas por estirpes de *O. oeni*, espécie que mais se multiplica nesta fase e que realiza a FML (REGUANT *et al*, 2005). No entanto, em determinadas ocasiões, como por exemplo em vinhos com pH mais alto (pH 3,5 a 4,0) pode-se ter um acréscimo da população de *Pediococcus spp.* e/ou de *Lactobacillus spp.* e estes serem os responsáveis pela fermentação (OLGUÍN *et al*, 2009).

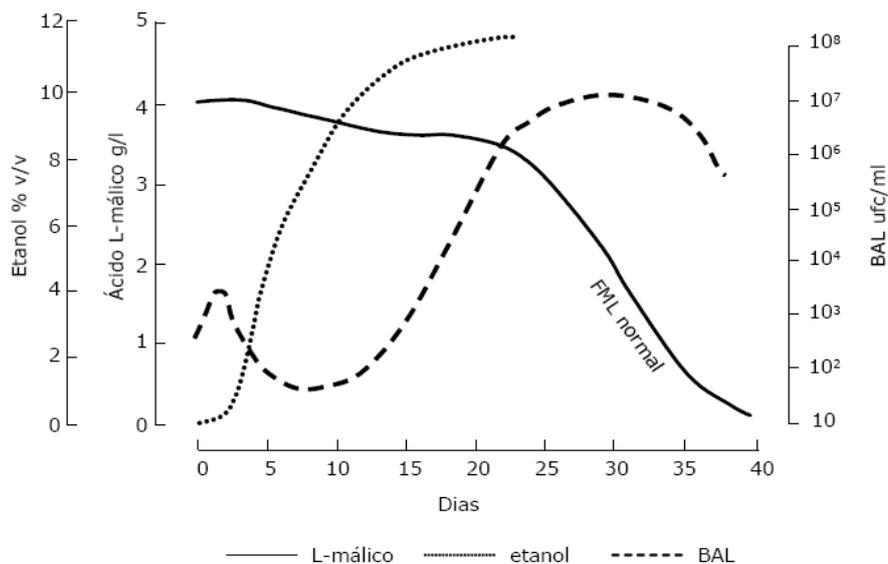


Figura 4. Dinâmica das populações de BAL durante a produção de vinhos.

Fonte: Fulgesang (1997).

Até o ano de 1995, a espécie mais relevante e importante no que diz respeito à FML (*O. oeni*) era classificada como *Leuconostoc oenos*. Um estudo publicado no mesmo ano, sugeriu a alteração taxonômica dessa espécie, baseado em uma avaliação filogenética das sequências 16S e 23S de rRNA, que identificou uma distinção de uma sequência quando comparada com outra BAL do gênero *Leuconostoc* spp. Em vista desta distinção, nomeou-se corrigidamente *Leuconostoc oenos* como *Oenococcus oeni* (Figura 5) (DICKS *et al*, 1995).

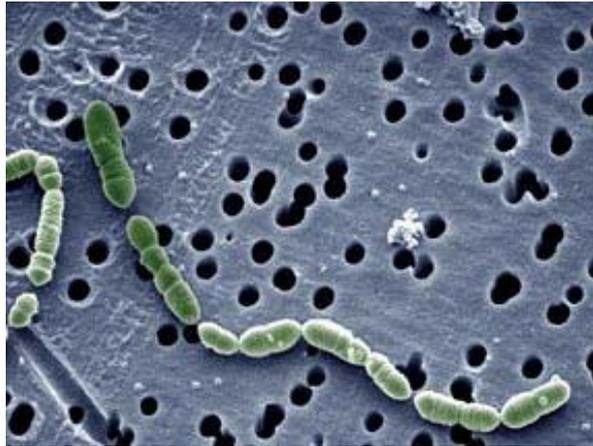


Figura 5. Imagem em alta resolução (microscopia de varredura) de *Oenococcus oeni*.
Fonte: *Department Of Viticulture and Enology - UC, 2014.*

Oenococcus oeni é descrito como a bactéria mais tolerante às condições da produção do vinho, isto é, baixo pH e alta concentração de etanol; por isso, o favoritismo em sua utilização (POZO-BAYON *et al*, 2005). Além disso, cepas de *O. oeni* não causam quaisquer efeitos deletérios sobre o sabor e o aroma, preservam o controle do tempo e a taxa de FML, além de reduzirem o potencial de deterioração por outras bactérias (SOLIERI *et al*, 2009). Inoculado o vinho com uma significativa concentração de *O. oeni*, aumenta-se a probabilidade de obtenção rápida e completa da FML (MAICAS *et al*, 1999).

Estudos apontam *O. oeni* como uma bactéria que apresenta possíveis efeitos benéficos (probióticos). A cepa IOEB 9115 apresentou potencial anti-inflamatório e aliviou significativamente os sintomas de colite, reduzindo o tamanho da lesão colônica, em experimento de colite induzida em ratos com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (SU *et al*, 2015).

O. oeni metaboliza hexoses e pentoses através da via heterolática. Citratos não podem ser utilizados como única fonte de carbono, mas com o metabolismo compartilhado aos açúcares, aguça o crescimento. Glicose e frutose, os principais açúcares existentes no mosto dos vinhos, expandem a biomassa quando utilizados no meio de cultura para seu crescimento *in vitro* (GRANDVALET, 2017).

Baseado nos inúmeros benefícios funcionais e até mesmo como probiótico, existem sugestões de que cepas de *O. oeni* deveriam ser isoladas e inoculadas em vinhos específicos como a champanhe e aplicadas também em cidras, visto seus inúmeros potenciais (KHOURY *et al*, 2016).

O gênero *Leuconostoc* spp engloba um variado conjunto de BAL heterofermentativas, com considerável importância industrial, tradicionalmente utilizado na fermentação de diferentes alimentos e vinhos (KÖNIG *et al*, 2009). Origina apenas ácido D-lático a partir de glicose e é incapaz de produzir amônia a partir de arginina. Têm células de forma esférica ou lenticulares, organizadas em duplas ou em cadeias (KÖNIG *et al*, 2009). Foi descrito por Van Tieghem (1878), e consistia até então pelas seguintes 14 espécies (excluindo reclassificadas e sinônimos): *L. mesenteroides*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. durionis*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. fructosum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. pseudoficulneum* e *L. pseudomesenteroides* (ENDO & OKADA, 2008). As espécies *L. mesenteroides* subespécies *mesenteroides*, *cremoris*, *lactis* e *pseudomesenteroides* são constituintes regulares da produção do aroma aplicadas cotidianamente em fermentações (KOT *et al*, 2014).

Weissella spp. são procariotos em formato de hastes esféricas, lenticulares ou irregulares. São heterofermentativas, que produzem ácido D/L-ácido láctico, enquanto *W. paramesenteroides* forma ácido D-láctico a partir de glicose (KÖNIG *et al*, 2009). Segundo KÖNIG *et al*, (2009), *W. paramesenteroides* é a única espécie desse gênero isolada do mosto ou do vinho. *W. uvarum* foi isolada de uvas vinícolas (NISIOTOU *et al*, 2014). Como os demais gêneros, esse grupo é Gram positivo, catalase negativo e não esporulado (FUSCO *et al*, 2015). *Weissella paramesenteroides* foi encontrada em uvas Sémillon, e nesse estudo relatou-se a incapacidade desta em crescer em condições elevadas de etanol no vinho (BAE *et al*, 2005). Esse gênero compreende 18 espécies e algumas espécies são sinônimos dentro do gênero, como por exemplo *W. cibaria* e *W. kimchii*. As espécies *W. cibaria*, *W. confuso* e *W. koreensis* foram descritos como associados diretos à fermentações vegetais (KOT *et al*, 2014).

Lactobacillus spp. é um gênero de BAL descrito como um grupo heterogêneo, em forma de bastonetes, não esporulados e Gram positivos (RODAS *et al*, 2005). Manifestaram resistência às condições de vinificação e possuem muitas características favoráveis, tornando-os adequados fermentadores (TOIT *et al*, 2011). Apresentam uma capacidade para tolerar etanol e baixos níveis de pH (LÓPEZ *et al*, 2008). Sendo, cepas de *Lactobacillus plantarum* capazes de sobreviver e se multiplicar às condições de produção do vinho (POZO-BAYON *et al*, 2005).

Além de *Lb. plantarum*, outras espécies desse mesmo gênero foram isoladas no vinho e/ou em uvas, incluindo *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum* (*Lb. cellobiosus*), *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fructivorans* (*Lb. trichodes*), *Lb. hilgardii* e *Lb. jensenii* (EDWARDS *et al*, 2000).

O gênero *Pediococcus spp.* é homofermentativo e exige complexos requisitos para sua proliferação como, por exemplo, uma série de aminoácidos. Além disso, são as únicas BAL que se dividem em dois planos: formação de pares ou tétrades e grandes aglomerações esféricas (FUGELSANG & EDWARDS, 2007).

Diferenciam-se pela série de possibilidades de fermentação de carboidratos, a capacidade de hidrólise de arginina, crescimento a diferentes níveis de pH (4,5~7,0), a configuração do ácido láctico produzido e podem apresentar pseudocalatase (KÖNIG *et al*, 2009).

As propriedades probióticas de *Pediococcus spp.* foram estudadas através de uma estirpe de *Pediococcus parvulus*, a qual foi isolada de bebidas alcólicas fermentadas. Os resultados demonstraram que essa variedade bacteriana pode resistir às condições do aparelho digestório, aderir ao intestino e promover propriedades imunomoduladoras interessantes (SU *et al*, 2015).

Bactérias lácticas do gênero *Pediococcus spp.*, que têm sido isoladas e caracterizadas até o momento, têm sido fortemente relacionadas com probióticos e estão sendo utilizadas em diversos tipos de alimentos fermentados e bebidas, como é o exemplo de *Pediococcus acidilactici* (PARK *et al*, 2017).

As propriedades benéficas das cepas de bactérias lácticas relacionadas com o vinho não devem ser ignoradas, pois além da importância enológica, apresentam benefícios ao organismo (SU *et al*, 2015).

2.4 Metabolismo de BAL no vinho

Sabe-se que o metabolismo das bactérias lácticas do vinho exerce um conjunto diverso de atividades secundárias que podem modificar as características sensoriais do vinho (COSTELLO *et al*, 2012). As alterações de perfis de aroma durante a FML dependem da estirpe bacteriana responsável pela fermentação e dos precursores presentes no mosto/vinho (LERM *et al*, 2010).

No vinho, a transformação do ácido málico provoca um efeito duplo, sendo o primeiro a desacidificação com um aumento do pH inicial (0,1~0,2 unidades) e o segundo, uma suavização da sensação bucal. O sabor ácido e amargo do ácido málico é substituído pelo sabor mais suave do ácido láctico (KNOLL, 2011).

Resultados apontam que, em condições vinícolas, a fermentação malolática alterou a concentração de mais de 114 compostos voláteis, dentre eles: álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, terpenos e norisoprenóides (CAÑAS *et al*, 2008). E também desencadeou aumento de um conjunto de outros compostos como, por exemplo, diacetilo, acetoína, 2,3-butanodiol, ésteres (lactato de etila, succinato de dietila), alguns álcoois superiores e a liberação de agliconas aromáticas (SILVA, 2005). Como pode ser observado na Figura 6, Swiegers *et al* (2005), diversos são os possíveis substratos utilizados pelas células, como por exemplo, o acetaldeído que pode ser convertido para ácido acético, o ácido málico que é convertido para ácido láctico pela FML, e que também pode ser produto da vida heterolática.

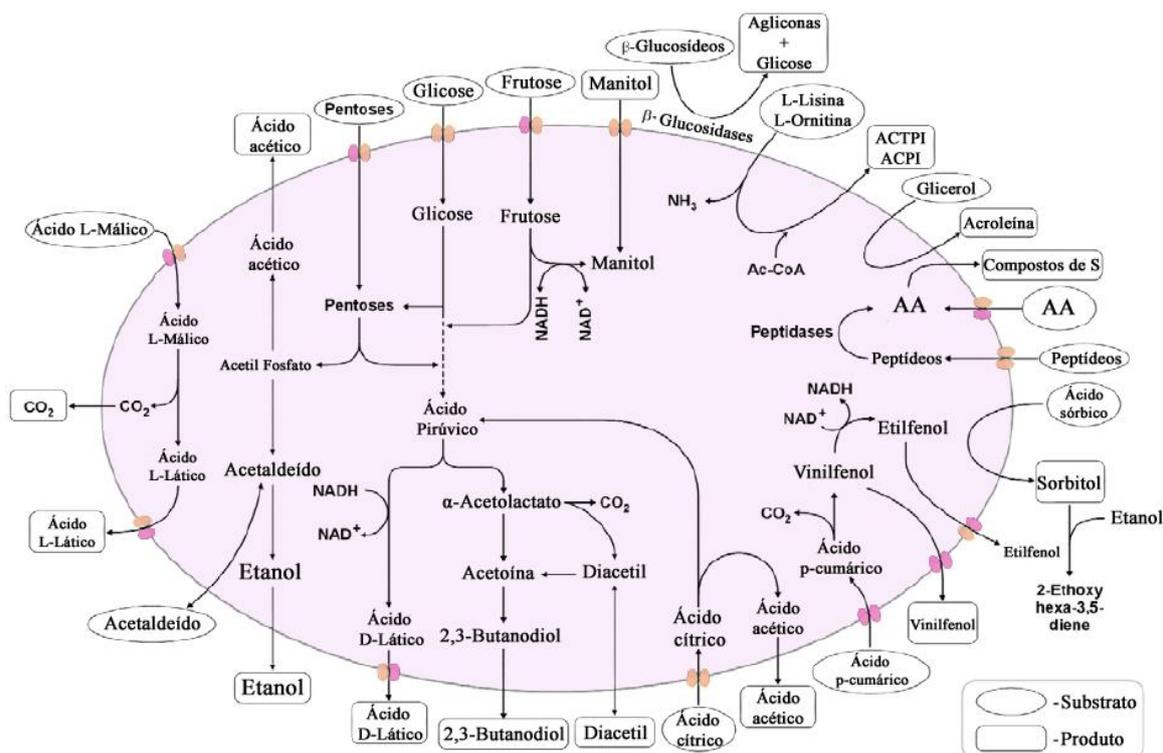


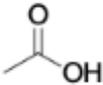
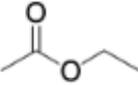
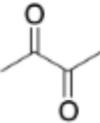
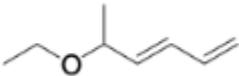
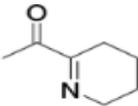
Figura 6. Possíveis rotas bioquímicas e subprodutos da FML.

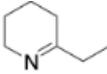
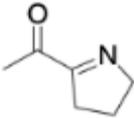
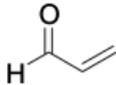
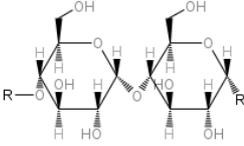
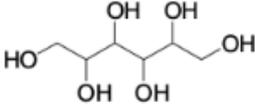
Fonte: Adaptado de Swiegers *et al*, 2005.

A fermentação maloláctica e o consumo de nutrientes, bem como a produção de bacteriocinas, levam à estabilização do vinho (KÖNIG *et al*, 2009).

Para além dos benefícios da presença de BAL no vinho, estes microrganismos (em principal algumas estirpes) podem induzir um efeito depreciativo na qualidade do vinho se a sua proliferação ocorrer no período errado no processo de vinificação. Na Tabela 1 são apresentadas as substâncias responsáveis pelas alterações mais frequentes provocadas pelas BAL em vinhos, as quais decorrem da produção de metabólitos indesejáveis. Estes podem então, gerar odores e turvação (causadas pela formação de carbonato de etila e pela produção de amins biogênicas, particularmente histamina, tiramina e putrescina) (SILVA, 2005).

Tabela 1. Alterações sensoriais que podem ser produzidas nos vinhos pelas BAL.

Composto	Estrutura química	Descrição sensorial	Limite do aroma	Bactéria (Gênero)
Acetaldeído		Maça, Nozes.	100mg/L ⁻¹	<i>Acetobacter</i> <i>Gluconobacter</i>
Ácido Acético		Vinagre azedo, Picante	0,2g/L ⁻¹	<i>Acetobacter</i> <i>Gluconobacter</i> , BAL*
Etilacetato		Removedor de Esmalte	7,5mg/L ⁻¹	<i>Acetobacter</i> <i>Gluconobacter</i> , BAL*
2,3-Butanodiona (diacetil)		Amanteigado, Noz, Caramelo	0,1 ~ 2mg/L ⁻¹	<i>Oenococcus</i> <i>Lactobacillus</i>
2-Etoxi-3,5-hexadieno		Folhas de gerânio	0,1µg/L ⁻¹	<i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>
2-acetil-tetrahidropiridina (ACTPI)		Urina de Rato ou Rato	4 ~ 5µg/L ⁻¹	<i>Lactobacillus</i> <i>Oenococcus</i>

2-Etiltetrahidropiridina (ETPI)		Urina de Rato ou Rato	2 ~ 18 $\mu\text{g/L}^{-1}$	<i>Lactobacillus</i> <i>Oenococcus</i>
2-Acetil-1-pirrolina (ACPI)		Urina de Rato ou Rato	7,8 $\mu\text{g/L}^{-1}$	<i>Lactobacillus</i> <i>Oenococcus</i>
Acroleína		Amargo	N.R.*	<i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>
β -D-Glicano (Exopolissacarídeo)		Oleoso, Viscoso, Espesso	N.R.*	<i>Pediococcus</i>
Manitol		Viscoso, Doce, Irritante	N.R.*	<i>Oenococcus</i>

*BAL: bactéria ácido lácticas incluindo espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Oenococcus* e *Pediococcus*.

*N.R.: não relatado.

Fonte: Adaptado de Bartowsky 2009.

2.5 Interferências na FML

As pesquisas de indução da FML em vinhos por inoculação bacteriana desenrolaram-se a partir da década de 60, as quais levaram à emergência de várias estirpes comerciais. Estes estudos foram realizados a partir da inoculação de culturas lácticas em diferentes estágios de vinificação, mas nem sempre se obteve sucesso. Efetivamente, o período ideal para a inoculação depende de inúmeros fatores, como a composição do mosto, a cepa de levedura e as técnicas elaborativas (AVILA & DAUDT, 1997).

Relativamente às características do vinho, nomeiam-se os seguintes parâmetros: pH, dióxido de enxofre (SO₂), grau alcoólico e temperatura. O pH é um dos critérios mais importantes que afetam o desenvolvimento e o comportamento das BAL no vinho, já que influencia a duração da fase de latência, a taxa de crescimento e, conseqüentemente, o tempo da FML. Além disso, interfere nas espécies que se desenvolvem no vinho, no seu metabolismo e na sua sobrevivência. Costumeiramente, observa-se que, em vinhos com pH igual ou inferior a 3,5, predomina a espécie *O. oeni*, não ocorrendo o crescimento de *Lactobacillus* spp. e de *Pediococcus* spp (INÊS *et al*, 2008); porém quando isso não ocorre (pH fica acima de 3,5) bactérias indesejáveis podem desenvolver-se e produzir compostos prejudiciais.

As espécies dentro de *Lactobacillus* spp. e de *Pediococcus* spp têm maior prevalência em vinhos com pH próximo de 4,0, podendo realizar a FML ou comportarem-se como agentes de deterioração após a FML efetuada por *O. oeni* (RIBÉREAU-GAYON, 1985; WIBOWO *et al*, 1985; LONVAUD-FUNEL, 1999;

GONÇALVES, 2009; AUAD, 2014). Além de afetar o crescimento das BAL, o pH também afeta a atividade da enzima malolática, bem como os substratos transformados e metabólitos resultantes. Apesar da enzima malolática purificada apresentar o máximo de atividade em pH de 5,9 *in vitro* aos 37°C, devido as quantidades de NAD⁺ e Mn⁺² disponíveis, na célula a atividade máxima se observa a valores de pH entre 3,0 e 3,2 ou seja, dentro do espectro de valores habitualmente observados em vinhos. O prazo de duração da FML nos vinhos reduz-se à medida que o pH aumenta ou diminui a partir dos valores mencionados (~3,2) (INÊS *et al*, 2008; BETTERIDGE *et al*, 2015).

O dióxido de enxofre é um aditivo alimentar (conservante INS E220) amplamente utilizado na indústria enológica pelas suas características inibidoras dos processos oxidativos e antissépticas. Como regra geral, as BAL têm dificuldade em desenvolver-se na presença de concentração de SO₂ total e livre superiores a 100 e 10 mg/L, respectivamente (REGUANT *et al*, 2005; RIBÉRAU-GAYON *et al*, 2006). Recomenda-se essa dosagem para estabilizar os vinhos após a FML ou para evitá-la naqueles vinhos nos quais ela não for almejada (SILVA, 2005). A sensibilidade ao SO₂ difere com a espécie e com a estirpe. Os cocos são mais sensíveis que os lactobacilos, e dentre os cocos, as espécies que fazem parte dos gêneros *Leuconostoc* e *Oenococcus* apresentam maior sensibilidade do que as do gênero *Pediococcus*. O efeito bactericida do SO₂ deve-se à fração de SO₂ livre, que por meio de difusão entra na célula e, no seu interior, é convertida em íon bissulfito (HSO⁻). Este íon reage com ácidos nucleicos, proteínas e alguns cofatores, causando inibição de enzimas e, conseqüentemente, conduzindo a morte das células (REGUANT *et al*, 2005; JACKOWETZ & ORDUÑA, 2012).

O etanol, produto principal resultante da fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*, também interfere nos parâmetros de crescimento das BAL e na sua função malolática. A capacidade de sobrevivência e crescimento das BAL decresce à medida que as concentrações de etanol aumentam (WIBOWO *et al*, 1985). A sensibilidade ao etanol varia entre as espécies de BAL; geralmente, os lactobacilos heterofermentativos são mais tolerantes ao etanol do que *Leuconostoc sp*, *Oenococcus sp*. e *Pediococcus sp*. Os cocos suportam variações de 12 a 14% (v/v) (INÊS *et al*, 2008).

A temperatura também interfere nos parâmetros de crescimento das BAL e, conseqüentemente, na velocidade da fermentação. Este é o fator com maior facilidade de monitoramento e controle no processo de vinificação. As temperaturas ideais de crescimento das BAL isoladas dos vinhos variam entre 20~30°C em meios de cultura e entre 20~23°C em vinho. A temperatura ótima para que durante o processo de vinificação ocorra o crescimento das BAL, em particular *O. oeni*, e a degradação do ácido málico, é de aproximadamente 20°C. Valores menores atrasam e prolongam a FML, enquanto que valores superiores a 25°C afetam a biomassa produzida e a qualidade do resultado pela maior produção de ácido acético. Essas alterações podem causar depreciação ou deterioração do produto final (RIBÉRAU-GAYON *et al*, 2006, RUIZ *et al*, 2010).

Melhorias na qualidade e na velocidade da FML são frequentemente atribuídas à utilização de determinadas estirpes, embora nem sempre uma identificação adequada é realizada a fim de verificar qual ou até mesmo quais delas realmente são as cepas responsáveis pela fermentação (LÓPEZ *et al*, 2008). Uma FML de longa duração implica na utilização demorada dos tanques de fermentação, que são

ocupados ao longo do pós-período de colheita, ocasionando o atraso na comercialização de vinhos (VILA-CRESPO *et al*, 2010).

2.5.1 Demais fatores interferentes

Resíduos de fungicidas e pesticidas, usados em diferentes etapas da vinificação a fim de controlar contaminações não desejadas, podem proporcionar um efeito fortemente inibitório sobre as bactérias e, por isso, precisa ser observado o momento certo para aplicação desses produtos e inoculação de bactérias lácticas (BINATI, 2015).

Também nos vinhos tintos encontram-se os compostos fenólicos, que dependem essencialmente da variedade da uva utilizada e do tempo de maceração: ácidos fenólicos carboxílicos ($100\text{-}200\text{mg L}^{-1}$), catequina ($100\text{-}400\text{mg L}^{-1}$), quercetina ($5\text{-}20\text{mg L}^{-1}$), dentre outros. Alguns desses ácidos fenólicos carboxílicos podem inibir o crescimento de BAL (REGUANT *et al*, 2000). O efeito dos compostos fenólicos nas BAL seriam a ocorrência de alterações dos envoltórios celulares (membrana e parede celular), o que resultaria na morte da célula (BINATI, 2015). Todavia, existem relatos que a concentração de fenóis voláteis aumentou acentuadamente na FML, o que sugere envolvimento da ação das bactérias lácticas através da descarboxilação dos compostos fenólicos (LIU, 2002).

Em suma, a interação entre os fenólicos do vinho e as BAL pode ser considerada em dois sentidos: BAL degradam os polifenóis do vinho em estruturas

menores, ou por outro lado, o seu crescimento e desenvolvimento podem ser afetados por esses compostos ou até mesmo por fenólicos produzidos por outros microrganismos. A concentração de compostos fenólicos é crítica nessa interação, com bactérias capazes de suportar e até mesmo metabolizar tais componentes, além de serem estimuladas por concentrações baixas ou inibidas quando os níveis são relativamente concentrados (GARCÍA-RUIZ *et al*, 2009).

2.6. Interações entre populações

2.6.1 Outros microrganismos e BAL

Bactérias lácticas e leveduras são encontradas nos mesmos ecossistemas naturais e podem competir pelos mesmos nutrientes. Neste caso, a forma como se comportam os microrganismos torna-se de difícil compreensão, considerando-se que os parâmetros físico-químicos do meio exercem uma pressão de seleção ao possibilitar mudanças constantes na sua complexa composição química e microbiológica (GOMES, 2009).

Além das leveduras produzirem etanol, que é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento das BAL, há produção de metabólitos antibióticos que inibem consideravelmente a biomassa bacteriana. Vale ressaltar que a composição do mosto e as diferentes práticas e formas de vinificação podem influenciar a interação das leveduras sobre bactérias maloláticas (HERVÉ *et al*, 2004; REGUANT *et al*, 2005).

As BAL como também demais organismos, podem sintetizar e liberar substâncias com atividade antimicrobiana. Essas substâncias podem ser simples (peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, etc), ou mais complexas, como bacteriocinas (RIBERÉAU-GAYON *et al*, 2006).

Bacteriocinas, como nisina, pediocina e plantaricina, produzidas pelas próprias espécies de bactérias lácticas, são pequenos polipeptídeos inibitórios à outras espécies bacterianas. Essas moléculas agem na parede celular bacteriana ao induzir sua lise. Espécies de *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. são mais resistentes à nisina do que estirpes de *O. oeni*. Já pediocina e plantaricina demonstram sucesso na eliminação desta bactéria (BARTOWSKI, 2009). A produção de bacteriocinas não é específica apenas de um gênero, mas também de algumas espécies dentro do mesmo gênero (RIBERÉAU-GAYON *et al*, 2006).

2.6.2 Bacteriófagos

A liquidação de fermentações bacterianas por bacteriófagos é um problema antigo bastante conhecido na indústria. Na enologia, Sozzi e colaboradores, em 1976 e 1982, realizaram as primeiras pesquisas em bacteriófagos de *O. oeni* (na época *Leuconostoc oenos*) (RIBERÉAU-GAYON *et al*, 2006).

Com a implementação do uso de culturas “*starter*” na vinificação, o problema de falhas fermentativas causadas por ataques de bacteriófagos foi inevitável (HENICK-KLING *et al*, 1986). Bactérias estudadas em dois tanques durante a

fermentação malolática demonstraram que ambas as populações apresentaram as mesmas características. O bacteriófago aparece após um pequeno espaço de tempo da fase *lag*, diminuindo a população bacteriana. Uma pane na fermentação malolática pode ocorrer quando a população viral for tão grande quanto a de BAL (RIBERÉAU-GAYON *et al*, 2006).

A única fermentação vinícola conhecida (por ser a mais utilizada), que é afetada por esse tipo de vírus, é a fermentação por *O. oeni*, devido à característica exclusiva dessas bactérias poderem ser hospedeiras do bacteriófago. Como consequência da ação de bacteriófagos, enquanto o impacto negativo em cepas iniciais e acidificação é bem documentado, o impacto do bacteriófago no desenvolvimento de aroma é pouco conhecido e está apenas começando a ser investigado (KOT *et al*, 2014).

2.7 Seleção de BAL para a fermentação e culturas *starter*

Depender da microbiota espontânea para completar a FML em tempo adequado e de forma idônea pode ser arriscado. Quando as BAL não estão estabelecidas em uma vinícola, o início da FML pode demorar alguns meses e também pode ocorrer somente em alguns tanques. Por esta razão, a indução da FML, com cultivos das bactérias autóctones selecionadas, despertou o interesse industrial. Selecionar cepas de *O. oeni* que conduzem a melhores resultados e que são mais interessantes do ponto de vista da contribuição sensorial dos vinhos é uma tarefa difícil (BERTRAND, 1984; KNOLL, 2011).

Nem todas as FML espontâneas apresentam características positivas para o vinho. O próprio vinho exerce importante pressão de seleção sobre as populações de BAL, particularmente pela presença de etanol, pH baixo e SO₂, como já foi ressaltado (REGUANT *et al*, 2005). Estes fatores afetam o desenvolvimento e a sobrevivência das BAL e por conseguinte, as cepas selecionadas devem ter maior tolerância, caso contrário, as novas cepas não serão eficientes. Além de resistentes, precisam aumentar o pH ao metabolizar o ácido málico e o transformar em lático pela enzima malolática. Não deverão produzir aromas ou compostos nocivos e, se possível, devem salientar ou produzir aromas desejáveis aos vinhos (BERTRAND, 1984; REGUANT *et al*, 2005; TOPISIROVIC *et al*, 2006; RUIZ *et al*, 2010).

A utilização de culturas selecionadas universais para desenvolver produtos diferentes tem sido questionada por vários autores, face à manutenção da tipicidade dos produtos obtidos. Por exemplo, o uso das mesmas culturas selecionadas comerciais para fabricar alguns alimentos, pode conduzir a produtos finais que são demasiadamente semelhantes (CARIDI *et al*, 2003; TOPISIROVIC *et al*, 2006).

Neste contexto, seria preferível o uso de culturas selecionadas regionalmente, permitindo a melhoria da qualidade microbiológica sem alterar significativamente as características típicas, evitando a desvantagem da perda da tipicidade dos produtos decorrente do uso de culturas selecionadas universalmente (TOPISIROVIC *et al*, 2006). Estas podem desempenhar um papel fundamental ao enaltecer as propriedades sensoriais dos vinhos regionais típicos, comparativamente às culturas selecionadas universais desenvolvidas essencialmente para conduzir processos rápidos, sem produção de sabores desagradáveis e com a garantia de produtos estáveis (TOPISIROVIC *et al*, 2006; RUIZ *et al*, 2010) que se padronizam.

É importante salientar a preocupação existente nos projetos mais recentes de cepas para vinificação, as quais dão relevância às estirpes autóctones ecotípicas, na tentativa de preservar a biodiversidade nas áreas de seleção e, ao mesmo tempo, garantir no vinho características ligadas à região de procedência. Para a indústria brasileira, a disponibilidade e facilidade de acesso à culturas lácticas nativas ou endógenas, adaptadas às condições locais, é uma necessidade econômica, tendo em vista a elevada produção e consumo de vinhos, a redução do custo de importação e o avanço tecnológico da região (BERTRAND, 1984; TOPISIROVIC *et al*, 2006; RUIZ *et al*, 2010; BINATI, 2015).

A maioria das bactérias que crescem em vinho podem ser cultivadas em meios de crescimento que atendam adequadamente os seus requisitos nutricionais. Porém, as técnicas clássicas podem precisar de inúmeros dias para gerar bons resultados, um período longo, quando se deseja monitorar a dinâmica populacional (BINATI, 2015).

De modo geral, os meios utilizados para o crescimento de bactérias lácticas não são economicamente atrativos devido ao número de nutrientes onerosos requeridos (BUSTOS *et al*, 2004). As bactérias são altamente exigentes em termos da composição nutricional. Geralmente, além de carbono, os meios de crescimento necessitam de vários aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos e minerais (KNOLL, 2011).

Os componentes empregados em meios de cultura, como por exemplo: o extrato de levedura, a peptona, o tri-amônio citrato, o fosfato de sódio monobásico e o surfactante Tween 80, podem melhorar a produção de ácido lático se os seus níveis forem aumentados. Já outras substâncias como o sulfato de magnésio, acetato de

sódio, extrato de carne, hidrolisado de caseína e carbonato de cálcio, bem como outros parâmetros tais como pH e tempo de crescimento (período de incubação), são considerados insignificantes. O sulfato de manganês deve ser evitado, uma vez que não favorece a fermentação malolática (LOPES, 2008).

É importante considerar que o vinho é composto por uma série de elementos importantes e que acabam modulando o comportamento dessas bactérias (MERNY, 2014) por esse motivo, as BAL são consideradas microrganismos nutricionalmente exigentes e requerem bastante atenção quando precisam ser cultivadas em laboratório.

A seleção de estirpes para a inoculação baseia-se essencialmente numa elevada capacidade de atividade malolática em relação às condições adversas encontradas (BRAVO-FERRADA *et al*, 2013); além disso, estirpes comerciais precisam de uma maior atenção antes da inoculação. Existem vários tipos ou formas de apresentação de culturas *starter* de bactérias lácticas selecionadas disponíveis no comércio. As culturas de suspensão líquida têm uma vida útil de apenas dois a 20 dias, e requerem um tempo de preparação de três a sete dias. As culturas congeladas precisam ser inoculadas imediatamente após serem descongeladas, e os *pellets* são adicionados diretamente ao vinho; já as culturas de inoculação direta não necessitam de preparação e são adicionadas diretamente (LERM *et al*, 2010).

O isolamento dessas culturas é mais eficaz quando utilizados sucos de frutas juntamente com a composição do meio comum, como foi relatado por diversos autores (ATLAS, 2010; GOMES *et al*, 2010; BINATI, 2015). Os sucos vegetais servem como um bom suplemento para o crescimento. A viabilidade de diferentes espécies de *Lactobacillus* sp. em suco de tomate, por exemplo, proporciona elevado

crescimento da bactéria, a qual foi capaz de manter-se ativa numa concentração de 10^6 UFC/mL (COELHO, 2009).

O uso de culturas *starter* a fim de induzir a fermentação malolática assegura uma maturação mais rápida do vinho, o que causa redução do potencial de deterioração por outras bactérias e, além disso, permite o controle e seleção de estirpes responsáveis pela fermentação e sua contribuição para o produto final (ZHANG & LOVITT, 2006).

No mercado atualmente, existem inúmeras culturas disponíveis para comercialização, como por exemplo: ALPHA[®], ALPHA-1[®], Beta[®], ELIOS[®], ELIOS-1[®], VP41[®], VP41-1[®], OMEGA[®], OMEGA-1[®], MALOTABS[®], ML Prime[®], PN4[®], PNA-1[®], LAVIN 31[®], LAVIN ELIOS[®], LAVIN-1[®], LAVIN MT01[®], UVAFERM ALPHA[®], UVAFERM BETA[®] e SEP-14[®] (*Oenococcus oeni* – Lallemand[®] – todas isoladas na Europa); LACTOENOS LF16[®], Pre Ac 450[®], B7 Direct[®], SB3[®] e B16[®] (*Oenococcus oeni* – Laffort[®] – todas isoladas na Europa); Inoflore[®] e Extraflore[®] (*Oenococcus oeni* – IOC – *Institute Oenologique de Champagne* – todas isoladas na Europa); ML Prime[®] e V22[®] (*Lactobacillus plantarum* – Lallemand[®] – ambas isoladas na Europa) (LALLEMAND, 2017; LAFFORT, 2017). Essas culturas são utilizadas por empresas de maior porte e que produzem maiores números de litros de vinhos por ano, ou seja, grandes produtores, que muitas vezes possuem a tecnologia adequada para o acompanhamento da FML. Vinícolas particulares e de menor porte geralmente optam pela utilização da fermentação malolática espontânea, já que o custo das estirpes comerciais é alto (BINATI, 2015), e a forma mais rentável de acompanhamento da FML é através da cromatografia de papel (qualitativa).

No contexto gaúcho, a grande parte das vinícolas ainda trabalha com a FML espontânea. Assim, é perceptível a importância da pesquisa microbiológica dos vinhos regionais, bem como a revisão das técnicas empregadas, para que os vitivinicultores não dependam mais do desenvolvimento espontâneo de bactérias nas cantinas, e que se beneficiem do uso de culturas apropriadas para realizar essa fermentação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as análises e procedimentos experimentais foram executados no Laboratório de Microbiologia Aplicada, no Instituto de Biotecnologia da Área do Conhecimento da Vida da Universidade de Caxias do Sul.

3.1 Coleta, isolamento, caracterização e identificação de isolados

As amostras de vinho foram coletadas em onze vinícolas da região serrana do Rio Grande do Sul (Figura 7), classificadas desde pequeno, médio e grande porte, com prévio conhecimento acerca do início da fermentação malolática espontânea, na safra de 2016.



Figura 7. Mapa dos municípios onde se localizam as vinícolas que foram visitadas para a coleta das amostras e o número de amostragens obtidas.

Fonte: Giovanni Colussi.

Foram coletadas um total de 50 amostras de vinhos em estado fermentativo malolático, sendo 45 de vinhos tintos e cinco amostras de vinhos brancos (que ao acaso estavam em FML). No momento da coleta, aplicou-se um questionário (Anexo 1) referente às informações do(s) vinho(s) em questão, em busca de informações, desde a variedade da uva utilizada na vinificação, até a sulfitação realizada (ou não) nos vinhos.

O material coletado em frascos de Duran esterilizados foi encaminhado até o Laboratório de Microbiologia Aplicada e plaqueado imediatamente.

O meio para isolamento foi baseado no específico para *Leuconostoc oenos* (MLO) adaptado, constituído por (v/v), 25% de suco de tomate, 2% de peptona, 0,5% de triptona, 2% de extrato de carne, 0,5% de extrato de levedura, 0,01% de Tween 80, 1% de glicose, 0,5% de frutose, 0,1% de ácido DL-málico, 0,2% de fosfato de potássio, 0,02% de sulfato de magnésio e 0,05% de cisteína, 1,8% de ágar, pH 4,8 autoclavado a 1 ATM, (LOUVAUD-FUNEL, 1999; SATO *et al*, 2001; ESCRIVÁ, 2009; ATLAS, 2010; BINATI, 2015) e adicionado 100 µL de cicloheximida numa concentração final de 0,001 g/mL (GOMES *et al*, 2010). Os plaqueamentos foram realizados de acordo com protocolo padrão de diluições seriadas de base 10, em triplicatas.

Posteriormente, o cultivo bacteriano foi incubado em condição microaerofílica a 30°C (POWELL, 2005). Após o período de sete dias, executou-se a contagem de colônias por mL de vinho e expressaram-se os resultados em Log de UFC (Unidades Formadoras de Colônia), bem como isolamento de bactérias. Para esse isolamento, as

colônias escolhidas foram retiradas da placa de Petri com auxílio de alça de platina e fixadas em lâmina de microscopia para análise em microscópio (aumento de 400x e 1000x) e coradas com azul de metileno 1%.

Os selecionados (bactérias) foram repassados em placas de Petri com meio de cultivo *Medium for Leuconostoc* MLO (adaptado de LOUVAUD-FUNEL, 1999; SATO *et al*, 2001; ESCRIVÁ, 2009; ATLAS, 2010; BINATI, 2015), e seu crescimento ocorreu nas mesmas etapas citadas anteriormente (microaerofília a 30°C por sete dias). As colônias crescidas foram caracterizadas morfológicamente a nível macroscópico, de acordo com a coloração, formato, borda, tipo de superfície, consistência da colônia e aparência (brilhante ou opaca).

Para o prosseguimento da pesquisa, utilizou-se o isolado comercial SEP-14 *Oenococcus oeni* (COM), para comparação de resultados. Esse microrganismo comercial é usualmente utilizado para fermentações maloláticas.

Por fim, para a garantia de mantimento dos isolados selecionados, efetuou-se criopreservação em quintuplicatas a -80°C.

3.2 Caracterização das colônias isoladas

3.2.1 Testes bioquímicos

As colônias isoladas foram testadas preliminarmente com o teste bioquímico da atividade de catalase e, posteriormente, passaram pela etapa da coloração de Gram (Anexo 2).

O teste de catalase é o meio ao qual as células eliminam o peróxido de hidrogênio tóxico (ânion peróxido O_2^{-2}), e é utilizado para discriminar categorias bacterianas. A catalase é facilmente detectada por sua ação no peróxido de hidrogênio. Quando uma gota de peróxido de hidrogênio é adicionada a uma colônia de células bacterianas produzindo catalase, bolhas de oxigênio são liberadas (COSTELLO *et al*, 2012; TORTORA *et al*, 2012).

Utilizou-se uma lâmina de microscopia, depositou-se uma amostra de células proveniente de cada colônia isolada e, sobre ela, com auxílio de um gotejador, despejou-se uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% v/v. Utilizou-se como controle positivo uma amostra de colônia de *Escherichia coli*, proveniente da própria coleção do Laboratório. Pelo período de cinco segundos, observou-se formação ou não de borbulhas, o que possibilitou a classificação dos isolados em catalase positivos (presença de bolhas) ou negativos (ausência de bolhas) (BINATI, 2015). Esse procedimento foi realizado em triplicata.

Após o experimento da catalase, os isolados foram previamente purificados e crescidos em meio sólido *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) em condição microaerofílica, e as colônias jovens foram sujeitas à técnica de coloração de Gram. Posteriormente, as lâminas coradas foram analisadas em microscópio para exclusão de bactérias Gram negativas. Aproveitando a coloração executada, avaliou-se, também, a morfologia celular dos isolados.

Também realizou-se um ensaio de mobilidade com as bactérias selecionadas Gram positivas. O experimento foi realizado em meio YEPD semi-sólido em tubos de ensaio com tampa. A inoculação dos isolados se deu com agulha bacteriológica, ao fazer uma picada central de até 3/4 da profundidade do tubo. Posteriormente, os tubos foram incubados em estufa a 30°C por um período de sete dias. Objetivou-se selecionar apenas bactérias imóveis. Esse ensaio foi realizado em triplicata.

3.3 Crescimento em meio líquido

O crescimento em meio líquido é um experimento que possibilita analisar a maneira de as células crescerem em líquido e avaliar se elas não decantam. Isso é fundamental para os testes seguintes (fermentação em mosto sintético e microvinificações).

Esse experimento foi executado em tubos de ensaio de 10mL com tampa, esterilizados. O meio de cultura utilizado foi o YEPD líquido (pH 7,0), e as células foram inoculadas a partir de uma amostra das colônias em placas de Petri, crescidas

previamente em meio YEPD sólido. Após inoculação, os tubos foram incubados em estufa a 30°C por um período de sete dias.

Decorrido o período de sete dias, os crescimentos foram avaliados em espectrofotômetro (Biochrom - Libra S12), no comprimento de onda de 660nm (BINATI, 2015; KUDA *et al*, 2016; KANAI *et al*, 2017), utilizando o meio líquido YEPD como branco, e o isolado comercial COM (SEP-14 - Lalemand[®]) como controle positivo. Esse ensaio deu-se em triplicata.

3.4 Fermentações de carboidratos e análise de degradação de ácido málico

3.4.1 Teste de fermentação de carboidratos

Com o objetivo de auxiliar a caracterização e seleção dos isolados, efetuou-se o teste de fermentação de alguns carboidratos. Os hidratos de carbono utilizados para a realização do teste foram: α -arabinose, celobiose, galactose, frutose, glicose, lactose, maltose, manitol, melibiose, manose, rafinose, ribose, sacarose e D-xilose.

O teste realizou-se em placa de cultura de 96 poços, com o meio base de (v/v): peptona 1%, extrato de levedura 0,25%, tween 80 0,01%, corante indicador púrpura de bromocresol 0,004% e 1% do carboidrato a ser testado, pH 6,8 (GARVIE, 1983; DICKS & ENDO, 2009).

O pré-inóculo para o experimento foi preparado em YEPD e, após turbidez do meio, precipitou-se as células com centrifugação (12.000RPM – 3 minutos) a fim de

retirar o meio de cultura. Ressuspendeu-se a biomassa em solução salina por 12 horas (*overnight*) para que não ocorresse interferência de carboidratos residuais do meio anterior.

Após, em cada um dos poços da placa de cultura, foram adicionados 200µL do meio para crescimento, sendo ele composto de 100µL de meio base e 100µL do carboidrato de teste (diluído em água destilada e esterelizado). Após, realizou-se o inóculo bacteriano com 10µL de suspensão de células do pré-inóculo. A anaerobiose nos poços da placa de cultura foi induzida com petrolato líquido esterelizado (aproximadamente 20µL). Como controles negativos, utilizaram-se dois poços da placa de cultura por isolado e repetição, um sem nenhum carboidrato, porém com inoculação bacteriana, e o outro com glicose e sem inoculação. O período de incubação foi de uma semana.

Para avaliação da fermentação, observou-se a alteração de cor do meio base, que conteve corante indicador púrpura de bromocresol (do púrpura para o esverdeado). As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.2 Fermentação em mosto sintético

A fim de avaliar o comportamento dessas bactérias quanto à sua capacidade de efetuar a fermentação malolática em laboratório, executou-se microfermentações com mosto sintético adaptado de diferentes autores (BELY *et al*, 1990; CIANI & FERRARO, 1996; ROSSIGNOL *et al*, 2003; ATLAS, 2010; GOMES, 2015).

A composição do mosto sintético utilizada foi solução A (v/v): 12,5% de glicose, 12,5% de frutose, 1,5% de ácido cítrico, 0,75% de ácido málico (ou 1,5% de ácido DL-málico) e 0,75% de ácido tartárico; solução B (v/v): 9,37% de fosfato de potássio, 6,25% de sulfato de potássio, 3,12% de sulfato de magnésio heptahidratado, 1,95% de cloreto de cálcio, 2,5% de cloreto de sódio, 0,5% de sulfato de zinco, 0,125% de sulfato de cobre, 0,125% de iodeto de potássio, 0,05% de cloreto de cobalto, 0,125% de ácido bórico e 0,125% de molibdato de amônio; solução C (v/v): 2,5% de meso-inositol, 0,19% de pantoneato de cálcio, 0,03% de tiamina, 0,25% de ácido nicotínico, 0,03% de piroxidina, 0,0003% de biotina, 5,75% de cloreto de amônio e 1% de caseína. O pH do mosto foi ajustado apenas nas soluções A e C para 3,4. A composição final do mosto se deu com a mistura de duas partes da solução A, uma parte da B e uma parte da C (2:1:1 respectivamente). O mosto foi esterilizado por meia hora à 0,5ATM de pressão.

Um total de 40mL de mosto esterilizado foi colocado em tubos cônicos esterilizados. O pré-inóculo foi preparado com o crescimento das bactérias em meio líquido YEPD e o inóculo dessas bactérias no mosto sintético só ocorreu com um crescimento eficiente do pré-inóculo (aproximadamente $10^5 \sim 10^6$ bactérias por mL). O conteúdo de 100 μ L foi repassado do meio líquido YEPD para os tubos cônicos contendo mosto sintético. Esse experimento foi realizado em triplicatas.

As condições de crescimento bacteriano foram em agitação por Agitador orbital com incubadora a 125 RPM (apenas para homogeneização), na temperatura de 30°C, por um período de 10 dias. No decorrer desses dias, foi interrompido brevemente para

acompanhamento do crescimento ou não dessas bactérias através da observação da turbidez.

Os fermentados bacterianos foram analisados quanto à conversão de ácido málico com auxílio de cromatografia de papel. O controle negativo utilizado como observação da ausência de contaminação foi o mosto sinético sem inoculação, que também foi incubado em agitador orbital. A cromatografia de papel consegue fornecer informação suficiente a ponto de o observador identificar ou não a ocorrência da fermentação malolática. É um dos métodos mais simples de avaliação dessa conversão biológica em vinícolas, e também não requer reagentes e equipamentos sofisticados.

A camada delgada da cromatografia executou-se em papel Whatman n°1, em corte de 30cmx20cm, e com espaço entre cada amostra de 1,5cm. A alíquota amostral foi depositada com auxílio de um capilar de vidro (um para cada fermentado), em repetição de três vezes para o padrão, e cinco vezes para os demais. Como branco utilizou-se água ultrapura e como padrão de ácidos, utilizou-se uma solução de ácido málico, láctico e tartárico à 0,2% de cada um em solução hidroalcolica a 10%, totalizando uma concentração final de 0,002g/mL de cada ácido.

As alíquotas foram secas com secador de ar quente, sempre antes de depositar nova quantidade de mosto, e no final da preparação para corrida com a fase móvel.

A fase móvel desse procedimento de separação foi composta de 50% de butanol, 0,1% de azul de bromofenol e 20mL de ácido acético a 50% (RIBERÉAU-GAYON *et*

al, 1980). O tempo estimado da corrida cromatográfica foi de aproximadamente 5 horas.

A avaliação do pH dos mostos fermentados ocorreu em pHmetro (Digimed - DM-22) em triplicata, e as médias utilizadas para análise.

Após medição de pH, foram executadas as medidas de absorvâncias em espectrofotômetro (Biochrom - Libra S12), para avaliação de crescimento bacteriano no mosto sintético. As medidas foram realizadas em triplicada, à uma absorvância de 660nm (BINATI, 2015).

3.4.3 Avaliação das características enológicas

Executou-se ensaios em placa de cultura com 96 poços, para avaliação do comportamento dos isolados em diferentes níveis de pH, diferentes concentrações de etanol e metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$). A bactéria comercial SEP-14 (COM) foi utilizado como controle.

O meio de cultivo utilizado foi o YEPD líquido, contendo diferentes concentrações dos componentes citados anteriormente e ajustado em diferentes pH, sem combinações (Tabela 2).

Tabela 2. Escalas de pH, concentração de etanol e metabissulfito de potássio testados.

Condições utilizadas para avaliação de perfil de resistência	
pH	2,9; 3,1; 3,5; 4,0; 5,0
Etanol	10%; 14%, 16%, 20%, 30%
$K_2S_2O_5$	20mg/L; 40mg/L; 60mg/L; 90mg/L; 100mg/L.

Para realização do ensaio, preparou-se primeiramente um pré-inóculo de acordo como mencionado anteriormente (capítulo: Fermentação em mosto sintético). Do pré-inóculo, foram utilizados 10 μ L que foram inoculados em cada poço contendo previamente o meio de crescimento ajustado para a condição a ser testada.

Em cada poço da placa de cultura foram acondicionados, além do inóculo de 10 μ L de suspensão de células, 200 μ L do meio de crescimento ajustado, e a anaerobiose foi instituída com adição de cerca de 20 μ L de petrolato líquido, totalizando uma cultura de 230 μ L/poço. Dois poços por isolado foram utilizados como controle, um deles contendo as condições testadas, porém sem inoculação bacteriana; e o outro contendo apenas o meio de cultura YEPD na íntegra também sem inóculo.

Após inoculação, as placas de cultura foram incubadas em estufa à 30°C por um período de sete dias. A avaliação de crescimento, após decorrido o tempo de incubação, se deu com observação de turbidez do meio e/ou crescimento de colônias no fundo dos poços, considerando-se crescimento negativo a ausência dessas características, e positivo a presença. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado e cada condição de crescimento.

3.4.4 Microvinificações e avaliação da degradação de ácido málico

As bactérias foram avaliadas na fermentação em vinho sintético, com a seguinte composição (v/v): glicose 0,1%, trehalose dihidratada 0,1%, glicerol 0,676%, ácido tartárico 0,5%, ácido L-málico 1%, acetato de sódio 0,028%, ácido cítrico 0,05%,

extrato de levedura 0,4%, casamino acids 0,5%, fosfato de potássio 0,06%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,013%, sulfato de manganês 0,003%, cloreto de cálcio 0,013% e cloreto de potássio 0,045%. O pH do vinho sintético foi ajustado com NaOH para 4,0 (MATEO *et al*, 2010). O experimento foi realizado com o vinho sintético no teor alcóolico de 8 e 10%, a fim de diferenciar o comportamento bacteriano.

As bactérias foram inoculadas em frascos de Duran de 250mL com volume de 200mL de vinho sintético a 8 e 10% de álcool. Para o ajuste alcoométrico, acrescentou-se o etanol após esterelização do vinho sintético diretamente nos frascos Duran, efetivados os cálculos de concentração pertinentes.

O preparo do pré-inóculo bacteriano ocorreu em meio líquido YEPD, incubados em estufa a 30°C até turvação do meio, contendo um número entre 10^6 e 10^8 células/mL. O inóculo consistiu de 1mL do pré-inóculo ao vinho sintético. Após esse procedimento, os frascos foram acondicionados em estufa a 20°C por 21 dias.

Para avaliação da degradação málica, coletaram-se, a cada três dias, duas amostras de 1mL do vinho, os quais foram acondicionadas em eppendorfs e congeladas logo após retirada. Ao total, somaram-se sete amostragens, que foram utilizadas para avaliação do consumo de ácido málico. O controle negativo para fermentação foi o vinho sem inoculação bacteriana, que também foi congelado imediatamente.

Passando-se o tempo de 21 dias, e com o final das fermentações, as amostras foram analisadas a caráter qualitativo em cromatografia de papel, seguindo os

mesmos procedimentos mencionados no capítulo anterior (Fermentação em mosto sintético), e quantitativo com auxílio do kit enzimático Boehringer Mannheim / R-Biopharm Cat. N. 10 139 068 035.

As análises do kit enzimático se deram através das seguintes etapas:

- a. Centrifugação das amostras de vinho sintético coletadas para retirada da biomassa;
- b. Diluição das amostras de vinho 1:50 para performance do experimento e especificidade da detecção do ácido málico;
- c. Adição de 250µL da Solução 1 (Tampão glicilglicina pH 10,0 + Ácido L-glutâmico 440mg) em cubetas B5 para avaliação UV em espectrofotômetro;
- d. Adição de 58µL da Solução 2 (NAD liofilizado 210mg);
- e. Adição de 2,5µL da Solução 3 (suspensão 160U de Glutamato-ozaloacetato transaminase);
- f. Adição de 25 µL da amostra diluída (1:50) do vinho;
- g. Adição de água destilada 164,5µL.
- h. Leitura em espectrofotômetro à 340nm após 5 minutos;
- i. Adição de 2,5µL da Solução 4 (L-malato desidrogenase 2400U);
- j. Homogeneização;
- k. Leitura à 340nm após 10 minutos de reação.

Como controle positivo utilizou-se a solução de ácido L-málico proveniente do próprio kit enzimático. E como controle negativo utilizou-se água no lugar da amostra. O branco para leitura em UV foi água destilada.

3.5 Classificação dos isolados

Para a classificação molecular das bactérias, todas foram crescidas em YEPD, 18-24h a 30°C. Após esse processo as amostras foram homogenizadas em vórtex e

diluídas em água esterilizada. Desta suspensão de células, um volume de 5µL de cada suspensão foi transferido juntamente com uma reação final (tampão, nucleotídeos e Taq polimerase), como material a ser amplificado em PCR. Os primers utilizados para a amplificação foram 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' forward e 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT3' reverse, para amplificação da sequência de 16S rDNA e possibilitar a identificação das espécies.

Os produtos de PCR foram tratados com as enzimas exonuclease I e shrimp alkaline (USB) antes do sequenciamento. A reação de sequenciamento foi feita com o kit BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante e adicionando 0.25 µM de primer e aproximadamente 100ng de produto de PCR purificado. As amostras foram amplificadas em termociclador e após foram purificadas com o BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) e inseridas no sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Os dados foram coletados pelo programa Data Collection (Thermo Fisher Scientific).

Com a obtenção das sequências de nucleotídeos (16S rDNA), os mesmos foram analisados no GenBank por busca de similaridade, cuja comparação é realizada pelo programa BLAST.

3.6 Análises estatísticas

Para análise estatística, utilizou-se o software SASM-Agri para a realização do teste de Tukey e levou-se em consideração o valor nominal de significância como

$p < 0,05$. A pesquisa das sequências através da similaridade ocorreu no banco de dados GenBank pelo programa BLAST. O alinhamento dos nucleotídeos se deram no software MEGA 7.0, utilizando o método *Multiple Sequence Alignments* (ClustalW 1.81), bem como a construção da árvore filogenética com *Bootstrap* de 500 réplicas. A construção de gráficos, tabelas e quadros se deu no software Microsoft Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta, isolamento e caracterização

As coletas de vinhos em fase de FML (determinada pelas vinícolas) foram executadas em vinícolas dos municípios de Bento Gonçalves, Farroupilha, Caxias do Sul, Flores da Cunha e Campestre da Serra.

A contagem de microrganismos nas amostras avaliadas foi de 6,69 a 8,54 log UFC/mL de bactéria ou/e levedura (Tabela 3). Apesar da utilização do inibidor leveduriano cicloheximida, observou-se crescimento de leveduras. Esse crescimento de leveduras se deve à grande quantidade de espécies, e até mesmo estirpes de leveduras que participam da fermentação do vinho (SCABORA, *et al* 2010). Cabe lembrar que a inibição de leveduras a partir da síntese proteica pela substância ciclohexamida (actidione) não é um fenômeno universal, pois existem gêneros que são resistentes a ela, como por exemplo *Dekkera/Brettanomyces* spp. (BASSI, 2011) e, além disto, este composto apresenta ação fungistático. Outro problema é que as colônias bacterianas apresentaram aspecto diminuto, muitas vezes quase imperceptível, o que exigiu atenção nas suas identificações. Pode-se haver certa interferência entre o crescimento das leveduras e bactérias, o que reduziu o crescimento das bactérias (deixando suas colônias menores).

Tabela 3. Amostras coletadas com a descrição de variedades, e descrição dos microrganismos identificados.

Cidade	Amostra	Variedade de Uva	log UFC/mL*	Microrganismo	Código
Flores da Cunha	1	Bordô	7,270	Levedura e bactéria	GLAC01
Flores da Cunha	2	Bordô	7,683	Levedura e bactéria	GLAC02
Flores da Cunha	3	Bordô	7,711	Levedura	-
Flores da Cunha	4	Cabernet Sauvignon	7,752	Levedura e bactéria	GLAC03
Flores da Cunha	5	Cabernet Sauvignon	8,544	Levedura e bactéria	GLAC04
Campestre da Serra	6	Bordô	8,544	Levedura e bactéria	GLAC05
Flores da Cunha	7	Bordô + Isabel	7,850	Levedura e bactéria	GLAC06
Farroupilha	8	Mertot	7,609	Levedura e bactéria	GLAC07
Farroupilha	9	Bordô + Isabel + Merlot	7,630	Levedura	-
Farroupilha	10	Bordô	7,753	Levedura	-
Farroupilha	11	Bordô	7,462	Levedura	-
Farroupilha	12	Bordô + Isabel	8,544	Levedura e bactéria	GLAC09
Farroupilha	13	Seyve Villard tinto	8,544	Levedura e bactéria	GLAC10
Farroupilha	14	Bordô	7,423	Levedura e bactéria	GLAC11
Farroupilha	15	Bordô + Isabel + Merlot	7,470	Levedura e bactéria	GLAC12
Bento Gonçalves	16	Tannat	7,111	Levedura	-
Farroupilha	17	Bordô + Isabel + Merlot	6,944	Levedura e bactéria	GLAC13
Campestre da Serra	18	Bordô	7,021	Levedura	-
Farroupilha	19	Merlot	8,544	Levedura e bactéria	GLAC08
Campestre da Serra	20	Tannat	7,358	Levedura	-
Bento Gonçalves	21	Peverella	8,544	Levedura e bactéria	GLAC15
Bento Gonçalves	22	Peverella	7,763	Levedura e bactéria	GLAC16
Bento Gonçalves	23	Peverella	7,079	Levedura e bactéria	GLAC17
Bento Gonçalves	24	Peverella	7,681	Levedura e bactéria	GLAC18
Bento Gonçalves	25	Merlot	6,954	Levedura e bactéria	GLAC19
Caxias do Sul	26	Bordô + Isabel	7,086	Levedura	-
Caxias do Sul	27	Tannat	7,531	Levedura	-
Caxias do Sul	28	Bordô	8,544	Levedura	-
Bento Gonçalves	29	Isabel	7,602	Levedura e bactéria	GLAC20
Bento Gonçalves	30	Isabel	7,021	Levedura e bactéria	GLAC21
Bento Gonçalves	31	Isabel	7,672	Levedura e bactéria	GLAC22
Bento Gonçalves	32	Isabel	8,544	Levedura	-
Caxias do Sul	33	Cabernet Franc	7,699	Levedura e bactéria	GLAC23
Caxias do Sul	34	Cabernet Sauvignon	7,246	Levedura e bactéria	GLAC25
Caxias do Sul	35	Cabernet Franc	7,380	Levedura e bactéria	GLAC24
Caxias do Sul	36	Tannat	7,037	Levedura e bactéria	GLAC27
Caxias do Sul	37	Cabernet Sauvignon	7,430	Levedura	-
Caxias do Sul	38	Merlot	7,643	Levedura e bactéria	GLAC26
Caxias do Sul	39	Tannat	7,230	Levedura e bactéria	GLAC31
Caxias do Sul	40	Merlot	8,544	Levedura	-
Campestre da Serra	41	Isabel	7,420	Levedura	-
Campestre da Serra	42	Tannat	6,771	Levedura	-
Caxias do Sul	43	Tannat	7,400	Levedura	-
Farroupilha	44	Bordô + Isabel + Merlot	8,544	Levedura	-
Farroupilha	45	Isabel	7,041	Levedura e bactéria	GLAC28
Farroupilha	46	Isabel	7,799	Levedura e bactéria	GLAC29* e GLAC29a*

Farroupilha	47	Moscato	6,724	Levedura e bactéria	GLAC32
Farroupilha	48	Moscato	7,093	Levedura e bactéria	GLAC33
Farroupilha	49	Bordô + Isabel	7,146	Levedura e bactéria	GLAC30
Farroupilha	50	Merlot	6,699	Levedura e bactéria	GLAC14

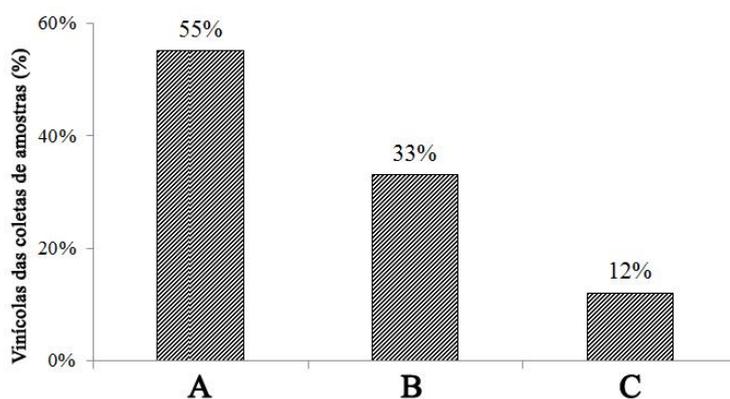
*Contagem de células viáveis considerando bactérias e/ou leveduras.

*GLAC29 e *GLAC29a foram encontradas na mesma placa de Petri.

Após contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) com auxílio de contador de colônias manual e a triagem das placas, no total, obtiveram-se 34 colônias bacterianas nomeadas com código. As colônias isoladas da mesma placa foram nomeadas seguidas de uma letra minúscula, como no caso dos isolados GLAC29 e GLAC29a. Dos 34 isolados, 22 foram provenientes das cidades de Farroupilha e Bento Gonçalves, 11 das cidades de Caxias do Sul e Flores da Cunha, e apenas um da cidade de Campestre da Serra, devido ao número de amostras avaliadas este resultado não representa uma relação local. Além disto, com este trabalho não foi possível relacionar número de isolados e variedade de uva.

No questionário aplicado no momento das coletas (Anexo 1), foram solicitadas as seguintes informações: variedade de uva do vinho, ocorrência de acompanhamento da fermentação malolática, metodologia do acompanhamento e quantidade de metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) adicionada, principalmente. Outras questões estavam presentes no questionário, como por exemplo: quantas vezes adicionou-se $K_2S_2O_5$, se foi efetuado o cálculo de SO_2 total ou livre e se era executado pé-de-cuba (pé de fermentador) na cantina. Essas últimas questões não foram consideradas, pois nem todas foram respondidas.

Já, o método utilizado para avaliar a conversão de ácido málico em ácido láctico são expressados na Figura 8.



Método analítico: A (cromatografia de papel); B (kit enzimático); C (cromatografia líquida).
Figura 8. Distribuição (%) de vinícolas de acordo a diferentes métodos analíticos para a detecção de fermentação malolática.

Nota-se prevalência do método tradicional de acompanhamento da FML, possivelmente em função do alto custo dos equipamentos e materiais necessários, além de mão de obra técnica para efetuar essa avaliação com metodologias modernas.

Já o teor de metabissulfito de potássio adicionado na vinificação tende a ser baixa (~30mg/L), levando-se em conta também adições efetuadas em mais de uma etapa (sulfitagem direta na uva, no mosto antes da fermentação alcoólica e antes da fermentação malolática). Mesmo assim, o enfoque foi conhecer o total da substância acrescida no vinho, já que adições elevadas de $K_2S_2O_5$ tendem a inibir drasticamente a ação das bactérias maloláticas.

Não foi possível estabelecer relação entre a obtenção de isolados e o teor de $K_2S_2O_5$ acrescentado em vinificações nas vinícolas, já que alguns dos responsáveis pelas informações não sabiam exatamente a quantidade acrescentada de $K_2S_2O_5$, e não eram capazes de dizer exatamente o momento ou os momentos em que ocorreram. Além disso, existiram casos onde os responsáveis afirmaram acrescentar diferentes

concentrações em tanques de fermentação distintos, dificultando ainda mais o conhecimento dessa informação.

Essa prática (sulfitagem) é muito antiga, e muitas vezes a quantidade a ser utilizada do composto é senso comum. Com a legislação brasileira permitindo até 350mg/L de $K_2S_2O_5$ (IBRAVIN, 2016), será extremamente difícil propiciar uma alternativa que vise a não interferência da FML, já que concentrações de 80~90mg/L já são suficientes para inibir essa fermentação.

4.2 Teste de catalase

As bactérias foram classificadas em catalase positiva e catalase negativas (Tabela 4). Após os resultados incompatíveis (catalase +) com as características de bactérias lácticas, os isolados GLAC02, GLAC04, GLAC07, GLAC08, GLAC09, GLAC10, GLAC13, GLAC14, GLAC15, GLAC17, GLAC18, GLAC19, GLAC20, GLAC21, GLAC22, GLAC26 e GLAC30, foram excluídos da pesquisa.

Em relação ao termo de classificação pseudocatalase, que pode ser encontrado em vários trabalhos científicos, em consequência da enzima com mesmo nome e que apresenta baixa atividade (FRIGHETTO, 2009; SILVA, 2011; LOPES, 2013), nesse estudo ignorou-se e considerou-se como positivas todas as liberações gasosas decorrentes da adição de H_2O_2 , mesmo sendo pouco vigorosas.

4.3 Coloração de Gram

As colorações de Gram (Figura 9) efetuadas com esfregaço bacteriano resultaram novamente em uma exclusão de um isolado da etapa anterior. O isolado GLAC05, Gram negativo, foi descontinuado da pesquisa.

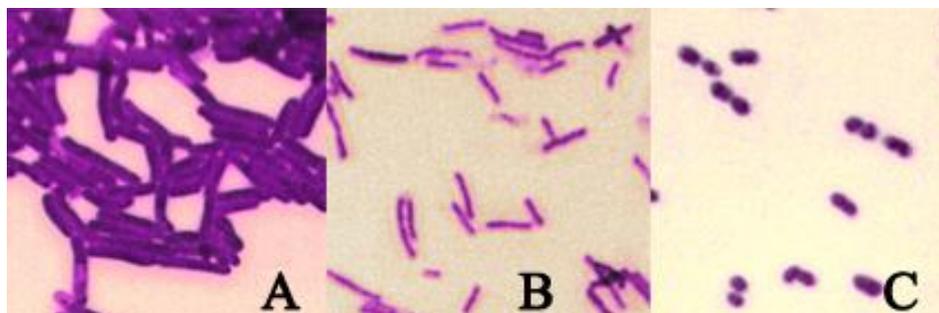


Figura 9. Microscopia de alguns dos isolados bacterianos de vinho.
Bacilos (A) e (B) e Cocobacilos (C).

Assim, todos os outros 17 isolados (somado o isolado comercial/controle) foram Gram positivos, característica essa esperada para bactérias lácticas (além de catalase negativa). A classificação em Gram positivos ou negativos encontra-se na Tabela 4, juntamente com os resultados do teste de catalase.

Tabela 4. Bactérias isoladas das amostras de vinhos – teste de catalase e coloração de Gram.

Isolados	Catalase	Coloração de Gram	Selecionados
COM	-	+	+
GLAC01	-	+	+
GLAC02	+	N.R.	-
GLAC03	-	+	+
GLAC04	+	N.R.	-
GLAC05	-	-	-
GLAC06	-	+	+
GLAC07	+	N.R.	-
GLAC08	+	N.R.	-
GLAC09	+	N.R.	-
GLAC10	+	N.R.	-
GLAC11	-	+	+
GLAC12	-	+	+
GLAC13	+	N.R.	-
GLAC14	+	N.R.	-
GLAC15	+	N.R.	-
GLAC16	-	+	+
GLAC17	+	N.R.	-

GLAC18	+	N.R.	-
GLAC19	+	N.R.	-
GLAC20	+	N.R.	-
GLAC21	+	N.R.	-
GLAC22	+	N.R.	-
GLAC23	-	+	+
GLAC24	-	+	+
GLAC25	-	+	+
GLAC26	+	N.R.	-
GLAC27	-	+	+
GLAC28	-	+	+
GLAC29	-	+	+
GLAC29a	-	+	+
GLAC30	+	N.R.	-
GLAC31	-	+	+
GLAC32	-	+	+
GLAC33	-	+	+

N.R.: Não realizado.

Após a primeira triagem, as bactérias selecionadas foram descritas de acordo com as suas características microscópicas e macroscópicas (Tabela 5).

Tabela 5. Características microscópicas e macroscópicas de isolados bacterianos catalase negativo e Gram positivos.

Morfologia geral dos isolados							
Características	Microscópicas	Macroscópicas					
Isolados	Tipo celular	Cor	Forma	Borda	Superfície	Consistência	Aparência
COM	Cocos	Bege	Circular	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC01	Bacilo	Branca	Puntiforme	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC03	Bacilo	Bege	Puntiforme	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC06	Bacilo	Branca	Puntiforme	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC11	Bacilo	Branca	Irregular	Ondulada	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC12	Cocos	Branca	Irregular	Ondulada	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC16	Cocos	Bege	Circular	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC23	Bacilo	Branca	Irregular	Lisa	Pulvinada	Creмоса	Brilhante
GLAC24	Cocobacilo	Branca	Puntiforme	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC25	Cocos	Bege	Puntiforme	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC27	Bacilo	Branca	Irregular	Ondulada	Convexa	Creмоса	Brilhante
GLAC28	Bacilo	Branca	Circular	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC29	Cocos	Branca	Irregular	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC29a	Bacilo	Branca	Irregular	Ondulada	Pulvinada	Creмоса	Opaca
GLAC31	Bacilo	Branca	Irregular	Ondulada	Pulvinada	Creмоса	Opaca
GLAC32	Cocos	Bege	Puntiforme	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante
GLAC33	Cocos	Bege	Irregular	Lisa	Lisa	Creмоса	Brilhante

De modo geral, as bactérias podem ser confundidas facilmente, por conta do tamanho da colônia ser bastante pequeno, bem como a coloração ser muito semelhante com a cor de colônias levedurianas.

A Figura 10 corresponde a registros da morfologia macroscópica de alguns isolados crescidos em meio YEPD.

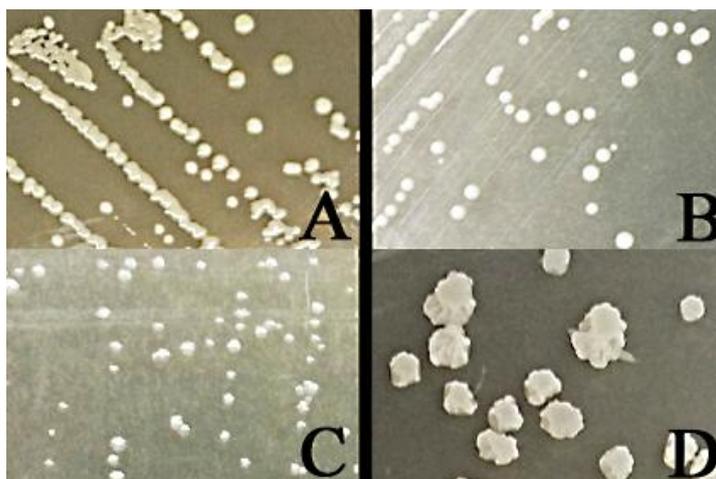


Figura 10. Características morfológicas de alguns isolados.
A (GLAC01); B (GLAC06); C (GLAC27); D (GLAC29a).

4.4 Teste de mobilidade celular

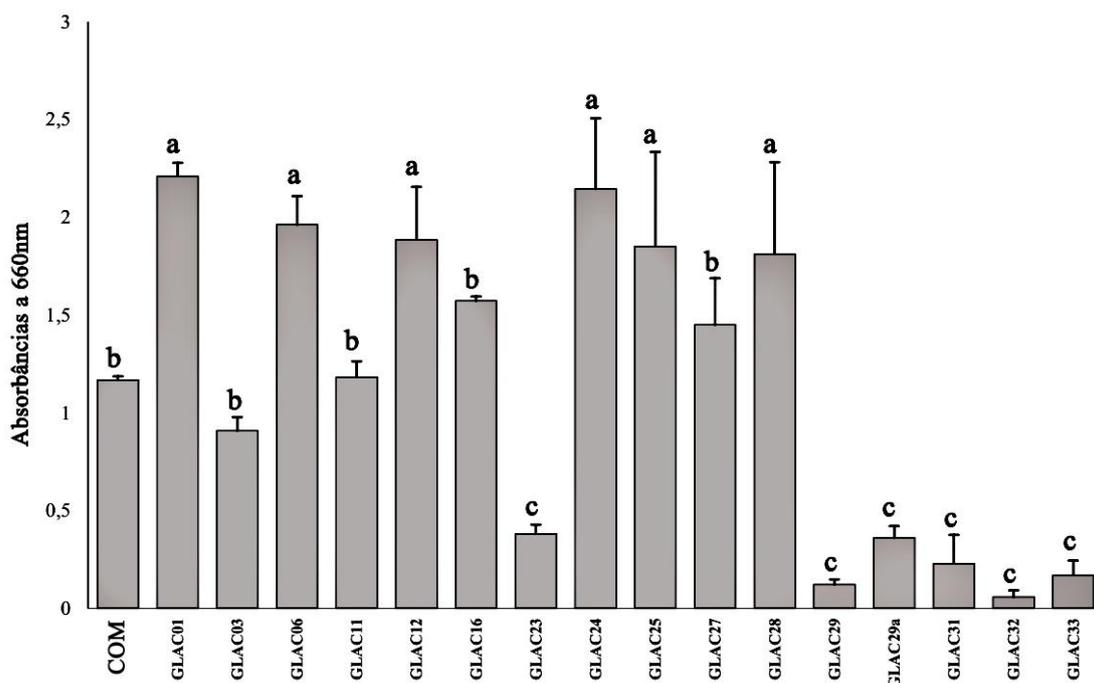
Após o tempo estipulado de incubação, os tubos de ensaio contendo meio YEPD semi-sólido foram avaliados, procurando observar formação de turvação em outras regiões do meio além do local da picada da agulha bacteriológica, sulcos, rachaduras ou ranhuras decorrentes da movimentação bacteriana, ou até mesmo produção satisfatória de gás que possibilitasse a formação dessas condições.

Após o ensaio, todos os isolados foram classificados como imóveis, ou seja, não tiveram capacidade de movimentar-se no interior do meio semi-sólido (conforme características de bactérias láticas).

4.5 Crescimento em meio líquido

Decorrido o tempo de crescimento em estufa a 30°C, os cultivos nos tubos de ensaio em triplicatas foram avaliados em espectrofotômetro, para a determinação das absorvâncias.

Com o resultado do teste, observou-se que os isolados puderam ser classificados em três grupos (Figura 11), com relação à capacidade de crescimento eficiente em meio líquido YEPD. Os grupos a, b, c, indicam maior e menor crescimento em ordem, respectivamente: a. GLAC01, GLAC06, GLAC12, GLAC24, GLAC25 e GLAC28 (35,29%); b. COM, GLAC03, GLAC11, GLAC16 e GLAC27 (29,41%); c. GLAC23, GLAC29, GLAC29a, GLAC31, GLAC32 e GLAC33 (35,29%).



As médias foram agrupadas por teste estatístico, e as letras sobre as barras indicam o seu agrupamento. As letras iguais demonstram que os valores não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 11. Crescimento em meio líquido dos isolados bacterianos.

O meio de cultura YEPD é muito utilizado para o cultivo de leveduras, e foi possível identificar que conseguia suprir as necessidades nutricionais das bactérias lácticas, como relatado nos trabalhos de Nobre (2005 e 2007), que se utilizou de um meio semelhante ao YEPD, o GLT, para o crescimento de *Bacillus* sp. Além disso, o meio YEPD já se demonstrou versátil para o crescimento de outros organismos, além de leveduras, como o de *C. elegans* (WASKO *et al.*, 2013). Neste trabalho o meio YEPD mostrou ser eficiente para o crescimento dos isolados de vinhos, sendo que onze (64,7%) das dezessete bactérias apresentaram absorbância de 1,0 a 2,5.

Por mais que existiram bactérias com crescimento baixo, pode-se perceber que o meio de cultura YEPD pode ser utilizado para o crescimento e manutenção dos isolados de bactérias maloláticas em laboratório, sem exigência de um meio mais

complexo. Porém, esse meio não deve ser utilizado para o isolamento dessas bactérias por impulsionar o desenvolvimento de colônias levedurianas (ANGELIS & VALSECHI, 2006).

4.6 Fermentação de carboidratos

Conforme os resultados, podemos caracterizar os isolados com relação à capacidade fermentativa dos carboidratos (Quadro 2).

Quadro 2. Fermentação de carboidratos e manitol dos isolados selecionados.

	COM	GLAC01	GLAC06	GLAC03	GLAC11	GLAC16	GLAC24	GLAC27	GLAC28	GLAC12	GLAC29	GLAC25	GLAC23	GLAC29a	GLAC31	GLAC32	GLAC33
Arabinose	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Lactose	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Manitol	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Sacarose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Xilose	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

Considerando os diferentes tipos de carboidratos testados: monossacarídeos (arabinose, frutose, galactose, glicose, manose, ribose e xilose), dissacarídeos (celobiose, lactose, maltose, melibiose e sacarose), trissacarídeos (rafinose) e um poliálcool (manitol), pode-se comparar com resultados obtidos por Endo & Okada

(2008), que investigou espécies de *Lactobacillus* sp. e *Fructobacillus* sp.. Com relação aos monossacarídeos, todos os isolados do trabalho de Endo & Okada realizaram fermentação da glicose, sendo que no isolamento deste trabalho, 88% dos isolados também a fermentaram. A arabinose deu-se de 46% contra 41% neste trabalho, bem como a frutose que obteve uma porcentagem de 92% contra 88% neste trabalho. A fermentação de xylose em ambos os estudos obtiveram um percentual de 23%, ou seja, 23% dos isolados de cada estudo a fermentaram. Outra classe que pôde ser comparada foram os dissacarídeos, onde 76% dos isolados do trabalho de 2008 fermentaram-na contra 70% dos isolados do presente estudo. Os demais carboidratos obtiveram grandes diferenças quando comparados os estudos. Endo & Okada, relataram uma taxa de 53% de fermentações de manitol, contra apenas 17% nesse trabalho.

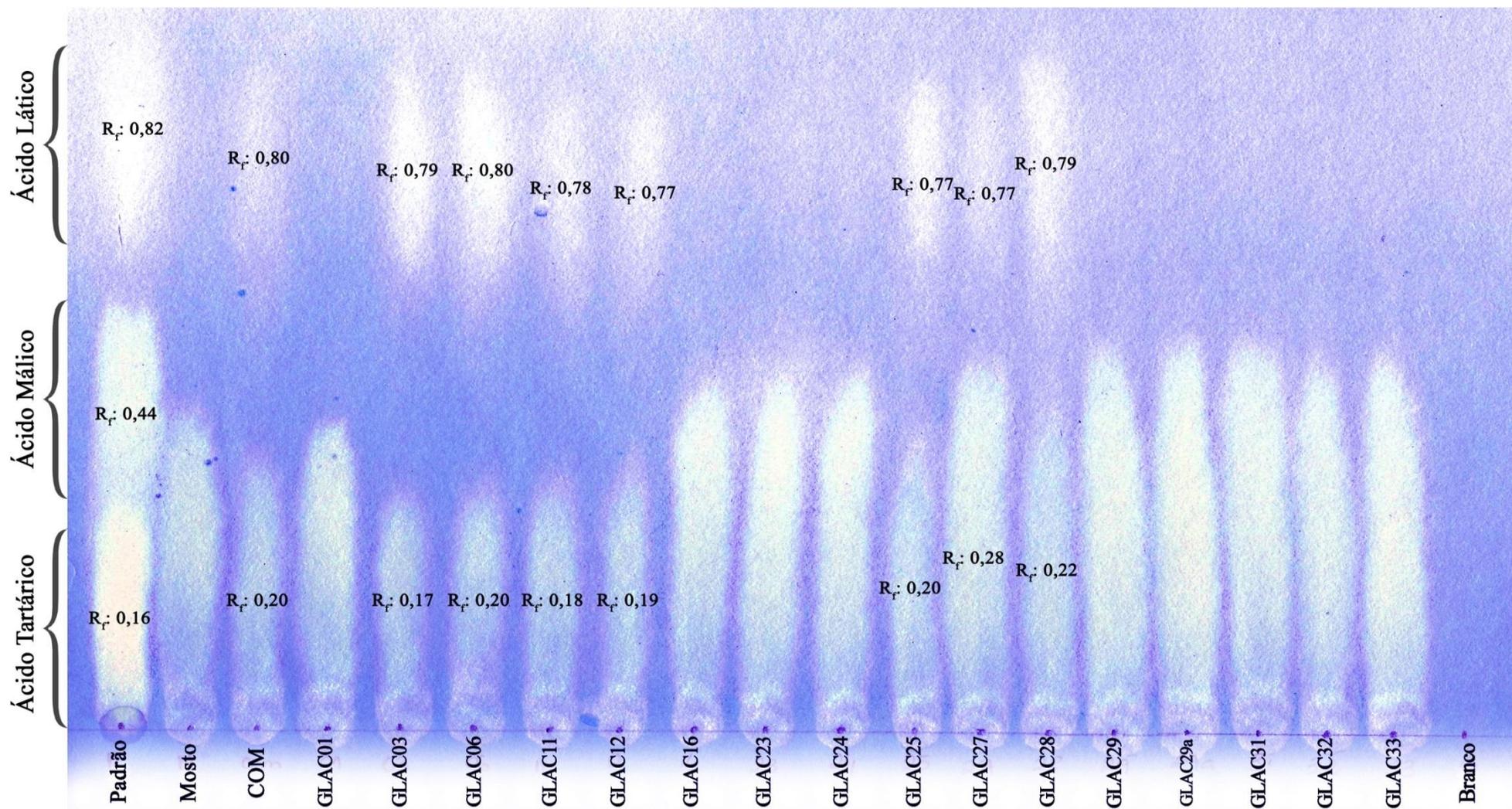
Essa comparação entre estirpes de trabalhos é importante pois busca padrões de fermentação entre grupos bacterianos ou até mesmo entre espécies que sejam isoladas de ambientes semelhantes (FORTES, 2008).

4.7 Fermentação em mosto sintético

Após dez dias que os isolados foram incubados em mosto sintético, executou-se a avaliação dessas fermentações em cromatografia de papel, além de efetuar também a medida das absorbâncias desses cultivos, que foram avaliados a 660nm (BINATI, 2015; KUDA *et al*, 2016; KANAI *et al*, 2017).

Com a avaliação da cromatografia de papel, pôde-se observar que sete isolados (GLAC03, GLAC06, GLAC11, GLAC12, GLAC25, GLAC27 e GLAC28), dos

dezessete, desenvolveram a fermentação malolática com eficiência. O isolado comercial, como esperado, efetuou a fermentação malolática; porém em comparação com os isolados GLAC03, GLAC06, GLAC25 e GLAC28, parece ter convertido menos ácido málico, de acordo com a Figura 12.



* R_f : fator de retenção ($R_f = \text{distância percorrida da substância} / \text{distância percorrida pelo solvente}$).

Figura 12. Cromatografia de papel, demonstrando a capacidade de fermentação malolática dos isolados em mosto sintético. COM (O. oeni comercial - SEP-14). As bactérias com a mancha superior, foram os isolados bacterianos que tiveram redução málica.

É importante salientar que essas bactérias são organismos exigentes a nível nutricional e podem se comportar de maneira diferente em distintos meios de sobrevivência. O mosto sintético utilizado em laboratório, por mais similar que possa ser ao mosto natural, difere em composição química. Pode-se diferenciá-los em níveis de carboidratos e outros componentes de acordo com a espécie de uva utilizada, o que pode afetar o resultado e não desempenhar a FML da mesma forma com que os isolados desempenharam *in vitro* (em mosto sintético).

O mesmo serve para a comparação entre mostos e vinhos. Bactérias que efetuam determinada reação em mosto, precisam ser novamente avaliadas em vinho, pois se alteram as condições de crescimento, já que o habitat é diferente (pH, presença de etanol, diminuição das concentrações de carboidratos) (RIBERÉAU-GAYON *et al*, 2006).

As manchas na cromatografia de papel (Figura 13, 15 e 16) referem-se aos três ácidos encontrados no vinho (ácido tartárico [R_f : 0,17 ~ 0,20/massa molar: 150,08 g/mol], ácido málico [R_f : ~ 0,40/massa molar: 134,08 g/mol] e ácido láctico [R_f : 0,74 ~ 0,80/massa molar: 90,08 g/mol]). A separação desses três ácidos orgânicos se dá através da diferença de peso molecular entre eles, sendo que o mais pesado é o ácido tartárico, cuja mancha é a primeira a ser observada logo após a base da fase imóvel, seguido pelo ácido málico (segunda mancha) e o mais leve, o ácido láctico, no fim do papel cromatográfico. As separações executadas nesse trabalho seguiram a metodologia clássica de acompanhamento da FML em cantinas (DAUDT, 1971; RIZZON, 2010), e através delas conseguiu-se identificar as bactérias que eram maloláticas por conta do desaparecimento da mancha do ácido málico, e surgimento da mancha do ácido láctico.

A avaliação da alteração do pH após dez dias de fermentação, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Avaliação do mosto sintético após fermentação de dez dias com isolados bacterianos.

Fermentação em mosto sintético		
Isolados	*pH	Aumento de pH
Mosto Sintético	3,41	-
COM	3,52	0,11
GLAC01	3,42	0,01
GLAC03	3,39	-
GLAC06	3,34	-
GLAC11	3,53	0,12
GLAC12	3,49	0,08
GLAC16	3,33	-
GLAC23	3,42	0,01
GLAC24	3,44	0,03
GLAC25	3,51	0,1
GLAC27	3,34	-
GLAC28	3,41	-
GLAC29	3,48	0,07
GLAC29a	3,36	-
GLAC31	3,41	-
GLAC32	3,34	-
GLAC33	3,52	0,11

*Médias dos valores avaliados em triplicatas.

Como observado por Knoll *et al*, (2011) e Chesini (2005), alguns isolados alteraram o pH do mosto, diminuindo a acidez. O isolado COM (comercial) pôde ser utilizado como controle positivo, e quando se compara o pH do mosto com o pH do fermentado por essa bactéria, observa-se aumento de pH de 3,41 para 3,52 (aumento de 0,11), o que indicou a existência da fermentação malolática..

Seguindo, todos os isolados que apresentaram estas características, podem ter realizado a FML, pois apresentaram redução de acidez (aumento de pH). Comparando com a cromatografia de papel, em que mostra a ocorrência dessa fermentação (com a existência do ácido lático), apenas os isolados GLAC11, GLAC12, GLAC25, GLAC29 e GLAC33 reduziram a acidez, aumentando o nível de pH em 0,12; 0,08; 0,10; 0,07 e 0,11, respectivamente. Já, as outras bactérias que demonstraram transformação de ácido málico para lático na cromatografia de papel (GLAC03, GLAC06, GLAC27) alteraram o pH original

do mosto, sendo que esses isolados o acidificaram. O isolado GLAC28 não alterou o seu pH, assim como GLAC01 e GLAC31. Em resumo pode-se dizer que: Apenas quatro isolados que apresentaram mancha de ácido lático na cromatografia de papel, reduziram a acidez do mosto (COM - ↑pH 0,11; GLAC11 - ↑pH 0,12; GLAC12 - ↑pH 0,08 e GLAC25 - ↑pH 0,10); Alguns isolados apenas reduziram acidez e não apresentaram mancha do ácido lático na cromatografia de papel (GLAC24 - ↑pH 0,03; GLAC29 - ↑pH 0,07; GLAC33 - ↑pH0,11) e alguns isolados apenas apresentaram a mancha do ácido lático na cromatografia, porém não reduziram a acidez do mosto, podendo ter executado a fermentação láctica, visto que existia a presença de altas concentrações de açúcares redutores na sua composição (GLAC03, GLAC06, GLAC27 e GLAC28).

No que diz respeito ao crescimento de biomassa em mosto, pode-se evidenciar um baixo desenvolvimento celular na maioria das bactérias. Notou-se um crescimento celular superior justamente nos mostos que ocorreram fermentação malolática (COM, GLAC03, GLAC06, GLAC11, GLAC12, GLAC27 e GLAC28). O isolado GLAC25 não apresentou um bom crescimento, e mesmo assim, efetuou a FML como visto na cromatografia de papel.

Quando comparamos o crescimento em mosto sintético com o crescimento em meio líquido YEPD (realizado no início do trabalho), pode-se perceber uma diferença evidente na capacidade de multiplicação celular entre as linhagens (Figura 13). As bactérias cresceram mais em meio YEPD primeiramente pela diferença de pH, visto que esse meio foi ajustado para o pH neutro (7,0). Ao contrário do mosto sintético que foi ajustado a fim de assemelhar-se ao mosto natural (pH 3,4). Apesar dessas bactérias serem mais tolerantes aos níveis baixos de pH, a presença de diferentes ácidos presentes no mosto sintético, pode ter potencializado o efeito inibitório dessas bactérias (JAENISCH *et al*, 2010). A acidificação do

meio reduz a atividade de enzimas sensíveis, o que resulta em danos para as proteínas e para o DNA bacteriano (BOTELHO *et al*, 2015).

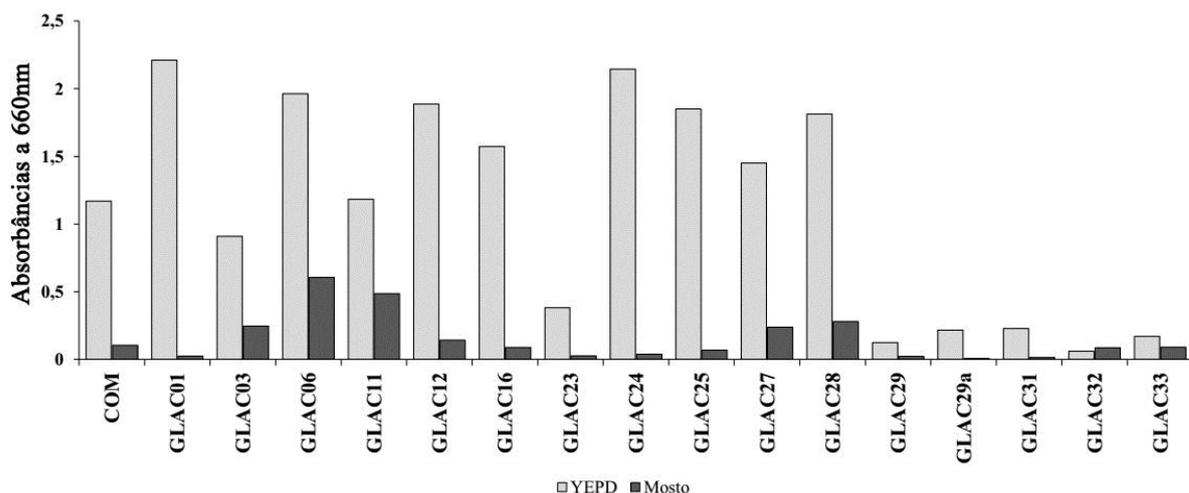


Figura 13. Comparação entre crescimento em meio líquido YEPD e mosto sintético.

Outro fator que pode explicar a diferença de crescimento é a presença de extrato de levedura em YEPD. O extrato de levedura é originado após a autólise de leveduras, liberando assim o seu conteúdo interno, sendo esse uma rica fonte proteica derivada de células vivas, tendo como aminoácido predominante o ácido glutâmico e o inositol. Esse segundo é um importante promotor de crescimento e estimula a síntese de biotina (vitamina ativamente participante de inúmeras reações) (SILVA, 2006).

Mesmo o mosto sintético contendo inositol (meso-inositol [0,25%]) e biotina em baixíssimas quantidades, a eficiência do metabolismo deu-se em YEPD, pois além do pH estar nêutro, a quantidade disponível dessas substâncias acaba por se tornar superior ao mosto sintético.

4.8 Crescimento dos isolados em diferentes pH, concentrações de etanol e K₂S₂O₅

Os resultados do experimento de resistência em diferentes condições de crescimento encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Crescimento dos isolados em diferentes condições (pH, graduação alcóolica e concentrações de K₂S₂O₅).

	pH					Etanol					Metabissulfito de potássio (K ₂ S ₂ O ₅)				
	2,9	3,1	3,5	4,0	5,0	10%	14%	16%	20%	30%	20mg/L	40mg/L	60mg/L	90mg/L	100mg/L
COM	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
GLAC01	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
GLAC03	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
GLAC06	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
GLAC11	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
GLAC12	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
GLAC16	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
GLAC23	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
GLAC24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
GLAC25	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
GLAC27	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
GLAC28	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
GLAC29	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
GLAC29a	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
GLAC31	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
GLAC32	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
GLAC33	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-

+ Crescimento - Ausência de crescimento

A tabela com os resultados individuais de cada bactéria isolada demonstra a diversidade encontrada. Em pH mais baixo (2,9 e 3,1), menos da metade dos isolados conseguiram se adaptar e se desenvolver, sendo o pH ideal para crescimento foi próximo ao neutro, como também foi observado por Binati (2015), o qual relatou que o pH baixo está na faixa de extrema dificuldade para o desenvolvimento bacteriano.

Os isolados se desenvolveram melhor nas concentrações mais baixas de metabissulfito de potássio, e em graduação alcóolica menor. Isso se confirma, pois o metabissulfito é responsável pelo aparecimento de ácido sulfídrico e de mercaptanos, dando seu nível inibitório (LARENTIS, 2012) e, já foi relatado que a maior ação sobre as bactérias é exercida sob a forma livre de SO₂ (molecular), sendo que sua concentração aumenta com a diminuição

do pH e aumento do teor alcóolico (BINATI, 2015). Ou seja, ambos inibem drasticamente a população bacteriana e se relacionam quimicamente quando o pH é baixo (características dos vinhos regionais).

Comparando o comportamento bacteriano *in vitro* nas diferentes concentrações de K₂S₂O₅, com a quantidade de sulfitagem declarada pelas vinícolas, pode-se entender que as bactérias lácticas encontradas nas amostras de vinhos eram provenientes em sua maioria, de amostras em que se utilizou menos de 80mg/L de metabissulfito de potássio. Comprovou-se no teste que as bactérias não resistem em níveis acima de 80mg/L de metabissulfito de potássio, o que entende-se que nas amostras coletadas em que foram utilizadas concentrações superiores a essa, a maior parte da biomassa bacteriana já havia desaparecido.

Em continuidade, com o objetivo de selecionar bactérias que primeiramente realizaram a FML e em segundo lugar, foram mais resistentes ao teor alcóolico, níveis de acidez alta e às concentrações mais elevadas de metabissulfito de potássio, os isolados selecionados para prosseguimento da seleção seguem no Quadro 3.

Quadro 3. Relação dos isolados selecionados até o experimento de caracteres enológicos.

Isolados selecionados para prosseguimento dos experimentos											
	COM	GLAC01	GLAC03	GLAC06	GLAC11	GLAC12	GLAC24	GLAC25	GLAC27	GLAC28	GLAC29
*A	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
*B	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
*C	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
*D	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

*A (fez fermentação malolática em mosto sintético); B (apresenta caráter acidófilo); C (boa tolerância a etanol); D (boa tolerância a metabissulfito de potássio).

* Isolado GLAC01, GLAC24 e GLAC29 foram utilizados como controle negativo para FML.

Com o intuito de comparar as bactérias que fermentam com as que não fermentam, selecionou-se aleatoriamente três isolados que não efetuaram a fermentação malolática

(GLAC01, GLAC24 e GLAC29) no experimento anterior (fermentação em mosto sintético). Essas bactérias foram utilizadas como controle negativo para a FML, além da amostra de vinho sem inoculação bacteriana.

4.9 Microvinificações de isolados com potencial de FML

Esse experimento teve como finalidade a elaboração em pequena escala de vinho sintético para avaliação do comportamento dos isolados perante as novas condições de crescimento. As bactérias já haviam sido testadas quanto à capacidade de resistência a algumas características enológicas em meio complexo modificado (caldo YEPD com teores de etanol, concentrações de metabissulfito de potássio e diferentes pH), e, após seleção, é fundamental que elas consigam resistir às condições do vinho sintético (teor alcóolico de 10% e pH 4,0), sendo que essas condições quando comparadas com as do vinho natural regional, são mais favoráveis ao crescimento das bactérias.

O vinho produzido no Rio Grande do Sul apresenta, segundo alguns estudos, pH abaixo de 4,0 (STEIN *et al* 2016); Bender *et al* (2017) e Costa (2017), e especialmente os vinhos produzidos da variedade Cabernet Sauvignon apresentaram pH em torno de 3,79. Resultados semelhantes foram obtidos por Vargas *et al* (2016), onde vinhos elaborados da casta Chardonnay apresentaram pH de 3,47. Por mais que esse último seja um vinho branco e comumente a FML não é desejada nesse tipo de vinho, a informação tem relevância sendo que nesse trabalho algumas amostras foram coletadas de vinhos brancos em estágio de FML. Todos os valores mencionados apresentaram uma característica mais ácida ao vinho natural produzido no Rio Grande do Sul, quando comparado com o vinho sintético onde foram executadas as microvinificações com os isolados bacterianos.

Com relação ao título alcoométrico, Stein *et al* (2016) obtiveram resultados que variaram de 11,96 e 14,10%. Já o grau alcóolico obtido no estudo de Vargas *et al* (2016) foi aproximado a 13% (12,8%). Bender *et al* (2017) também registraram teor de álcool em Cabernet Sauvignon de 13,6%. Todos esses números indicam que parte dos vinhos gaúchos tem teor alcóolico maior do que o ajustado no vinho sintético utilizado neste estudo. Também é importante salientar que o vinho sintético não foi sulfitado, o que facilita o crescimento populacional das bactérias maloláticas. Considerando-se os dados mencionados, o teste de microvinificação foi executado a fim de avaliar se os isolados seriam bons fermentativos em condições mínimas estipuladas pelo Decreto N° 8.198 de 20 de fevereiro de 2014, onde institui que o vinho recém-elaborado, realizado a partir de *Vitis vinifera*, deve conter um mínimo de 10% e um máximo de 14% de etanol em temperatura de 20°C.

Detendo-se à etapa experimental, após o fim do período fermentativo, observou-se que grande parte dos isolados não se desenvolveu em vinho sintético. Essa constatação se deu por conta do vinho encontrar-se translúcido, ou seja, como se não tivesse ocorrido nenhum tipo de desenvolvimento bacteriano. Isso provavelmente ocorreu por conta da presença das concentrações de álcool, que inibiram as bactérias e/ou até mesmo provocaram a morte celular. O isolado comercial apresentou um bom crescimento.

As bactérias que não se desenvolveram na etapa de microvinificações foram: GLAC01, GLAC12, GLAC24, GLAC25, GLAC27 e GLAC29. Esse comportamento não foi coerente com o teste antes efetuado, pois, de acordo com esse ensaio, as bactérias que não se desenvolveram nessa microvinificação, apresentaram boa tolerância ao etanol anteriormente (avaliação das características enológicas – concentração de etanol). Porém, isso pode ser explicado pelo fato de que em condições de placa de cultura, onde a anaerobiose é induzida através do petrolato líquido, a concentração de etanol testada pode variar com o tempo. Esse

fenômeno ocorre por conta da volatilização do etanol que não tem forte impedimento de escape, impulsionado também pela temperatura e tempo de exposição à temperatura da estufa (30°C/7dias), representando assim um falso positivo quanto à sensibilidade desses microrganismos. Quando essas bactérias foram acrescidas no recipiente com vinho sintético, com a respectiva concentração de etanol e tampados com rosca, ou seja, com excelente impedimento de perda de etanol pela volatilização, elas não conseguiram resistir ao teor de álcool existente.

Apesar desse fato ter se demonstrado equivocado na seleção anterior desses microrganismos, a prova real da sua incapacidade de crescimento em 8 e 10% de etanol foi comprovada no experimento de vinificação; assim sendo, apenas os isolados que demonstraram bom crescimento foram avaliados. Para as bactérias que apresentaram bom crescimento e alta capacidade fermentativa, avaliaram-se as modificações de pH titulável, bem como turbidez do vinho (crescimento bacteriano).

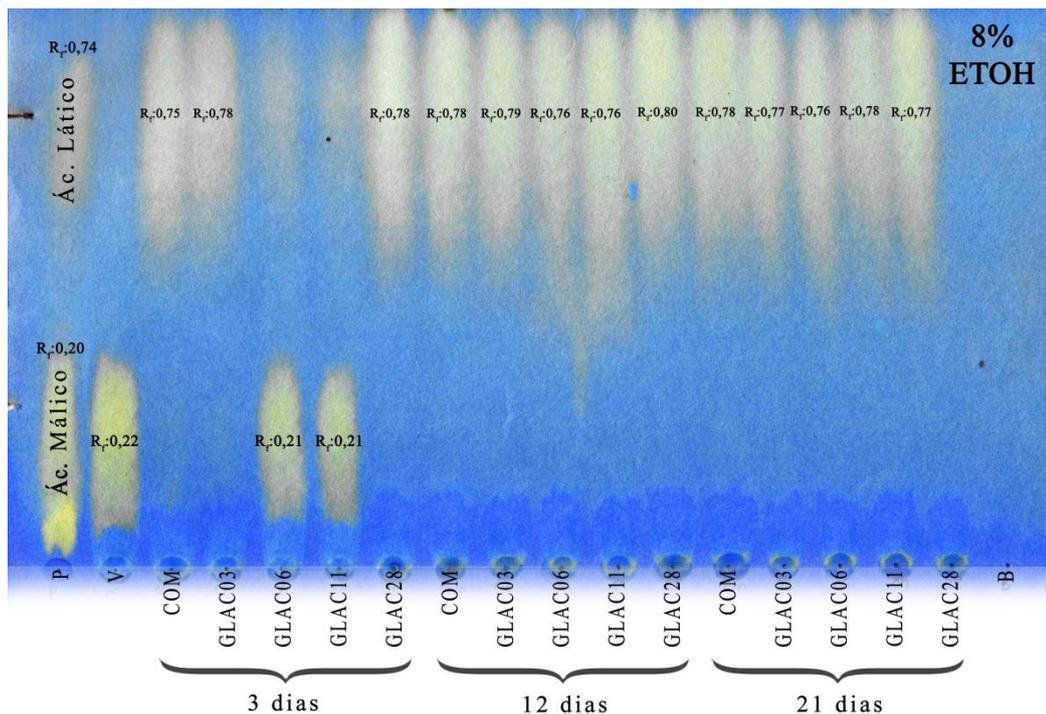
Tabela 8. pH dos vinhos após fermentação dos isolados bacterianos.

	8% Etanol	10% Etanol
Controle	4,17*	4,19*
COM	4,22	4,25
GLAC03	4,32	4,26
GLAC06	4,66	4,65
GLAC11	4,7	4,63
GLAC28	4,25	4,21

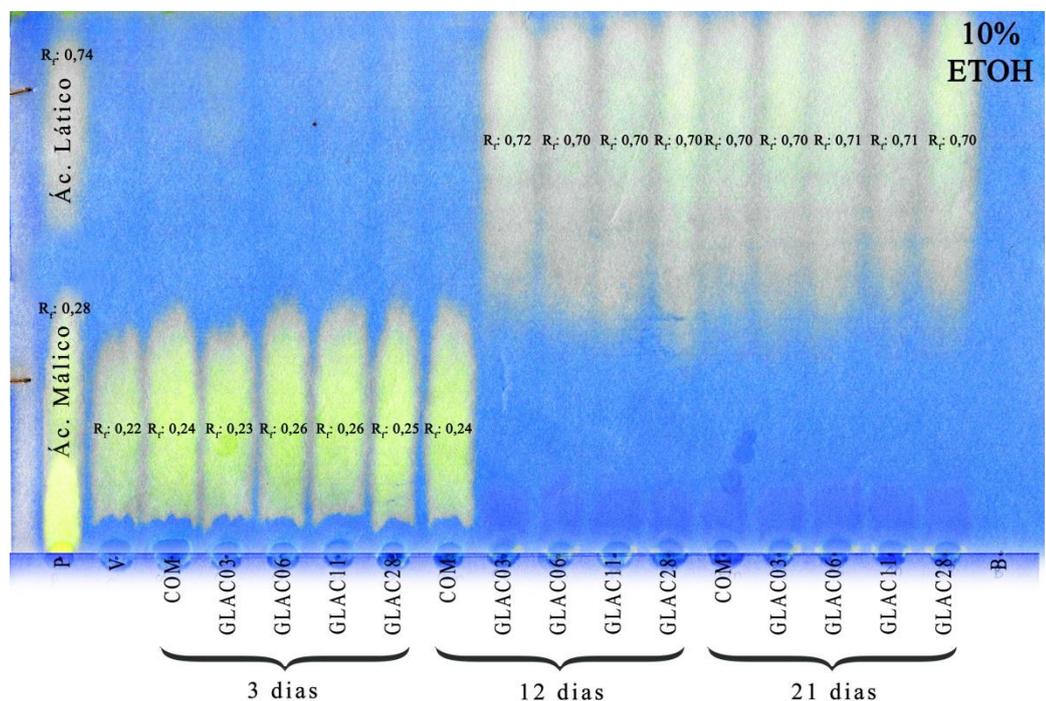
O controle utilizado foi o vinho sintético sem fermentação.

*A diferença de 0,02 na titulação do pH dos vinhos se deve à diferença do teor alcóolico.

Em caráter qualitativo, as cromatografias em papel foram efetuadas com amostragens de todos os isolados em período de três, 12 e 21 dias de fermentação, em 8 e 10% de etanol (Figura 14 e 15).



* R_f : fator de retenção ($R_f = \text{distância percorrida da substância} / \text{distância percorrida pelo solvente}$).
Figura 14. Cromatografia demonstrando a eficiência da FML em vinho sintético (8%). P = padrão de ácidos; V = controle negativo para a fermentação; B = água.



* R_f : fator de retenção ($R_f = \text{distância percorrida da substância} / \text{distância percorrida pelo solvente}$).
Figura 15. Cromatografia demonstrando a eficiência FML em vinho sintético (10%). P = padrão de ácidos; V = controle negativo para a fermentação; B = água.

Pode-se perceber que, em concentração menor de etanol, menor é a interferência que ele exerce sobre as bactérias lácticas (RIBERÉAU-GAYON *et al*, 2006), o que acarreta em um início fermentativo adiantado em 8% de álcool, onde todas as bactérias executaram a fermentação malolática até o décimo segundo dia. Já em 10% de teor de álcool, as bactérias iniciaram a FML apenas no décimo segundo dia, ou seja, no momento em que as bactérias que foram inoculadas no vinho com 8% de etanol estavam finalizando a fermentação.

Em 8% de álcool etílico no vinho, os isolados GLAC03 e GLAC28 conseguiram conversão ácido málica até o terceiro dia, apresentando um comportamento semelhante a bactéria comercial. Já as bactérias GLAC06 e GLAC011, percebeu-se o início de fermentação com o surgimento de leves manchas superiores, que indicam o ácido láctico. Essa diferenciação mostra uma assincronia fermentativa, ou seja, elas iniciam a FML em tempos distintos. Esse tempo está altamente relacionado à multiplicação celular, visto que a FML só tem seu efetivo início quando o número populacional for relativamente alto.

A quantificação da FML (Figura 16), avaliada com o Kit Boehringer Mannheim / R-Biopharm Cat. N. 10 139 068 035, foi executada com a concentração etanólica de 10%, porém mesmo assim confirma o assíncrono início da FML entre os isolados GLAC03, GLAC06, GLAC11 e GLAC28 (que iniciaram a fermentação no terceiro dia) e o isolado COM (que iniciou a fermentação apenas no décimo segundo dia, ou seja, nove dias após os demais isolados).

Todos os isolados testados apresentaram capacidade de realizar FML, incluindo a comercial, no entanto, ela iniciou a FML em atraso quando comparadas com os demais. Considerando-se que foram utilizadas as mesmas condições de crescimento, pode-se compará-las e predispor uma concorrência acentuada dos novos isolados contra a estirpe comercial, utilizada comumente em vinificações industriais. Essa diferença pode sugerir uma

adaptação mais difícil da bactéria comercial às condições do vinho sintético, e esse mesmo comportamento pode vir a ser diferente em vinho natural.

Com baixa disponibilidade de carboidratos, no caso a glicose presente na composição desse vinho sintético (0,1%), as bactérias procuram alternativas para a sua produção energética e viabilização de suas funções metabólicas. O ácido málico, presente em 1% do vinho utilizado no experimento, serviu satisfatoriamente para todas as bactérias, as quais conseguiram se desenvolver e turvar a solução de vinho.

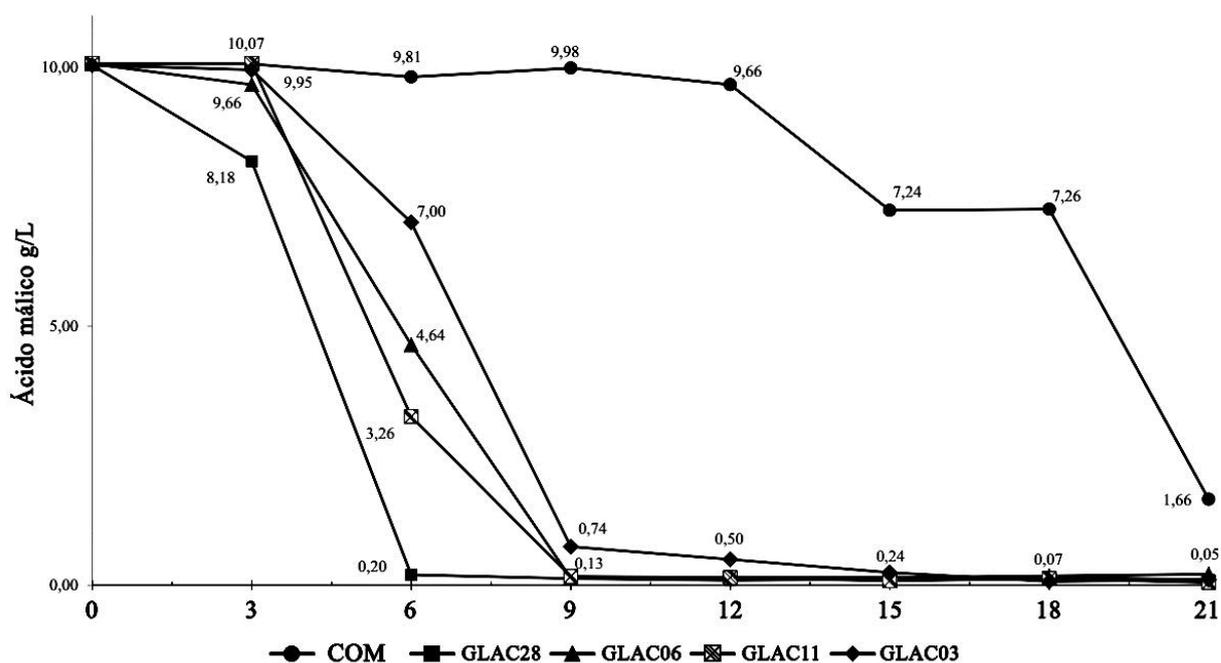


Figura 16. Degradação de ácido málico em fermentação malolática executada pelos isolados COM, GLAC03, GLAC06, GLAC11 e GLAC28, em vinho sintético com conteúdo inicial de 10g/L de ácido málico.

A alteração do pH titulável está relacionada com a eficiência da FML, visto que os décimos de aumento do pH correspondem à conversão dos ácidos. Essa mudança de pH é altamente perceptível ao paladar.

4.10 Classificação dos isolados selecionados

Os resultados obtidos pelas análises das sequências dos cinco isolados que realizaram a fermentação malolática (GLAC03, GLAC06, GLAC11, GLAC28 e o isolado comercial), permitiu identificar as bactérias selecionadas (Tabela 9).

Tabela 9. Classificação final dos isolados e da bactéria comercial.

Isolado	Classificação	E. value	Identidade	Acessos
COM	<i>Oenococcus oeni</i>	0.0	84%	AB054808.1
GLAC03	<i>Lactobacillus suebicus</i>	0.0	98%	LC071852.1
GLAC06	<i>Lactobacillus suebicus</i>	0.0	98%	LC071852.1
GLAC11	<i>Lactobacillus suebicus</i>	0.0	98%	LC071852.1
GLAC28	<i>Lactobacillus pentosus</i>	0.0	99%	KX057667.1
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.0	99%	CP024413.1

*Banco de dados dos acessos: INSDC – International Nucleotide Sequence Database Collaboration – GenBank.

Com os resultados finais, pode-se perceber que todos os isolados que realizaram fermentação malolática são do gênero *Lactobacillus* sp.. Os isolados GLAC03, GLAC06 e GLAC11 foram classificados como a espécie *Lactobacillus suebicus* que já foi relatada como potencial candidata à produção de alimentos saudáveis (GARAI-IBADE *et al*, 2010), dentre eles, isolada de bebidas, como a cidra na Espanha (PUERTAS *et al*, 2014) e diversas aguardentes de frutas (KLEYNMANS *et al*, 1988). A bactéria é uma heterofermentativa e produz CO₂, etanol, acetado e DL-Lactato a partir de glicose (KLEYNMANS *et al*, 1988; DICKS & ENDO, 2009), porém, até então, não foi relatada como uma bactéria malolática.

O isolado GLAC28, apresentou similaridade a duas espécies, *Lactobacillus pentosus* (99%) e *Lactobacillus plantarum* (99%) (Figura 21), como já relatada anteriormente (BRINGEL *et al*, 2005), e para diferenciá-las necessita-se de uma classificação diferencial adicional, que é possível apenas com métodos genotípicos específicos (DICKS & ENDO,

2009), como executado por Torriani *et al* (2001), que explorou regiões variáveis de nucleotídeos do gene *recA* de *Lb. pentosus* e *Lb. plantarum*, e através de um multiplex-PCR, conseguiu separar ambas as espécies, além de também propor uma hibridização de 15 a 56% de seus genomas. Parente *et al* (2010), também executaram a diferenciação genotípica dessas duas espécies, e se utilizou de métodos como multiplex-PCR, rep-PCR, RAPD-PCR e SDS-PAGE. A espécie *Lb. pentosus* não pode ser discriminada de outras espécies como *Lb. plantarum* e *Lb. paraplantarum* apenas pela sequência de 16S rDNA (SIEZEN *et al*, 2011).

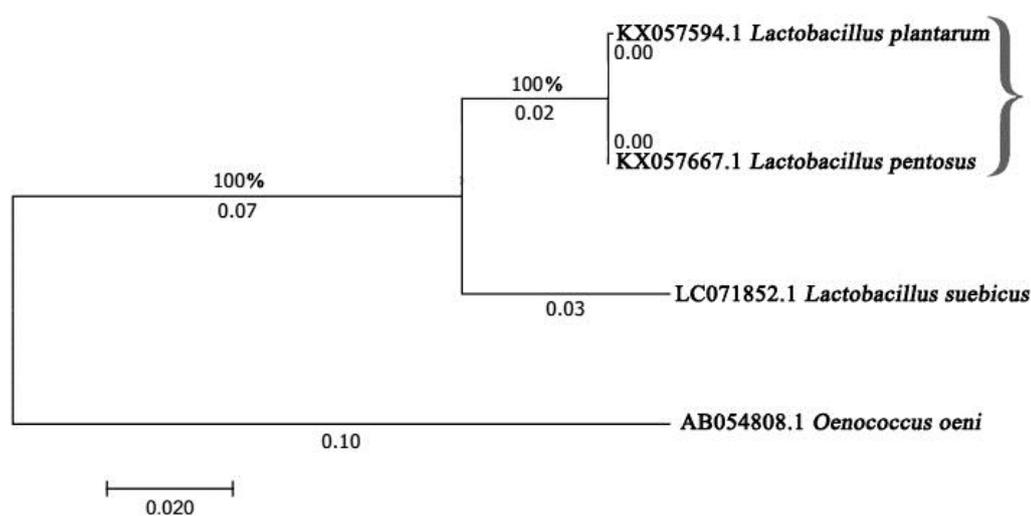


Figura 17. Árvore estabelecida pelo método de Máxima Verossimilhança com *Bootstrap* de 500 réplicas.

Na avaliação filogenética efetuada com as sequências de nucleotídeos dos isolados, construiu-se um dendrograma (Figura 17) que demonstra a similaridade entre as espécies isoladas nesse trabalho e também relaciona as espécies *Lb. plantarum* e *Lb. pentosus*, que se agruparam com 100% de similaridade e 0.00 de distância entre vizinhos, ou seja, apenas com o sequenciamento do 16S rDNA, não é possível distingui-las.

Sobre a espécie *Lb. pentosus*, com potencial de FML, pode-se dizer que ela é frequentemente isolada de vinhos Australianos (BAE *et al*, 2005). É uma bactéria heterofermentativa facultativa e que produz ácido DL-Lático à partir de glicose (DICKS &

ENDO, 2009). Também pode produzir outros ácidos a partir de diversos carboidratos como arabinose, celobiose, frutose, galactose, manitol, maltose, melibiose, ribose, sucralose e trealose (ZANONI *et al*, 1987). Essa bactéria também ainda não foi relatada como malolática, diferentemente de *Lb. plantarum*, que já é utilizada como cultura *starter* para a realização da FML.

Em vinhos de uva Malbec na Argentina, *Lb. plantarum* apresentou 57% de degradação de ácido málico em fermentações, aumentando o nível de pH e demonstrou-se capaz de sobreviver ou tolerar níveis de 15,1 a 16,3% de etanol (LERENA *et al*, 2016). *Lactobacillus plantarum*, é uma espécie homofermentativa e além de tolerar alto teor de etanol e pH, é indicada como adequada para a fermentação malolática de vinhos (LALLEMAND, 2010). Inúmeros trabalhos já utilizaram estirpes dessa espécie para a realização da fermentação malolática em vinhos (HERNÁNDEZ *et al*, 2007; LÓPEZ, *et al*, 2008; CHO *et al*, 2011; MOCALVO *et al*, 2015 e IORIZZO *et al*, 2016).

Um resumo das linhagens obtidas nesse trabalho pode ser observado no Quadro 4.

Quadro 4. Caracterização completa das linhagens obtidas neste trabalho.

	GLAC03	GLAC06	GLAC11	GLAC28	COM
Amostra	4	7	14	45	SEP-14
Origem	Flores da Cunha	Flores da Cunha	Farroupilha	Farroupilha	Europa
Variedade	Cabernet Sauvignon	Bordô + Isabel	Bordô	Isabel	-
Espécie	<i>Lactobacillus</i> <i>suebicus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>suebicus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>suebicus</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Oenococcus</i> <i>oeni</i>
Acesso	LC071852.1	LC071852.1	LC071852.1	KX057667.1 e CP024413.1	AB054808.1
Tolerância					
pH	2,9	4	5	3,5	2,9
Etanol (%)	10%	30%	16%	14%	16%
K₂S₂O₅ (mg/L)	40mg/L	40mg/L	60mg/L	40mg/L	40mg/L
Capacidade Fermentativa de Carboidratos					
Arabinose	+	+	+	-	+
Celobiose	+	+	+	+	+
Frutose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	-	-
Maltose	+	+	+	+	-
Manitol	-	+	-	-	-
Manose	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	-
Ribose	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	-
Xilose	-	-	-	-	+
↑ pH em *MS	0	0	0,12	0	0,11
Aumento de pH em vinho sintético					
8% de etanol	0,15	0,49	0,53	0,08	0,05
10% etanol	0,07	0,46	0,44	0,02	0,06
FML	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Capacidade fermentativa g/L					
	10g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L
3 dias	8,18	9,66	10,00	9,95	10,00
6 dias	0,20	4,64	3,26	7,00	9,81
9 dias	0,13	0,14	0,17	0,74	9,98
12 dias	0,10	0,16	0,15	0,50	9,66
15 dias	0,12	0,15	0,09	0,24	7,24
18 dias	0,15	0,18	0,13	0,07	7,26
21 dias	0,11	0,21	0,05	0,11	1,66

*MS: mosto sintético.

A presença dessas espécies em vinhos e vinícolas não surpreende, visto que o gênero *Lactobacillus* sp. é amplamente encontrado em ambiente fermentativos. As espécies *Lb.*

suebicus e *Lb. pentosus* que foram isoladas nesse trabalho, precisam ser melhor avaliadas quanto aos seus mecanismos fermentativos, visto que ambas não estão relatadas como maloláticas, e nesse trabalho elas realizaram a conversão de ácido málico para ácido lático.

As bactérias isoladas nesse trabalho poderão ser utilizadas como culturas *starter*, e os dados são importantes a nível industrial, visto que favorecem a atualização de metodologias empíricas para a utilização desses microorganismos, bem como melhorar a produção de vinhos e ao mesmo tempo diminuir o custeio do processo pela diminuição de gastos com a compra de cepas comerciais, visto que o valor de mercado desses microorganismos pode alcançar uma média de até \$535,00, equivalentes a 25g de biomassa, o qual se indica o uso de cerca de 1g/100L de vinho e essa quantidade gera um custeio atual de cerca R\$16,00/g.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível listar as seguintes conclusões:

- ✓ Foram isoladas quatro estirpes bacterianas com o potencial de utilização para fermentações maloláticas, identificadas como *Lactobacillus suebicus* (GLAC03, GLAC06 e GLAC11) e *Lactobacillus pentosus/Lactobacillus plantarum* (GLAC28);
- ✓ A inoculação com as bactérias isoladas que foram selecionadas na região, alcançou o objetivo esperado (execução da FML) de forma eficaz e rápida;
- ✓ As bactérias apresentaram variação de tolerância nos testes de etanol, pH e metabissulfito de potássio.
- ✓ Apenas uma estirpe de *Lactobacillus suebicus* (GLAC03) cresceu em 60mg/L de metabissulfito de potássio. As demais bactérias pararam o crescimento populacional em 40mg/L;
- ✓ O efeito do etanol sobre as bactérias demonstrou resultados distintos para cada uma delas: *Lactobacillus suebicus* (GLAC03) tolerou até 10% de álcool; *Lactobacillus suebicus* (GLAC06) tolerou até 30% de etanol; *Lactobacillus suebicus* (GLAC11) desenvolveu-se em até 16% de etanol, e a estirpe *Lactobacillus pentosus/Lactobacillus plantarum*, tolerou um nível de 14% de álcool;
- ✓ A fermentação em mosto sintético foi um passo fundamental, pois favoreceu o desenvolvimento bacteriano para que se pudessem isolar as bactérias maloláticas e observar o seu comportamento quando em condições de vinificação;
- ✓ Do total de isolados iniciais (16), quatro deles foram capazes de realizar a FML;
- ✓ Em vinho sintético com grau alcóolico menor (8%) a fermentação iniciou antes do que com grau alcóolico mais elevado (10%);
- ✓ Quando comparadas com a bactéria comercial *Oenococcus oeni* (COM), todas as quatro estirpes isoladas também realizaram a FML;

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras do trabalho, cita-se:

- ✓ Avaliar as bactérias isoladas acerca da produção de compostos de interesse ou desinteresse como aminas biogênicas;
- ✓ Investigar a fermentação malolática das bactérias isoladas *Lactobacillus suebicus* e *Lactobacillus pentosus*, visto que ainda não são relatadas na literatura como maloláticas;
- ✓ Avaliar a fermentação malolática dos isolados potenciais obtidos em vinho natural;
- ✓ Auxiliar na classificação de outros organismos de mesmo habitat, em estudos futuros, com os resultados do ensaio fermentativo de carboidratos com os dezesseis isolados iniciais;
- ✓ Desenvolver culturas *starter* com as linhagens obtidas neste trabalho, para FML de vinhos.

7 REFERÊNCIAS

- ALCAIDE-HIDALGO, J.M. et al., Partial characterization of peptides from red wines. Changes during malolactic fermentation and ageing with lees. **Food Chemistry**, Barking107, n 2, p.622-630, mar. 2008.
- ANGELIS, D. F. de; VALSECHI, O. A. **Monitoramento teórico e prático da fermentação etanólica: Meios de cultura para leveduras.** Rio Claro: Unesp, 2006. 9 p.
- ATLAS, R. M. **Handbook of microbiological media.** 4. ed. Boca Raton: Crc Press, 2010. 2043 p.
- AUAD, L. I. **Seleção de bactérias lácticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de listeria monocytogenes.** 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- AVILA, L. D. de; DAUDT, C. E. Indução da fermentação maloláctica em vinho Gewürztraminer. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.331-336, jun. 1997. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84781997000200027>.
- BAE, S.; FLEET, G.H.; HEARD, G.M. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 100, p.712-727, 2005.
- BARTOWSKY, E. Oenococcus oeni and malolactic fermentation: Moving into the molecular arena. **Australian Journal of Grape And Wine Research**, Glen Osmond, v. 11, p.174-187, abr. 2005.
- BARTOWSKY, E. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48: p. 149-156, 2009.
- BASSI, A. P. G. **Tolerância ao estresse e características fermentativas de leveduras Dekkera bruxellensis isoladas da fermentação alcoólica.** 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BELY, M.; SABLAYROLLES, J.; BARRE, P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. **Journal of Fermentation And Bioengineering**, [s.l.], v. 70, n. 4, p.246-252, jan. 1990. Elsevier BV.
- BENDER, A. et al. Avaliação físico-química e compostos bioativos de vinho tinto colonial produzido no Município de São Lourenço do Sul-RS. **Revista Eletrônica Científica da Uergs**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.249-266, 25 ago. 2017. Revista Eletronica Cientifica da UERGS?. <http://dx.doi.org/10.21674/2448-0479.32.249-265>.
- BERTRAND, A.; SMIROU-BONAMOUR, C.; LONVAUD-FUNEL, A. Aroma compounds in malolactic fermentation. In: ALKO SYMPOSIUM ON FLAVOR RESEARCH IN ALCOHOLIC BEVERAGES. 1984, Helsinki. **Research... FOUNDATION FOR BIOTECHNICAL AND INDUSTRIAL FERMENTATION**, p. 37-49.
- BETTERIDGE, A.; GRBIN, P.; JIRANEK, V. Improving Oenococcus oeni to overcome challenges of wine malolactic fermentation. **Trends in Biotechnology**, v. 33, p.547-553, 2015.
- BINATI, R. L. **Avaliação da fermentação maloláctica em vinhos de altitude com bactérias ácido-lácticas autóctones selecionadas.** 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- BOTELHO, L. G. et al. Resistência in vitro de bactérias ácido lácticas isoladas de iogurtes brasileiros ao suco gástrico e sais biliares. **Revista Científica Univiçosa**, Viçosa, v. 1, n. 1, p.1-6, dez. 2015.

- BUSTOS, G et al. Optimization of d-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. **Food Microbiology**, v. 21, p.143-148, 2004.
- BRAVO-FERRADA, B. M. et al. Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p.1537-1549, 2013.
- BRINGEL, F.. *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 55, n. 4, p.1629-1634, 1 jul. 2005. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63333-0>.
- CAPOZZI, V. et al. Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p.327-334, 2009.
- CAÑAS, P.M. I. et al. Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p.724-730, 2008.
- CARIDI, A. P. et al. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprinod'Aspromonte produced from raw or thermized goat's Milk. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 2, p.201-209, abr. 2003.
- CARVALHO, B. T.. **Fermentação Consorciada Leveduras/Bactérias Láticas Aplicada à Produção de Cachaça como Possibilidade de Melhoria do Padrão de Qualidade**. 2011. 93p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
- CHESINI, D. A. **Degradação do ácido málico durante a fermentação alcoólica da uva chardonnay por três diferentes leveduras da espécie *Sacharomyces cerevisiae***. 2005. 27 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia, Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, 2005.
- CHO, G. Development of a Quantitative PCR for Detection of *Lactobacillus plantarum* Starters During Wine Malolactic Fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.1280-1286, 28 dez. 2011. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1107.07003>.
- CIANI, M.; FERRARO, L. Enhanced Glycerol Content in Wines Made with Immobilized *Candida stellata* Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Perugia, v. 62, n. 1, p.128-132, jan. 1996.
- COELHO, J. C. **Elaboração de bebida probiótica a partir do suco de laranja fermentado com *Lactobacillus casei***. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- COSTA, V. M. **Perfil dos metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico**. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- COSTA, E. K. **Avaliação físico-química de vinhos artesanais produzidos na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul**. 2017. 21 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2017.
- COSTELLO, P.J.; FRANCIS, I.I.; BARTOWSKY, E.J. Variations in the effect of malolactic fermentation on the chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine: interactive influences of *Oenococcus oeni* strain and wine matrix composition. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 18, p.287-301, 2012.
- DAUDT, C. E. Determinação da fermentação malolática em vinhos pela cromatografia em papel. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 1, n. 3, p.81-94, jan. 1971.
- DEPARTMENT OF VITICULTURE AND ENOLOGY (Estados Unidos). University Of California (Ed.). **Viticulture & Enology**. 2014. Disponível em: <<http://wineserver.ucdavis.edu/>>. Acesso em: 20 set. 2017.

- DICKS, L. M. T.; DELLAGLIO, F.; COLLINS, M. D.. Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s.l.], v. 45, n. 2, p.395-397, 1 abr. 1995. Microbiology Society.
- DICKS, L. M.T.; ENDO, A. Taxonomic Status of Lactic Acid Bacteria in Wine and Key Characteristics to Differentiate Species. **South African Journal For Enology and Viticulture**, Matieland, v. 30, n. 1, p.72-90, maio 2009.
- DICKS, L. M.T.; HOLZAPFEL, W. H. Genus II. *Oenococcus* Dicks, Dellaglio and Collins 1995a, 396VP: oe.no.coc'cus. Gr. n. oinos wine; Gr. masc. n. kokkos berry, little round thing; N.L. masc. n. oenococcus little round thing from wine.. In: VOS, Paul de et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes**. 2. ed. Athens: Springer, 2009. p. 635-642.
- EDWARDS, C. G. et al. *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 50, n. 2, p.699-702, 1 mar. 2000. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-2-699>.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **ISSN 0102-0110 ISSN 2179-8184**: Manual de curadores de germoplasma - Microrganismos - Bactérias ácido-láticas. Brasília: Embrapa, 2011. 15 p.
- ENDO, A.; OKADA, S.. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 58, n. 9, p.2195-2205, 1 set. 2008. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.65609-0>.
- ESCRIVÁ, L. B. **Aplicación de las técnicas fish, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación**. 2009. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Microbiologia e Ecologia, Departamento de Microbiologia e Ecologia, Universidade de Valência, Valência, 2009.
- FALCADE, I. 2004, Caxias do Sul. **Enoturismo nas Regiões Vitivinícolas Serra Gaúcha e Vale dos Vinhedos (Brasil)**. **Anais...** Caxias do Sul: Ucs, 2004. 11 p.
- FORTES, F. B. B. **Perfil bioquímico de amostras de Escherichia coli isoladas de materiais avícolas no estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- FULGESANG, K. C. **Wine Microbiology**, London: Chapman & Hall, 1997.
- FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. Wine Microbiology. **Wine Microbiology**, [s.l.], p.29-44, 2007. Springer US. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-33349-6>.
- FUSCO, V. et al. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-22, 17 mar. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>.
- FRIGHETTO, J. M. **Isolamento e caracterização de bactérias lácticas associadas à vinificação**. 2009. 59 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Bento Gonçalves, 2009.
- GARAI-IBABE, G. et al. Naturally occurring 2-substituted (1,3)- β -d-glucan producing *Lactobacillus suebicus* and *Pediococcus parvulus* strains with potential utility in the production of functional foods. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 23, p.9254-9263, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.050>.
- GARCÍA-RUIZ, A. et al. Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p.1042-1053, 2009.
- GARVIE, E. I. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (Knudsen and Sgrensen) comb. nov. and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Beijerinck) comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Shinjield, v. 33, n. 1, p.118-119, jan. 1983.

- GOMES, C. M. P. B. S. P. **Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de uvas do vale do são francisco como produtoras de vinhos**. 2015. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.
- GOMES, F. C. O. et al. Identification of lactic acid bacteria associated with traditional cachaça fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.486-492, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822010000200031>.
- GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**. 2009. 172 f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- GONÇALVES, S. M. L. **Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril**. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Segurança Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.
- GRANDVALET, C. *Oenococcus oeni*: Queen of the cellar, nightmare of geneticists. **Microbiology**, [s.l.], v. 163, n. 3, p.297-299, 1 mar. 2017. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000456>.
- HENICK-KLING, T. **Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus plantarum* in wine**. 1986. 220p. Tese (Doutorado) – The University of Adelaide.
- HENICK-KLING, T.; LEE, T. H.; NICHOLAS, D. J. D.. Inhibition of bacterial growth and malolactic fermentation in wine by bacteriophage. **Journal of Applied Bacteriology**, [s.l.], v. 61, n. 4, p.287-293, out. 1986. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb04289.x>.
- HERNÁNDEZ, T. et al. Contribution of Malolactic Fermentation by *Oenococcus Oeni* and *Lactobacillus Plantarum* to the Changes in the Nonanthocyanin Polyphenolic Composition of Red Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 13, p.5260-5266, jun. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf063638o>.
- HERVÉ, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* - *Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. **International journal of Food Microbiology**, Amsterdam, p. 141-154, jun. 2004.
- IBRAVIN - INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. **Cadastro Vinícola**. IBRAVIN/MAPA/SEAPPA-RS: Bento Gonçalves, 2014. Disponível em <<http://www.ibravin.org.br/dados-estatisticos.php>>. Acessado em 16 de fevereiro de 2016.
- INÊS, A. et al. Revisão: as bactérias do ácido láctico do vinho: Parte I. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, Vila Real, v. 23, n. 2, p.81-96, dez. 2008.
- IORIZZO, M. et al. Selection and technological potential of *Lactobacillus plantarum* bacteria suitable for wine malolactic fermentation and grape aroma release. **Lwt - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 73, p.557-566, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.062>.
- JACKOWETZ, J.N.; ORDUÑA, R. M. Metabolism of SO₂ binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, p.153-157, 2012.
- JAENISCH, F. R. F.; KUCHIISHI, S. S.; COLDEBELL A, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.354-358, fev. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782010000200020>.
- KANAI, M. et al. Sake yeast YHR032W/ERC1 haplotype contributes to high S-adenosylmethionine accumulation in sake yeast strains. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 123, n. 1, p.8-14, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.07.007>.
- KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.49, p.209-224, 1983.

- KANDLER, O.; WEISS, N. *Lactobacillus*. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. v. 2, p. 103 -121.
- KLEYNMANS, U.; HEINZL, H.; HAMMES, W. P. *Actobacillus suebicus* sp. nov., an Obligately Heterofermentative *Lactobacillus* Species Isolated from Fruit Mash. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 11, n. 1, p.267-271, nov. 1988.
- KÖNIG, H.; UNDEN, G.; FRÖHLICH, J. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Heidelberg: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 2009. 516 p.
- KOT, W. et al. Bacteriophages of *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Weissella*. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 5, p.1-9, 28 abr. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00186>.
- KUDA, T. et al. Bile acid-lowering properties of *Lactobacillus plantarum* Sanriku–SU3 isolated from Japanese surfperch fish. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 14, p.41-46, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2016.02.004>.
- KHOURY, M. El et al. Biogeography of *Oenococcus oeni* Reveals Distinctive but Nonspecific Populations in Wine-Producing Regions. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 83, n. 3, p.1-16, 18 nov. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02322-16>.
- KNOLL, C. **Evaluating the influence of stress parameters on *Oenococcus oeni* and the subsequent volatile aroma composition of white wine**. 2011. 108p. Tese (Doutorado) - Faculty Of Agricultural Sciences, Nutritional Sciences And Environmental Management.
- LAFFORT: L'oenologie par nature. L'oenologie par nature. 2017. Disponível em: <<https://www.laffort.com/>>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- LALLEMAND: Yeast, bacteria and specialty ingredients. Yeast, bacteria and specialty ingredients. 2017. Disponível em: <<http://www.lallemand.com/>>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- LALLEMAND. ***Lactobacillus plantarum* A new generation of malolactic starter culture in high pH wines**. Blagnac: @lallemand, 2010. 2 p.
- LARENTIS, A. **Curva de combinação do SO₂ em vinho base para espumante**. 2012. 41 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Bento Gonçalves, 2012.
- LERENA, M. C. et al. Malolactic Fermentation induced by *Lactobacillus plantarum* in Malbec Wines from Argentina. **37th World Congress of Vine and Wine Oiv**, Mendoza, v. 37, n. 2, p.115-123, mar. 2016.
- LERM, E.; ENGELBRECHT, L.; DUTOIT, M. Malolactic fermentation: the ABC's of MLF. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 31, p.186-212, 2010.
- LIU, S. Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p.589-601, 2002.
- LOPES, A. R. **Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de cultivo**. 2008. 75p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.
- LOPES, A. R. **Prospecção de bactérias lácticas em matriz ambiental**. 2013. 84 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.
- LÓPEZ, I. et al. Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. **Vitis Journal of Grapevine Research**, v. 47, p.123-129, 2008.
- LONVAUD-FUNEL. ***Leuconostoc***. Encyclopedia of Food Microbiology, Oxford, 1999 p. 1183-1194.

- LOVATO, M. A.; WAGNER, R. Avaliação da qualidade do vinho de mesa suave por análises físico-químicas. **Caderno da Escola de Saúde**, v. 8, p.168-178, 2014.
- MAICAS, S. et al. Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. **Biotechnology Letters**, v. 21, p.349-353, 1999.
- MATEO, E. M. et al. Effect of ethanol on the ability of *Oenococcus oeni* to remove ochratoxin A in synthetic wine-like media. **Food Control**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.935-941, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.015>.
- MERNY, E. **Une nouvelle souche de bactérie malolactique amène un changement fondamental en œnologie**. 2014. Revista UpperWine. Disponível em: <<https://www.upperwine.com/fr/blog/une-nouvelle-souche-de-bacterie-malolactique-amene-un-changement-fondamental-en-oenologie>>. Acesso em: 20 set. 2017.
- MIGUEL, V. F. A. **Deteção e Prevenção de Defeitos Organolépticos Originados pela Fermentação Maloláctica em Vinhos Tintos**. 2011. 57p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Politécnico de Santarém.
- MONCALVO, A. et al. *Lactobacillus plantarum* sequential inoculation: malolactic fermentation and biogenic amines occurrence in wine. **Internet Journal of Enology and Viticulture**, Arezzo, v. 2, n. 3, p.1-5, maio 2015.
- NISIOTOU, A. et al. *Weissella uvarum* sp. nov., isolated from wine grapes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 64, n. 11, p.3885-3890, 1 set. 2014. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.066209-0>.
- NOBRE, Thais de Paula. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. 2005. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- NOBRE, T. P.; HORII, Jorge; ALCARDE, André Ricardo. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.20-25, mar. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612007000100004>.
- OLGUÍN, N. *et al.* Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. **Food Microbiology**. London, v. 26, n. 2, p. 197-203, abr. 2009.
- PARENTE, E. et al. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 144, n. 2, p.270-279, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.005>.
- PARK, G. et al. Draft genome sequence of alcohol-tolerant bacteria *Pediococcus acidilactici* strain K3. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.1-2, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.021>.
- PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Constituição (2014). Decreto nº 8.198, de 08 de novembro de 1988. **Casa Civil**: Subchefia para assuntos jurídicos. Brasília, DF, 20 fev. 2014. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2014/decreto/d8198.htm>. Acesso em: 02 jan. 2018.
- POZO-BAYÓN, M. A. et al. Wine Volatile and Amino Acid Composition after Malolactic Fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* Starter Cultures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 53, n. 22, p.8729-8735, nov. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf050739y>.
- 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.

- PUERTAS, A. I. et al. *Lactobacillus sicerae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish natural cider. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 64, n. 9, p.2949-2955, 4 jun. 2014. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.059980-0>.
- REGUANT, C. et al. Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p.1065-1071, 2000.
- REGUANT, C. *et al.* Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain, **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam v. 246, n. 1, p. 111-117, maio 2005.
- RIBÉREAU-GAYON, J., PEYNAUD, E., SUDRAUD, P., et al. Tratado de enología, ciencias y técnicas del vino. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1980. 671 p.
- RIBEREAU-GAYON, P. (1985) - New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 1 - 10.
- RIBEREAU-GAYON, et al. **Handbook of Enology Volume 1 e 2: The Microbiology of Wine and Vinifications**, 2006. 497 p.
- RIBÉREAU-GAYON, P. **Os vinhos da França. France, Análises e Reflexões**. 2001. 2p. Disponível em: <<http://www.ambafrance.org.br/abr/imagesdelafrance/>> Acesso em: 01 jan.2017
- RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C.; MIELE, A. Efeito da fermentação malolática na composição do vinho tinto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p.497-500, jan. 1997.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A. Efeito da safra vitícola na composição da uva, do mosto e do vinho Isabel da Serra Gaúcha, Brasil. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.959-964, jun. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000300036>.
- RIZZON, Luiz Antenor. **Metodologia para análise de vinhos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 120 p.
- RODAS, A. M.. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.197-207, 1 jan. 2005. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63249-0>.
- ROSSIGNOL, T. et al. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. **Yeast**, [s.l.], v. 20, n. 16, p.1369-1385, 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1046>.
- RUIZ, P. P.M. I, S. S., M.LL. P.. Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. **Food Control**, Vurrey, v. 21, n. 1, p.70-75, jan. 2010.
- SÁNCHEZ, L. A.; DOKOOZLIAN, Nick K.. Bud Microclimate and Fruitfulness in *Vitis vinifera* L. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. [N.I.], n. 56, p.319-329, dez. 2005.
- SANTOS, G. L. P. **Mecanismos de motilidade bacteriana**. Goiânia: Texto, 2011. 23 slides, P&B. Universidade Federal de Goiás.
- SATO, H. et al. Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 202, n. 1, p.109-114, ago. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10788.x>.
- SIEZEN, R. J; Vlieg, J. E. H. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-13, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-10-s1-s3>.
- SILVA, G. A. Atividade de bactérias lácticas durante a vinificação e aspectos relacionados com a qualidade química do vinho. In: X CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2005, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: [S.I.], 2005. p. 163-171.

- SILVA, V. C. **Extrato de levedura (saccharomyces cerevisiae) e prebiótico na dieta pré-inicial para frangos de corte criados em diferentes temperaturas.** 2006. 169 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2006.
- SILVA, L. J. M. **Isolamento e caracterização bioquímica das bactérias do ácido lático do queijo São Jorge DOP.** 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.
- SOLIERI, L. et al. Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p.285-298, 2009.
- SOZZI, T.; MARET, R.; POULIN, J. M. Mise en évidence de bactériophages dans le vin observation of bacteriophages in wine. **Experientia**, v. 32, p.568-569, 1976.
- SOZZI, T. et al. Problems with the malolactic fermentation of wine due to the bacteriophage of *Leuconostoc oenos*]. **Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.**, v. 14, p.17-23, 1982.
- SU, J. et al. Antioxidant properties of wine lactic acid bacteria: *Oenococcus oeni*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 99, n. 12, p.5189-5202, 13 fev. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6425-4>.
- SCABORA, M. H.; SILVA, E. M.; SOUZA, R. L.. Caracterização de leveduras contaminantes estabelecidas em processo fermentativo. **Revista da Unesp, Ilha Solteira**, v. , n. , p.1-4, jun. 2010.
- STEIN, T. et al. Diferentes épocas de colheita na adequação do pH e acidez titulável em vinhos 'cabernet sauvignon'. in: Universidade Federal do Pampa, 8., 2016, Dom Pedrito. **8º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Dom Pedrito: UFP, 2016. p. 1 - 2.
- SWIEGERS, J. et al. **Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour**. Mains: Library, 2005.
- TELES, A. I. S. **Inativação Térmica de Bactérias Lácticas em Meio de Elevado Teor de Etanol.** 2013. 72p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa.
- TOIT, M. D. et al. Lactobacillus: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview. **Food and Bioprocess Technology**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.876-906, 16 out. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-010-0448-8>.
- TONET, A. **Avaliação de Quatro Leveduras para a Produção de Espumante pelo Método Champenoise.** 2007. 50 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Viticultura e Enologia, Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, 2007.
- TOPISIROVIC L., et al. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, p. 230-235, dez. 2006
- TORRIANI, S.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F.. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 67, n. 8, p.3450-3454, 1 ago. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.8.3450-3454.2001>.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L. **Microbiologia**. 10ª edição, 1ª reimpressão, Artmed, Porto Alegre, 2012.
- WASKO, B. M et al. Buffering the pH of the culture medium does not extend yeast replicative lifespan. **F1000research**, [s.l.], p.1-7, 15 out. 2013. F1000 Research, Ltd.. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.2-216.v1>.

- WIBOWO, D. *et al.* Occurrence and Growth of Lactic Acid Bacteria in wine: A Review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, p. 302-313, 1985.
- VALDUGA, V. **O processo de desenvolvimento do enoturismo no vale dos vinhedos**. 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Turismo, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2007.
- VAN TIEGHEM, N. Sur La Gomme De Sucrierie. In: VAN TIEGHEM,. **Sur La Gomme De Sucrierie**. N.i.:., 1878. p. 1.
- VARGAS, F. J. et al. Análises Físico-químicas dos Vinhos Chardonnay no município de Bagé-RS. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA, 8., 2016, Dom Pedrito. **8º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Dom Pedrito: UFP, 2016. p. 1 - 2.
- VILA-CRESPO et al. Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions. **Technology and Education Topics in Applied Microbiology: Microbial Biotechnology**, v.1, p.920-929, 2010.
- ZANONI, P. et al. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., norm, rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Shinfield, v. 37, n. 4, p.339-341, out. 1987.
- ZOCHE, R. G. S. **Potencial enológico de uvas Tannat, Cabernet Sauvignon e Merlot produzidas no município de Bagé - RS**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Ciências, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
- ZHANG, B. *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 55, n. 5, p.2167-2170, 1 set. 2005. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63778-0>.
- ZHANG, D.; LOVITT, R. W. Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, p.1130-1140, 2006.

8 ANEXOS

1. Questionário de coleta executado no momento da coleta de amostras de vinho.
2. Fluxograma de seleção dos isolados bacterianos.
3. Sequências de nucleotídeos 16S rDNA dos isolados e bactéria comercial.
4. Artigo de revisão submetido à Revista Brasileira de Viticultura e Enologia em 2017.
5. Parecer da Revista Brasileira de Viticultura e Enologia do artigo submetido (02/2018).

Anexo 1.

QUESTIONÁRIO DE COLETA

Local de Coleta: _____

Cidade: _____

Variedade: _____

Concentração de SO₂ adicionado: _____

Quantas vezes foi adicionado SO₂: () uma vez () duas vezes () mais de duas vezes

() apenas no início da fermentação () apenas no fim da fermentação () no início e no fim da fermentação

Efetuiu-se o cálculo de SO₂ total ou livre? () SIM () NÃO

Se sim, o resultado é: Total = _____ / Livre = _____

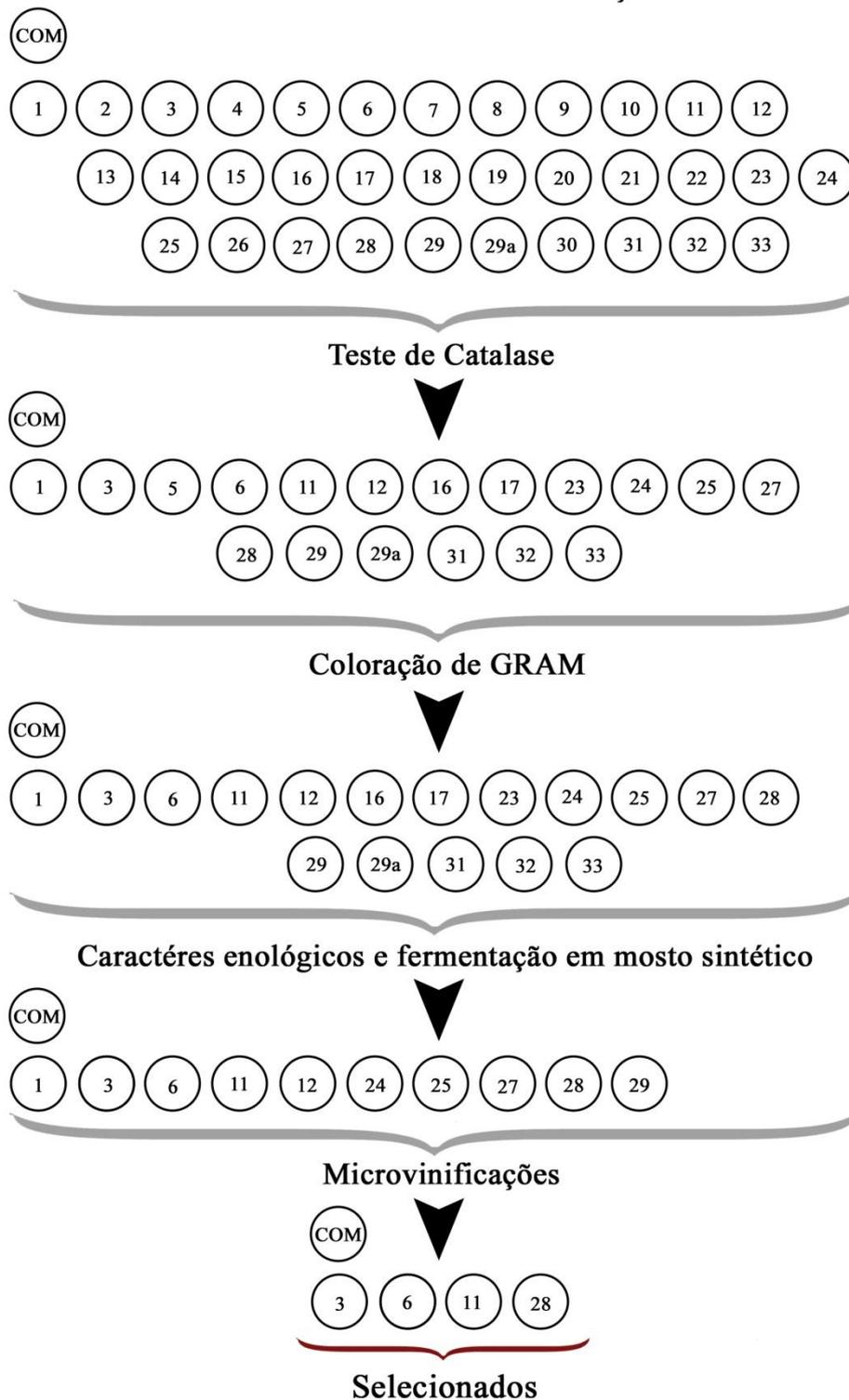
Tempo de fermentação malolática: _____

A vinícola faz Pé-de-cuba? () SIM () NÃO

Há acompanhamento da fermentação malolática? () SIM () NÃO

Se sim, qual forma? _____

FLUXOGRAMA DE SELEÇÃO



Anexo 3.

<p style="text-align: center;">Bactéria comercial: <i>Oenococcus oeni</i></p> <p>5'GCAGAAGTGGTGAGTAACACGTAAGAAACCTGCCCTTTAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCCGCTAACAAACAAATCACA CATGTGATCTGTTGAAAGGTCCTTTGGATCGCTAGAGGATGGTCTTGGCGCGTATTAGCTTGTGGTAGGGTAGAAGCCTACCAAGGCAATGA TGCCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGGCCGGCCACATTGGGACTGAGACACTGCCAAACTCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATTTCCGCAATG CACGAAAGTGTGACGGAGCGACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTAAGGGAAGAATAACTTGAATTCAGAGA AAGTTTCAGCTTGACGGTACCTTACCAGAAAGGGATGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCGAGCGTTATCCGGATT ATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTATTAAGTCTGATGTGAAATCCCAGGGCCCAACCTCGGAACTGCATTGGAAACTGATTTACTTGGAG TGCGATAGAGGCAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGGCTTGTAGATCGTAA CTGACGTTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACGGGATTAGATACCCCGTAGTCCATACCCTAAACGATGGGTGCTAGTTGTTAAGAGGTTT CCGCCTCTAGTGACGTAGCAAACGCATTAAGCACCCCGCTGAGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTAAAGGAATTGACGGGGACCCGCA CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGATACCGGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATACCAATGATCGCTTTTGTAAAGAAAGTTTCT TCGGAACATTGGATGAGGTGGTGCATGGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTATTAG TTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGATAAACCCGAGGAAAGTGGGGACGACGTCAGATCATCA3'</p>
<p style="text-align: center;">GLAC03: <i>Lactobacillus suebicus</i></p> <p>5'CGTARSGGCGKGTATMATGCAAGTCGTACGCATTCTCGYTTCTGATTGACGGTGTTCACCTAATTGACGAGACATTGGAATGAGTGGCG GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAAGYGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCCGATAAAAGTCAAACACCATGG TTTTGATTTAAAAGATGGCCTTTGTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAYGGCTTACCAAGGCAATGAT ACGTAGCCGAAGTGTGAGGTTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATG GGCGAAGCGCTGAAAGCATGCCGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTTAACTCTGTTGTTAAAGAAAGCAGTATCTAAGAGTAACTG CTTAGGTAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTAT TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTG CAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCC GCCCTCAGTGCTGACGTAACGCATTAAGCATTCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAG GGTGGAGCATGTGGTTATTGAGCAGCGGAGAACCTTACCAGGTCTGGACATCTAGCGCCATCTCAGAGATGAGACGGTCTCCGGACGCTTAG ACAGTGGTGCATGGTGTCTGCTAGCTGTTCTGGAATGTGGCTAAGTCCCGCAC3'</p>
<p style="text-align: center;">GLAC06: <i>Lactobacillus suebicus</i></p> <p>5'CWTGSGGSKGTCAWATACATGCAGTCGTACGCATTCTCGYTTCTGATTGACGGTGTTCACCTAATTGACGAGACATTGGAATGAGTGGCGG ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAAGYGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCCGATAAAAGTCAAACACCATGGT TTTTGATTTAAAAGATGGCCTTTGTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAYGGCTTACCAAGGCAATGATA CGTAGCCGAAGTGTGAGAGTTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGG GCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAAGCAGTATCTAAGAGTAACTGC TTAGGTAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTAT GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC AGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA ACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCG CCCTCAGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCATTCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAG CGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGTCTGGACATCTAGCGCAATCTCAGAGATGAGACGTCTCCGGGA CGCTTAGACAGTGGTGCATGCTGCTGCTAGCTCGTCCGTGAGAATGTTGGGATTAAKCTACCGCA3'</p>
<p style="text-align: center;">GLAC11: <i>Lactobacillus suebicus</i></p> <p>5'CGTSGGGSTKMTATACATGCAGTCGTACGCATTCTCGYTTCTGATTGACGGTGTTCACCTAATTGACGAGACATTGGAATGAGTGGCGGACG GGTGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAAGYGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCCGATAAAAGTCAAACACCATGGT GATTTAAAAGATGGCCTTTGTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAYGGCTTACCAAGGCAATGATACGT AGCGAACTGAGAGTTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGCG CAAGCCTGATGGAGCAACACCGGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAAGCAGTATCTAAGAGTAACTGCTTA GGTAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGG CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA AGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA CTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCC TTCAGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCATTCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC GTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCTAGCGCAATCTCAGAGATGAGACGTTCCCTTCCGG GACGCTTAGACAGTTGATGCATGCGTGTCTGCTAGCTCGTCCGTGAGAATGTTGGGATTAAKCTACCGCA3'</p>
<p style="text-align: center;">GLAC28: <i>Lactobacillus pentosus</i> ou <i>Lactobacillus plantarum</i></p> <p>5'CTWWMWGSCTTTAAWATAMATGCAAGTCGAACGAACCTCGGTTATTGATTGGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGTGGCAACTG GTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCCGATAAAACTTGGACCGCATGGTCCGA GYTTGAAAGATGGCTTCGGTATCACTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGC CGACTGTGAGAGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAA GTCTGTAGGAGCAACCGCGTGTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAATCTGAGAGTAACTGTTAGGT ATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGCGGT AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAG AGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA AGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTC AGTGTGACAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGT GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGTACCGCAAGAACCTTACCAGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTTCCCTTCCGG ACATGGGATACAGGTGTGCATGATTGTCTGCTAGCTCGATGTCGTAAGATGKCTCGGATTAAGGTTI3'</p>

Anexo 4 Artigo: A importância das bactérias lácticas na vitivinicultura: Revisão

Giovanni Colussi¹, Sérgio Echeverrigaray¹, Ana Paula Longaray Delamare¹.

¹Laboratório de Microbiologia Aplicada, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Francisco G. Vargas 1130, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul 95070-560, Brasil.

Autor correspondente: thecolussi@gmail.com

Resumo

Os vinhos brasileiros, principalmente do Rio Grande do Sul, apresentam elevada acidez fixa decorrente da maturação desuniforme das uvas. Esta acidez é determinada principalmente por níveis elevados de ácido málico. Para atenuar a acidez fixa nos vinhos, os mesmos são submetidos a fermentação malolática (FML) durante ou após a fermentação alcoólica. Na prática enológica essa fermentação normalmente representa um ponto crítico, ocorrendo de forma descontrolada e em muitos casos sem finalização do processo. Ainda que muitas vezes eficiente, a fermentação malolática espontânea, depende das bactérias presentes na uva ou na cantina, variando de fermentação para fermentação e de ano para ano. Dentre as distintas espécies bactérias maloláticas, destaca-se *Oenococcus oeni*, em geral predominante nas FML de vinhos. Diversos parâmetros como pH, dióxido de enxofre (SO₂), conteúdo alcoólico, temperatura e a tecnologia vinícola, podem afetar o desenvolvimento bacteriano e a FML. Esse artigo de revisão oportunizará ampla informação sobre essa classe de microorganismos tão importantes na enologia.

Palavras-chave: *Oenococcus oeni*, vinho, fermentação malolática.

Abstract

Brazilian wines, mainly from Rio Grande do Sul, show high fixed acidity due to the uneven maturation of the grapes. This acidity is mainly determined by high levels of malic acid. To attenuate the fixed acidity in wines, they are subjected to malolactic fermentation (MLF) during or after alcoholic fermentation. In oenological practice this fermentation usually represents a critical point, occurring in an uncontrolled way and in many cases without finalization of the process. Although often efficient, spontaneous malolactic fermentation depends on the bacteria present in the grape or canteen, varying from fermentation to fermentation and from year to year. Among the different malolactic species, *Oenococcus oeni* stands out, generally predominant in MLF of wines. Various parameters such as pH, sulfur dioxide (SO₂), alcohol content, temperature and wine technology can affect bacterial development and MLF. This review article will provide extensive information on this class of microorganisms so important in oenology.

Key-words: *Oenococcus oeni*, wine, malolactic fermentation.

Introdução

A microbiota vínica é composta por um conjunto heterogêneo de leveduras, bactérias ácido-láticas e aceto-láticas, responsáveis pela síntese de determinados compostos, a partir do mosto das uvas, que vão conferir aos vinhos o seu *bouquet* original (CAETANO, 2008).

As bactérias láticas (BAL) estão naturalmente presentes nas superfícies das uvas e representam populações importantes no vinho (VILA-CRESPO et al., 2010). As BAL são responsáveis pela condução da fermentação malolática (FML), uma fermentação secundária importante que ocorre em muitos vinhos após a fermentação alcoólica realizada por leveduras (BAE et al., 2006). No final da fermentação alcoólica, os açúcares redutores já foram transformados em etanol e CO₂, ocorre a diminuição da população de leveduras e um aumento no números de bactérias láticas, iniciando-se a FML (MIGUEL, 2011).

A fermentação malolática, seja espontânea ou induzida por inoculação de bactérias, é responsável pela conversão de L (-) ácido málico a (L) ou D (-) ácido lático. Para cada grama de ácido málico metabolizado, 0,67 gramas de ácido lático e 0,33 gramas (165 ml) de CO₂ são produzidos. Bactérias ácido láticas também podem degradar em paralelo 0,3 a 2g/L de açúcares residuais para formar aproximadamente 100 mg/L de D (-) ácido lático (SABLAYROLLES & SALMON, 2004).

A FML exerce influências importantes na acidez do vinho, sabor e estabilidade microbiológica. Uma das principais espécies responsáveis pela fermentação malolática é *Oenococcus oeni* (anteriormente *Leuconostoc oenos*), embora outras espécies de BAL também podem contribuir na FML (BAE et al., 2006). Essa fermentação é desejável por diminuir a acidez e melhorar as características organolépticas do vinho (MIGUEL, 2011). Porém, de modo geral as condições para o desenvolvimento bacteriano e FML em processos enológicos são desfavoráveis, o que tem levado à utilização estirpes selecionadas para garantir um melhor controle do processo (MAICAS et al., 1999). Uma fermentação malolática de

excelência pode ser alcançada com a inoculação de BAL selecionadas (CAPOZZI et al., 2009). Por isso, nos últimos anos as indústrias vitivinícolas vêm utilizando culturas iniciais (*starter*) puras a fim de promover uma bioconversão rápida do L-málico, garantindo melhor controle e previsibilidade da reação (LÓPEZ et al., 2008).

A conversão de ácido málico em láctico falha por causa de condições ambientais (vinho) muito rigorosas, como por exemplo pH baixo, álcool elevado, altas concentrações de SO₂ e baixas temperaturas, afetando a sobrevivência e crescimento bacteriano (SOLIERI et al., 2010).

Caracterização das BAL.

A microbiota láctica das uvas é constituída por um grupo hetergêneo de bactérias, com diferentes necessidades fisiológicas, que inclui espécies pertencentes a vários gêneros, entre os quais, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* e *Oenococcus* (POTES & MARINHO, 2007; TELES, 2013). Nas difíceis condições difíceis da vinificação (pH baixo e alto teor de ácido málico e etanol), somente bactérias lácticas bem adaptadas apresentam crescimento rápido e promovem uma fermentação maloláctica adequada (KRIEGER et al., 2004).

As bactérias lácticas crescem *in vitro* normalmente em glicose, frutose e alguns outros carboidratos, mas no vinho predomina o crescimento mixotrófico, o qual a utilização de diferentes substratos como fonte de energia e carbono, incluindo pequenas quantidades de frutose/glicose e ácidos orgânicos. Além das fontes de carboidrato, o desenvolvimento de bactérias lácticas também requer a presença de aminoácidos e vitaminas (BINATI, 2015).

Existem quatro fatores que têm uma influência decisiva na realização da fermentação malolática devido à influência que têm no crescimento das bactérias lácticas no vinho: o pH, a temperatura, o título alcoométrico e o teor de dióxido de enxofre (RIBERÉAU-GAYON, 2006; MIGUEL, 2011). Esses fatores permitiram o estabelecimento de regras enológicas (RIBERÉAU-GAYON, 2006).

[Inserir Tabela 1]

Interferências no crescimento e desenvolvimento de bactérias maloláticas: temperatura.

A temperatura influencia na taxa de crescimento dos microrganismos e como as reações químicas, acelera as reações bioquímicas. A fermentação malolática inicia geralmente quando a população bacteriana estiver próxima de 10^6 células/mL e é quase não acontece quando a temperatura for inferior de 19-20°C (LONVAUD-FUNEL, 1995). As bactérias maloláticas são essencialmente mesófilas (20 a 40°C), com algumas linhagens termófilas - acima de 45°C (SILVA, 2011).

Uma temperatura excessiva, 25°C ou superior, também irá retardar a fermentação, principalmente pela inibição da biomassa bacteriana. Além disso, esta condição o risco de deterioração bacteriana e aumento da acidez volátil. Na prática, portanto, manter um vinho a 20°C é recomendado (RIBERÉAU-GAYON, 2006).

Interferências no crescimento e desenvolvimento de bactérias maloláticas: dióxido de Enxofre (SO₂).

O dióxido de enxofre (SO₂) é um importante conservante utilizado na vinificação e na produção de outros alimentos. É uma substância antimicrobiana, antioxidante e anti-enzimática quando em baixas concentrações (JACKOWETZ & ORDUÑA, 2012). A concentração de SO₂ não deve ser muito alta, pois pode inibir as bactérias lácticas durante a fermentação malolática. Concentrações de SO₂ total de 100-150mg l⁻¹, 50-100mg l⁻¹ de SO₂ combinado e livre 1-10mg l⁻¹ são suficientes para dificultar o desenvolvimento das bactérias maloláticas e podem acarretar na parada desta fermentação (REGUANT et al., 2005). Esta dosagem é recomendada para estabilizar os vinhos após a fermentação malolática ou para evitá-la naqueles vinhos nos quais não for desejada (SILVA, 2005).

Interferências no crescimento e desenvolvimento de bactérias maloláticas: etanol.

O etanol, principal resultante da fermentação alcoólica ou adicionado no caso de vinhos fortificados, também afeta os parâmetros de crescimento das bactérias maloláticas e a sua atividade malolática. A capacidade de sobrevivência e crescimento das BAL decresce à medida que as concentrações de etanol aumentam (RAMOS, 2013).

Geralmente em laboratório, bactérias maloláticas isoladas de vinho sofrem inibição sob uma concentração de etanol que varia de 8 a 10% do volume (RIBERÉAU-GAYON, 2006).

Interferências no crescimento e desenvolvimento de bactérias maloláticas: pH.

No geral a velocidade de crescimento das bactérias lácticas e da realização da fermentação malolática aumenta com o aumento de pH de 3,0 para 4,0. Por outro lado, o pH tem um forte efeito seletivo nas espécies que se desenvolvem no vinho (MIGUEL, 2011). Os gêneros e espécies se caracterizam pela atividade diferenciada de produzir fermentação malolática pura, pois os valores de pH ótimo para a degradação do ácido málico e dos açúcares são diferentes (MANFROI, 2002). A espécie *Oenococcus oeni* é capaz de manter um gradiente de pH através da sua parede celular principal, especificamente a um pH abaixo de pH 3,0 (BUNTE, 2009).

Os vinhos que possuem pH inferior a 3,5, não favorecem o crescimento de bactérias do gênero *Pediococcus* e *Lactobacillus*, portanto, há uma aumento na população de *O. oeni* que é considerada a espécie mais tolerante ao pH ácido (MANFROI, 2002). Já em vinhos com pH mais elevado (pH 3,5 a 4,0) pode-se ter um aumento da população de *Pediococcus spp.* e/ou de *Lactobacillus spp.* e estes serem os responsáveis pela FML (BUNTE, 2009).

Culturas starter.

Após a fermentação alcoólica e malolática, os vinhos são microbiologicamente estáveis (MERNY, 2014). Nem todas as fermentação malolática espontâneas apresentam características positivas para o vinho. O próprio vinho exerce importante pressão de seleção

sobre as populações de bactérias maloláticas, particularmente pela presença de etanol, pH baixo e SO₂ (REGUANT et al., 2005).

A utilização de culturas selecionadas universais para produzir produtos diferentes tem sido questionada, face à manutenção da tipicidade dos produtos obtidos. Por exemplo, o uso das mesmas culturas selecionadas comerciais para fabricar diferentes tipos de queijo pode conduzir a produtos finais que são demasiadamente semelhantes (TOPISIROVIC et al., 2006).

Existem vários tipos ou formas de apresentação de culturas *starter* de bactérias lácticas. As culturas de suspensão líquida têm apenas uma vida útil de dois a 20 dias e requer um tempo de preparação de três a sete dias. As culturas congeladas precisam ser inoculadas imediatamente após serem descongeladas e os *pellets* são adicionados diretamente ao vinho. Ao contrário das culturas de inoculação direta que não necessitam de preparação e são adicionadas diretamente ao vinho (LERM et al., 2010).

A seleção de estirpes para a inoculação baseia-se essencialmente numa elevada capacidade de atividade malolática em relação às condições adversas encontradas (BRAVO-FERRADA et al., 2013).

O uso de culturas *starter* a fim de induzir a fermentação malolática, assegura uma maturação mais rápida, reduzindo o potencial de deterioração por outras bactérias, e além disso permite o controle e seleção de estirpes responsáveis pela fermentação e sua contribuição para o vinho (ZHANG; LOVITT, 2006).

Conclusões

1. O estudo da diversidade de bactérias lácticas e seu comportamento é primordial para a fermentação dos vinhos.
2. As bactérias lácticas interagem constantemente com o meio e inclusive com outros os outros indivíduos, como leveduras, demais bactérias e vírus.
3. É necessária uma revisão e atualização dos métodos enológicos para a preservação de microrganismos de interesse e exclusão dos indesejáveis.
4. As culturas puras selecionadas são eficientes, porém culturas selecionadas regionalmente agregam maior originalidade ao produto final.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade de Caxias do Sul (UCS) pelo espaço de pesquisa e ao CNPq pelo apoio financeiro às linhas de pesquisa.

Referências

BAE, S.; FLEET, G.H.; HEARD, G.M. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 100, p.712-727, 2006.

BINATI, R. L. **Avaliação da fermentação maloláctica em vinhos de altitude com bactérias ácido-lácticas autóctones selecionadas**. 2015. 111p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BRAVO-FERRADA, B. M.; HOLLMANN, A.; DELFEDERICO, L.; HENS, D. V. L.; CABALLERO, A.; SEMORILE, L. Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 29, p.1537-1549, 2013.

BUNTE, M. A. Fermentation malolactique: métabolisme bactérien et altérations. Mise au point sur les amines biogènes. **CHR Hansen**, v. 1, p.17-19, 2009.

CAETANO, M. D. P. **Desenvolvimento de um sistema diagnóstico molecular para microorganismos enológicos**. 2008. 76p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro, 2008.

CAPOZZI, V.; RUSSO, P.; BENEDUCE, L.; WEIDMANN, S.; GRIECO, F.; GUZZO, J.; SPANO, G. Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. **Letters In Applied Microbiology**, v. 50, p.327-334, 2009.

INES, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R. MENDES-FAIA, A. Revisão: as bactérias do ácido láctico do vinho- Parte I. **Ciência Tecnologia Vitivinícola**. v.23, p.81-96, 2008.

KRIEGER, A. S.; DUMONT, A.; DÉLÉRIS-BOU, M.; SILVANO, A.; ESCOT, S. Lalvin VP41®: au-delà de la fermentation malolactique, une bactérie oenologique à fort impact sensoriel. **Elevage et conditionnement des vins**, v.1, p. 74-81, 2004.

LERM, E.; ENGELBRECHT, L.; DUTOIT, M. Malolactic fermentation: the ABC's of MLF. **South African Journal Of Enology And Viticulture**, v. 31, p.186-212, 2010.

LONVAUD-FUNEL, A. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. **Fems Microbiology Letters**, v. 126, p.209-214, 1995.

LÓPEZ, I.; LÓPEZ, R.; SANTAMARÍA, P.; TORRES, C.; RUIZ-LARREA, F. Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. **Vitis Journal Of Grapevine Research**, v. 47, p.123-129, 2008.

MAICAS, S.; GONZÁLEZ-CABO, P.; FERRER, S.; PARDO, I. Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. **Biotechnology Letters**, v. 21, p.349-353, 1999.

MANFROI, L. **Avaliação do processo fermentativo e da composição de vinho merlot elaborado com diferentes espécies de *Saccharomyces*, *Oenococcus* e *Lactobacillus***. 2002. 139p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

MERNY, E. **Une nouvelle souche de bactérie malolactique amène un changement fondamental en oenologie**. 2014. 2p. Disponível em: <<https://www.upperwine.com/fr/blog/une-nouvelle-souche-de-bacterie-malolactique-amene-un-changement-fondamental-en-oenologie/>> Acesso em: 01 jan.2017

MIGUEL, V. F. A. **Deteção e Prevenção de Defeitos Organolépticos Originados pela Fermentação Maloláctica em Vinhos Tintos**. 2011. 57p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Politécnico de Santarém.

JACKOWETZ, J.N.; ORDUÑA, R. M. Metabolism of SO₂ binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 155, p.153-157, 2012.

POTES, M. E.; MARINHO, A. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p.145-151, 2007.

RAMOS, A. P. P. **Influência da glicose, etanol e dióxido de enxofre no crescimento de bactérias ácido láctico**. 2013. 99p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa.

REGUANT, C.; CARRETÉ, R.; CONSTANTÍ, M.; BORDONS, A.; Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. **Fems Microbiology Letters**, v. 246, p.111-117, 2005.

RIBEREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LOUVAUD, A. **Handbook of Enology Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications**, 2006. 497 p.

SABLAYROLLES, J. M.; SALMON, J. M. Déroulement et contrôle de la fermentation. **Sciences pour L'oenologie**. v.2, p.1-29, 2004.

SILVA, G. A. Atividade de bactérias lácticas durante a vinificação e aspectos relacionados com a qualidade química do vinho. In: X CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2005, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: [S.I.], 2005. p. 163-171.

SILVA, L. J. M. **Isolamento e Caracterização Bioquímica das Bactérias do Ácido Láctico do Queijo São Jorge DOP**. 2011. 135p. Dissertação (Mestrado) - Universidade dos Açores.

SOLIERI, L.; GENOVA F.; DE PAOLA, M.; GIUDICI, P. Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 108, p.285-298, 2010.

TELES, A. I. S. **Inativação Térmica de Bactérias Lácticas em Meio de Elevado Teor de Etanol**. 2013. 72p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Técnica de Lisboa.

TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 112, p.230-235, 2006.

VILA-CRESPO J.; RODRIGUES-NOGALES, J. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E.; HERNANZ-MORAL, M.C. Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions. **Technology And Education Topics In Applied Microbiology: Microbial Biotechnology**, v.1, p.920-929, 2010.

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

Tabela 1. Espécies de BAL isoladas a partir de uvas, mostos e vinhos.

Homofermentativos		Heterofermentativos	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	
<i>Pc. damnosus</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. buchnerii</i>	
<i>Pc. dextrinicus</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. collinoides</i>	
<i>Pc. inopinatus</i>	<i>Lb. homohoichii</i>	<i>Lb. fermentum</i>	
<i>Pc. parvulus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. fructivorans</i>	
<i>Pc. pentosaceus</i>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. hilgardii</i>	
<i>Pediococcus spp.</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. kunkeei</i>	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. sanfrancisensis</i>	
<i>Lb. jensenii</i>	<i>Lb. zaeae</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	
<i>Lb. mali</i>	<i>Lb. nagelli</i>	<i>Leuconostoc citrovorum</i>	
<i>Lb. vini</i>	<i>Lb. diolivorans</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> <i>subsp. Dextranicum</i>	
-	-	<i>Leuc. mesenteroides</i> <i>subsp. Mesenteroides</i>	
-	-	<i>Leuconostoc spp.</i>	
-	-	<i>Weissella confusa</i>	
-	-	<i>W. paramesenteroides</i>	
-	-	<i>Oenococcus oeni</i>	

Fonte: Adaptado de INÊS et al., 2008.

Anexo 5 Artigo: **Parecer da Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**



RBVE - Revista Brasileira de Viticultura e Enologia

Rua Matheus Valduga, 143 – Bairro Planalto

CEP 95700-000 – Bento Gonçalves – RS

Fone: (54) 3452 6289 Fax: (54) 3451 2277

E-mail: revista@enologia.org.br

Site: www.enologia.org.br

Trabalho n°: 24/2017

Data:

Assessor: 02

Título:

A importância das bactérias lácticas na vitivinicultura: Revisão

Bom noite. Quanto a revisão do trabalho “A importância das bactérias lácticas na vitivinicultura”, é uma revisão pequena e enxuta e de muita importância, principalmente para os leitores que não tem ideia do que pode ocorrer durante um fermentação alcoólica ou malolática.

Grato

