UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL DE APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS AUTÓCTONES EM VINHOS TINTO DA SERRA GAÚCHA

SHANA PAULA SEGALA MIOTTO

ERECHIM, RS – BRASIL

2019

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL DE APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS AUTÓCTONES EM VINHOS TINTO DA SERRA GAÚCHA

SHANA PAULA SEGALA MIOTTO

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientadores: Prof. Drª. Eunice Valduga

Prof. Dr. Rogério Luís Cansian

Prof. Dr. Evandro Ficagna

ERECHIM, RS – BRASIL

2019

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL DE APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS AUTÓCTONES EM VINHOS TINTO DA SERRA GAÚCHA

Shana Paula Segala Miotto

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Comissão Julgadora:

Profª. Drª. Eunice Valduga Orientadora (URI - Erechim)	Profª. Drª. Jamile Zeni Membro da banca (URI - Erechim)
Prof. Dr. Rogério Luis Cansian Orientador (URI - Erechim)	Profª. Drª. Simone Bertazzo Rossato Membro da banca (IFRS - Bento Gonçalves)
Prof. Dr. Evandro Ficagna Orientador (IFRS - Bento Gonçalves)	Prof. Dr. Luciano Manfroi Membro da banca (IFRS - Bento Gonçalves)
	Profª. Drª. Rosicler Colet Membro da banca (URI - Erechim)

Erechim, 2019

M669i Miotto, Shana Paula Segala
Isolamento, identificação e potencial de aplicação tecnológica de bactérias ácido láticas autóctones em vinhos tintos da serra gaúcha / Shana Paula Segala Miotto. - 2019.
131 f.

Tese (doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

"Orientação: Dra Eunice Valduga; Dr. Rogério Luís Cansian; Dr. Evandro Ficagna."

1. Micro-organismos nativos 2. Fermentação malolática 3. Indústria vinícola 4. Desacidificação biológica I. Título

C.D.U.: 664

Catalogação na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

Dedico este trabalho a minha família,
especialmente a minha mãe, Terezinha Segala.

AGRADECIMENTOS

Costumo dizer que este foi um trabalho construído por muitas mãos, e gostaria de agradecer a todos que de alguma maneira disponibilizaram um pouco de seu tempo e conhecimento para que eu pudesse concluí-lo.

Agradeço a URI, CAPES e IFRS, pelo apoio financeiro, condições acadêmicas e todo o suporte proporcionado para que esta pesquisa saísse do sonho e se tornasse realidade.

Aos meus orientadores, Eunice Valduga, Rogério Luís Cansian e Evandro Ficagna, foi um privilégio ter vocês como mentores. Obrigada por embarcarem comigo no mundo do vinho, acreditando que este trabalho seria possível. Vocês dividiram comigo seus saberes, experiências, foram essenciais para que este trabalho tomasse forma e fosse concluído, foram além de mestres, amigos.

A todos os professores do PPGEAL que sempre estiveram disponíveis, compartilhando seus conhecimentos ao longo desta caminhada. Saibam que isto foi a base para a realização desta pesquisa. Aos meus colegas de doutorado, que dividiram comigo risadas, angústias e conhecimento ao longo destes quatro anos. Em especial aos que sempre estiveram presentes (me salvando nas cadeiras de cálculo, lendo meus resumos e artigos, compartilhando o café da tarde e os almoços entre as aulas): Raíza Almeida Mesquita, Fernanda Carolina Lindner, Monalise Marcante Meregalli, Tuany Honaiser e Guilherme Hassemer, vocês sempre serão muito importantes na minha vida.

Agradeço a minha família que sempre esteve presente, minha mãe, Terezinha, e meu companheiro Augusto, que não me deixaram esmorecer, nem desistir ao longo desta caminhada. Aos meus tios Izabel, Silvia, Suzete e Ildo e aos primos Mariana e Cristiano, que sempre tiveram um cantinho na casa e um lugar a mesa pra me receber durante esta aventura. O amor, a dedicação e a compreensão de vocês foram essenciais para que este dia chegasse.

Aos meus colaboradores e amigos, Letícia C. Fensterseifer, Sheila Canossa e Danton Magri, pelos isolamentos de bactérias, DNAs extraídos, cromatografias feitas, vinhos elaborados, as tardes no laboratório, rodadas de mate e almoços de domingo, obrigada pela dedicação e companheirismo. Vocês sabem que de bolsistas de Iniciação Científica, se tornaram meus melhores amigos, meus irmãos mais novos, amo vocês!

Aos meus colegas do IFRS, que me apoiaram desde o momento da decisão por fazer o doutorado, nas análises, definição de metodologia, desenvolvimento do trabalho prático e tantos conselhos dados ao longo percurso: Vaneisa Gobatto, Jonas Heck, Daniel Ayub, Gisele Gugel, Bruno Cisilotto, Tiago Belmonte Nascimento, Luciano Manfroi, Simone Rossato, Valmor Guadanin, Ronald Araújo Rodrigues e Raquel Bondam de Lima.

In vino veritas!

Os vinhos são poesia para o corpo

e canção para a alma!

RESUMO

As bactérias ácido láticas (BALs) são micro-organismos responsáveis pela fermentação malolática nos vinhos, processo que converte o ácido L-Málico em ácido L-lático, proporcionando estabilização microbiológica e maior palatabilidade. Esta fermentação ocorre naturalmente nos vinhos tintos, o que demonstra a existência de micro-organismos autóctones capazes de realizar esta desacidificação. O objetivo deste trabalho foi isolar BALs de vinhos tintos da Serra Gaúcha e avaliar sua capacidade fermentativa, mediante características morfológicas (cor e formato da colônias, gram e catalase), genéticas (RAPD e 16S rDNA) e fermentativas (aumento de pH, redução de acidez, preservação de antocianinas, descarboxilação de ácido L-málico, produtividade e rendimento de ácido L-lático), indicando potencialidades de aplicação na indústria vinícola. Das 245 colônias obtidas, 47 apresentaram características compatíveis com BALs, 13 delas exibiram o loci para as enzimas responsáveis pela fermentação malolática. Oito demonstraram cinética compatível com aplicação na indústria, onde o consumo de substrato e síntese de produto médios foram de 3,34 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ e 2 $mg.L^{-1}.h^{-1}$, respectivamente. Seis isolados foram identificados geneticamente como *Oenococcus oeni* (4 cepas), *Lactobacillus plantarum* (1 cepa) e *Lactobacillus suebicus* (1 cepa). Durante a fermentação malolática em vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot, as bactérias láticas nativas, CS (16) 3B1, CS (17) 5, ME (16) 1A1 e ME (17) 26, comportaram-se de maneira similar a cepa comercial *Oenococcus oeni*, sendo que as mesmas atuaram aumentando o pH (± 0,11), reduzindo a acidez total (± 2,5 $g.L^{-1}$ ác. tartárico), sintetizando ácido L-lático (± 1,5 $mg.L^{-1}$), além de apresentarem uma média de 250 $mg.L^{-1}$ de antocianinas totais. A análise sensorial revelou que os parâmetros instrumentais de redução de acidez total titulável, intensidade da cor, concentração de antocianinas e a presença de ácido L-lático, foram detectados pelos provadores, uma vez que os atributos de acidez, intensidade visual da cor e aroma lático foram pontuados tanto para as bactérias comerciais quanto para os isolados. A partir dos resultados obtidos pode-se dizer que as bactérias autóctones avaliadas em vinho apresentaram potencial malolático, independente da safra e da variedade de uva da qual foram isoladas.

Palavras-chave: Micro-organismos nativos, adaptação ecológica, fermentação malolática, desacidificação biológica, vinhos de altitude, indústria vinícola.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LABs) are microorganisms responsible for malolactic fermentation in wines, a process that converts L-malic acid to DL-lactic acid, providing microbiological stabilization and greater palatability. This fermentation occurs naturally in red wines, which demonstrates the existence of autochthonous microorganisms capable of performing this deacidification. The objective of this work was to isolate LABs from Serra Gaúcha red wines and to evaluate their fermentative capacity, through morphological characteristics (color and shape of the colonies, gram and catalase), genetic (RAPD and 16S rDNA) and fermentative (pH increase, acidity, preservation of anthocyanins, decarboxylation of L-malic acid, productivity and yield of DL-lactic acid), indicating potential application in the wine industry. Of the 245 colonies obtained, 47 showed characteristics compatible with LABs, 13 of them exhibited loci for malolactic fermentation enzymes. Eight showed compatible kinetics with application in the industry, where average substrate consumption and product synthesis were 3.34 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ and 2 $mg.L^{-1}.h^{-1}$, respectively. Six isolates were genetically identified *as Oenococcus oeni* (4 strains), *Lactobacillus plantarum* (1 strain) and *Lactobacillus suebicus* (1 strain). During the malolactic fermentation in Cabernet Sauvignon and Merlot wines, the native lactic acid bacteria, CS (16) 3B1, CS (17) 5, ME (16) 1A1 and ME (17) 26, behaved similarly to commercial strain *Oenococcus oeni*, which increased the pH (± 0.11), reducing the total acidity (± 2.5 gL^{-1} tartaric acid), synthesizing DL-lactic acid (± 1.5 $mg.L^{-1}$), presenting an average of 250 $mg.L^{-1}$ of total anthocyanins. The sensorial analysis revealed that the instrumental parameters of reduction of total titratable acidity, color intensity, anthocyanin concentration and the presence of DL-lactic acid were detected by the tasters, since the attributes of acidity, color intensity and aroma lactic acid bacteria were scored for both commercial and isolate bacteria. From the obtained results it can be said that the autochthonous bacteria evaluated in wine presented malolactic potential, independent of the harvest and the grape variety from which they were isolated.

Keywords: Native microorganisms, ecological adaptation, malolactic fermentation, biological deacidification, wines of altitude, wine industry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 24
2. OBJETIVOS 26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 27
3.1 PRODUÇÃO DE UVAS E DERIVADOS NO BRASIL 27
3.2 VINIFICAÇÃO 28
3.2.1 Fermentação alcoólica 29
3.2.2 Fermentação malolática 30
3.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS 32
3.4.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM VINHO 35
3.4.2 USO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NA INDÚSTRIA VINÍCOLA 37
4. MATERIAL E MÉTODOS 40
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS 41
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE POTENCIAIS BALS 42
4.3 TESTE DE CAPACIDADE DE CRESCIMENTO EM MEIO MÍNIMO, REDUÇÃO DE pH, DESCARBOXILAÇÃO DE ÁCIDO L-MÁLICO E PERFIL ENZIMÁTICO 43
4.3.1 Crescimento em meio mínimo 43
4.3.2 Redução da acidez – método do potencial hidrogeniônico (pH) 44
4.3.3 Presença dos ácidos L-málico e ácido L- lático 44
4.3.4 Eletroforese de Isoenzimas 45
4.4 FERMENTAÇÃO EM VINHO TINTO 46
4.4.1 Aumento de pH e redução da acidez total titulável 47
4.4.2 Quantificação de ácido L-málico e ácido L-lático 48
4.4.3 Quantificação de antocianinas 48
4.4.4 Características cromáticas 49
4.4.5 Estudo de parâmetros cinéticos e estequiométricos da FML 50
4.5 PERFIL GENOTÍPICO - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BALs SELECIONADAS 51

4.5.1 Extração de DNA.....51
4.5.2 RAPD 52
4.5.3 Identificação das espécies.....53
4.6 MICROVINIFICAÇÃO 53
4.6.1 Análises físico-químicas.....55
4.6.1.1 Teor alcoólico.....*55*
4.6.1.2 pH, acidez total e acidez volátil.....*55*
4.6.1.3 Ácidos L-málico e L-lático *56*
4.6.1.4 Açúcares redutores.....*56*
4.6.1.5 Características cromáticas, antocianinas e polifenóis totais.....*56*
4.6.2 Análise sensorial dos vinhos elaborados 57
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE POTENCIAIS BALS.....61
5.2 TESTE DE CAPACIDADE DE CRESCIMENTO EM MEIO MÍNIMO, REDUÇÃO DE pH, DESCARBOXILAÇÃO DE ÁCIDO L-MÁLICO E PERFIL ENZIMÁTICO.....63
5.3 FERMENTAÇÃO EM VINHO TINTO 75
5.4 PERFIL GENOTÍPICO - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BAL SELECIONADAS.....90
5.5 MICROVINIFICAÇÃO.....95
5.5.1 Análises Físico-químicas.....96
5.5.2 Análise Sensorial.....99
6. CONCLUSÕES.....111
7. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....113
8. REFERÊNCIAS 114
APÊNDICES 122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quantidade Média de uvas produzidas no RS entre os anos de 2013 e 2015. 28

Figura 2: Etapas da elaboração de vinhos. 29

Figura 3: Possíveis vias de conversão do ácido L-málico em ácido L-láctico por diferentes enzimas. MDH, malato desidrogenase; ME, enzima mica; MLE, enzima maloltica; OADC, oxaloacetato descarboxilase; LDH, lactato desidrogenase. 31

Figura 4: Colônias com morfologia típica para bactérias ácido láticas, isoladas de vinho tinto, microscopia óptica em aumento de 1000x. 33

Figura 5: Evolução da população de BAL durante o processo de Vinificação. 35

Figura 6: Principais gêneros de BALs observados na FML espontânea: benéficos (A) *Oenococcus oeni*, (B) *Lactobacillus plantarum* e maléficos (C) *Pediococcus damnosus*, (D) *Leuconostoc mesenteroides*. 36

Figura 7: Amostras de vinho sintético preparadas para cromatografia em papel. 45

Figura 8: Modelo para fermentação malolática em escala laboratorial. 47

Figura 9: Sistema utilizado para fermentação malolática em vinho tinto. 54

Figura 10: Cabines de avaliação sensorial da Vinícola-Escola no IFRS campus Bento Gonçalves. 59

Figura 11: Processo de isolamento e placas com colônias não purificadas obtidas de vinhos da Serra Gaúcha. 61

Figura 12: Exemplo de Teste da Catalase: (A) *S. aureus* - Catalase positivo, (B) Isolado 65 - Catalase negativo. 62

Figura 13: Características morfológicas das colônias encontradas nas amostras: (A) - C. Sauvignon 2017 (Vale dos Vinhedos); (B)- C. Sauvignon 2016 (Distrito de Tuiuty); (C) - Merlot 2016 (Vale dos Vinhedos); (D) – Merlot 2017 (Distrito de Tuiuty); (E) - P. Noir 2017 (Vale dos Vinhedos); (F) - P. Noir 2017 (Pinto Bandeira). 62

Figura 14: Exemplos de isolados corados com Técnica de Gram e fotografados em Microscópio óptico com aumento de 1000x, onde observa-se isolados Gram (+) e em configuração de cocos (A e D) e bacilos (B, C e E). 63

Figura 15: Curvas de Crescimento: (A) – Densidade ótica (absorbância) e (B) – células viáveis ($UFC.mL^{-1}.10^{-3}$), para os isolados da variedade Cabernet Sauvignon safra 2016. 64

Figura 16: Curvas de crescimento: (A) – Densidade ótica (absorbância) e (B) – células viáveis ($UFC.mL^{-1}.10^{-3}$), para os isolados da variedade Merlot safra 2016. 65

Figura 17: Curvas de crescimento: (A e C) – Densidade ótica (absorbância) e (B e D) – células viáveis (UFC.mL^{-1}.10^{-3}), para os isolados da variedade Cabernet Sauvignon safra 2017. 66

Figura 18: Curvas de crescimento: (A) – Densidade ótica (absorbância) e (B) – células viáveis (UFC.mL^{-1}.10^{-3}), para os isolados da variedade Merlot safra 2017. 68

Figura 19: Curvas de crescimento: (A) – Densidade ótica (absorbância) e (B) – células viáveis (UFC.mL^{-1}.10^{-3}), para os isolados da variedade Pinot Noir safra 2017. 69

Figura 20: Exemplos de cromatogramas onde observa-se a formação de manchas para o ácido L-lático e de ácido L-málico. (A) – Isolado PN (17) 65; (B) – Isolado ME (16) 1A1; (C) – Isolado CS (17) 112. 73

Figura 21: Gel obtido para a iso-enzima Malato Desidrogenase (MDH). Na sequência: (1) - *O. oeni*, (2) - CS (16) 3B1, (3) - ME (16) 1A1, (4) - ME (16) 5B1, (5) - CS (17) 2, (6) - CS (17) 10, (7) - ME (17) 23, (8) - ME (17) 26, e (9) - PN (17) 65. 74

Figura 22: Valores de ácido L-málico e L-lático encontrados para os isolados, *L. plantarum* e *O. oeni*, durante a evolução da fermentação malolática em vinho tinto: (A) redução L-málico completa em até 35 dias; (B) residual de até 1,2 g.L^{-1} em 45 dias de experimento; (C) produção superior a 1,8 g.L^{-1}; (D) produção inferior a 1 g.L^{-1} em 45 dias de experimento.....78

Figura 23: Teores de Antocianinas obtidos para isolados, cepas comerciais e vinho sem inoculação ao final de 45 dias de FML.....81

Figura 24: Correlação dos parâmetros cromáticos, com o pH e o teor de antocianinas.....82

Figura 25: Histograma representando os valores obtidos para as características cromáticas ao final da fermentação malolática (45 dias) para os 13 isolados, *L. plantarum*, *O,oeni* e vinho sem inoculação. 84

Figura 26: Contribuição percentual dos pigmentos amarelo, vermelho e violeta para a composição global da cor dos vinhos estudados. (A) – CS(16) 3B1; (B) ME (16) 1A1; (C) ME (16) 5A1; (D) ME (16) 5B1; (E) CS (17) 2; (F) CS (17) 5; (G) CS (17) 8; (H) CS (17) 10; (I) CS (17) 41; (J) ME (17) 23; (L) ME (17) 26; (M) PN (17) 65; (N) PN (17) 75; (O) *L. plantarum*; (P) *O. oeni* e (Q) sem inoculação. 86

Figura 27: Cinética de crescimento celular (biomassa), consumo de ácido L-málico e síntese de ácido L-lático durante 45 dias (1080 hs) de FML em vinho tinto: (A) – CS(16) 3B1; (B) ME (16) 1A1; (C) ME (16) 5A1; (D) ME (16) 5B1; (E) CS (17) 2; (F) CS (17) 5; (G) CS (17) 8; (H) CS (17) 10; (I) CS (17) 41; (J) ME (17) 23; (L) ME (17) 26; (M) PN (17) 65; (N) PN (17) 75; (O) *L. plantarum*; (P) *O. oeni*. 88

Figura 28: Gel de RAPD para o primer OPA 12. Na sequência: (1) - *L. plantarum*, (2) - CS (17) 5, (3) - CS (16) 3B1, (4) - ME (17) 26, (5) - ME (16) 1A1, (6) - PN (17) 65, (7) - PN (17) 75, (8) - *O. oeni* e o marcador de peso molecular. 91

Figura 29: Dendrograma obtido pela análise de PCR-RAPD, utilizando o índice de Similaridade de Jaccard. 93

Figura 30: Árvore filogenética obtida através de 16S rDNA, estabelecida pelo método de Máxima Verossimilhança com Bootstrap de 500 réplicas. 94

Figura 31: Perfil de características do vinho C. Sauvignon após fermentação malolática com cepa comercial e isolados. 100

Figura 32: Análise de componentes principais para os parâmetros físico-químicos, cromáticos e atributos sensoriais do vinho C. Sauvignon. 104

Figura 33: Perfil de características do vinho Merlot após fermentação malolática com cepa comercial e isolados.....105

Figura 34: Análise de componentes principais para os parâmetros físico-químicos, cromáticos e atributos sensoriais do vinho Merlot. 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da classificação de BALs (Adaptado de Ines, 2007). 33

Tabela 2: Exemplos de BALs usadas na fermentação de alimentos de diversas origens (Adaptado de Ines, 2007) 34

Tabela 3: Exemplos de alterações sensoriais produzidas nos vinhos por bactérias ácido láticas, (adaptado de Bartowsky, 2009). 39

Tabela 4: Localização geográficas dos pontos de coletas das amostras de vinho. 41

Tabela 5: Sequência de iniciadores (primers) utilizados na análise por RAPD. 52

Tabela 6: Termos descritores, definições e referências utilizadas na etapa de treinamento dos provadores para vinho tinto. 58

Tabela 7: Valores de pH encontrados ao final de 60 dias de FML em vinho sintético (pH inicial 3,2) para cepas autóctones e comerciais. 71

Tabela 8: Presença e/ou ausência de ácidos L-málico e L-lático obtido por cromatografia de Papel (Método qualitativo) para as BALs no início e final de Fermentação em Vinho Sintético (0 e 60 dias). 72

Tabela 9: Presença e/ou ausência de enzimas responsáveis pela fermentação malolática, obtidas por eletroforese de iso-enzimas após 48 h de fermentação. 74

Tabela 10: Isolados selecionados para fermentação em vinho tinto – critérios. 76

Tabela 11: Valores (médias e desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos obtidas para os 13 isolados em 45 dias de FML em vinho tinto em comparação com amostra sem inoculação. .. 77

Tabela 12: Teor de antocianinas totais e características cromáticas (médias e desvio padrão) obtidas para os 13 isolados e cepas comerciais em 45 dias de FML em vinho tinto em comparação com amostra sem inoculação. 80

Tabela 13: Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos para os 13 isolados e cepas comerciais em 45 dias de FML (1080 h) em vinho tinto 87

Tabela 14: Lista de Iniciadores (primers), sequência de nucleotídeos e número de fragmentos observados. 91

Tabela 15: Isolados selecionados para fermentação em vinho tinto – critérios. 92

Tabela 16: Identidade genética dos isolados e bactérias ‘starter’ comerciais. 94

Tabela 17: Parâmetros físico-químicos e características cromáticas (médias e desvio padrão) avaliados após 45 dias, ao final da FML para vinho C. Sauvignon. 96

Tabela 18: Parâmetros físico-químicos e características cromáticas (médias e desvio padrão) avaliados ao final da FML para vinho Merlot. 98

Tabela 19: Médias e desvio padrão das notas relativas aos atributos avaliados para vinho tinto C. Sauvignon. 99

Tabela 20: Correlação de Pearson para os parâmetros físico-químicos, cromáticos e atributos sensoriais do vinho C. Sauvignon. 102

Tabela 21: Médias e desvio padrão das notas relativas aos atributos avaliados para vinho tinto Merlot. 105

Tabela 22: Correlação de Pearson para os parâmetros físico-químicos, cromáticos e atributos sensoriais do vinho Merlot. 107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Etapas realizadas para a seleção de bactérias ácido láticas em vinho. 40

Quadro 2: Codificação utilizada para identificar os micro-organismos isolados. 43

Quadro 3: Tratamentos realizados em vinho tinto para análise sensorial. 54

Quadro 4: Tratamentos, padrão, controle e testemunha da FML em vinho tinto.....96

Quadro 5: Resumo dos resultados obtidos após os ensaios de seleção bioquímica e identificação genética.....110

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Acidez total titulável.....48

Equação 2 – Antocianina livre.....49

Equação 3 – Intensidade de cor em vinhos.....49

Equação 4 – Tonalidade em vinhos.....49

Equação 5 – Percentual da cor amarela.....49

Equação 6 – Percentual da cor vermelha.....49

Equação 7 – Percentual da cor violeta.....49

Equação 8 – Consumo de substrato.....50

Equação 9 – Síntese de produto.....50

Equação 10 – Fator de rendimento..... 50

Equação 11 – Percentual de rendimento.....50

Equação 12 – Acidez volátil em vinhos.....55

Equação 13 – Açúcares redutores.....56

Equação 14 – Fator de conversão açúcares redutores.....56

ABREVIATURAS E SIGLAS

pH – potencial hidrogeniônico
RS – Rio Grande do Sul
FA – Fermentação alcoólica
FML – Fermentação malolática
BAL – Bactéria ácido lática
BALs – Bactérias ácido láticas
PCR – Polymerase Chain Reaction
DNA – Ácido desoxirribonucleico
RNA – Ácido ribonucleico
CO_2 – Dióxido de carbono
$UFC.mL^{-1}$ – Unidades formadoras de colônia por mililitro
Lb. – *Lactobacillus*
SO_2 – Dióxido de enxofre / anidrido sulfuroso
ME – Merlot
CS – Cabernet Sauvignon
PN – Pinot Noir
mL – Mililitro
µL – Microlitro
MRS – Mann Rogosa Sharp
VS – vinho sintético
UV-VIS - ultravioleta – visível
EM – enzima Málica
MDH – enzima Malato Desidrogenase
OADC – enzima Oxalacetato Descarboxilase
LDH – enzima Lactato Desidrogenase
MLE – enzima Malolática
ATT – Acidez Total Titulável
NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
RPM – rotações por minuto
NM – nanômetros
T – Tonalidade
IC – Intensidade de cor
CTAB – Brometo cetiltrimetil amônio
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
CIA – Clorofórmio e álcool isoamílico
RAPD – Random Amplified Polymorfic DNA
mM – milimolar
HCl – Ácido clorídrico
µM – micromolar
KCl – Cloreto de potássio
$MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio
dNTPs – Desoxi-ribonucleotídeos fosfatados
nG – nanogramas
U – Unidade
TA – Tampão de amostra
UV – Ultravioleta
TBE – Trisma, ácido Bórico e EDTA
AV – Acidez volátil
IPT – Índice de polifenóis totais
DNS – Ácido dinitrosalicílico
ADQ – Análise descritiva quantitativa
ANOVA – Análise de variância
PCA – Análise componentes principais
CO – controle
TE - testemunha

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido láticas consistem num grupo de procariontes responsáveis pela fermentação de diversos alimentos, inclusive a desacidificação biológica do vinho, através da descarboxilação do ácido L-málico produzindo ácido L-lático e gás carbônico, culminando na redução da acidez total do vinho, aumento do pH, estabilização microbiológica e produção de compostos relacionados ao aroma e sabor do produto final (BINATTI, 2015). Uma vez que estes micro-organismos se encontram naturalmente nas uvas, é de grande importância compreender o seu crescimento e atividade malolática, o que pode levar a seleção de uma cultura "starter" mais adaptada ao produto final almejado, permitindo que sejam otimizadas as condições de inoculação e fermentação.

A acidez em bebidas fermentadas é uma questão complexa principalmente nos vinhos de altitude, uma vez que os mesmos muitas vezes não atingem a maturação fenólica completamente, como ocorre com os produzidos no Rio Grande do Sul. A fermentação malolática é comumente utilizada para reduzir esta acidez nos vinhos tintos, proporcionando multiplicidade nos aromas e sabores além de maior estabilidade microbiológica, trazendo maior qualidade ao produto final.

Segundo Davis et al. (1985), os estudos de indução da fermentação malolática começaram na década de 60 e os mesmos demonstraram a importância do uso de bactérias iniciadoras para a enologia, promovendo assim a investigação e o surgimento de diversas cepas comerciais. Além disso, também revelaram que não existe uma cultura universal que esteja apta a crescer e conduzir a fermentação em todos os tipos de vinhos.

De um modo geral, a microbiota autóctone de bactérias ácido láticas das uvas apresenta os gêneros *Oenococcus, Lactobacillus, Pediococcus e Leuconostoc,* no entanto a prevalência de um deles depende de diversos fatores como a composição do mosto, a cepa de levedura usada, pH e técnicas de elaboração, entre outros (ÁVILA e DAUDT, 1997; ALCAIDE-HIDALGO et al., 2008).

A maioria das vinícolas costuma deixar que o processo de fermentação malolática ocorra naturalmente após a fermentação alcoólica. No entanto, Ines (2007) destaca que a fermentação espontânea pode vir a comprometer a qualidade no produto final, permitindo o crescimento de bactérias indesejáveis, como as do gênero *Pediococcus* e *Acetobacter,* responsáveis por defeitos nos vinhos, além de dificultar o controle do processo, muitas vezes tornando a fermentação malolática demasiadamente longa.

As bactérias comerciais importadas (Itália e França), possuem custo elevado e muitas vezes apresentam dificuldades na adaptação aos vinhos brasileiros. Diante do exposto, fica nítida a importância de se conhecer a microbiota das bactérias ácido láticas das uvas cultivadas no Brasil, uma vez que possuem peculiaridades para cada região, podendo estar melhor adaptadas na condução da fermentação malolática e assim contribuir para a melhoria da qualidade no produto final, salientando os atributos regionais dos vinhos do Rio Grande do Sul.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias ácido láticas de amostras de vinhos tintos das variedades viníferas Cabernet Sauvignon, Merlot e Pinot Noir cultivadas na Serra Gaúcha e investigar seu potencial para utilização como culturas iniciadoras "starter", a fim de promover a fermentação malolática em vinhos finos tintos, pelo desenvolvimento das seguintes etapas:

- ✓ Isolar colônias típicas de bactérias ácido láticas de vinhos tintos finos nas safras de 2016 e 2017, identificando-as morfologicamente;
- ✓ Avaliar a capacidade destes isolados de desenvolverem-se em meio mínimo (vinho sintético) tendo ácido L-málico como fonte de carbono;
- ✓ Testar os isolados para a presença das enzimas responsáveis pela fermentação malolática: enzima málica, malato desidrogenase, oxalacetato descarboxilase e lactato desidrogenase;
- ✓ Avaliar a capacidade das cepas autóctones conduzirem a fermentação malolática no vinho tinto (meio complexo) em escala laboratorial, utilizando como parâmetros: pH, acidez total titulável, teor de ácido L-málico, teor de ácido L-lático;
- ✓ Avaliar o teor de antocianinas totais e as características cromáticas: pigmentos (vermelho, amarelo e violeta), índice de tonalidade e intensidade de cor;
- ✓ Avaliar a viabilidade fermentativa dos isolados a partir dos parâmetros cinéticos e estequiométricos (consumo de substrato, síntese de produto e rendimento) da fermentação malolática;
- ✓ Identificar geneticamente os isolados que apresentaram resultados estatisticamente similares as culturas comerciais de *Lactobacillus plantarum* e *Oenococcus oeni*;
- ✓ Elaborar vinhos tintos (Cabernet Sauvignon e Merlot) com os isolados identificados e a cultura 'starter' de *Oenococcus oeni*, e posteriormente compará-los em termos de características físico-químicas (acidez total, concentração de ácido L-lático e teor de antocianinas) e perfil sensorial (acidez, aromas: frutado e lático, intensidade da cor, persistência do gosto e aspecto global).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre a produção de uvas e derivados, processo de vinificação, fermentação malolática e a utilização de bactérias ácido láticas para desacidificação biológica dos vinhos.

3.1 PRODUÇÃO DE UVAS E DERIVADOS NO BRASIL

A produção de uvas no Brasil, tanto viníferas como as americanas, encontra-se principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste com destaque para os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco (MELLO, 2017). Em 2017, a área plantada no país ocupou 78.028 hectares, sendo que 62,58 % da lavoura vitícola nacional esteve localizada no RS (KIST et al., 2018).

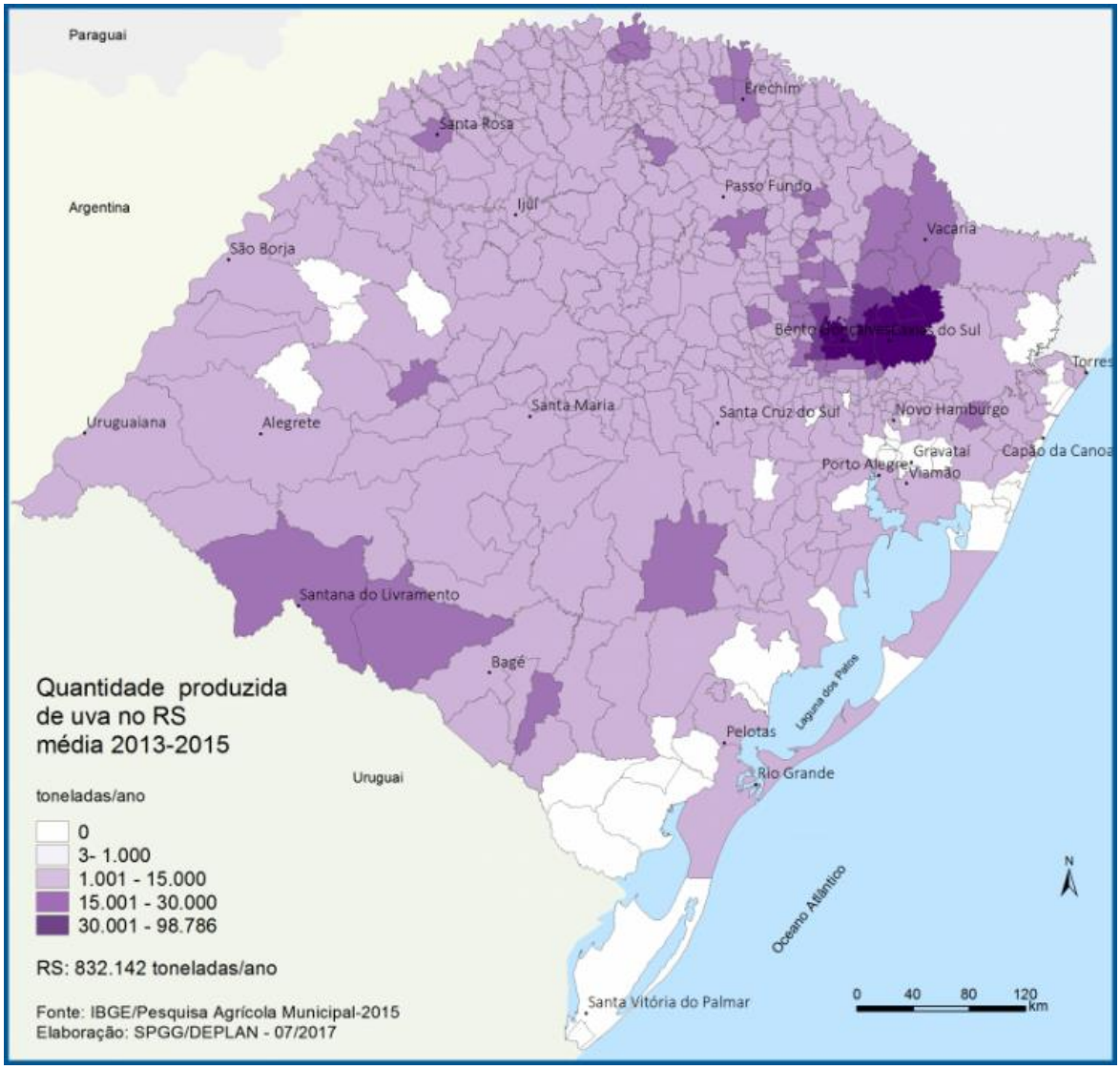
Neste estado, a região da Serra Gaúcha (Figura 1) apresenta grande expressividade, destacando-se neste cenário por possuir sazonalidade adequada para a produção de uvas, em especial as viníferas. Esta região foi responsável por 85 % da produção de vinhos no Brasil no ano de 2017 (IBRAVIN, 2018).

Além disso, a Serra Gaúcha obteve a indicação geográfica no ano de 2002 (ARAÚJO et al., 2009). As variedades tintas mais cultivadas na Serra Gaúcha, segundo Rizzon e Miele (2009) são a C. Sauvignon e Merlot.

De acordo com os dados disponibilizados no site do IBRAVIN (2018), as vinícolas gaúchas processaram 663,2 milhões de quilos da fruta, tendo sido observada uma diminuição de 12 % da produção em relação ao ano anterior, porém dentro da média histórica, fato justificado pela diminuição das horas de frio.

Foram obtidas 113 variedades de uvas, sendo 597,7 toneladas de uvas americanas e híbridas e 65,5 toneladas de *Vitis viníferas*, destacando-se entre as tintas Cabernet Sauvignon e Merlot. Segundo dados do IBGE (2016) a produção de vinhos, suco e derivados de uva no Rio Grande do Sul no ano de 2016 foi de 583.015 milhões de litros, 15,38 % superior à verificada em 2014. Porém no ano de 2018 houve diminuição da produção da fruta, e isto refletiu na quantidade de produtos elaborados, com 417,75 milhões de litros de vinhos, sucos e derivados.

Figura 1: Quantidade Média de uvas produzidas no RS entre os anos de 2013 e 2015.

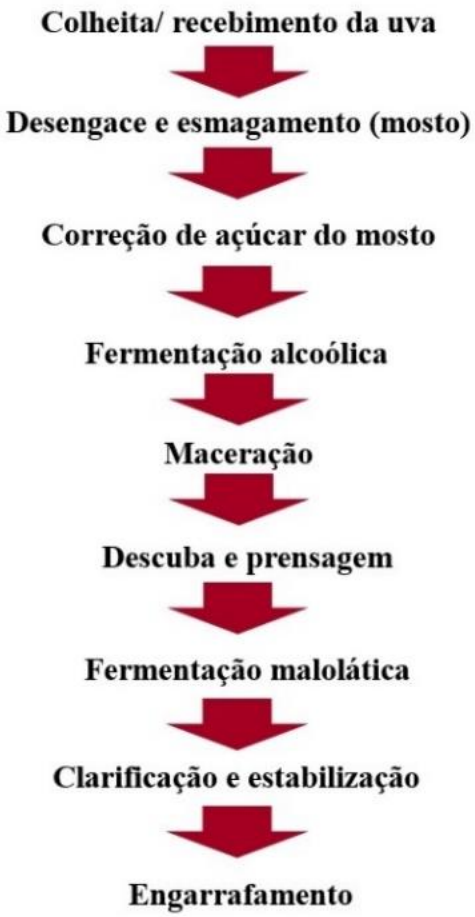


Fonte: IBGE -Atlas Socioeconômico do RS (2015).

3.2 VINIFICAÇÃO

De acordo com Binatti (2015), a vinificação é uma etapa bastante complexa do ponto de vista ecológico, uma vez que, naturalmente, existe uma microbiota autóctone nas uvas, composta por fungos, leveduras e bactérias. Este processo apresenta-se de maneira simplificada na Figura 2.

Figura 2: Etapas da elaboração de vinhos.



Fonte: Rizzon e D'all Agnol (2007)

A vinificação pode ser dividida em dois processos distintos: o primeiro é a fermentação alcoólica (FA) e ocorre em todos os vinhos por ação das leveduras, o segundo é a fermentação malolática (FML) que ocorre principalmente em vinhos tintos. Sendo assim, o vinho é uma bebida, obtida a partir da fermentação alcoólica de mosto simples de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1988).

3.2.1 Fermentação alcoólica

Conforme Rizzon e D'all Agnol (2007) após o recebimento das uvas realiza-se: a) separação da baga e da haste, uma vez que a permanência da ráquis (parte lenhosa do cacho) interfere negativamente na composição do mosto, proporcionando amargor, b) esmagamento, aumenta a maceração e contribui para a dissolução dos taninos, e c) determinação do teor de

açúcar presente no mosto, e a partir deste valor pode ser realizada a correção de açúcar, conforme necessidade.

Todos os vinhos, brancos e tintos, são submetidos à fermentação alcoólica (FA), que consiste na conversão do açúcar do mosto em álcool pela ação de leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces*. Esta fermentação pode ocorrer espontaneamente, devido a presença de leveduras autóctones na casca da uva, porém, comercialmente realiza-se a mesma com micro-organismos previamente selecionados, adquiridos liofilizados, que estão adaptados a diferentes tipos de cultivares utilizadas. O mosto é um meio rico em carboidratos, vitaminas e compostos aminados, substâncias necessárias às funções vitais das leveduras (RIBÉREAU-GAYON, et al, 2006).

A alta concentração de açúcar leva as leveduras a optarem pela rota metabólica anaeróbia para geração de energia. A FA é precedida pela glicólise, que consiste em uma série de reações que transformam glicose em piruvato com a formação de adenosina tri fosfato (ATP). Ao final desta, ocorrem duas reações enzimáticas: a primeira, onde o piruvato é reduzido a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1), e a segunda, onde a enzima álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1) reduz o acetaldeído em álcool. O principal produto da FA é o etanol, porém outros metabólitos são gerados, como os ácidos acético, lático, succínico e compostos aromáticos. A FA é considerada finalizada quando o meio é exaurido de açúcares do tipo hexoses (RIBÉREAU-GAYON, et al, 2006).

Para a obtenção de vinhos tintos é desejável que o mosto permaneça em contato com a casca e a semente da uva (maceração), no intuito de extrair compostos de interesse, como cor e aroma. Neste período pode se realizar a remontagem (homogeneização suave do mosto) a cada dois dias de fermentação. Quando o mosto atinge a densidade 1.010 $g.cm^3$ a 20ºC, realiza-se a descuba, que consiste na separação do mosto nas partes líquida e sólida, e na sequência a prensagem (RIZZON e DALL'AGNOL, 2007). Ao final desta etapa os vinhos com elevado concentração de ácido L-málico, detectado por cromatografia em papel são conduzidos a fermentação malolática (INES, 2007).

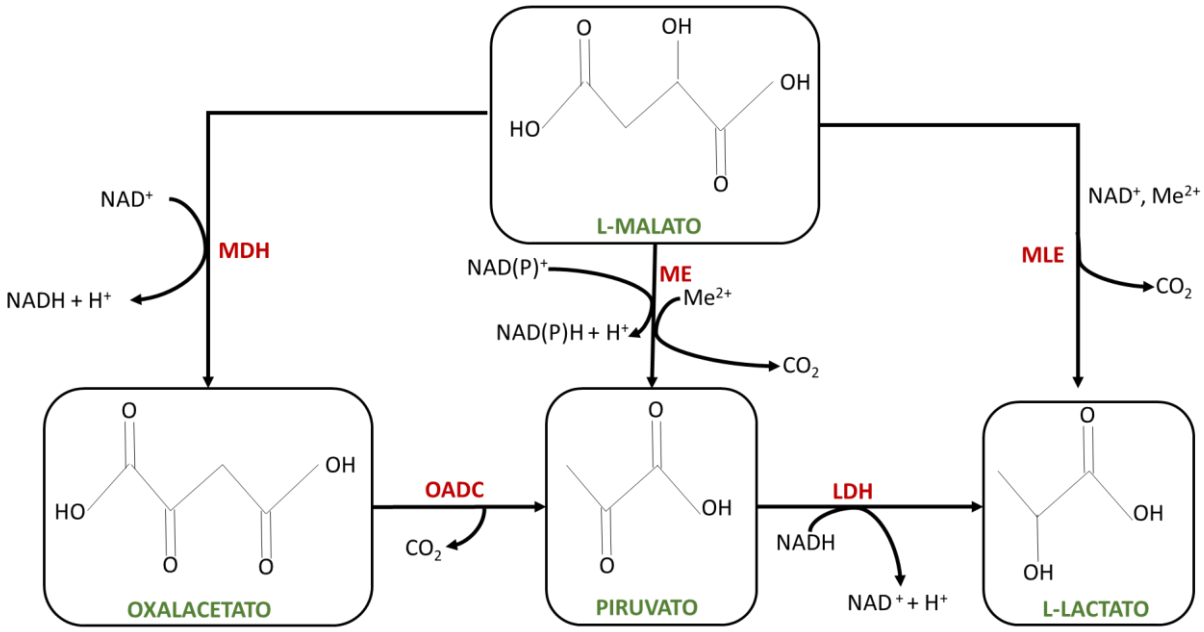
3.2.2 Fermentação malolática

A fermentação malolática (FML) é realizada mais comumente em vinhos tintos, efetuada por bactérias láticas com a intenção de redução de acidez. No RS, esta segunda etapa

é extremamente interessante, pois nas regiões mais frias, as uvas contêm naturalmente níveis mais elevados de ácidos orgânicos, tornando a redução da acidez bastante importante (BARTOWSKY, 2005; STEIN et al., 2016). Ela comumente ocorre após a FA, porém pode ocorrer simultaneamente a mesma. É desencadeada por bactérias autóctones, que estão presentes nas uvas, ou pela inoculação de estirpes selecionadas.

De acordo Schümann et al., (2013), na conversão do ácido dicarboxílico L-málico (L-malato) a um ácido monocarboxílico L-lático (L-lactato) e dióxido de carbono, chamada tradicionalmente de fermentação, não é uma fermentação verdadeira, mas sim a descarboxilação enzimática do L-malato, que poderia ser catalisada por três vias enzimáticas (Figura 3), baseada nas publicações de diversos autores desde a década de 40. As primeiras observações indicaram uma reação em duas etapas da enzima málica (ME, EC 1.1.1.40) e L-lactato desidrogenase (L-LDH, EC 1.1.1.27) (KORKES e OCHOA., 1948). A seguir, uma reação em três etapas incluindo a enzima malato desidrogenase (L-MDH, EC 1.1.1.37), oxaloacetato descarboxilase (OADC, EC 4.1.1.3) e L-LDH, (FLESCH, 1969).

Figura 3: Possíveis vias de conversão do ácido L-málico em ácido L-láctico por diferentes enzimas. MDH, malato desidrogenase; ME, enzima mica; MLE, enzima maloltica; OADC, oxaloacetato descarboxilase; L-LDH, lactato desidrogenase.



Fonte: Schümann et al, (2013).

Já em 1983, Caspritz e Radler, realizaram estudo em *L. plantarum*, onde evidenciaram a presença de uma terceira via de conversão direta do L-malato em L-lactato, referida como a

enzima malolática (MLE, ainda não classificada como EC), a qual consiste de duas subunidades idênticas. Esta reação é realizada na presença de concentrações catalíticas de NAD + e Mn2 +, mas o mecanismo do MLE permanece incerto, porque nenhuma redução de NAD + ou detecção de intermediários de reação livre foi relatada. Segundo estudo posterior, publicado por Galland et al. (2003), esta enzima malolática (MLE), é comumente encontrada em BALs nos gêneros *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*.

O resultado deste processo é o acréscimo de pH, enquanto ocorre a diminuição da acidez titulável (INES, 2007) que influencia nas características organolépticas do vinho, uma vez que o ácido lático é menos agressivo ao paladar. Observa-se também a ocorrência da estabilização microbiológica, uma vez que o ácido L-málico deixa de ser uma fonte de carbono que propiciaria o desenvolvimento da microbiota contaminante (BARTWOSKY, 2005)

Além das melhorias organolépticas e estabilidade microbiológica decorrentes da FML ela também pode levar a modificação do aroma, pois além da liberação do ácido lático ocorre o aumento de uma série de outros compostos (diacetil, acetoína, 2,3 butanodiol, ésteres) alguns álcoois superiores e agliconas aromáticas (VAQUERO et al., 2004). Contudo, a ação da FML pode não ter resultados benéficos, algumas cepas bacterianas podem conferir um efeito organoléptico indesejado no vinho, como odores e *flavors* indesejáveis (aroma de manteiga, odor de gerânio, amargor), metabólitos (carbamato de etila, aminas biogênicas – histamina, putrescina e tiramina) e turvação (DU TOIT e PRETORIUS, 2000).

Assim, o processo de elaboração dos vinhos é extremamente complexo e a FML pode afetar o produto positiva ou negativamente, dependendo de fatores físico, químicos e microbiológicos envolvidos (BINATI, 2015).

3.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Os micro-organismos responsáveis pela FML são chamados de bactérias ácido láticas (BALs), este termo define um grupo de procariotos capaz de produzir ácido lático ao final da descarboxilação de hidratos de carbono (INES, 2007). As BALs são bacilos e cocos Gram positivos que não formam endósporos, catalase negativos, característicos de locais não aeróbios, porém são aero tolerantes e suportam valores muito baixos de pH (FUGELSANG e EDWARDS, 2007).

Segundo Ines (2007), estas bactérias têm como principais características morfológicas: cor branca, forma circular puntiforme, bordas e superfícies lisas, consistência cremosa e aparência brilhante (Figura 4), o que dificulta sua classificação utilizando-se apenas características fenotípicas. Contudo, com o avanço nas técnicas moleculares, utilizam-se principalmente a Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) e o sequenciamento de DNA e RNA para complementar a classificação das BAL. Em 1919, Orlan-Jensen realizou a primeira classificação das BALs com sete gêneros. Atualmente existem 15 gêneros derivados dos 7 iniciais, conforme Tabela 1.

Figura 4: Colônias com morfologia típica para bactérias ácido láticas, isoladas de vinho tinto, microscopia óptica em aumento de 1000x.

Fonte: autor (2018).

Tabela 1: Comparação da classificação de BALs (Adaptado de Ines, 2007).

Gênero (ano 1919)	**Forma**	**Catalase**	**Redução nitrito**	**Fermentação**	**Gênero atual (ano 2007)**
Betabacterium	Bacilos	-	-	Hetero	*Lactobacillus*
	Bacilos	-	-	Hetero	*Weissella*
Thermobacterium	Bacilos	-	-	Homo	*Lactobacillus*
Streptobacterium	Bacilos	-	-	Homo/ Hetero	*Lactobacillus*
	Bacilos	-	-	Homo/ Hetero	*Carnobacterium*
Streptococcus	Cocos	-	-	Homo	*Streptococcus*
	Cocos	-	-	Homo	*Enterococcus*
	Cocos	-	-	Homo	*Lactococcus*
	Cocos	-	-	Homo	*Vagococcous*
Betacoccus	Cocos	-	-	Hetero	*Leuconostoc*
	Cocos	-	-	Hetero	*Oenococcus*
	Cocos	-	-	Hetero	*Weissela*
Microbacterium	Bacilos	+	+	Homo	*Brochothix*
Tetracoccus	Cocos	-	+	Homo	*Pediococcus*
	Cocos	+	+	Homo	*Tetragenococcus*

As bactérias ácido láticas podem ser classificadas como: a) homo-fermentativas, as quais tem como subproduto o lactato e ácido acético; b) hetero-fermentativas que produzem CO_2, lactato e etanol (INES, 2007), sendo as últimas as de interesse para vinificação. As BALs hetero-fermentativas são encontradas em diversos locais, desde alimentos, bebidas fermentadas, frutos, solo e águas residuais (MAKAROVA e KOONIN, 2007), possuem uma vasta aplicação desde fermentadores de alimentos até uso como probióticos na alimentação humana (SU et al., 2015).

Durante muitos anos, utilizou-se as BALs nas fermentações lática e acética com a finalidade de conservar alimentos. Após a inserção de novas técnicas de preservação (refrigeração e cozimento), estas fermentações passaram a ser de suma importância para melhorar a qualidade organoléptica de muitos alimentos, uma vez que as mesmas, propiciam benefícios nutricionais aos alimentos devido a biodisponibilidade de minerais, sintetização de aminoácidos e vitaminas, aumento da digestibilidade da lactose e eliminação de toxinas (BUCKENHUSKES, 2001).

Klaenhammer et al. (2002) destaca seis gêneros de BALs muito utilizados na indústria alimentícia: *Lactoccocus* (leite), *Lactobacillus* (leite, carne, vegetais, frutas e cereais), *Leuconostoc* (leite e vegetais), *Pediococcus* (carne, vegetais), *Streptococcus thermophilus* (leite) e *Lactobacillus e Oenococcus* (vinho), as quais estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Exemplos de BALs usadas na fermentação de alimentos de diversas origens (Adaptado de Ines, 2007).

Tipos de produto	**BAL típica utilizada**	**Tipos de produto**	**BAL típica utilizada**
Queijos e leites fermentados	*Lactococcus lactis* *Streptococcus thermophilus* *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus casei*	Vinho	*Oenococcus oeni* *Pediococcus spp.* *Lactobacillus delbrueckii* *Lactobacillus plantarum*
Produtos cárneos	*Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus pentosus* *Pediococcus pentosaceus* *Pediococcus acidilactici*	Probióticos	*Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus casei* *Bifidobacterium bifidum*
Produtos vegetais	*Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus casei* *Pediococcus pentosaceus* *Leuconostoc mesenteroides*	Panifícios	*Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus casei* *Lactobacillus brevis* *Lactobacillus fermentum*

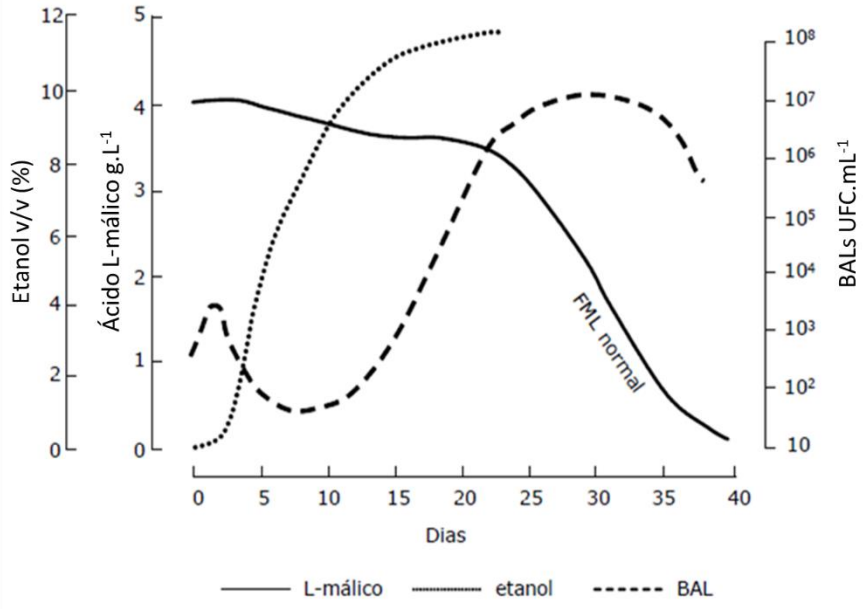
Algumas espécies também se destacam na produção de biopolímeros (*Leuconostoc spp.)*, enzimas (*Lactobacillus brevis*), etanol e ácido lático (*Lactobacillus spp.*), compostos aromáticos, substâncias antimicrobianas e produção de proteínas (SYBESMA et al., 2006).

3.4.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM VINHO

A ação de BALs em vinhos foi descrita por Luis Pasteur, há mais de 100 anos (BINATTI, 2015), porém a elaboração de vinhos de qualidade não é tão simples quanto se pensava no século 19, sendo que as descobertas da bioquímica e dos micro-organismos fermentadores de vinho feitas na década de 90 demonstraram que as interações entre eles são de grande complexidade (MORRENO-ARRIBAS e POLO, 2005).

Segundo Binatti (2015), as BALs ocorrem naturalmente nas bagas de uva, folhas e ramos da videira. A microbiota autóctone das uvas composta por leveduras, bactérias e fungos, interage desde o campo (uvas) até o final da elaboração do vinho. Neste período, ocorre uma flutuação nas populações destes micro-organismos. No caso das BAL (Figura 5) sabe-se que nas uvas em maturação encontram-se cerca de 10^1 UFC.mL^{-1}, após a prensagem no mosto observa-se cerca de 10^2 UFC.mL^{-1}, neste período as principais cepas isoladas são comumente de *Lactobacillus plantarum, Lb. casei, Lb. hilgardii, Lb. brevis, Lb. confusos, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus damnosus e Oenococcus oeni* (INES, 2007; BINATTI, 2015).

Figura 5: Evolução da população de BAL durante o processo de Vinificação.

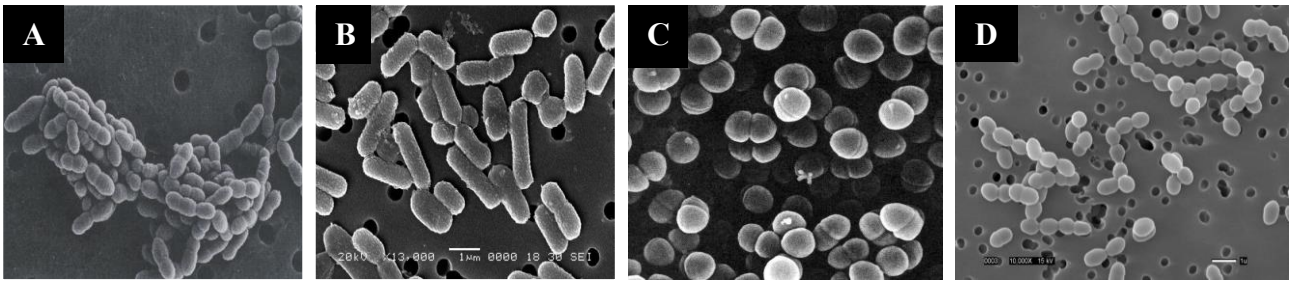


Fonte: INES (2007).

Dependendo das características do vinho estas populações de BALs permanecem em quantidades pequenas – fase de latência – até a finalização da fermentação alcoólica

(<10^2 UFC.mL^{-1}) (FUGELSANG, 1997), então as células sobreviventes multiplicam-se na fase de crescimento exponencial (10^6 a 10^8 UFC.mL^{-1}), onde geralmente os gêneros *Oenococcus* e *Lactobacillus* predominam (Figura 6), (INES, 2007), dando início a fermentação malolática.

Figura 6: Principais gêneros de BALs observados na FML espontânea: benéficos (A) *Oenococcus oeni*, (B) *Lactobacillus plantarum* e maléficos (C) *Pediococcus damnosus*, (D) *Leuconostoc mesenteroides*.



Fonte: Department Of Viticulture and Enology – UC (2014).

Para realizar uma amostragem das BALs, é necessário levar em consideração alguns fatores como: características do vinho, vinificação e interações entre a microbiota do vinho. Essas características irão influenciar a fase de latência, taxa de crescimento, tempo de duração da FML, as espécies de BAL que irão se desenvolver, seu metabolismo e sobrevivência. Os parâmetros físico-químicos que mais afetam o desenvolvimento das mesmas são: pH, dióxido de enxofre, etanol e temperatura (FUGELSANG, 1997).

Segundo Ines (2007), vinhos com pH inferior a 3,5 são povoados predominantemente por *Oenococcus oeni*, raramente aparecendo os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Figura 6), que são mais frequentes quando o pH está próximo a 4,0. Porém, estudos clássicos em vinhos demonstraram que no valor de pH 3,5 estes gêneros podem tanto realizar a FML como levar os vinhos a deterioração (WIBOWO et al., 1985; DAVIS et al., 1985b; AUAD, 2014). As enzimas precursoras da FML também são afetadas pelo pH, sendo que seu pico máximo de atividade intracelular se encontra em pH de 3,2, assim o período de FML pode diminuir conforme o pH dos vinhos aumenta, ou pode se arrastar devido a inativação enzimática (INES, 2007; BETTERIDGE et al., 2015).

Outo fator decisivo no crescimento das BAL é a quantidade de dióxido de enxofre (SO_2) adicionada às uvas e ao mosto durante a elaboração do vinho. O SO_2 é um conservante alimentar utilizado como antisséptico e antioxidante na indústria vinícola (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006), sendo que a quantidade utilizada dependerá da qualidade sanitária das uvas, não podendo

ultrapassar o valor de 300 $mg.L^{-1}$ (ANVISA, 2016). As BAL em formato de cocos são mais sensíveis ao SO_2 do que as de formato de bacilos, sendo que os gêneros *Leuconostoc* e *Oenococcus* são os menos resistentes a este composto (BINATTI, 2015).

A concentração de etanol também pode influenciar a cinética das BALs. Wibowo et al. (1985) observaram que à medida que a concentração de etanol aumentou, a capacidade de sobrevivência e crescimento das BAL diminuiu. Porém, a sensibilidade a este composto variou entre as espécies, sendo que os bacilos demonstraram ser mais tolerantes, suportando teores entre 16 e 20 % de etanol, enquanto os cocos suportaram até 14 % de teor alcoólico no vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

De acordo com Ines (2007) a temperatura ótima para crescimento de BAL em vinhos fica entre 20-23ºC, sendo que para *Oenococcus oeni* a temperatura ideal para que ocorra a descarboxilação do ácido málico é de 20ºC. Assim, valores superiores ou inferiores a esta temperatura podem arrastar a FML, fazendo com que haja a produção de ácido acético, o que resultará num produto final com qualidade organoléptica indesejável (RIBÉREAU-GAYON, et al., 2006).

3.4.2 USO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS NA INDÚSTRIA VINÍCOLA

A seleção de micro-organismos fermentadores “starter” para produção de alimentos é uma prática corriqueira, porém na área da vinificação é mais comum a utilização de culturas puras de leveduras para a fermentação alcoólica do que de bactérias ácido láticas para a fermentação malolática. No entanto, estas culturas já podiam ser encontradas na década de 1980 no mercado europeu e americano (HENICK-KLING, 1995). Comumente encontra-se BAL selecionadas em meio líquido, congeladas ou liofilizadas, sendo que as espécies mais comuns são *Oenococcus oeni, Pediococcus* sp., *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus Hilgardii* e *Lactobacillus brevis* (Ines, 2007).

Topisirovic et al. (2006) ressaltam que o uso de culturas “starter” comerciais podem conduzir a produtos demasiadamente semelhantes, apesar de serem utilizadas em matérias primas diferentes, por exemplo, em queijos. Assim, o uso de micro-organismos autóctones permitiria a melhoria da qualidade microbiológica sem a perda de características específicas dos produtos, quando comparados a utilização de culturas “starter” universais.

Segundo Binatti (2015) e Luz (2018), para a indústria vinícola Brasileira, a obtenção de BALs autóctones adaptadas às condições dos vinhos locais, tornou-se uma necessidade econômica devido ao aumento da produção e consumo de vinhos, especialmente na Serra Gaúcha.

É sabido que para os vinhos, as leveduras selecionadas regionalmente enaltecem as propriedades sensoriais quando comparadas a culturas universais, ou seja, garantem ao vinho características da região de procedência (DE BORTOLI et al., 2007).

Ao aplicar o mesmo princípio para as BAL, isolar bactérias das regiões produtoras das uvas onde elas serão inoculadas permitiria uma melhor adaptação das linhagens e consequentemente, maior qualidade, além da preservação das características regionais (IZQUIERDO, et al., 2004). Em estudo realizado por Zapparoli et al. (2004), foram realizadas microvinificações com estirpes autóctones de *Oenococcus oeni* isoladas em Valpolicella, Itália, que se apresentaram melhores que as culturas 'starter' comerciais. Corroborando com estes resultados Pramateftaki, et al. (2006) observaram em três safras consecutivas, a dominância de uma cepa nativa, com elevado grau de adaptação às condições de vinificação.

O metabolismo das BALs proporciona diversas atividades secundárias que podem atuar modificando as características sensoriais do vinho (COSTELLO et al, 2012). As alterações percebidas são em relação ao aroma e palatabilidade, as quais dependem tanto do tipo de uva e *terroir* quanto da estirpe bacteriana responsável pela fermentação malolática (LERM, et al., 2010).

Nesse sentido, a FML além de favorecer o aparecimento de aromas agradáveis, também promove a desacidificação do vinho, a partir da descarboxilação do ácido L-málico, o que causa um efeito duplo, sendo o primeiro o aumento do pH inicial (0,1 - 0,2 unidades) e consequente redução de acidez total, e o segundo, decorrente do primeiro, a suavização da sensação bucal. Devido a esta reação, a acidez e amargor promovidos pelo ácido L-málico são substituídos pelo sabor mais suave do ácido L-lático (KNOLL, 2011).

Conforme Krieger (2005) o isolamento das cepas de interesse deve ser feito a partir de vinhos que estejam sofrendo FML espontânea, no intuito de encontrar entre as bactérias autóctones presentes, dentre estas, selecionar aquelas que possuam melhor cinética de fermentação e que tolerem as condições limitantes do vinho (pH, temperatura, etanol e SO_2), além de serem capazes de produzir compostos que contribuam para a expressão de aroma e sabor desejáveis (Tabela 3).

Tabela 3: Exemplos de alterações sensoriais produzidas nos vinhos por bactérias ácido láticas, (adaptado de Bartowsky, 2009).

Composto	**Descrição sensorial**	**Gênero responsável**
2,3 butanodiona (acetil)	Amanteigado, noz, caramelo	*Oenococcus, Lactobacillus*
Acroleína	Amargo	*Lactobacillus, Pediococcus*
Manitol	Viscoso, doce	*Oenococcus*

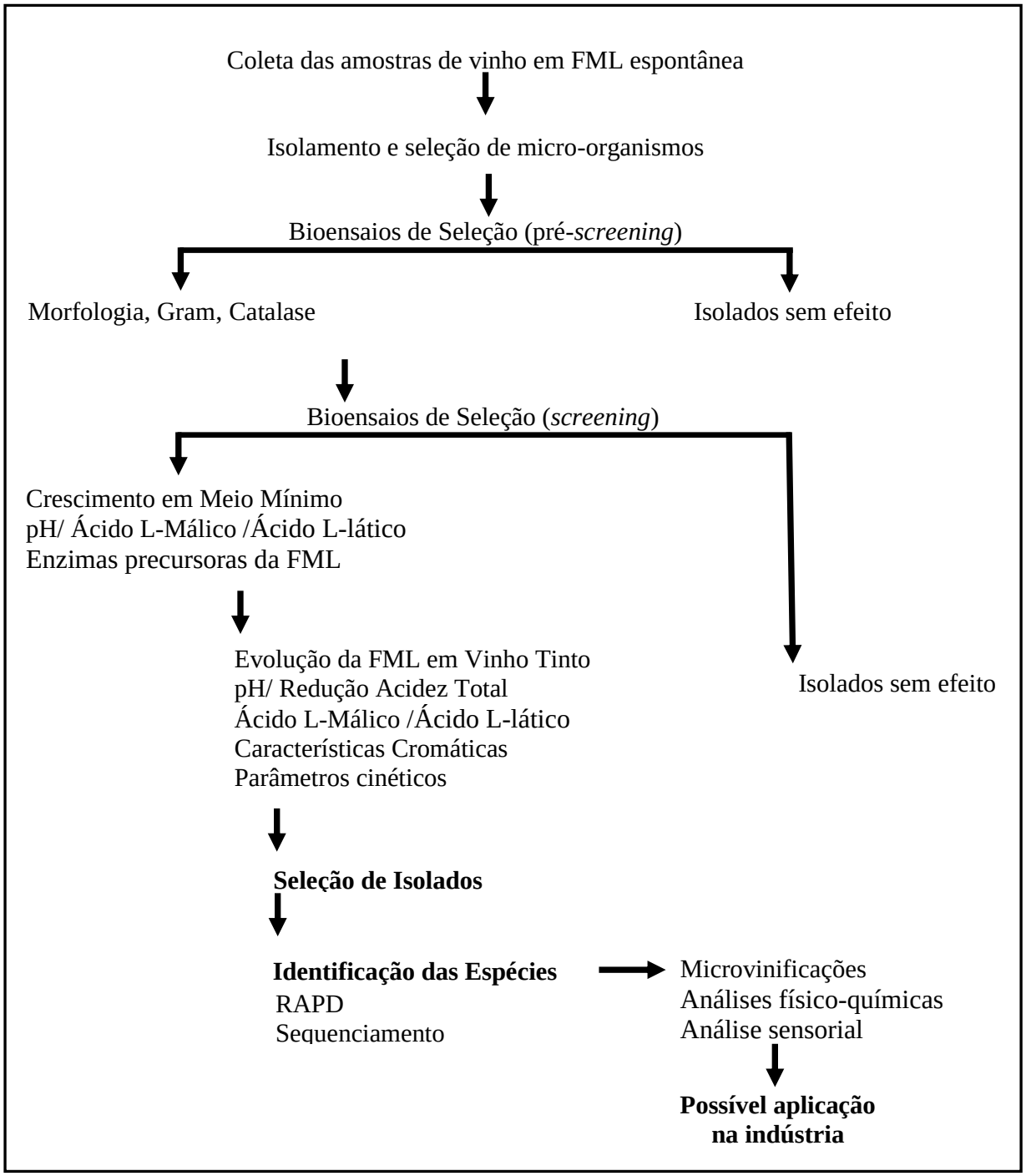
Segundo Knoll (2011) e Luz (2018), apesar de a seleção de cepas que levem a melhores resultados e que agreguem melhorias do ponto de vista sensorial aos vinhos, este processo é uma tarefa difícil, pois nem todas as fermentações espontâneas agregam características positivas aos vinhos.

Sendo assim, é necessário isolar e purificar as colônias presentes nesse vinho, avaliar o metabolismo bacteriano, diferenciar e identificar os isolados potenciais, realizar ensaios de microvinificação, análises físico-químicas e sensoriais dos vinhos elaborados (BOU e POWELL, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico estão elencados os procedimentos laboratoriais (isolamento, seleção, análises físico químicas, identificação genética), microvinificação e análise sensorial desenvolvidos durante a fase experimental deste trabalho. No Quadro 1 pode ser observado o diagrama resumido dos procedimentos utilizados na pesquisa.

Quadro 1: Etapas realizadas para a seleção de bactérias ácido láticas em vinho.



4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Para obtenção das amostras foram selecionadas vinícolas onde foi realizada exclusivamente a fermentação malolática de maneira espontânea, a fim de se evitar o isolamento de microbiota comercial utilizada em outras safras, além da inibição dos micro-organismos autóctones pelo uso de anidrido sulfuroso.

Ao longo de dois anos, foram coletadas 45 amostras de vinhos tintos (Tabela 4) provenientes dos distritos do Vale dos Vinhedos e de Tuiuty, ambos da cidade de Bento Gonçalves-RS na Serra Gaúcha, e Pinto Bandeira-RS. As variedades selecionadas foram: Merlot (ME), Cabernet Sauvignon (CS), safras de 2016 e 2017 e Pinot Noir (PN) safra 2017.

Tabela 4: Localização geográficas dos pontos de coletas das amostras de vinho.

Local de coleta	**Coordenadas**		**Amostras**	
	Sul	**Oeste**	**2016**	**2017**
Tuiuty / Bento Gonçalves - RS	29º 09’ 479”	51º 31’ 257”	C. Sauvignon Merlot	C. Sauvignon Merlot
Vale dos Vinhedos /Bento Gonçalves - RS	29º 10’ 338”	51º 33’ 338”	C. Sauvignon Merlot	C. Sauvignon Merlot
Vale dos Vinhedos /Bento Gonçalves - RS	29º 10’ 377”	51º 33’ 176”	C. Sauvignon Merlot	C. Sauvignon Merlot P. Noir
Pinto Bandeira - RS	29º 09’ 485”	51º 27’ 060”	C. Sauvignon Merlot	C. Sauvignon Merlot P. Noir

Os volumes (500 mL) foram coletados após finalização da fermentação alcoólica, em tanques onde não houve inoculação de bactérias ácido láticas comerciais, conforme orientações de Krieger (2005). Após a coleta, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal do Rio Grande do Sul, campus Bento Gonçalves para realização dos ensaios. Nos vinhos amostrados foram realizadas análises físico-químicas de pH, grau alcoólico, acidez total, dióxido de enxofre (SO_2) e acidez volátil de acordo com protocolo da International Organization of Vine and Wine (OIV, 2016) e açúcares redutores (VASCONCELOS, et al., 2013).

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE POTENCIAIS BALS

Procedeu-se o isolamento das colônias a partir das amostras de vinho conforme Ines (2007), transferindo-se 100 mL delas para erlenmeyers estéreis, que foram incubados a 21ºC durante 48 h para enriquecimento da microbiota existente. Na sequência, foi realizada semeadura de 100 uL do inóculo em superfície de ágar Man Rogosa Sharpe (MRS), para crescimento e seleção das colônias típicas de bactérias ácido láticas. Procedeu-se a identificação de acordo com as características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas.

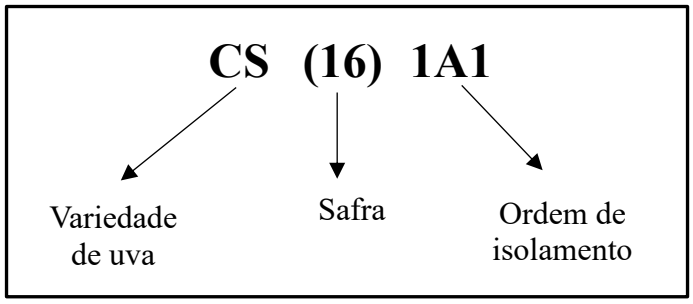
Os micro-organismos foram selecionados a partir de características estruturais desejáveis: cor branca, forma circular puntiforme, bordas e superfícies lisas, consistência cremosa e aparência brilhante, estas foram transferidas para ágar MRS visando crescimento e seleção das colônias puras.

Uma vez que as BALs pertencem ao grupo de bactérias Gram positivas, as mesmas foram testadas para coloração de Gram de acordo com o protocolo de Tortora et al. (2006), onde procedeu-se o esfregaço de uma colônia em lâmina de vidro com o auxílio de solução salina, fixação do material em chama e posterior coloração: 15 s em solução de cristal violeta, enxague com água, 60 s em solução de lugol, enxague com água, desidratação com etanol absoluto, lavagem, 30 s em solução de fucsina, lavagem e secagem. Em seguida as lâminas foram observadas em microscópio óptico no aumento de 1000x e fotografadas. Levou-se em consideração, além da coloração, o formato e arranjo das células, sendo desejável a ocorrência de cocos e bacilos.

Foi realizado, também, o Teste da Catalase, uma vez que BALs são catalase negativas (POFFO e SILVA, 2011), sendo que os isolados testados foram considerados catalase positivos (efervescente) e catalase negativos (não efervescente). Conforme descrito por Binatti (2015), os micro-organismos desenvolveram enzimas capazes de neutralizar a ação tóxica do peróxido de hidrogênio, utilizando na sua maioria as enzimas catalase (gera água e oxigênio) ou peroxidase (gera somente água). Sendo assim, espera-se que BALs não apresente efervescência quando submetidas a este ensaio. Utilizou-se uma solução de peróxido de hidrogênio 3 %, que foi gotejada em lâmina de vidro e acrescida de uma colônia do isolado e aguardou-se a formação de bolhas de ar. Utilizou-se uma cultura de *Staphylococcus aureus* como controle, pois esta bactéria é catalase positiva.

Os isolados que se apresentaram como Gram positivos, formato de cocos ou bacilos e catalase negativos, tiveram uma colônia repassada para microtubo estéril contendo 900 uL de caldo MRS, incubados a 21ºC por 48 h. Após o crescimento foram adicionados 100 uL de glicerol (crioprotetor) e os tubos com os micro-organismos foram acondicionados em ultra freezer (-80ºC) para os demais ensaios. Os mesmos foram codificados, conforme Quadro 2, de acordo com o tipo de vinho coletado, ano da safra proveniente e ordem de isolamento da colônia.

Quadro 2: Codificação utilizada para identificar os micro-organismos isolados.



4.3 TESTE DE CAPACIDADE DE CRESCIMENTO EM MEIO MÍNIMO, REDUÇÃO DE pH, DESCARBOXILAÇÃO DE ÁCIDO L-MÁLICO E PERFIL ENZIMÁTICO

4.3.1 Crescimento em meio mínimo

Para testar a capacidade dos isolados se desenvolverem em meio mínimo, reduzir a acidez e em degradar o ácido L-málico foi utilizada a metodologia de Solieri et al. (2010), que constituiu-se de cultivo durante 60 dias, em vinho sintético (4 $g.L^{-1}$ extrato levedura; 2 $g.L^{-1}$ glicerol; 6 $g.L^{-1}$ ácido L-málico; 10 % etanol absoluto (v/v), com pH inicial de 3,2), a fim de simular as características de um vinho real em final de fermentação alcoólica, sem acréscimo de anidrido sulfuroso ou dióxido de enxofre (SO_2).

As amostras foram descongeladas e procedeu-se o adensamento em caldo MRS a 21ºC durante 48 h. Após crescimento, 1000 µL de inóculo ($0{,}8_{OD}$) dos isolados e das bactérias comerciais [*Lactobacillus plantarum* (WLP 675®, White Labs) e *Oenococcus oeni*

(Lactoenos®, Laffort)] foram transferidos para tubos de ensaio contendo 9 mL vinho sintético (VS), os quais foram mantidos fechados para evitar oxigenação.

A fermentação foi realizada em triplicata e com amostras destrutivas. A mesma foi conduzida em temperatura controlada (21ºC) e a cada 5 dias o crescimento foi avaliado por leitura a 660 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo – AQ 7000), tendo como branco, vinho sintético estéril (BINATTI, 2015). A confirmação foi realizada por contagem de unidades formadoras de colônias com técnica de micro-diluição ($UFC.mL^{-1}.10^{-3}$).

4.3.2 Redução da acidez – método do potencial hidrogeniônico (pH)

A diminuição da acidez foi acompanhada pela medição do potencial hidrogeniônico (pH) (RIZZON, 2010), com auxílio de medidor de pH acoplado a eletrodo para amostras líquidas, calibrado com tampões 4,0 e 7,0 a 20ºC. Durante os 60 dias de fermentação foi realizada a medição e obteve-se o valor diretamente na escala de valor de pH. As leituras foram realizadas a cada 5 dias em triplicata.

4.3.3 Presença dos ácidos L-málico e ácido L- lático

Esta reação foi acompanhada por cromatografia em papel, um método qualitativo baseado na presença das manchas referentes aos compostos de interesse comparadas com um padrão, conforme metodologia descrita por Rizzon (2010), adaptada. Nos mesmos dias da contagem celular, realizou-se o ensaio, em papel Whatmann nº1 em folhas de 20 cm x 18 cm, utilizando uma mistura de butanol e ácido acético com azul de bromofenol como indicador (fase móvel).

Alíquotas de 30 µL do VS fermentado pelas BALs e padrões de ácido L-málico (solução de 6 %) e o ácido L-lático (solução 2,5 %), foram pipetadas em repetição de três vezes no papel (Figura 7) e após secagem foram acondicionadas em cuba vedada para corrida durante cerca de 3 h. Após a eluição, os cromatogramas foram secos em capela de exaustão por 30 min e escaneados.

Figura 7: Amostras de vinho sintético preparadas para cromatografia em papel.

Fonte: autor (2018).

4.3.4 Eletroforese de Isoenzimas

O perfil iso-enzimático é uma das formas mais utilizadas para se acessar e avaliar a diversidade genética em populações naturais, uma vez que, está baseado no estudo do polimorfismo do DNA apresentando loci que codificam proteínas específicas (ALFENAS, 1998). O genoma bacteriano expressa cerca de 2000 proteínas diferentes (INES et al., 2009). É sabido que as BALs também podem ser diferenciadas pela forma como processam o ácido L-málico produzindo o ácido L-lático de acordo com as enzimas que intermediam o processo (DICKS e VAN VUUREN, 1998; MIGUEL, 2011).

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da URI Campus Erechim. As enzimas empregadas no ensaio foram: enzima málica (EM – EC 1.1.1.40), malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37), oxalacetato descarboxilase (OADC – 4.1.1.3) e lactato desidrogenase (L-LDH – 1.1.1.27) de acordo com a método de Alfenas (1998).

Após cultivo das células (10 mL), as mesmas foram centrifugadas a 12000 rpm em microtubos a temperatura 24ºC para a formação do *pellet*, o sobrenadante foi descartado e em seguida adicionou-se o tampão NaPBS (Di-hidrogeno fosfato de sódio dodecahidratado + Di-hidrogeno fosfato de sódio dihidratado + Cloreto de sódio e água bi-destilada pH 7,3) para lavagem das mesmas. Repetiu-se este processo duas vezes. Após a purificação acrescentou-se tampão de tratamento de amostra (Tris + 2-mercaptoetanol + Glicerol + Ácido clorídrico e água

bi-destilada, pH 6,8). As amostras foram homogeneizadas em vortex e receberam 0,14 mL de solução de dodecil sulfato de sódio 20 %, na sequência foram aquecidas a 45ºC durante 10 min, resfriadas em gelo e centrifugadas a 12000 rpm por 10 min. Coletou-se o sobrenadante em dois tubos que foram armazenados a -20ºC, para posterior análise.

Empregou-se o método de eletroforese vertical, com cuba dupla, sendo que o sistema foi mantido à temperatura de 4ºC durante a corrida, para evitar a inativação das enzimas. Foram aplicados 20 uL de amostra + 10 uL de Tampão (Glicerina + azul de bromofenol). As enzimas foram separadas em gel de poliacrilamida a 12 % (acrilamida 29 g e bis-acrilamida 1 g), associado a Tris-HCl 1,5 mol.L^{-1} como solução-tampão, com pH 8,8 para o gel de corrida e pH 6,8 para o gel empilhador, o tampão utilizado no tanque e nos eletrodos foi Tris-Glicina, pH 8,9, diluído 10 vezes. A corrente elétrica para a corrida eletroforética foi de 150 V e 20 mA até a marca do corante alcançar o gel separador; a partir desse ponto, foi de 220 V e 40 mA até a marca do corante aproximar-se do final do gel. Utilizou-se o gel de altura de 7,0 cm para o gel separador e de 1,0 cm de altura para o empilhador. O preparo das soluções e os procedimentos de coloração/revelação utilizados seguiram a metodologia de Alfenas (1998). Os géis foram fotografados para análise, e a interpretação dos resultados baseou-se na presença, nitidez, número e localização das bandas.

4.4 FERMENTAÇÃO EM VINHO TINTO

Os isolados que realizaram a fermentação malolática em até 45 dias e foram capazes de aumentar o pH, produzir ácido L-lático e apresentaram o loci para as enzimas EM, MDH, OADC e L-LDH foram testados em vinho tinto Cabernet Sauvignon, previamente elaborado pela Vinícola Escola do IFRS campus Bento Gonçalves, cedido para o experimento.

Conforme recomendado por Solieri et al. (2010) e Fensterseifer (2017), o preparo das amostras foi realizado em triplicata, em garrafas de 500 mL transparentes (Figura 8), previamente esterilizadas, vedadas com rolhas esterilizadas acopladas de válvulas do tipo airlok preenchidas com etanol 70 % para evitar a oxigenação.

Foram preparados 50 mL de inóculo a partir das células congeladas em caldo MRS, ambientadas no próprio vinho até obter-se densidade óptica de 0,8. Este volume foi adicionado ao sistema previamente esterilizado juntamente com 450 mL do vinho tinto filtrado por membrana (0,80 micra). A FML foi conduzida por 45 dias em ambiente a 21ºC. A cada 5 dias

com o auxílio micro-pipetador estéril retirou-se alíquota de 2 mL para realização das análises. Utilizou-se como branco uma amostra de vinho sem inoculação (controle).

Figura 8: Modelo para fermentação malolática em escala laboratorial.

Fonte: Fensterseifer (2017).

4.4.1 Aumento de pH e redução da acidez total titulável

O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado conforme item 4.3.2.

A acidez total titulável (ATT) foi determinada de acordo com Rizzon (2010) por método titulométrico, que consistiu na reação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH - 0,1 mol.L^{-1}) até o ponto de viragem, para a solução indicadora (azul de bromotimol a 1 %), conforme a Equação 1.

$$ATT = \frac{n \times N \times 1000 \times 0{,}075}{V} \quad (1)$$

Onde:
ATT = Acidez total titulável em $g.L^{-1}$ de ácido tartárico.
n = Hidróxido de sódio gasto na titulação em mL.
N =Normalidade da solução de hidróxido de sódio.
V = Volume da amostra em mL.

4.4.2 Quantificação de ácido L-málico e ácido L-lático

Após a centrifugação das amostras (3000 RPM, 15 minutos, 24ºC), recuperou-se o sobrenadante e a quantificação dos ácidos foi realizada por meio de kit enzimático (Gibertini®), com o equipamento Wineflow (Gibertini®), conforme orientação do fabricante.

O teor de ácido L-málico foi calculado a partir da oxidação do oxaloacetato por nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) na presença da enzima malato desidrogenase (MDH). O oxalacetato é imediatamente clivado pela mesma enzima para piruvato e dióxido de carbono. A quantidade de NADH formado é relativa a quantidade de D-malato presente na amostra. O aumento do NADH é medido por meio de absorbância a 365 nm.

Enquanto, que para a quantificação do ácido L-lático foi medida a intensidade colorimétrica da reação enzimática onde o ácido L-lático é oxidado pela NAD a piruvato, utilizando a enzima lactato desidrogenase (L-LDH) como catalizador, formando um composto colorido, cuja absorção a 340 nm e 37ºC é proporcional à concentração de ácido L-lático presente na amostra expresso em $g.L^{-1}$.

4.4.3 Quantificação de antocianinas

A detecção das antocianinas totais em vinho foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Lee, et al., (2005) e Rizzon (2010), que se fundamenta na diferença da coloração das mesmas em relação ao pH, visto que a variação da intensidade corante em dois valores de pH é proporcional ao teor de antocianinas. Os resultados foram expressos como mg de antocianinas monoméricas em equivalentes de cianidina-3-glucosídeo por litro de vinho.

A quantificação foi realizada por espectrofotômetro (UV-VIS - Thermo – AQ 7000), utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de percurso ótico. Em tubo de ensaio colocou-se 1 mL

de vinho, 1mL de etanol com 0,1 % de ácido clorídrico e 10 mL de ácido clorídrico 2 %. Em um segundo tubo adicionou-se 1 mL da mesma amostra, 1 mL de etanol com 0,1 % de ácido clorídrico e 10 mL de solução tampão de pH 3,5 (fosfato dissódico 0,2 mol L^{-1} e ácido cítrico 0,1 mol L^{-1}). Após isto, calibrou-se o aparelho com água destilada e realizou-se a leitura em 520 nm. A concentração de antocianinas livres, expressa em $mg.L^{-1}$, foi obtida relacionando-se a diferença de densidade ótica (Equação 2).

Antocianinas totais ($mg.L^{-1}$) = 388 x Δd **(2)**

Onde:
Δd = diferença de leitura entre os dois tubos.

4.4.4 Características cromáticas

Para correlacionar a evolução da cor de acordo com a ocorrência da FML foram mensuradas as características cromáticas de acordo com a metodologia de Rizzon (2010). Cinco mililitros de amostra foram centrifugados à 3000 rpm durante 15 min. Em seguida coletou-se o sobrenadante e a leitura de absorbância foi realizada em cubeta de quartzo de 1 mm de percurso ótico em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo – AQ 7000).

Foram determinados os valores para as densidades ópticas referentes as cores: amarela (420 nm), vermelha (520 nm) e violeta (620 nm). Com base nos valores encontrados, foi possível determinar os índices de intensidade de cor (IC) e tonalidade (T) de acordo com as Equações 3 e 4. A contribuição de cada componente (amarelo, vermelho e violeta) para a cor global do vinho (percentual) foi determinada pelo quociente de cada um deles e a intensidade de cor, conforme Equações 5, 6 e 7.

$IC = A_{420}+A_{520}+A_{620}$ **(3)**

$T = A_{420} / A_{520}$ **(4)**

$\%\ amarelo = (A_{420} / IC) \times 100$ **(5)**

$\%\ vermelho = (A_{520} / IC) \times 100$ **(6)**

$\%\ violeta = (A_{620} / IC) \times 100$ **(7)**

Onde:
A_{420} = Absorbância Amarelo.
A_{520} = Absorbância Vermelho. IC = Índice de Cor.
A_{620} = Absorbância Violeta. T = Tonalidade.

4.4.5 Estudo de parâmetros cinéticos e estequiométricos da FML

A partir das medidas obtidas dos 13 isolados submetidos a FML em vinho tinto Cabernet Sauvignon, também foi realizada a determinação dos parâmetros cinéticos. A cada cinco dias com o auxílio micro-pipetador estéril retirou-se alíquota de 2 mL para realização das análises. Utilizou-se como branco uma amostra de vinho sem inoculação.

A quantificação de células (biomassa) foi realizada através de leitura em espectrofotômetro na absorbância de 660 nm, conforme Binatti (2015).

Os valores globais de substrato e produto, em relação ao tempo, foram determinados através dos parâmetros: consumo de substrato (r_s) e síntese de produto (r_p), utilizando as Equações 8 a 9 (BAILEY e OLLIS, 1986). O fator de conversão de rendimento de produto ($Y_{p/s}$) foi calculado através da Equação 10, a partir dos valores iniciais de ácido L-málico presente no vinho, conforme Bailey e Ollis (1986).

$$\mathbf{r_s = - S_f – S_0/t_f - t_0} \quad \textbf{(8)}$$

$$\mathbf{r_p = P_f – P_0/t_f - t_0} \quad \textbf{(9)}$$

$$\mathbf{(Y_{p/s}) = P_f – P_0/S_0 - S_f} \quad \textbf{(10)}$$

Onde:
P_0 e Pf = concentração inicial e final de ác. L-lático ($g.L^{-1}$).
S_0 e Sf = concentração inicial e final de ác. L-málico ($g.L^{-1}$).
t_0 e tf = tempo inicial e final (horas).

O rendimento (R) da fermentação malolática, expresso em % (Equação 11), calculado a partir da razão da concentração de ácido L-lático teórica e experimental, multiplicado por 100, forneceu os valores quantitativos e a eficácia com que as BALs converteram o ácido L-málico em ácido L-lático (LOPES e SILVA, 2006; FONTAN et al., 2011).

$$\mathbf{R= P_{exp}/P_{teo} \times 100} \quad \textbf{(11)}$$

Onde:
R = Rendimento
P_{exp} = concentração $g.L^{-1}$ ácido L-lático experimental
P_{teo} = concentração $g.L^{-1}$ ácido L-lático teórica
t = tempo em horas

4.5 PERFIL GENOTÍPICO - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BALs SELECIONADAS

Os isolados testados em vinho tinto que apresentaram em até 45 dias aumento de pH, redução da acidez total, consumo de ácido L-málico e produção de ácido L-lático, preservação do teor de antocianinas, preservação de pigmento vermelho e rendimento da FML superior a 90 % foram encaminhados para o Laboratório de Biotecnologia da URI, Campus de Erechim para ensaio de RAPD e ao laboratório de Fitopatologia II da EMBRAPA uva e vinho para identificação genética em nível de espécie.

4.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir dos isolados após cultivo em 2mL de caldo MRS durante 48h, utilizando-se a técnica da lise térmica (AUSUBEL et al., 1992). Transferiu-se 1 mL de cultivo para microtubo, submetido a centrifugação por 15 min, a 14.000 rpm, a 4ºC. Descartou-se o sobrenadante e ao *pellet* formado foi adicionado de 200 µL de tampão de lise (2 % CTAB; 1,4 mol L^{-1} cloreto de sódio; 20 mmol L^{-1} EDTA; 100 mmol L^{-1} TRIS em pH 8.0) para homogeneização, em seguida transferiu-se o volume para graal e adicionou-se mais 400 µL de tampão, e realizou-se maceração. O macerado foi colocado novamente no tubo e adicionado de 1,2 µL de 2-mercaptoetanol, a fim de se evitar a oxidação do DNA (MAMLOUK et al., 2011), homogeneizou-se o tubo que foi transferido para congelador. Após completo congelamento, o microtubo foi colocado em banho maria a 65ºC durante 5 min. Repetiu-se este procedimento mais uma vez e após o tubo foi deixado em banho-maria a 65ºC durante 60 min.

Para separação das proteínas foi utilizado protocolo clorofórmio e álcool iso-amílico (CIA), pois segundo Binatti (2015), está técnica fornece maior quantidade de DNA e em melhor qualidade. Adicionou-se 600 µL de CIA (24:1) no tubo, procedeu-se agitação por inversão durante 5 minutos e centrifugação por 15 min, a 14.000 rpm, a 4ºC, após isto observou-se a formação de duas fases, das quais recuperou-se a superior para novo tubo o qual foi adicionado de 500 µL de isopropanol gelado, para precipitação do DNA. Foram realizados a homogeneização e congelamento a -20ºC por 24 h. Após, o tubo foi retirado do congelador e centrifugado (centrífuga EPPENDORF®, modelo 5810R) por 5 min, a 14.000 rpm. O *pellet* formado foi lavado com 500 µL de etanol 70 % (v/v), resfriado em freezer e novamente centrifugado nas mesmas condições. Depois do descarte do sobrenadante os tubos foram secos

naturalmente e o *pellet* ressuspendido em 50 µL de água ultrapura e armazenado a -20ºC, até o momento das análises.

4.5.2 RAPD

Para avaliar o agrupamento das cepas autóctones e as bactérias comerciais de acordo com a similaridade genética, recorreu-se inicialmente a técnica de PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), por ser uma técnica relativamente barata, frente à quantidade de informações genéticas obtidas em curto prazo e que segundo Ferreira e Grattapaglia (1995), pode ser aplicada a qualquer espécie de planta, bactéria ou fungo, sem necessidade do conhecimento prévio do seu genoma

O ensaio foi conduzido utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1987) adaptado por Rottava (2010), para a amplificação foram utilizados: tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 9,0) 50 µM primer, 3 mM $MgCl_2$, 40 µmM KCl, 0,5 % Triton X-100), dNTPs (200 mM cada), 0,2 ng de DNA e 1,5 U Taq DNA polimerase com volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (INFINIGEN®, modelo TC96CG), seguindo o procedimento: 3 min a 92ºC (separação inicial da fita), 40 ciclos de um minuto a 92ºC (desnaturação), um minuto a 36ºC (anelamento) e 2 min em 72ºC (ligação do primer). Depois, 3 min a 72ºC e resfriamento a 4ºC até a retirada de amostras.

Os primers (Operon Technologies®, USA), foram selecionados a partir de publicações prévias, conforme Zavaleta, et al. (1997), Tabela 5.

Tabela 5: Sequência de iniciadores (primers) utilizados na análise por RAPD.

Primer	Sequência (5'-3')	Primer	Sequência (5'-3')
OPA 09	GGGTAACGCC	OPA 16	AGCCAGCGAA
OPA 11	CAATCGCCGT	OPA 20	GTTGCGATCC
OPA 12	TCGGCGATAG	OPX 02	TTCCGCCACC
OPB 01	GTTTCGCTCC	OPX 08	CAGGGGTGGA

Após a amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,4 % (0,5 mg x mL^{-1} brometo de etídio), em tampão Trisma, ácido bórico e EDTA, em sistema horizontal (Loccus®, modelo LPS 300), com tensão constante (100 volts) durante 240 min. As amostras de DNA submetidas ao RAPD, receberam 10 µL de TA (Sacarose + azul de bromofenol). O marcador do tamanho do DNA foi o DNA Lambda clivado. Visualizou-se os fragmentos em

trans-iluminador UV (KASVI, modelo K33-312A) e os géis foram fotografados (Canon, EOS Rebel T6i)) para posterior análise.

4.5.3 Identificação das espécies

A técnica escolhida para diferenciar os isolados bacterianos foi a análise de restrição de DNA 16S ribossômico amplificado (r16S-ARDRA), seguindo os procedimentos adotados por Rodas et al. (2003), Bravo-Ferrada (2013) e Luz (2018).

O DNA obtido, foi adicionado à solução tampão contendo nucleotídeos e Taq DNA polimerase, juntamente com os primers 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' forward e 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT3' reverse. Para isso, os produtos de amplificação do gene rDNA 16S foram submetidos à digestão com enzimas de restrição exonuclease I e shrimp alcaline (USB). Foram adicionados em microtubo de 0,2 mL: 10 μL do DNA amplificado; 2 μL do tampão específico de cada enzima; 1 μL da enzima (Taq DNA polimerase) e completou-se com 17 μL de água ultrapura. Os tubos foram deixados overnight a 37°C. A reação de sequenciamento foi feita seguindo as instruções do fabricante com o kit BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific®), adicionando 0,25 μM de primer e aproximadamente 100ng de produto de PCR purificado. As amostras foram amplificadas em termociclador (Biorad T100®) e após foram purificadas com o BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific®). Os dados foram coletados pelo programa Data Collection (Thermo Fisher Scientific®). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com sequências previamente depositadas no GenBank, utilizando o programa "Basic Alignment Search Tool" (BLAST).

4.6 MICROVINIFICAÇÃO

Para este ensaio foram selecionados vinhos tintos 100% Cabernet Sauvignon e 100% Merlot, por serem os mais consumidos no país (IBRAVIN, 2017). Os vinhos foram elaborados pela Vinícola-Escola do IFRS campus Bento Gonçalves e cerca de 20 L de cada variedade foram cedidos para o experimento. Realizaram-se análises físico-químicas pré (vinho antes do início da FML - testemunha) e pós fermentação malolática. Antes da inoculação os vinhos foram filtrados em membrana de celulose (0,40 micra), a fim de se evitar a ocorrência de FML

espontânea. Os tratamentos consistiram em dois blocos, conforme Quadro 3, onde: a) 04 amostras inoculadas com cepas autóctones; b) 02 amostras com a bactéria comercial *O. oeni* (padrão) e c) 02 amostras sem inoculação (controle).

Quadro 3: Tratamentos realizados em vinho tinto para análise sensorial.

Bloco 1 **Vinho C. Sauvignon**	**Bloco 2** **Vinho Merlot**
Isolado CS safra 2016	Isolado ME safra 2016
Isolado CS safra 2017	Isolado ME safra 2017
O. oeni - padrão	*O. oeni* - padrão
Controle CS	Controle ME
Testemunha CS	Testemunha ME

A fermentação malolática (FML) foi conduzida conforme Solieri et al. (2010), por um período de 45 dias na Vinícola-Escola do IFRS. Utilizaram-se garrafões de vidro de 2 L (esterilizados em autoclave), vedados com rolhas, acopladas de válvula do tipo airlok preenchidas com álcool 70 % (Figura 9).

Figura 9: Sistema utilizado para fermentação malolática em vinho tinto.

Fonte: **autor (2018).**

Os tratamentos foram mantidos a 21ºC e a cada cinco dias com o auxílio da pipeta estéril coletou-se cerca de 2 mL de fermentado para realização das análises de acompanhamento, no intuito de comparar os valores obtidos para os tratamentos (isolados) e bactéria comercial

(padrão), o controle e a testemunha. Após a finalização da FML realizou-se a estabilização tartárica em câmara fria (10ºC) durante 10 dias, em seguida procedeu-se a desborra, trasfega e engarrafamento. Os vinhos foram armazenados em posição horizontal, em 24ºC, ao abrigo da luz e calor, durante 6 meses até o momento da análise sensorial.

4.6.1 Análises físico-químicas

No intuito de comparar a evolução do vinho ao longo da fermentação malolática (Isolados, *O. oeni* e controle) com as amostras de vinho controle, os vinhos fermentados foram avaliados quanto ao teor alcoólico, pH, acidez total e volátil, ácido L-málico e ácido L-lático, características cromáticas, polifenóis totais e açúcares redutores.

4.6.1.1 Teor alcoólico

O teor alcoólico foi determinado pelo método densimétrico, que é baseado na separação do álcool pela destilação da amostra e sua posterior quantificação, de acordo com a densidade relativa do destilado a 20ºC (RIZZON, 2010).

4.6.1.2 pH, acidez total e acidez volátil

O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado conforme descrito no item 4.3.2. A acidez total titulável (ATT) foi obtida de acordo com o item 4.4.1.

A determinação da acidez volátil (AV) foi realizada pelo método de titulação do destilado, obtido por arraste de vapor. Procedeu-se titulação com hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol L^{-1}) tendo como indicador solução de fenolftaleína alcóolica 1 % (RIZZON, 2010), aplicando-se a Equação 12.

AV = (60/a) x v x N **(12)**

Onde:

AV = Acidez volátil em $g.L^{-1}$ de ácido acético.

a = alíquota da amostra em mL.

v = Volume do titulante gasto em mL.

N =Normalidade da solução de hidróxido de sódio.

4.6.1.3 Ácidos L-málico e L-lático

As concentrações dos ácidos L-málico e L-lático foram determinadas conforme descrito no item 4.4.2.

4.6.1.4 Açúcares redutores

A quantificação de açúcares foi baseada na metodologia de Vasconcellos et al. (2013) com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) que quando puro apresenta coloração alaranjado, este ácido é facilmente reduzido por açúcares, tornando-se ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e passa a apresentar uma coloração acastanhada. Nesta, a amostra foi acrescida de DNS (1:1) e submetida a hidrólise em banho-maria a 98ºC durante 15 min. Resfriou-se os tubos e completou-se o volume para 10 mL com água destilada. Em seguida foi realizada a leitura da intensidade da cor em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando-se como branco DNS e água destilada. A curva padrão foi composta por diluições de glicose (0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,8 e 2 %). Os valores obtidos de densidade ótica foram submetidos a Equação 13. A curva de regressão linear para determinar os açúcares redutores foi construída a partir do fator de conversão (Equação 14).

$$\mathbf{GRT = abs \times f \times d} \qquad \mathbf{(13)}$$

Onde:
GRT = açúcares redutores em $g.L^{-1}$ de glicose
Abs = média das absorbâncias lidas.
f = fator de concentração.
d = inverso da diluição da amostra.

$$\mathbf{Fator = \frac{1}{Coef.\ angular}} \qquad \mathbf{(14)}$$

Onde:
Coef. Angular = termo a da equação de regressão linear (y=a.x-b)

4.6.1.5 Características cromáticas, antocianinas e polifenóis totais

Estes parâmetros foram obtidos conforme descrito nos itens 4.4.3 e 4.4.4.

Segundo Ribéreau-Gayon et al., (2006), o índice de polifenóis totais (IPT) é baseado no princípio de que os núcleos benzênicos, característicos dos compostos fenólicos, tem absorbância entre 280 nm e 282 nm. O IPT foi determinado pela absorbância da amostra diluída (1:100) em espectrofotômetro a 280 nm, sendo o resultado multiplicado pelo fator de diluição (RIZZON, 2010).

4.6.2 Análise sensorial dos vinhos elaborados

Para a elaboração de vinhos de qualidade é necessário que a fermentação malolática produza aromas e sabores agradáveis, o que segundo Vigentini, et al., (2009), é um quesito de extrema importância quando da seleção das bactérias precursoras da FML. Portanto, a etapa de análise sensorial tende a ser decisiva na escolha de qual das linhagens isoladas tem maior aptidão para tornar-se um inóculo com potencial de uso industrial (IZQUIERDO et al., 2004).

O teste escolhido foi o de análise descritiva quantitativa (ADQ) por ser um método utilizado para determinar o perfil sensorial de produtos alimentícios, que oferece informações detalhadas das características, permitindo assim uma descrição organoléptica do produto e ressaltar quais dos seus atributos são mais relevantes (cor, aparência, textura e sabor), bem como sua detecção pelos órgãos do sentido. A avaliação é feita por meio de escalas não estruturadas, ancoradas com pontos extremos, referindo-se à intensidade de determinado atributo avaliado. A confiabilidade e a validade das medidas são dependentes das características da escala, dos julgadores (treinados ou não) e das amostras de referência utilizadas (MEILGAARD et al., 2006).

A realização da avaliação sensorial foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do IFRS (Apêndice I), CAAE nº 95133618.7.0000.8024. Cada participante da seleção recebeu o termo de consentimento livre e esclarecido, no qual constavam as informações da avaliação, do projeto e dados para contato com o pesquisador (Apêndice II).

O painel sensorial foi composto por 18 participantes selecionados, com faixa etária média de 30 anos, de ambos os sexos, dentre eles professores do curso Superior de Tecnologia de Viticultura e Enologia do IFRS, Campus Bento Gonçalves e Enólogos responsáveis pela Vinícola-Escola da mesma Instituição. Previamente a avaliação foi realizado treinamento para os atributos (cor, aroma e sabor). Para a formação deste último, diversos produtos comerciais e

naturais foram utilizados como referências para os descritores frequentemente associados à vinho tinto (MIELE, 2006), conforme Tabela 6.

Tabela 6: Termos descritores, definições e referências utilizadas na etapa de treinamento dos provadores para vinho tinto.

Termo descritor	Definição	Referência mínima	Referência máxima
Cor			
Intensidade	Tonalidade atribuída a vinho tinto jovem.	Vinho tinto seco com 3 anos de engarrafamento.	Vinho tinto seco jovem com 6 meses de engarrafamento.
Aroma			
Frutado	Aroma lembra mistura de frutas vermelhas frescas.	Nenhum: água.	Mistura de frutas vermelhas.
Lático	Aroma característico de manteiga.	Nenhum: água.	Manteiga de leite.
Sabor			
Acidez	Gosto ácido característico de solução de ácido cítrico. Associado à presença de ácidos no vinho.	Solução de ácido cítrico grau alimentício 0,02%.	Solução de ácido cítrico grau alimentício 0,9%.
Persistência do gosto	Tempo da permanência do gosto em boca.	Nenhum: água.	Vinho tinto C. Sauvignon.

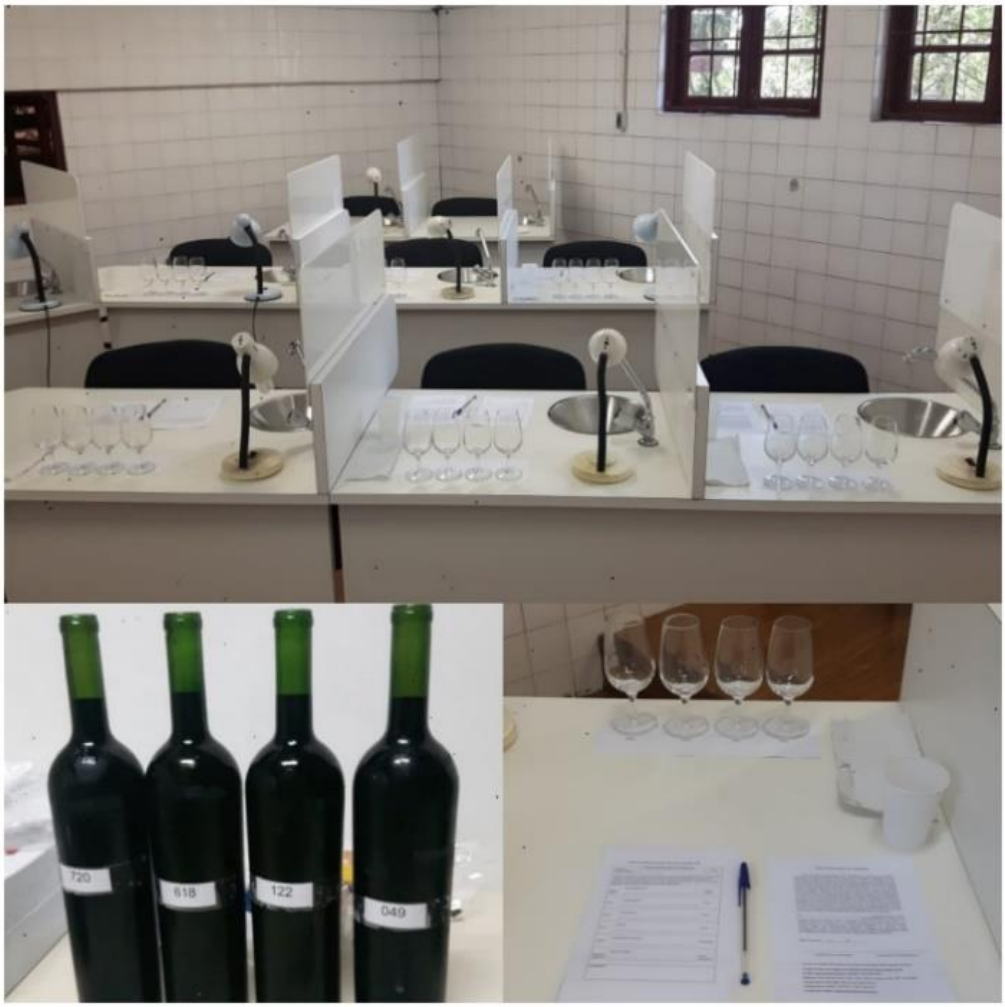
Com base no poder de discriminação e repetibilidade das amostras e concordância entre os provadores (consenso na equipe), o painel sensorial final foi composto de 13 julgadores. Foram computados para cada provador em cada atributo os níveis de significância (p) dos valores de F (amostras) e F (repetições). Os provadores que apresentaram poder discriminativo (p Famostras< 0,50); reprodutibilidade nos julgamentos (p Frepetições > 0,05); e consenso com os demais membros do grupo, foram selecionados para compor a equipe definitiva treinada, segundo metodologia proposta por DAMASIO e COSTELL (1991).

A análise foi realizada na Vinícola-Escola do IFRS, em sala própria, isenta de odores, com iluminação uniforme, temperatura controlada e provida de cabines individuais de degustação, com iluminação de led branca e pia para descarte dos resíduas (Figura 10).
Antes do início da avaliação os participantes receberam instruções de como proceder o teste, conforme orientação de Miele (2006): provar uma amostra de cada vez e na ordem em que foram ofertadas, e em seguida realizar as anotações na ficha (apêndice III) em relação aos atributos: i) visual - intensidade da cor; ii) aromas - frutado e lático; iii) sensorial e *flavors* - acidez, persistência do gosto e aspecto global, e que de acordo com sua percepção, assinalasse

para cada atributo para cada um fosse um traço vertical na escala não estruturada (0 a 9 cm, ancorados nas extremidades da linha).

As bancadas foram preparadas com 4 taças codificadas, papel toalha, água mineral e as fichas para anotação, conforme Figura 10.

Figura 10: Cabines de avaliação sensorial da Vinícola-Escola no IFRS campus Bento Gonçalves.



Fonte: autor (2019).

Foram avaliadas 8 amostras de vinho, em dois blocos, as quais foram servidas a 16ºC, em taças específicas para vinho tinto (ISO), na quantidade de 50 mL cada. Entre cada amostra de vinho os avaliadores foram instruídos a limpar o paladar com água mineral. A ordem de apresentação e distribuição das amostras foi balanceada, com codificação de três dígitos aleatória e ordem casualizada para cada provador.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises microbiológicas, físico-químicas e cinéticas foram realizadas em triplicata com amostras destrutivas, exceto para cromatografia. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente mediante Análise de Variância – ANOVA, seguido do teste de Tukey, com nível de 95 % de confiança.

Para o perfil genotípico, no ensaio de RAPD, a partir das bandas construiu-se uma matriz binária (1 = presença; 0 = ausência), a mesma foi submetida à análise de similaridade, utilizando-se o Coeficiente de Jaccard. Na sequência aplicou-se o método da distância da Média (UPGMA), utilizando a média das distâncias entre todos os pares de genótipos para formação de cada grupo, o que possibilitou a apresentação das distâncias no dendrograma com a visualização de agrupamentos de genótipos mais similares. Na identificação das espécies por 16s rDNA, os indivíduos foram agrupados de acordo com seus perfis genéticos utilizando o método de neighbour-joining com correção Poisson (TAMURA et al., 2007). As análises de associação foram realizadas por 500 bootstrap.

Para avaliar os atributos da Análise Sensorial com ($p<0,05$) foi realizada a Análise de Variância – ANOVA, seguido do teste de Tukey, Correlação de Perason (r) e Análise de Componentes Principais (PCA) em matriz de correlação. Para a tabulação, análise dos dados e construção dos gráficos foram utilizados os softwares Excel (versão 365) e Past 2.17 (HAMMER e HARPER, 2006).

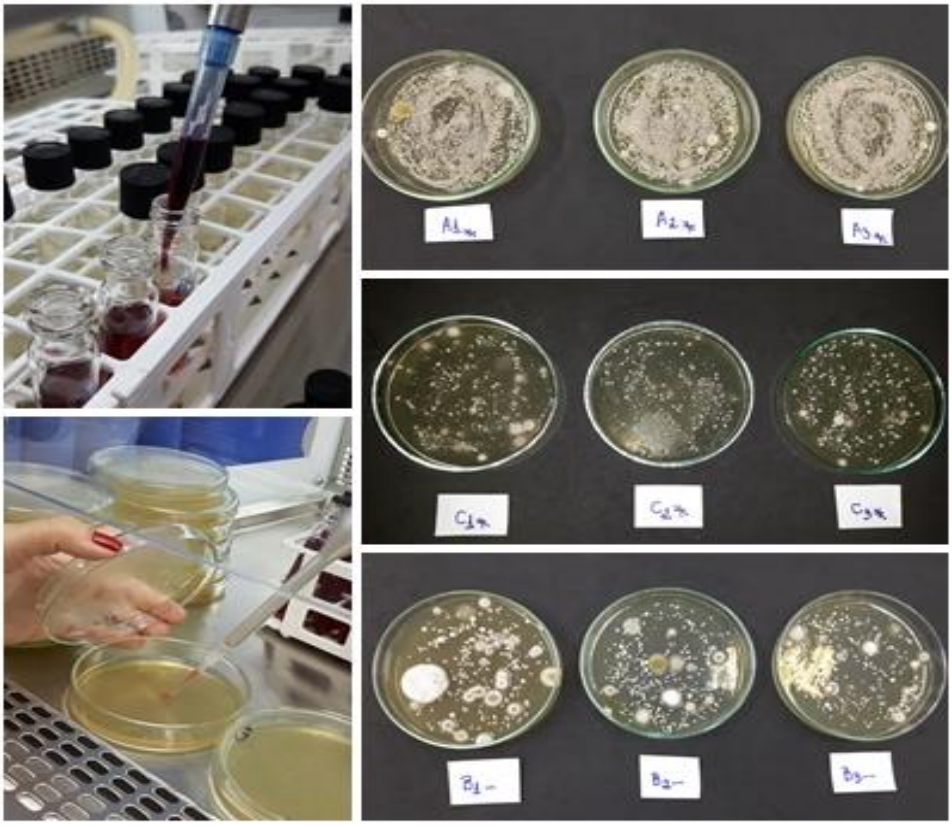
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE POTENCIAIS BALS

Foram coletadas um total de 45 amostras de vinho tinto em vinícolas parceiras, na região da Serra Gaúcha (Vale dos Vinhedos, Tuiuty e Pinto Bandeira) sendo 17 amostras provenientes da safra de 2016 e 28 amostras na safra de 2017. As análises físico-químicas realizadas nestas amostras iniciais demonstraram que os vinhos haviam finalizado a fermentação alcoólica, ou seja, conforme Rizzon (2010) havia cessado o desprendimento de gás carbônico e a análise de açúcares redutores foi inferior a 3 $g.L^{-1}$.

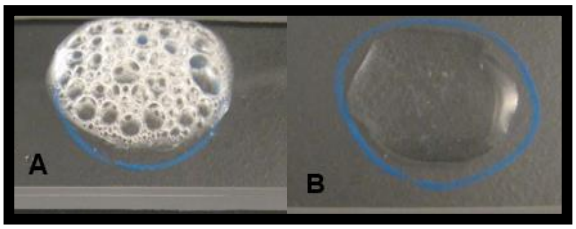
Destas amostras, foi realizado o isolamento de 245 colônias, incluindo bactérias, bolores e leveduras, sendo que 68 delas apresentaram características morfológicas compatíveis para bactérias ácido láticas: cor branca, forma circular puntiforme, bordas e superfícies lisas, consistência cremosa e aparência brilhante (Figura 11). Das colônias com morfologia característica, 49 apresentaram-se como catalase negativas (Figura 12).

Figura 11: Processo de isolamento e placas com colônias não purificadas obtidas de vinhos da Serra Gaúcha.



Fonte: autor (2016).

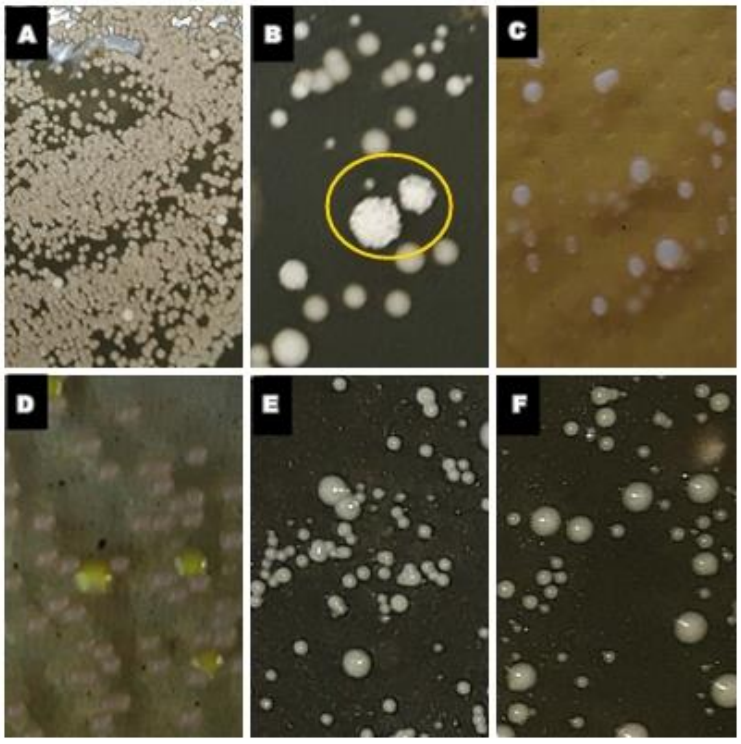
Figura 12: Exemplo de Teste da Catalase: (A) *S. aureus* - Catalase positivo, (B) Isolado 65 - Catalase negativo.



Fonte: autor (2016).

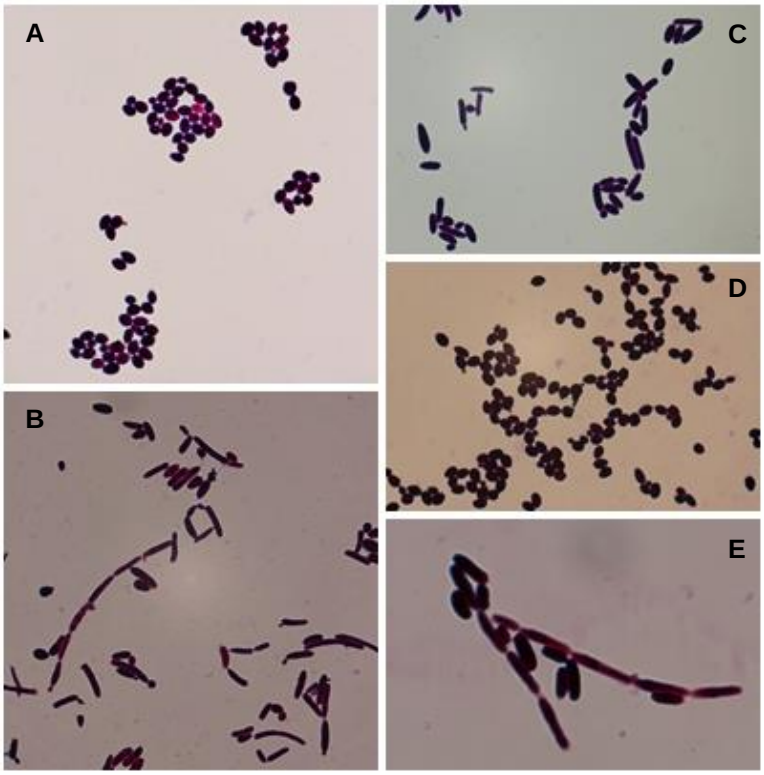
Juntamente com bactérias características como láticas (Figura 13), foram encontrados nas amostras bolores, leveduras e bactérias não características (coloração amarelada e rosada). Como exemplos, a amostra de C. Sauvignon 2016 proveniente de Tuiuty apresentou também um grupo de leveduras (Figura 13B). Já na amostra de Merlot 2017 (Vale dos Vinhedos), foi possível identificar dois grupos de colônias com características distintas, sendo um de coloração branca e outra de cor levemente amarelada (Figura 13D). Os 49 isolados foram classificados como Gram positivos apresentando-se no arranjo de cocos, cocos em cadeia ou bacilos e bacilos em cadeia, conforme Figura 14 e apêndice IV.

Figura 13: Características morfológicas das colônias encontradas nas amostras: (A) - C. Sauvignon 2017 (Vale dos Vinhedos); (B)- C. Sauvignon 2016 (Distrito de Tuiuty); (C) - Merlot 2016 (Vale dos Vinhedos); (D) – Merlot 2017 (Distrito de Tuiuty); (E) - P. Noir 2017 (Vale dos Vinhedos); (F) - P. Noir 2017 (Pinto Bandeira).



Fonte: autor (2016/2017).

Figura 14: Exemplos de isolados corados com Técnica de Gram e fotografados em Microscópio óptico com aumento de 1000x, onde observa-se isolados Gram (+) e em configuração de cocos (A e D) e bacilos (B, C e E).



Fonte: autor (2017).

Os resultados obtidos nos ensaios de isolamento e caracterização morfológica foram similares aos encontrados por Binatti (2015), Solieri et al. (2010) e Inês (2007). Estes autores também encontraram grande diversidade de micro-organismos (bolores, leveduras e bactérias) nas amostras utilizadas para isolamento, quando as mesmas se tratavam de uvas, mosto ou vinho, porém quando a amostra foi de borra ao final da FML foram encontradas apenas BAL do gênero *Lactobacillus* e *Oenococcus*.

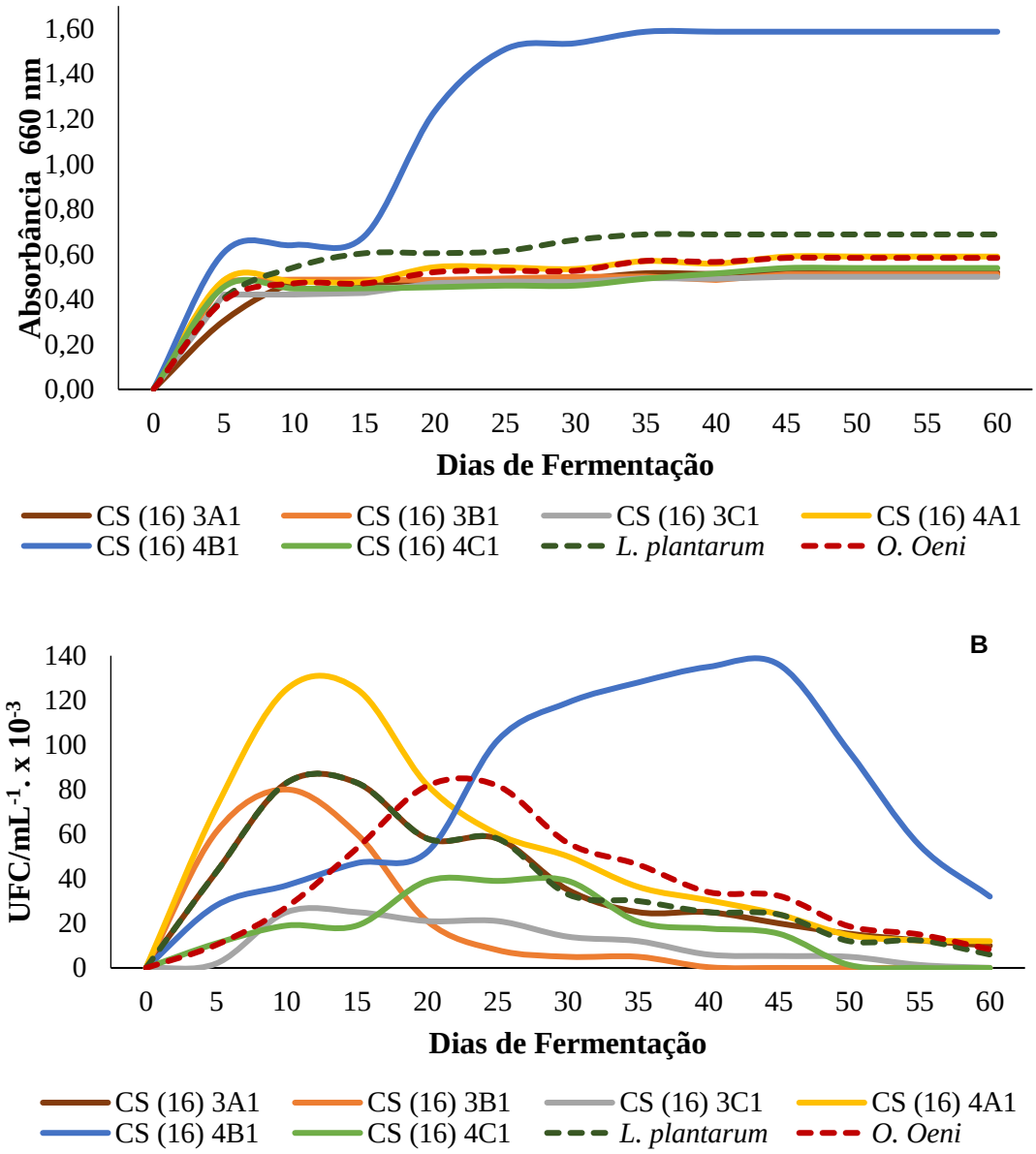
5.2 TESTE DE CAPACIDADE DE CRESCIMENTO EM MEIO MÍNIMO, REDUÇÃO DE pH, DESCARBOXILAÇÃO DE ÁCIDO L-MÁLICO E PERFIL ENZIMÁTICO

Dos 49 isolados, 47 foram capazes de se desenvolver utilizando a composição do meio mínimo como fonte de nutrientes, o que permite inferir que estes micro-organismos conseguiram utilizar o ácido L-málico como fonte de carbono. Nas Figuras 15-19 são apresentadas as curvas de crescimento (A – Densidade ótica: 660 nm; B – Células viáveis) dos

isolados para os dias de fermentação, em comparação com a cepas comerciais de *Lactobacillus plantarum* e *Oenococcus oeni*.

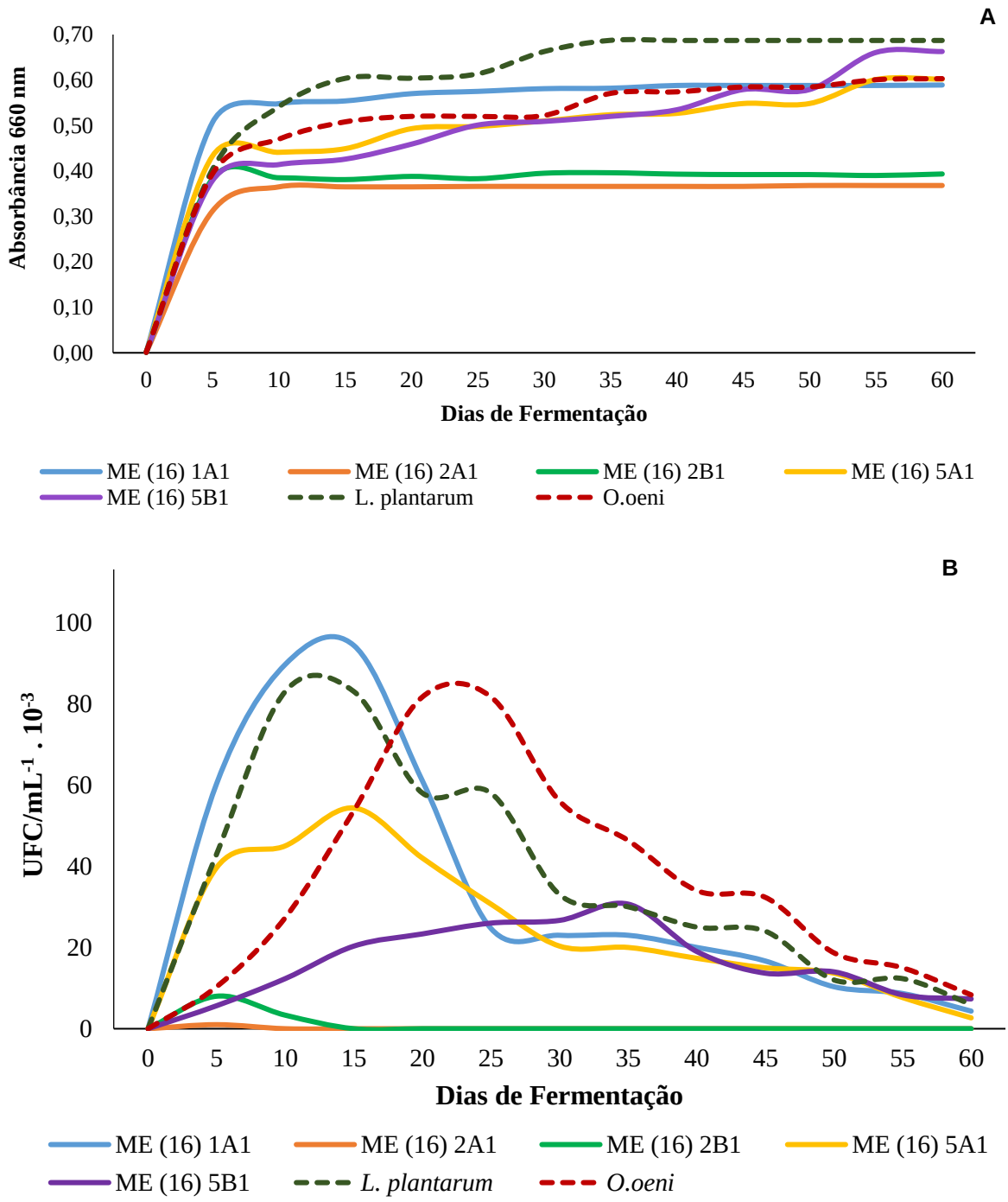
Os micro-organismos obtidos do vinho C. Sauvignon – safra 2016 (Figura 15 A e B), apresentaram maiores valores para absorbância a partir do 10º dia de cultivo exceto para *L. plantarum* (0,60$_{OD}$ e 80 UFC.mL^{-1}.10^{-3}), em 15 dias para CS (16) 3B1, CS (16) 4A1, CS (16) 3A1 (± 0,50 $_{OD}$ e ±75 UFC.mL^{-1}.10^{-3}), enquanto que para o isolado CS (16) 4B1 (1,53$_{OD}$ e 130 UFC.mL^{-1}.10^{-3}) ocorreu em 25 dias, o que também foi observado para cepa comercial de *O. oeni*, porém com menor valor para células viáveis (0,52$_{OD}$ e 80 UFC.mL^{-1}.10^{-3}).

Figura 15: Curvas de Crescimento: (A) – Densidade ótica (absorbância) e (B) – células viáveis (UFC.mL^{-1}.10^{-3}), para os isolados da variedade Cabernet Sauvignon safra 2016.



Das amostras de Merlot – safra 2016 (Figura 16 A e B), dois isolados ME (16) 2A1 e ME (16) 2B1, apresentaram crescimento apenas até 5º dia de fermentação (0,40$_{OD}$ e 8 UFC.mL^{-1}.10^{-3}), aos 10 dias observou-se aumento nas leituras para *L. plantarum* e ME (16) 1A1 (±0,60$_{OD}$ e ±75 UFC.mL^{-1}.10^{-3}), e ME (16) 5B1 (0,40$_{OD}$ e 20 UFC.mL^{-1}.10^{-3}). A partir do 15º dia destacam-se respectivamente *O. oeni* (0,52$_{OD}$ e 81 UFC.mL^{-1}.10^{-3}) e ME (16) 5A1 (0,44$_{OD}$ e 53 UFC.mL^{-1}.10^{-3}).

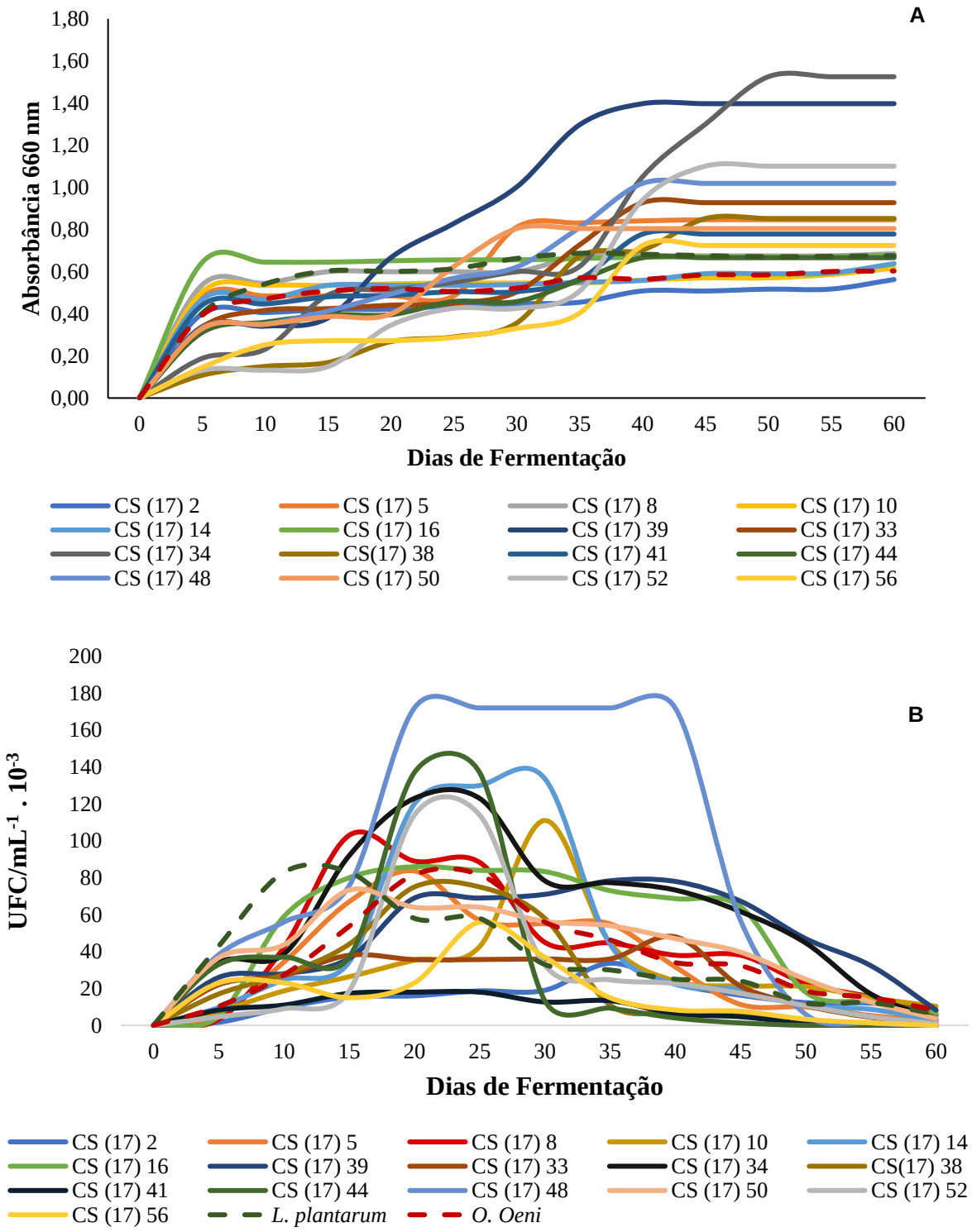
Figura 16: Curvas de crescimento: (A) – Densidade ótica (absorbância) e (B) – células viáveis (UFC.mL^{-1}.10^{-3}), para os isolados da variedade Merlot safra 2016.

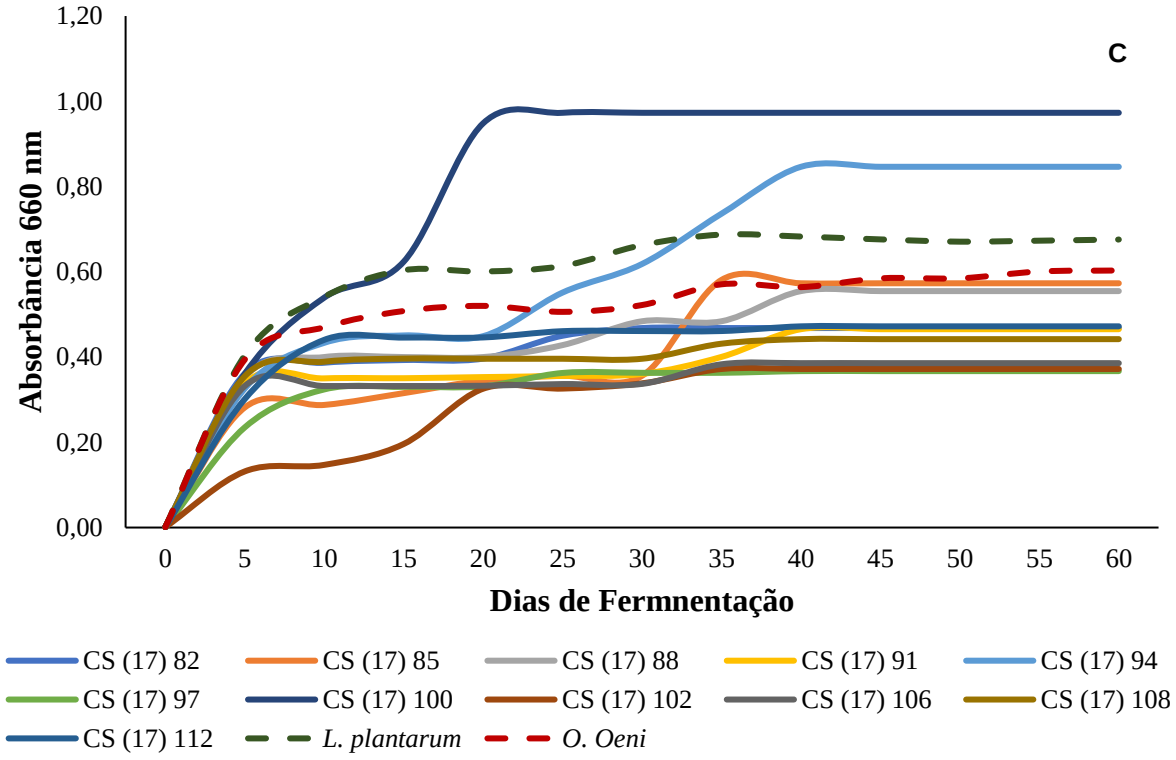


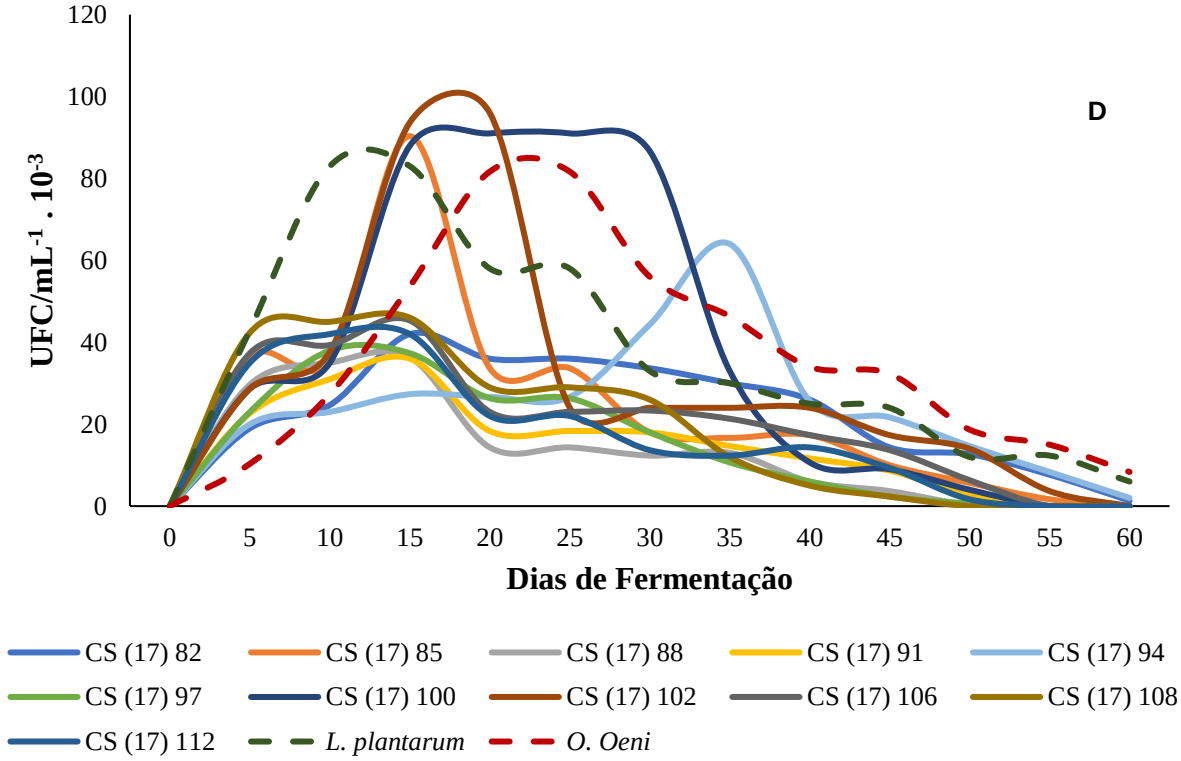
A safra de 2017 foi a que promoveu o isolamento da maior quantidade de possíveis BALs, na variedade C. Sauvignon, totalizando 27 cepas.

Na Figura 17 (A, B, C e D) estão representados os gráficos do desenvolvimento destes isolados em vinho sintético

Figura 17: Curvas de crescimento: (A e C) – Densidade ótica (absorbância) e (B e D) – células viáveis (UFC.mL^{-1}.10^{-3}), para os isolados da variedade Cabernet Sauvignon safra 2017.





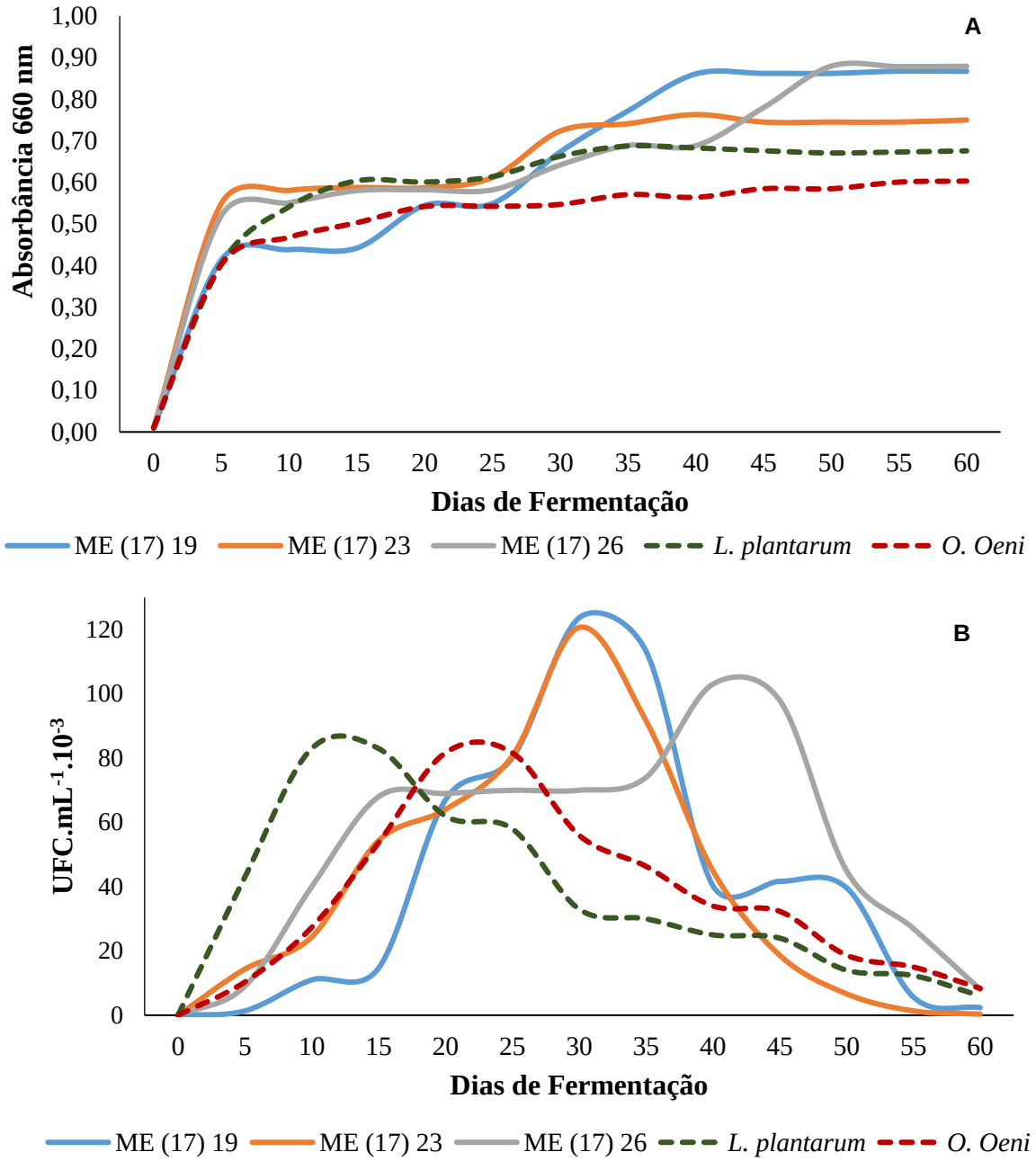


A partir destes resultados (figura 17 A-D), foi possível separar os isolados em quatro grupos: a) crescimento a partir do 10º dia de fermentação: CS (17) 16 e CS (17) 112 (±0,40$_{OD}$ e ±49 UFC.mL^{-1}.10^{-3}); b) comportamento similar ao das BAL comerciais: CS (17) 2, CS (17) 8, CS (17) 10, CS (17) 14, CS (17) 34, CS (17) 41, CS (17) 44, CS (17) 82, CS (17) 85, CS (17)

88, CS (17) 91, CS (17) 97, CS (17) 106 e CS (17) 108 quando observou-se aumento dos valores a partir do 15º e 20º dia (±0,60$_{OD}$ e ±75 UFC.mL^{-1}.10^{-3}), exceto CS (17) 48, CS (17) 100 e CS (17) 102, para os quais as leituras de absorbância e células viáveis (1,019$_{OD}$ e 172 UFC.mL^{-1}.10^{-3}; 0,97 $_{OD}$ e 91 UFC.mL^{-1}.10^{-3}; 0,92 $_{OD}$ e 96 UFC.mL^{-1}.10^{-3}) foram superiores as encontradas para *L. plantarum* e *O. oeni*; c) crescimento após 25º dia: CS (17) 38, CS (17) 50 e CS (17) 56 com médias de (±0,80$_{OD}$ e ±96 UFC.mL^{-1}.10^{-3}); d) crescimento a partir de 35 dias: CS (17) 33, CS (17) 39, CS (17) 94, os mesmos apresentaram crescimento tardio, porém com leituras altas (0,92$_{OD}$ e 88 UFC.mL^{-1}.10^{-3}; 1,39$_{OD}$ e 73 UFC.mL^{-1}.10^{-3}; 0,84 $_{OD}$ e 64 UFC.mL^{-1}.10^{-3}).

As curvas para os isolados de Merlot – safra 2017, encontram-se na Figura 18, A e B.

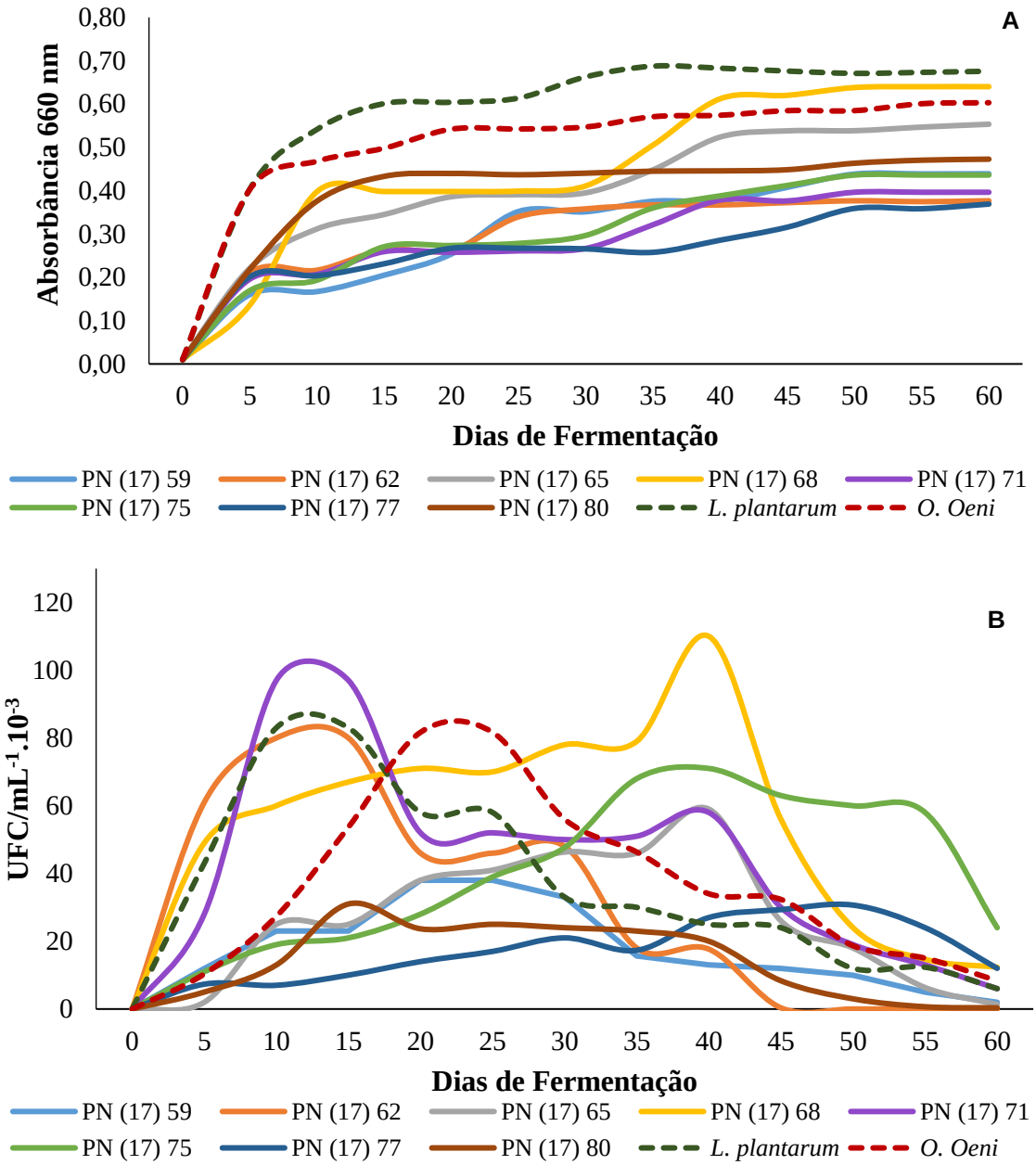
Figura 18: Curvas de crescimento: (A) – Densidade ótica (absorbância) e (B) – células viáveis (UFC.mL^{-1}.10^{-3}), para os isolados da variedade Merlot safra 2017.



Pode-se observar que os mesmos tiveram comportamento diferente dos micro-organismos isolados do mesmo tipo de vinho da safra 2016, apesar de todos iniciarem o desenvolvimento no 5º dia de fermentação, observou-se maior expressividade nas leituras a partir do 20º dia para ME (17) 19 ($0{,}54_{OD}$ e 80 $UFC.mL^{-1}.10^{-3}$), ME (17) 23 ($0{,}61_{OD}$ e 78 $UFC.mL^{-1}.10^{-3}$) e ME (17) 26 ($0{,}60_{OD}$ e 81 $UFC.mL^{-1}.10^{-3}$), seguidos de uma segunda rampa de crescimento após o 25º dia para os dois primeiros, e no 35º para o último isolado.

Todas as bactérias isoladas de vinho Pinot Noir safra – 2017, desenvolveram-se no vinho sintético (Figura 19 A e B).

Figura 19: Curvas de crescimento: (A) – Densidade ótica (absorbância) e (B) – células viáveis ($UFC.mL^{-1}.10^{-3}$), para os isolados da variedade Pinot Noir safra 2017.



O isolado PN (17) 80, apresentou os maiores valores no 15º dia de fermentação ($0,44_{OD}$ e 31 UFC.mL^{-1}.10^{-3}), entre o 20º e 25º dias PN (17) 65, PN (17) 62 e PN (17) 59 obtiveram valores próximos de absorbância e unidades formadoras de colônia ($0,38_{OD}$ e 39 UFC.mL^{-1}.10^{-3}; $0,39_{OD}$ e 46 UFC.mL^{-1}.10^{-3}; $0,36_{OD}$ e 38 UFC.mL^{-1}.10^{-3}), sendo que PN (17) 65 apresentou uma segunda rampa de crescimento aos 40 dias ($0,53_{OD}$ e 59 UFC.mL^{-1}.10^{-3}). Os isolados PN (17) 75 ($0,36_{OD}$ e 35 UFC.mL^{-1}.10^{-3}), PN (17) 71 ($0,48_{OD}$ e 58 UFC.mL^{-1}.10^{-3}) e PN (17) 77 ($0,35_{OD}$ e 31 UFC.mL^{-1}.10^{-3}) aumentaram o crescimento celular em 35, 40 e 50 dias respectivamente.

Binatti (2015) relata que os isolados de C. Sauvignon desenvolveram-se em todos os meios de cultivo testados, enquanto que houve dificuldade em ambientar isolados de Merlot, principalmente em meio de cultura suplementado com ácido L- málico apesar do teor de açúcares presente (meio ML - glucose 10 g.L^{-1}, frutose 10 g.L^{-1} , L-ácido málico 2 g.L^{-1}, extrato de levedura 4 g.L^{-1}, extrato de carne 4 g.L^{-1}, peptona 10 g.L^{-1}, sulfato de magnésio 0,2 g.L^{-1}, sulfato de manganês 0,05 g.L^{-1}, fosfato de potássio 5 g.L^{-1}, detergente 1 g.L^{-1}, pH 4,5).

Como apresentado nas Figuras 16-20, observou-se variação na contagem de células viáveis ao longo dos dias de fermentação para todos os micro-organismos estudados, ou seja, esta flutuação foi observada tanto para as bactérias comerciais como para as cepas autóctones. Como exemplo do observado, podemos citar os isolados [CS (17) 33 e PN (17) 75)] que apresentaram células viáveis após o 35º dia de fermentação, enquanto *O. oeni* já havia entrado na fase de declínio celular.

Essa diferença pode ser explicada devido aos micro-organismos possuíres diferenças no metabolismo, uma vez que se utilizou um meio de cultura padronizado. De acordo com estudo de Ribéreau-Gayon et al. (2006), onde o autor descreve que durante a fermentação alcoólica a população de bactérias ácido láticas permanece em fase de latência por tempo indeterminado, o qual pode durar alguns meses, assim, o início do crescimento irá depender de fatores como pH, etanol e temperatura, e dos componentes do meio.

Binatti (2015) e Luz (2018) encontraram valores semelhantes aos deste estudo para crescimento de isolados de bactérias ácido láticas utilizando meios enriquecidos com açúcares e com apenas 2 g.L^{-1} e 1,5 g.L^{-1} de ácido málico, respectivamente. Assim, pode inferir-se que os isolados utilizados no ensaio em vinho sintético foram capazes de utilizar o ácido L-málico ou glicerol como fonte de carbono, uma vez que o meio não foi suplementado com açúcares.

Ao final dos 60 dias de fermentação dos 47 isolados positivos morfologicamente e que desenvolveram-se em VS, 33 apresentaram mudança no pH durante a fermentação, sendo que para 18 deles, o aumento foi superior a 0,1. Na Tabela 7 encontram-se os valores de potencial

hidrogeniônico obtidos durante o período do ensaio onde observou-se que até o quinto dia a maior parte dos micro-organismos não apresentou variação nos valores de pH (Apêndice V), apenas PN (17) 65, PN (17) 80 e *O. oeni*, sendo que um acréscimo considerável nos valores ocorreu entre 15º e 35º dias de fermentação, o que vai de encontro aos máximos encontrados para absorbância e número de células viáveis nos respectivos períodos para a maioria dos isolados. Beaman (2011) relata que a atividade malolática pode ser observada tanto na fase exponencial, quanto na fase estacionária do desenvolvimento celular, fato que justifica o aumento de pH.

Tabela 7: Valores de pH encontrados ao final de 60 dias de FML em vinho sintético (pH inicial 3,2) para cepas autóctones e comerciais.

	Faixa de pH ao final de 60 dias de FML			
	Não alterado (3,21)	**3,25 – 3,29**	**3,30 – 3,40**	
Isolados	CS (16) 4A1 CS (16) 4B1 CS (17) 34 CS (17) 38 CS (17) 44 CS (17) 48 CS (17) 50 CS (17) 52 CS (17) 88 CS (17) 91 CS (17) 94 CS (17) 97 CS (17) 108 CS (17) 112	CS (16) 3A1 CS (16) 4C1 CS (17) 33 CS (17) 39 CS (17) 56 CS (17) 82 CS (17) 85 CS (17)106 ME (17) 19 PN (17) 59 PN (17) 62 PN (17) 68 PN (17) 71 PN (17) 77 PN (17) 80	CS (16) 3B1 CS (16) 3C1 ME (16) 1A1 ME (16) 5A1 ME (16) 5B1 *O. oeni* *L. plantarum*	CS (17) 2 CS (17) 5 CS (17) 8 CS (17) 10 CS (17) 14 CS (17) 16 CS (17) 41 CS (17) 100 CS (17) 102 ME (17) 23 ME (17) 26 PN (17) 65 PN (17)75

Os valores obtidos para as bactérias comerciais no 60º dia de ensaio foram de pH 3,35 para *L. plantarum* e pH 3,4 para *O. oeni*. Os isolados que obtiveram valores próximos a estes foram respectivamente: a) pH 3,35±0,1 – CS (17) 2, CS (17) 5, CS (17) 8, CS (17) 10, PN (17) 75; b) pH 3,38 ±0,1 – CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, ME (17) 26, PN (17) 65. Os demais isolados não apresentaram um aumento considerável, quando comparados as cepas comerciais, o que pode ser explicado pelo fato de que os meios de cultivo mais ácidos (vinho sintético teve pH ajustado para 3,2), podem reduzir atividades enzimáticas importantes, sendo capaz de deteriorar o DNA e com isso causar danos as proteínas bacterianas (BOTELHO et al., 2015), ou seja, a acidez potencializa a inibição do crescimento de BALs (JAENISCH et al., 2010). Os resultados obtidos vão de encontro a valores observados por Luz (2018) em estudo semelhante, onde o aumento de pH foi de 0,11 pontos em média, utilizando um meio de cultura ajustado para pH 3,4.

A cada cinco dias de fermentação foi realizada cromatografia em papel, para acompanhar o momento aproximado em que as bactérias iniciaram a formação do ácido L-lático em detrimento a descarboxilação do ácido L-málico (Tabela 8).

Tabela 8: Presença e/ou ausência de ácidos L-málico e L-lático obtido por cromatografia de Papel (Método qualitativo) para as BALs no início e final de Fermentação em Vinho Sintético (0 e 60 dias).

Isolado	L-Málico		L-lático		Isolado	L-Málico		L-lático	
	0dias	60dias	0dias	60dias		0dias	60dias	0dias	60dias
CS (16)3A1	+	+	-	-	CS (17) 52	+	+	-	-
CS (16) 4A1	+	+	-	-	CS (17) 56	+	+	-	-
CS (16) 3B1	+	-	-	+	CS (17) 82	+	+	-	-
CS (16) 4B1	+	+	-	-	CS (17) 85	+	+	-	-
CS (16) 3C1	+	-	-	+	CS (17) 88	+	+	-	-
CS (16) 4C1	+	+	-	-	CS (17) 91	+	+	-	-
ME (16) 1A1	+	-	-	+	CS (17) 94	+	+	-	-
ME (16) 2A1	+	+	-	-	CS (17) 97	+	+	-	-
ME (16) 2B1	+	+	-	-	CS (17) 100	+	-	-	+
ME (16) 5A1	+	-	-	+	CS (17) 102	+	-	-	+
ME (16) 5B1	+	-	-	+	CS (17)106	+	+	-	-
CS (17) 2	+	-	-	+	CS (17) 108	+	+	-	-
CS (17) 5	+	-	-	+	CS (17) 112	+	+	-	-
CS (17) 8	+	-	-	+	ME (17) 19	+	+	-	-
CS (17) 10	+	-	-	+	ME (17) 23	+	-	-	+
CS (17) 14	+	-	-	+	ME (17) 26	+	-	-	+
CS (17) 16	+	-	-	+	PN (17) 59	+	+	-	-
CS (17) 33	+	+	-	-	PN (17) 62	+	+	-	-
CS (17) 34	+	+	-	-	PN (17) 65	+	-	-	+
CS (17) 38	+	+	-	-	PN (17) 68	+	+	-	-
CS (17) 39	+	+	-	-	PN (17) 71	+	+	-	-
CS (17) 41	+	-	-	+	PN (17) 75	+	-	-	+
CS (17) 44	+	+	-	-	PN (17) 77	+	+	-	-
CS (17) 48	+	+	-	-	PN (17) 80	+	+	-	-
CS (17) 50	+	+	-	-	*O. oeni*	+	-	-	+
					L. plantarum	+	-	-	+

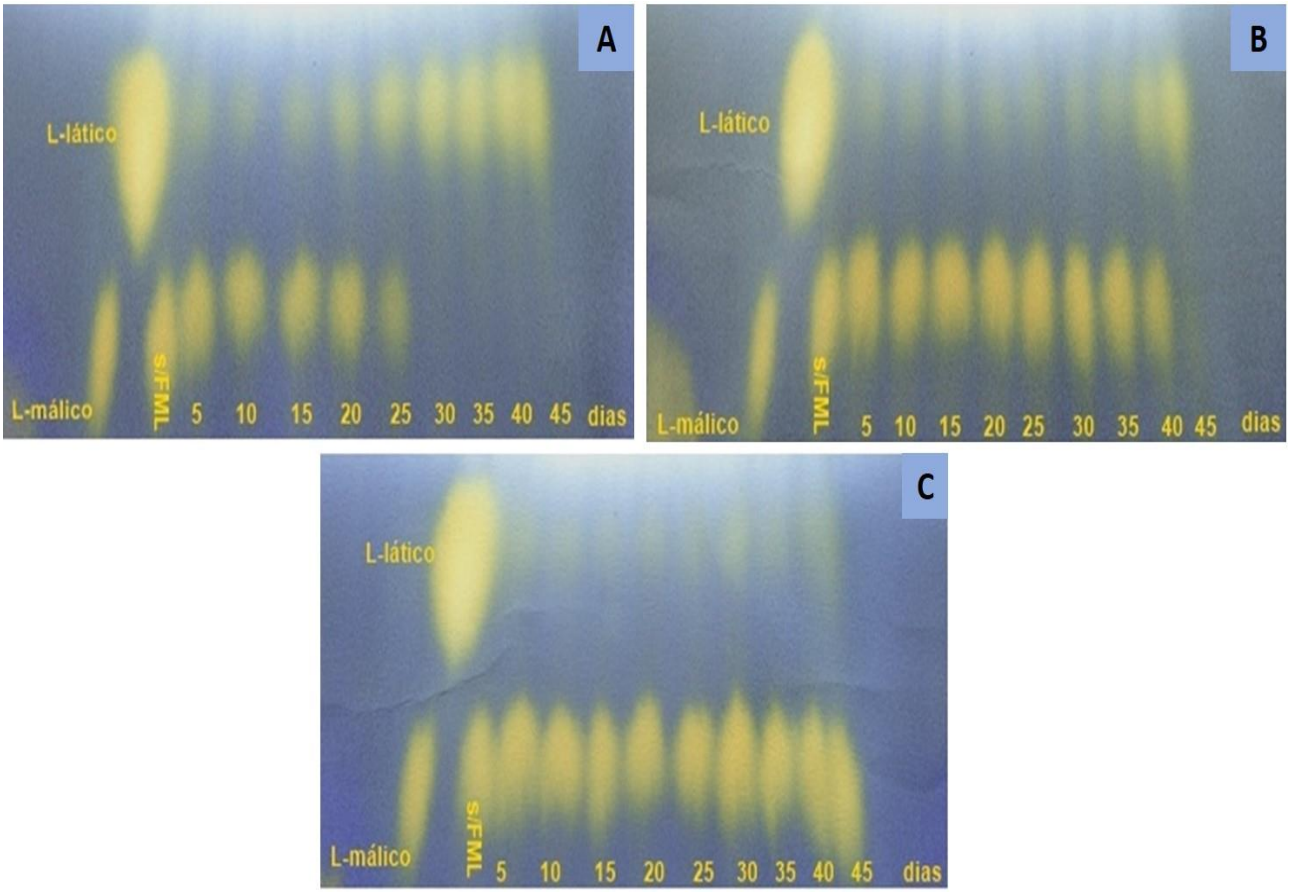
*onde, o sinal (-) representa ausência da mancha e (+) a presença, respectiva ao ácido avaliado.

Na Tabela 8, é possível observar que todos os micro-organismos estudados foram positivos para a presença do ácido L-málico no primeiro dia de fermentação, enquanto que no último dia de experimento (60 dias) as cepas comerciais e 18 isolados [CS (16) 3B1, CS (16) 3C1, ME (16) 1A1, ME (16) 5A1, ME (16) 5B1, CS (17) 2, CS (17) 5, CS (17) 8, CS (17) 10, CS (17) 14, CS (17) 16, CS (17) 41, CS (17) 100, CS (17) 102, ME (17) 23, ME (17) 26, PN (17) 65 e PN (17) 75] foram negativos para o ácido L-málico e positivos para o ácido L-lático, ou seja, os mesmos micro-organismos que apresentaram aumento no pH de mínimo 0,1, metabolizaram o ácido L-málico.

Na Figura 20, estão retratados os cromatogramas obtidos para três isolados estudados [PN (17) 65, ME (16) 1A1 e CS (17) 22], iniciando em 5 até 45 dias de fermentação. Para PN (17) 65 (Figura 20-A), nota-se no 20º dia de fermentação a formação da macha nítida que

representa o ácido L-lático, em contrapartida é possível observar a diminuição da mancha referente ao ácido L-málico, seguida de seu desaparecimento nos dias subsequentes; para ME (16) 1A1 (Figura 20-B), observa-se este comportamento a partir do 40º dia de experimento; e para CS (17) 112 (Figura 20-C), apenas a mancha referente ao ácido L-málico está presente.

Figura 20: Exemplos de cromatogramas onde observa-se a formação de manchas para o ácido L-lático e de ácido L-málico. (A) – Isolado PN (17) 65; (B) – Isolado ME (16) 1A1; (C) – Isolado CS (17) 112.



Fonte: autor (2017).

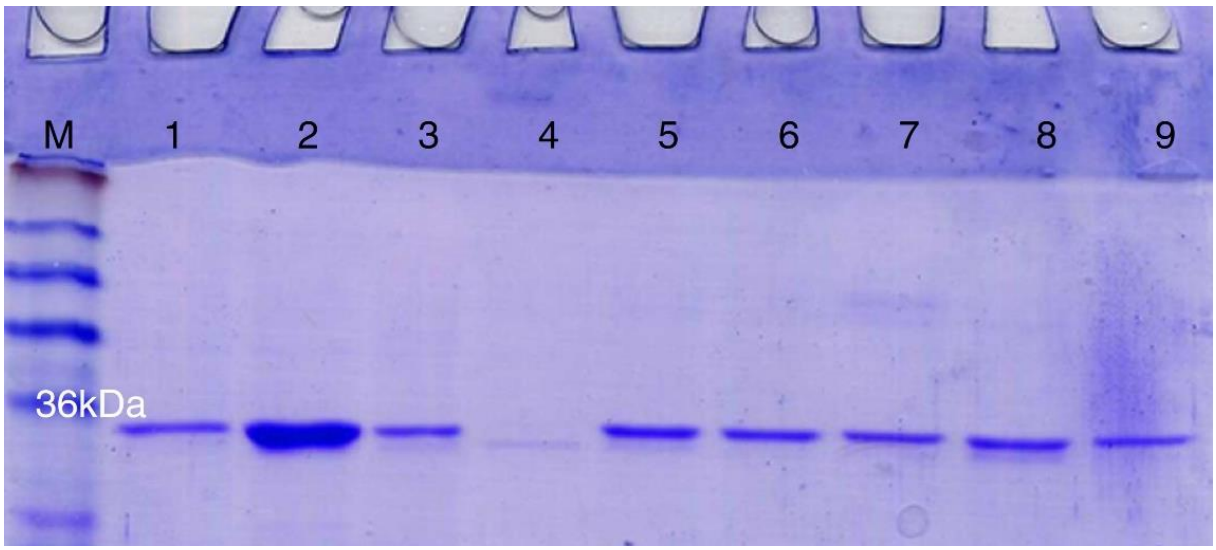
As 18 cepas isoladas que apresentaram a mancha para o ácido L-lático, foram testadas para a presença das enzimas responsáveis pela descarboxilação do ácido L-málico (enzima málica - EM, malato desidrogenase – MDH e oxalacetato descarboxilase - OADC) e síntese de ácido L-lático (lactato desidrogenase – L-LDH), conforme Tabela 9. Na Figura 21, está apresentado o gel de acrilamida para a enzima malato desidrogenase, onde evidencia-se as bandas para presença da mesma.

A enzima MLE (malolática), não foi investigada por ainda não ter sido reconhecida pela Enzime Comission, (Schumman et al., 2013).

Tabela 9: Presença e/ou ausência de enzimas responsáveis pela fermentação malolática, obtidas por eletroforese de iso-enzimas após 48 h de fermentação.

Isolados	Presença das enzimas			
	MDH	**ME**	**OADC**	**LDH**
CS (16) 3B1	X	-	X	X
CS (16) 3C1	-	X	-	-
ME (16) 1A1	X	-	X	X
ME (16) 5A1	-	X	-	X
ME (16) 5B1	-	X	-	X
CS (17) 2	X	-	X	X
CS (17) 5	X	-	X	X
CS (17) 8	X	-	X	X
CS (17) 10	X	-	X	X
CS (17) 14	-	X	-	-
CS (17) 16	-	X	-	-
CS (17) 41	X	-	X	X
CS (17)100	-	X	-	-
CS (17) 102	-	X	-	-
ME (17) 23	X	-	X	X
ME (17) 26	X	-	X	X
PN (17) 65	X	-	X	X
PN (17) 75	-	X	-	X
O. oeni	X	-	X	X
L. plantarum	-	X	-	X

Figura 21: Gel obtido para a iso-enzima Malato Desidrogenase (MDH). Na sequência: (1) - *O. oeni*, (2) - CS (16) 3B1, (3) - ME (16) 1A1, (4) - ME (16) 5B1, (5) - CS (17) 2, (6) - CS (17) 10, (7) - ME (17) 23, (8) - ME (17) 26, e (9) - PN (17) 65.



Fonte: autor (2017).

Dos 49 isolados, os 18 que apresentaram aumento de pH e descarboxilaram o ácido L-málico, apenas 13 acusaram a presença dos loci para as enzimas responsáveis pela fermentação malolática (Tabela 9).

As cepas CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, CS (17) 2, CS (17) 5, CS (17) 8, CS (17) 10, CS (17) 41, ME (17) 23, ME (17) 26 e PN (17) 65, podem ser comparadas a cepa comercial de *O. oeni*, que apresentou os sítios das enzimas: malato desidrogenase (MDH – EC 1.1.1.37 ou 1.1.1.38), utilizando-se de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+) como cofator, seguida da enzima oxalacetato descarboxilase (OADC -EC 4.1.1.3) que realiza descarboxilação de oxalacetato em piruvato e finalizando a L-LDH, sintetiza o lactato (COSTELLO, 2012; BINATTI, 2015).

Além disso, a reação pode ocorrer via piruvato, que é reduzido em lactato com ação combinada da enzima málica (ME – EC 1.1.1.40) e da lactato desidrogenase (L-LDH – EC 1.1.1.27), como ocorre para *Lactobacillus plantarum* (INES, 2007), estas enzimas foram presentes em 4 dos isolados investigados [ME (16) 5A1, ME (16) 5B1 e PN (17) 75]. As espécies de *L. casei* e *L. plantarum*, expressaram em estudo de Landete et al., (2013), tanto a enzima málica quanto a enzima malolática, a ativação de cada uma foi dependente da quantidade de malato disponível no meio de cultura, o que leva a crer que estas BALs podem realizar as duas vias metabólicas para a FML. Schütz and Radler (1974), descobriram que quando existe a disponibilidade tanto de glicose quanto ácido L-málico a via preferida é a da enzima MLE, enquanto a ocorrência de maior quantidade de malato, estas BALs optam pela via da enzima málica.

5.3 FERMENTAÇÃO EM VINHO TINTO

Dos 49 isolados iniciais (Tabela 10), os 13 que apresentaram resultados de crescimento em até 45 dias, aumento de pH maior ou igual 0,1, ausência do ácido L-málico, presença de ácido L-lático e existência das enzimas responsáveis pela fermentação malolática, sendo estes, selecionados para o ensaio em vinho tinto.

O experimento consistiu na substituição do vinho sintético (meio mínimo) pelo vinho tinto C. Sauvignon (meio complexo) a fim de investigar se o comportamento bacteriano observado inicialmente seria mantido. A fermentação foi conduzida por 45 dias, onde a cada 5 dias foi realizada amostragem para mensurar a evolução do pH, da acidez total titulável, concentração dos ácidos L-málico e L-lático, sendo que os valores obtidos ao final da FML encontram-se elencados na Tabela 11, os mesmos foram comparados a amostra sem inoculação (controle), ou seja, com o vinho antes de receber o pé de cuba.

Tabela 10: Isolados selecionados para fermentação em vinho tinto – critérios.

Seleção	Isolado	Parâmetro				
		Crescimento VS até 45 dias	**Aumento de pH ≥ 0,1**	**Ausência de L-málico**	**Presença L-lático**	**Presença das enzimas**
	CS (16)3A1	X	-	-		
	CS (16) 4A1	X	-	-		
1	CS (16) 3B1	X	X	X	X	X
	CS (16) 4B1	-	-	-		
	CS (16) 3C1	X	X	X	X	
	CS (16) 4C1	X	-	-		
2	ME (16) 1A1	X	X	X	X	X
	ME (16) 2A1	-	-	-		
	ME (16) 2B1	-	-	-		
3	ME (16) 5A1	X	X	X	X	X
4	ME (16) 5B1	X	X	X	X	X
5	CS (17) 2	X	X	X	X	X
6	CS (17) 5	X	X	X	X	X
7	CS (17) 8	X	X	X	X	X
8	CS (17) 10	X	X	X	X	X
	CS (17) 14	X	X	X	X	-
	CS (17) 16	X	X	X	X	-
	CS (17) 33	X	-	-	-	-
	CS (17) 34	-	-	-	-	-
	CS (17) 38	X	-	-	-	-
	CS (17) 39	X	-	-	-	-
9	CS (17) 41	X	X	X	X	X
	CS (17) 44	X	-	-	-	-
	CS (17) 48	X	-	-	-	-
	CS (17) 50	X	-	-	-	-
	CS (17) 52	-	-	-	-	-
	CS (17) 56	X	-	-	-	-
	CS (17) 82	X	-	-	-	-
	CS (17) 85	X	-	-	-	-
	CS (17) 88	X	-	-	-	-
	CS (17) 91	X	-	-	-	-
	CS (17) 94	-	-	-	-	-
	CS (17) 97	X	-	-	-	-
	CS (17) 100	X	X	X	X	-
	CS (17) 102	X	X	X	X	-
	CS (17)106	X	-	-	-	-
	CS (17) 108	X	-	-	-	-
	CS (17) 112	X	-	-	-	-
	ME (17) 19	-	-	-	-	-
10	ME (17) 23	X	X	X	X	X
11	ME (17) 26	X	X	X	X	X
	PN (17) 59	X	-	-	-	-
	PN (17) 62	X	-	-	-	-
12	PN (17) 65	X	X	X	X	X
	PN (17) 68	X	-	-	-	-
	PN (17) 71	X	-	-	-	-
13	PN (17) 75	X	X	X	X	X
	PN (17) 77	-	-	-	-	-
	PN (17) 80	X	-	-	-	-

*Onde X, representa que o micro-organismo atendeu ao critério.

Tabela 11: Valores (médias e desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos obtidas para os 13 isolados em 45 dias de FML em vinho tinto em comparação com amostra sem inoculação.

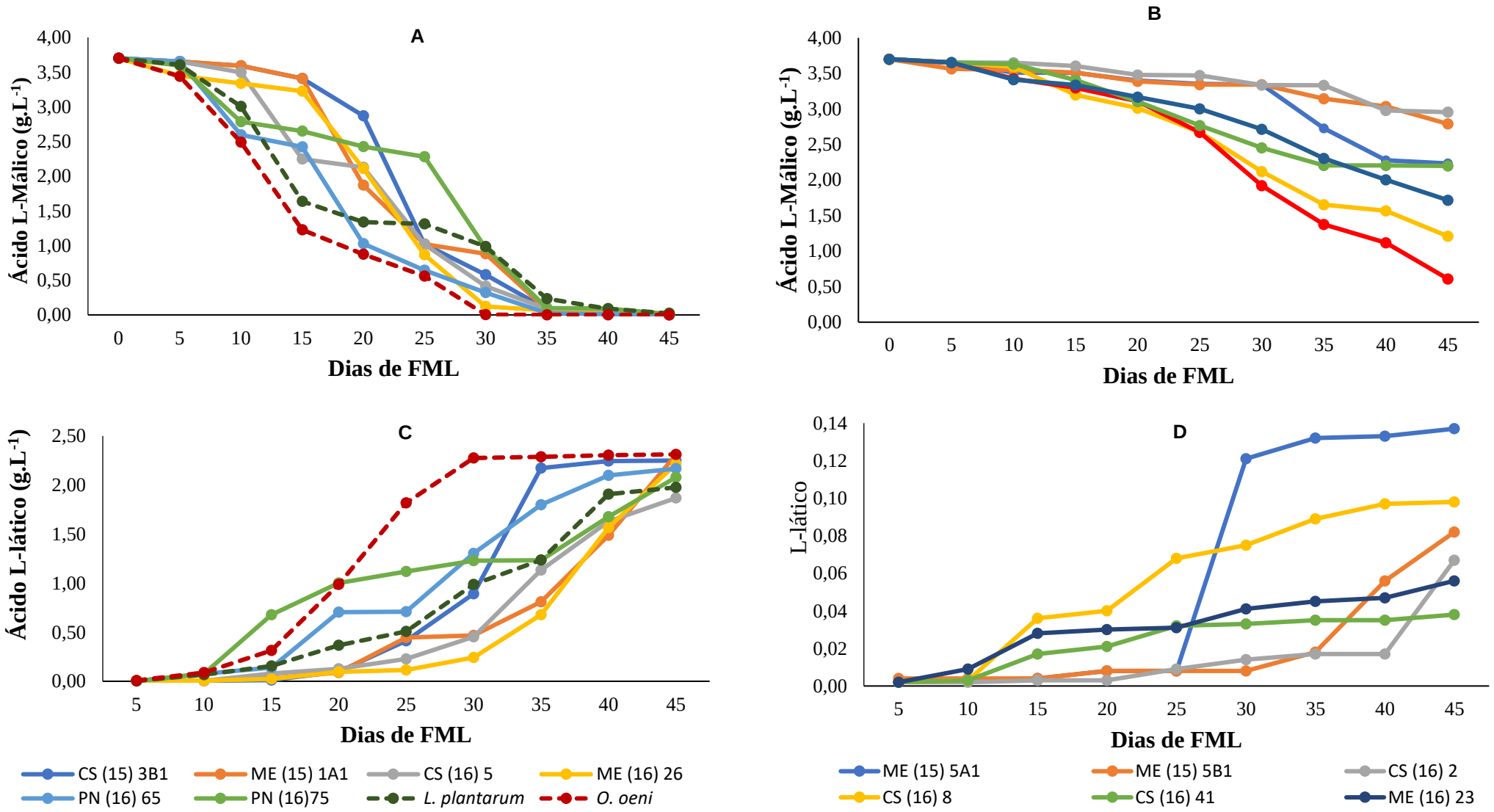
Isolados	Parâmetros físico-químicos			
	pH	Acidez total ($g.L^{-1}$)	Ácido L-málico ($g.L^{-1}$)	Ácido L-lático ($g.L^{-1}$)
CS (16) 3B1	$3,37^{a} \pm 0,01$	$4,47^{c} \pm 0,03$	$0,000^{c} \pm 0,001$	$2,249^{a} \pm 0,002$
ME (16) 1A1	$3,37^{a} \pm 0,01$	$4,45^{c} \pm 0,01$	$0,000^{c} \pm 0,001$	$2,308^{a} \pm 0,003$
ME (16) 5A1	$3,27^{b} \pm 0,02$	$4,51^{C} \pm 0,01$	$2,233^{b} \pm 0,001$	$0,137^{d} \pm 0,003$
ME (16) 5B1	$3,23^{b} \pm 0,02$	$4,56^{c} \pm 0,00$	$2,789^{b} \pm 0,001$	$0,082^{d} \pm 0,002$
CS (17) 2	$3,24^{b} \pm 0,01$	$5,11^{d} \pm 0,03$	$2,954^{b} \pm 0,000$	$0,067^{d} \pm 0,002$
CS (17) 5	$3,37^{a} \pm 0,01$	$4,48^{c} \pm 0,04$	$0,011^{c} \pm 0,001$	$1,867^{b} \pm 0,002$
CS (17) 8	$3,24^{b} \pm 0,03$	$5,10^{d} \pm 0,09$	$1,208^{cd} \pm 0,001$	$0,098^{c} \pm 0,002$
CS (17) 10	$3,32^{ab} \pm 0,01$	$4,46^{c} \pm 0,02$	$0,609^{e} \pm 0,001$	$1,316^{c} \pm 0,004$
CS (17) 41	$3,23^{b} \pm 0,01$	$5,22^{b} \pm 0,03$	$2,198^{bc} \pm 0,005$	$0,038^{d} \pm 0,003$
ME (17) 23	$3,24^{b} \pm 0,04$	$5,24^{b} \pm 0,01$	$1,716^{c} \pm 0,004$	$0,056^{d} \pm 0,102$
ME (17) 26	$3,35^{a} \pm 0,05$	$4,40^{c} \pm 0,01$	$0,001^{c} \pm 0,002$	$2,215^{a} \pm 0,002$
PN (17) 65	$3,31^{ab} \pm 0,03$	$4,40^{c} \pm 0,04$	$0,000^{c} \pm 0,001$	$2,167^{a} \pm 0,001$
PN (17)75	$3,32^{ab} \pm 0,02$	$4,38^{c} \pm 0,02$	$0,012^{c} \pm 0,002$	$2,078^{a} \pm 0,001$
L. plantarum	$3,23^{b} \pm 0,02$	$4,42^{c} \pm 0,02$	$0,023^{c} \pm 0,001$	$1,976^{b} \pm 0,001$
O. oeni	$3,39^{a} \pm 0,01$	$4,40^{c} \pm 0,03$	$0,000^{c} \pm 0,001$	$2,312^{a} \pm 0,001$
Sem inoculação	$3,11^{c} \pm 0,01$	$6,42^{a} \pm 0,01$	$3,625^{a} \pm 0,001$	$0,008^{d} \pm 0,001$

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente a $p<0,05$, segundo ANOVA e teste de Tukey.

As 13 cepas autóctones testadas demonstraram aumento de pH e diminuição da acidez total titulável (ATT). Comparando os valores obtidos para pH, os micro-organismos que assemelharam-se estatisticamente a *O. oeni* foram: CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, CS (17) 5 e ME (17) 26; Os isolados ME (16) 5A1, ME (16) 5B1, CS (17) 2, CS (17) 8, CS (17) 41 e ME (17) 23 exibiram valores similares ($p<0,05$) a *L. plantarum*; Apenas CS (17) 10, PN (17) 65 e PN (17) 75 apresentaram-se idênticas as duas cepas comerciais. Os resultados para acidez total titulável foram estatisticamente distintos do valor obtido para o vinho sem inoculação (ATT ± 6,42 $g.L^{-1}$ de ácido tartárico). Os isolados CS (17) 2, CS (17) 8, CS (17) 41 e ME (17) 23 com valores intermediários (ATT ± 5,16 $g.L^{-1}$ de ácido tartárico); e juntamente com as cepas comerciais encontram-se os micro-organismos autóctones: CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, ME (16) 5A1, ME (16) 5B1, CS (17) 5, CS (17) 10, ME (17) 26, PN (17) 65 e PN (17) 75 (ATT ± 4,45 $g.L^{-1}$ de ácido tartárico).

Na sequência avaliou-se a descarboxilação do ácido L-málico em detrimento da síntese de ácido L-lático (figura 22 A-D).

Figura 22: Valores de ácido L-málico e L-lático encontrados para os isolados, *L. plantarum* e *O. oeni*, durante a evolução da fermentação malolática em vinho tinto: (A) redução L-málico completa em até 35 dias; (B) residual de até 1,2 g.L^{-1} em 45 dias de experimento; (C) produção superior a 1,8 g.L^{-1}; (D) produção inferior a 1 g.L^{-1} em 45 dias de experimento.



Oito isolados demonstraram um consumo eficiente de ácido L-málico, sendo que seis deles [CS(16) 3B1, ME(16) 1A1, CS(17) 5, ME(17) 26, PN(17) 65 e PN(17) 75] apresentaram a cinética de descarboxilação completa do malato em até 35 dias, com valores abaixo de 0,01 $g.L^{-1}$, sendo estatisticamente análogos a *L. plantarum* e *O. oeni*, os quais realizaram este processo completamente em 30 e 40 dias, respectivamente (Tabela 11 e Figura 22 A-B). A cepa CS (17) 10 obteve valores intermediários (0,609 $g.L^{-1}$), conforme Tabela 11. Seis isolados [ME (16) 5A1, ME (16) 5B1, CS (17) 2, CS (17) 8, CS (17) 41 e ME (17) 23] demonstraram-se ineficazes em degradar completamente o ácido L-málico nos 45 dias de FML (Tabela 11 e Figura 22-B), apresentando valores residuais deste composto acima da concentração de 1,2 $g.L^{-1}$, porém, demonstrando uma maior atividade de redução a partir do 35º dia de experimento. Em estudo similar, Solieri et al., (2010) observaram diferenças nas velocidades de degradação para o ácido L-málico para cepas isoladas e comerciais de *O. oeni*, onde algumas delas levaram até 60 dias para iniciar o processo. Ines (2007) relata que em alguns casos a fermentação malolática realizada em vinho pode começar em até 180 dias após a inoculação da cultura 'starter', dependendo das condições físico-químicas e nutricionais do mesmo, sendo que estas variam de acordo com as condições de nutrientes do solo e do clima de cada safra.

Conforme era esperado, os teores de ácido L-málico e L-lático, apresentaram-se inversamente proporcionais (Figura 23, C-D), sendo que o último composto exibiu valores expressivos para os isolados: CS (17) 10 (lactato superior a ± 1,3 $g.L^{-1}$), CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, CS (17) 5, ME (17) 26, PN (17) 65 e PN (17) 75 (lactato 2,14 $g.L^{-1}$), os quais foram estatisticamente iguais as culturas 'starter' *L. plantarum* (± 1,97 $g.L^{-1}$) e *O. oeni* (2,31 $g.L^{-1}$). Verificou-se, também, que as cepas autóctones iniciaram o consumo do ácido L-málico entre 5 e 10 dias de fermentação, mas a produção de ácido L-lático relevante foi observada somente a partir do 15º dia para eles.

Este atraso observado na FML, pode ser explicado pelo fato de o vinho tinto ser um meio de cultura mais complexo que o vinho sintético, possuindo açúcares, ácidos, além de possíveis compostos inibitórios para as BALs (INES, 2007; SOLIERI et al., 2010; BINATTI, 2015), como os compostos fenólicos (GARCÍA-RUIZ et al., 2009), que podem influenciar positiva ou negativamente as mesmas, dependendo de seu metabolismo (LOMBARDI et al., 2012). Alguns compostos fenólicos, como os taninos, provocam alterações na membrana plasmática e parede celular de BALs (KRIEGER-WEBER, 2014) afetando consideravelmente o seu metabolismo e desenvolvimento. Para seleção de culturas 'starter', espera-se que o micro-organismo de interesse seja capaz de produzir atributos que agreguem valor sensorial ao

produto. No caso dos vinhos, a capacidade de converter o ácido L-málico (di-carboxílico), que é um dos principais ácidos orgânicos presente nos vinhos, para o ácido L-lático (mono-carboxílico) e dióxido de carbono, é muito interessante, pois resulta num acréscimo de pH e decréscimo da acidez titulável (BARTWOSKY, 2005; INES, 2007; BINATTI, 2015), fato observado neste estudo.

Uma vez que o experimento consistiu no uso dos isolados para fermentação em vinho tinto durante os 45 dias, também foram avaliadas as características cromáticas (Tabela 12) no intuito de acompanhar sua evolução.

A cor dos vinhos é formada pelos compostos fenólicos presentes na uva, que durante o esmagamento, a maceração e a fermentação, são difundidos no mosto e após isto, conforme o processo de envelhecimento ocorre, os mesmos são alterados devido as reações físico-químicas (MELÉNDEZ et al., 2001). As características cromáticas variam conforme as características das uvas, com as técnicas de vinificação e com as numerosas reações que têm lugar durante o armazenamento dos vinhos, com as consequentes alterações organolépticas, principalmente durante o primeiro ano após a vinificação (BIRSE, 2007).

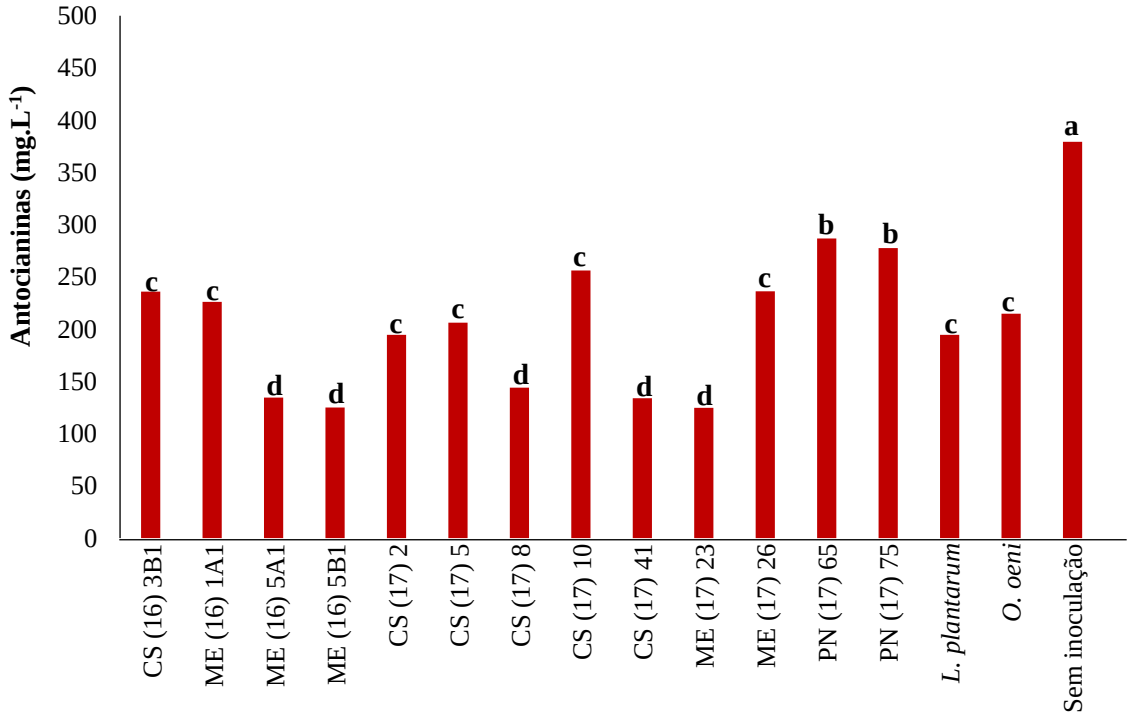
Tabela 12: Teor de antocianinas totais e características cromáticas (médias e desvio padrão) obtidas para os 13 isolados e cepas comerciais em 45 dias de FML em vinho tinto em comparação com amostra sem inoculação.

Isolado	Antocianinas totais (mg. L^{-1})	Características Cromáticas				
		420 nm Amarelo	520 nm vermelho	620 nm violeta	Intensidade (420+520+620)	Tonalidade (420/520)
CS (16) 3B1	$235,82^{c} \pm 0,02$	$0,640^{b} \pm 0,001$	$0,901^{b} \pm 0,004$	$0,210^{b} \pm 0,001$	$1,751^{b} \pm 0,001$	$0,711^{c} \pm 0,002$
ME (16) 1A1	$226,21^{c} \pm 0,01$	$0,650^{b} \pm 0,001$	$0,890^{b} \pm 0,102$	$0,220^{b} \pm 0,002$	$1,750^{b} \pm 0,002$	$0,730^{c} \pm 0,003$
ME (16) 5A1	$134,65^{d} \pm 0,02$	$0,780^{a} \pm 0,001$	$0,780^{c} \pm 0,002$	$0,170^{c} \pm 0,003$	$1,740^{b} \pm 0,002$	$1,000^{b} \pm 0,001$
ME (16) 5B1	$125,04^{d} \pm 0,02$	$0,790^{a} \pm 0,001$	$0,750^{c} \pm 0,002$	$0,211^{b} \pm 0,009$	$1,751^{b} \pm 0,012$	$1,053^{b} \pm 0,001$
CS (17) 2	$194,66^{c} \pm 0,02$	$0,781^{a} \pm 0,001$	$0,780^{c} \pm 0,002$	$0,180^{c} \pm 0,002$	$1,741^{b} \pm 0,002$	$1,000^{b} \pm 0,001$
CS (17) 5	$206,20^{c} \pm 0,07$	$0,752^{a} \pm 0,001$	$0,810^{bc} \pm 0,00$	$0,210^{b} \pm 0,009$	$1,772^{b} \pm 0,002$	$0,926^{c} \pm 0,002$
CS (17) 8	$143,88^{d} \pm 0,18$	$0,670^{b} \pm 0,001$	$0,750^{c} \pm 0,002$	$0,211^{b} \pm 0,002$	$1,631^{c} \pm 0,002$	$0,893^{c} \pm 0,002$
CS (17) 10	$216,19^{c} \pm 0,12$	$0,760^{a} \pm 0,001$	$0,760^{c} \pm 0,002$	$0,200^{b} \pm 0,003$	$1,730^{b} \pm 0,002$	$1,000^{b} \pm 0,009$
CS (17) 41	$133,99^{d} \pm 0,22$	$0,640^{b} \pm 0,001$	$0,750^{c} \pm 0,002$	$0,180^{c} \pm 0,002$	$1,570^{c} \pm 0,001$	$0,853^{c} \pm 0,009$
ME (17) 23	$124,61^{d} \pm 0,01$	$0,780^{a} \pm 0,001$	$0,770^{c} \pm 0,001$	$0,210^{b} \pm 0,002$	$1,760^{b} \pm 0,001$	$1,013^{b} \pm 0,002$
ME (17) 26	$236,25^{c} \pm 0,01$	$0,701^{bc} \pm 0,002$	$0,850^{b} \pm 0,002$	$0,160^{c} \pm 0,002$	$1,731^{b} \pm 0,002$	$0,824^{c} \pm 0,003$
PN (17) 65	$286,82^{b} \pm 0,02$	$0,640^{b} \pm 0,001$	$0,850^{b} \pm 0,002$	$0,210^{b} \pm 0,002$	$1,700^{b} \pm 0,012$	$0,753^{c} \pm 0,102$
PN (17)75	$277,76^{b} \pm 0,04$	$0,650^{b} \pm 0,001$	$0,920^{b} \pm 0,001$	$0,180^{c} \pm 0,003$	$1,750^{b} \pm 0,009$	$0,707^{c} \pm 0,002$
L. plantarum	$184,64^{c} \pm 0,13$	$0,760^{a} \pm 0,001$	$0,651^{d} \pm 0,002$	$0,190^{b} \pm 0,002$	$1,601^{c} \pm 0,009$	$1,169^{a} \pm 0,002$
O. oeni	$214,68^{c} \pm 0,02$	$0,780^{a} \pm 0,001$	$0,690^{d} \pm 0,003$	$0,210^{b} \pm 0,001$	$1,680^{c} \pm 0,002$	$1,130^{a} \pm 0,002$
Sem inoculação	$379,32^{a} \pm 0,04$	$0,551^{c} \pm 0,002$	$1,090^{a} \pm 0,009$	$0,261^{a} \pm 0,002$	$1,902^{a} \pm 0,002$	$0,505^{d} \pm 0,002$

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente a $p<0,05$, segundo ANOVA e teste de Tukey.

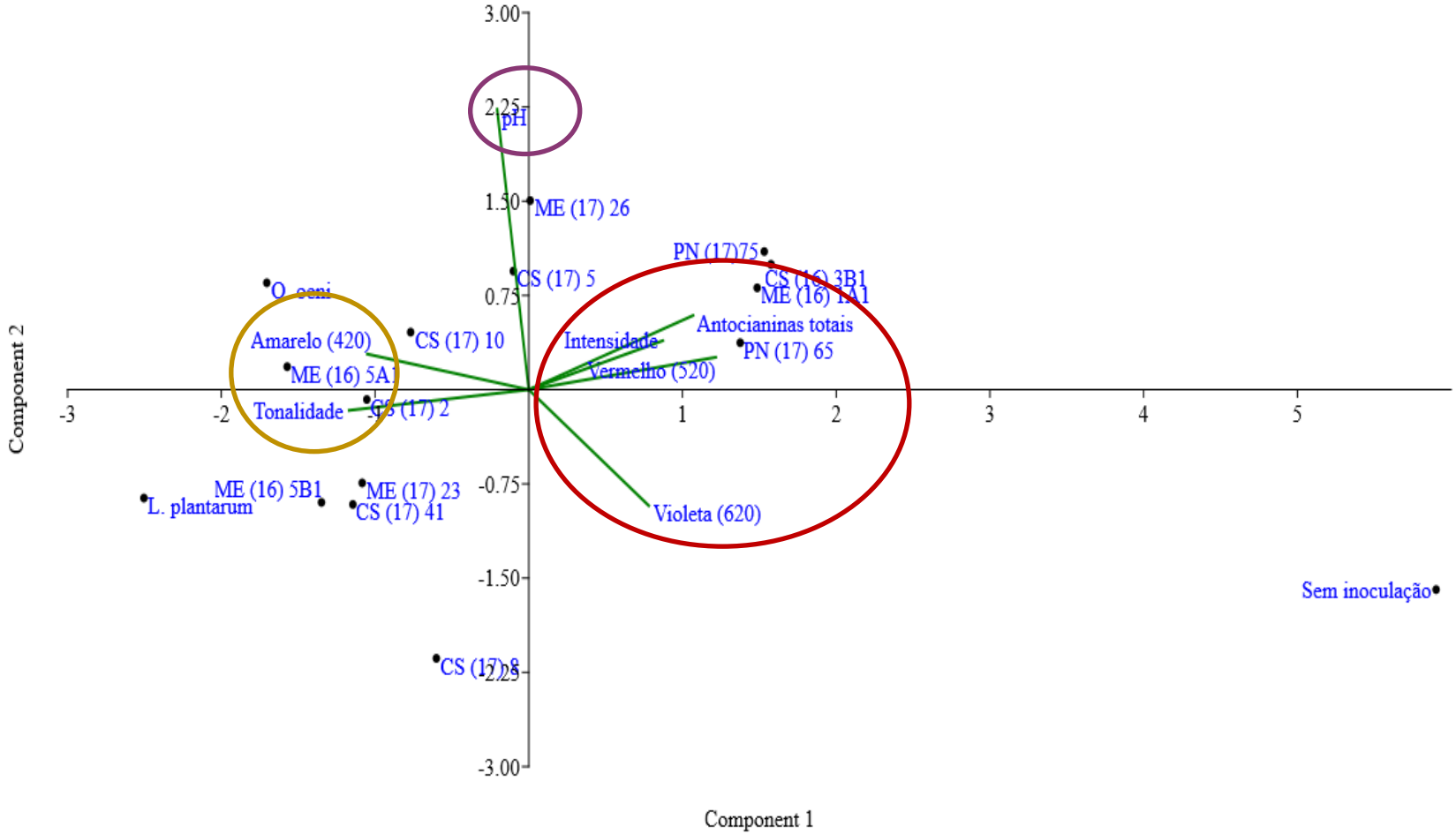
As concentrações de antocianina obtidas encontram-se na Tabela 12 e na Figura 23. O vinho controle apresentou o maior teor (379,32 mg.L^{-1}), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. O mesmo foi seguido dos isolados PN (17) 65 (286,82 mg.L^{-1}) e PN (17) 75 (277,76 mg.L^{-1}). As cepas comerciais não diferiram ($p<0,05$) dos isolados CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, CS (17) 5, CS (17) 10 e CS (17) 26, apresentando concentração média de (223,15 mg.L^{-1}). As amostras que exibiram os menores valores (131,13 mg.L^{-1}) de antocianinas foram: ME (16) 5A1, ME (16) 5B1, CS (17) 2, CS (17) 8, CS (17) 41 e ME (17) 23. Segundo Rizzon e D'all Agnol (2007) as concentrações de antocianinas nos vinhos tintos podem variar grandemente, de acordo com o cultivar de *Vitis vinífera* e diferentes tempos de maceração utilizados, sendo que quanto mais jovem o vinho maior será a proporção deste composto, percebendo-se sua diminuição durante o seu envelhecimento. Costello et al., (2012) relataram variação nos teores de antocianinas em vinhos que foram submetidos a FML, com cepas comerciais ou autóctones, e sugeriu que essas diferenças provavelmente ocorrem devido a diferenças no tempo necessário para completar FML ou diferenças na composição do vinho (pH, etanol, fonte de uvas).

Figura 23: Teores de Antocianinas obtidos para isolados, cepas comerciais e vinho sem inoculação ao final de 45 dias de FML.



No presente estudo (Figura 24), observou-se correlação entre o pH, teor de antocianinas e as características cromáticas.

Figura 24: Correlação dos parâmetros cromáticos, com o pH e o teor de antocianinas.



Observando a Figura 24, pode se dizer que quanto maior o pH do fermentado menor a sua correlação com o teor de antocianinas, pigmento vermelho e intensidade de cor. Enquanto, a correlação com a tonalidade e o pigmento amarelo foi mais próxima aos maiores valores de pH.

Ines et al., (2009) relataram que apesar da maioria das α-glucosidases serem inibidas pelas condições enológicas (pH, temperatura e etanol), durante a FML o aumento do potencial hidrogeniônico pode favorecer a atividade de algumas delas, o que possibilitaria que as mesmas hidrolisassem as antocianinas ligadas aos açúcares, libertando-as, estas tornar-se-iam menos estáveis convertendo-se em compostos castanhos ou descorados, o que não é desejável nos vinhos tintos.

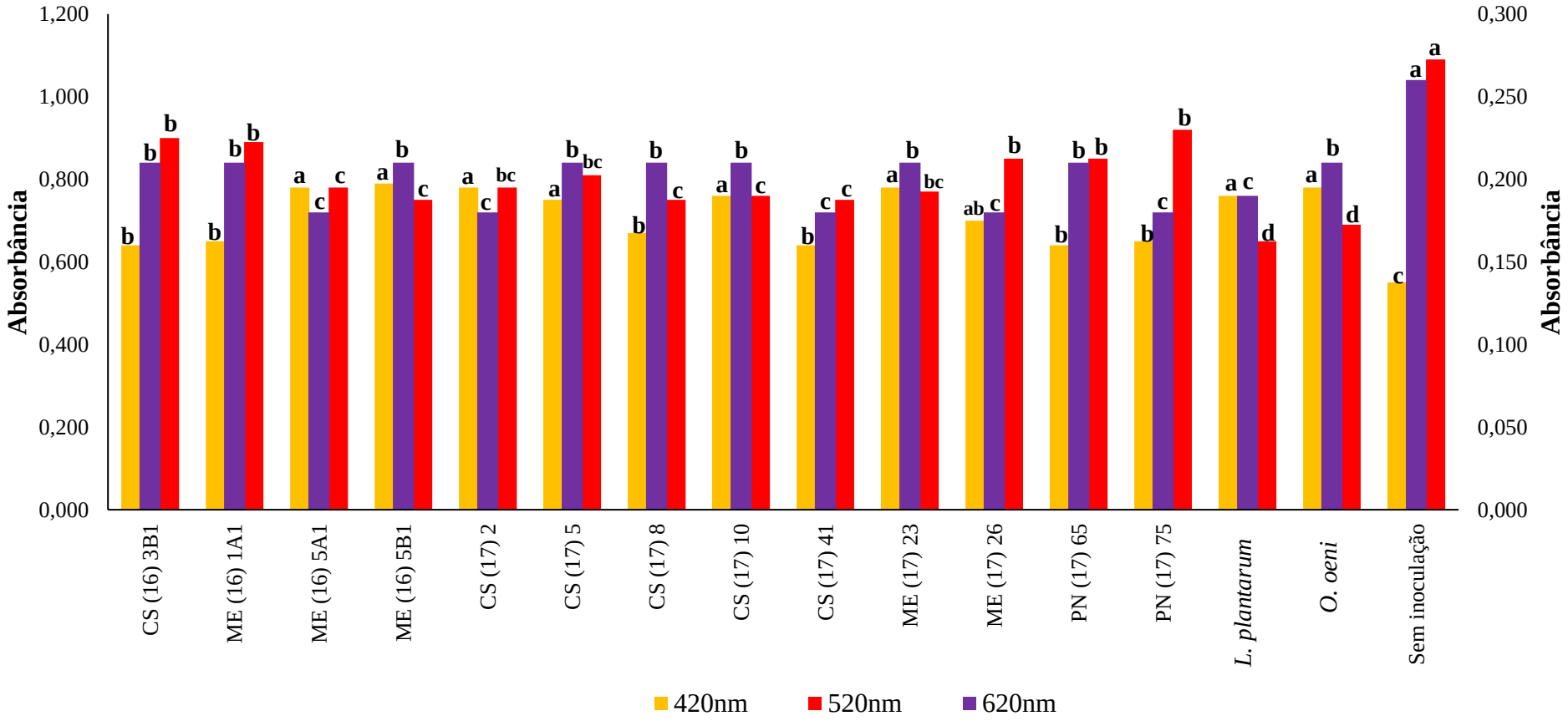
Além disso, Wells e Osborne (2012), observaram que todas as cepas de *O. oeni* testadas degradaram acetaldeído e ácido pirúvico, fato este que pode colaborar para a perda da cor nos vinhos durante a FML, uma vez que o acetaldeído desempenha um papel importante na formação estável de pigmentos, fornecendo uma ponte para a ligação de flavanóides ás antocianinas ou antocianinas a outras antocianinas (Cheynier, et al., 2006).

As absorbâncias observadas para os comprimentos de onda referentes a cor nos vinhos encontram-se na Tabela 12 e Figura 27.

Para a cor amarela (420 nm) Figura 25 e Tabela 12, todos os fermentados apresentaram diferença nas medidas quando comparados ao vinho sem inoculação ($0{,}551_{OD}$), estatisticamente ($p<0{,}05$) apenas as cepas ME (16) 5B1, CS (17) 2, CS (17) 5, CS (17) 10, ME (17) 23, tiveram resultados similares as bactérias comerciais ($0{,}660_{OD}$).

Na avaliação da cor vermelha (520 nm) Figura 25 e Tabela 12, também foi observado decréscimo ($p<0{,}05$) nos valores para todos os tratamentos quando comparados ao vinho sem inoculação ($1{,}090_{OD}$), os isolados CS (16) 3B1, CS (16) 1A1, ME (17) 26, PN (17) 65 e PN (17) 75 foram semelhantes entre si ($0{,}881_{OD}$), ME (16) 5A1, ME (16) 5B1, CS (17) 2, CS (17) 8, CS (17) 10, CS (17) 41 e ME (17) 23 exibiram absorbâncias próximas (0,760) enquanto que *L. plantarum* e *O. oeni* obtiveram o menor valor médio ($0{,}670_{OD}$). Esta disparidade nos valores obtidos para o vermelho também foi relatada para vinho Shiraz, em estudo feito por Costello et al., (2012)**,** após realização de FML com estirpes distintas de BALs. O mesmo ocorreu em vinhos P. Noir e Merlot, fermentados utilizando 3 estirpes de *O. Oeni*, sendo que a diferença observada foi de 18% menos de pigmento vermelho em comparação ao controle (BURNS, et al., 2013).

Figura 25: Histograma representando os valores obtidos para as características cromáticas ao final da fermentação malolática (45 dias) para os 13 isolados, *L. plantarum*, *O,oeni* e vinho sem inoculação.



Já para a cor violeta (620 nm) Figura 25 e Tabela 12 houve diferença estatística ($p<0,05$) entre os isolados, as cepas comerciais e o vinho sem inoculação, sendo que este último teve o maior valor ($0,260_{OD}$), seguido das bactérias comerciais e dos isolados [CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, ME (16) 5B1, CS (17) 5, CS (17) 8, CS (17) 10, ME (17) 23, PN (17) 65] ($0,211_{OD}$) e os menores valores médios ($0,170_{OD}$) para CS (16) 5A1, CS (17) 2, ME (17) 26 e PN (17) 75. Ribéreau-Gayon e Sudraud (1991) ressaltam que ao contrário do que se observa para as antocianinas totais, quanto maior a quantidade de antocianinas livres no vinho (não glicosiladas), maior é a diminuição dos valores da densidade óptica a 520 nm, pois as mesmas precipitam, e devido a esta precipitação ocorre um aumento na densidade óptica a 420 nm. Este comportamento foi observado tanto para as cepas comerciais quanto para os isolados testados, onde os valores para as cores amarela, vermelha e violeta foram proporcionais ao teor de antocianinas obtido.

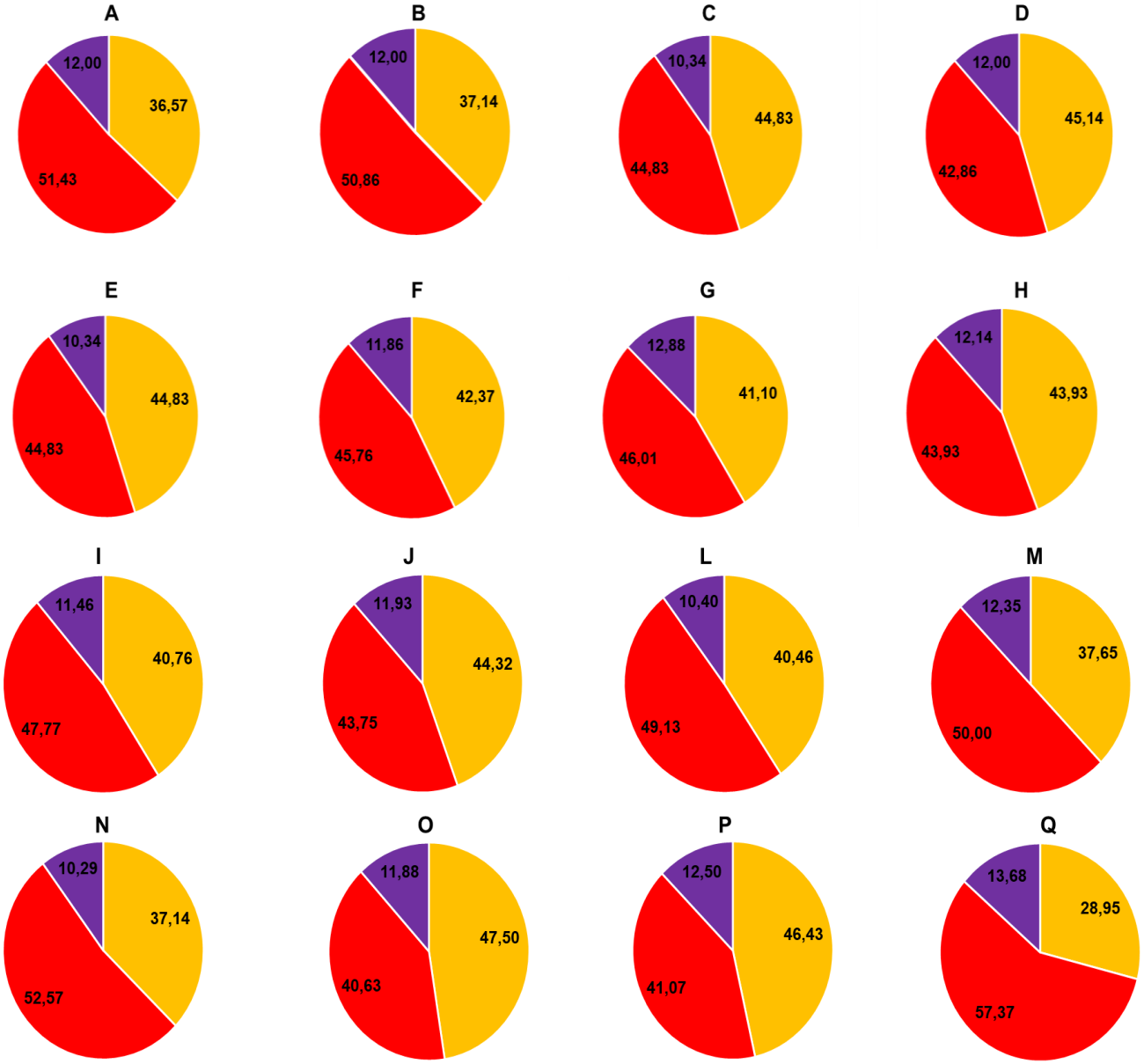
Para o parâmetro intensidade de cor (Tabela 12), o vinho sem inoculação apresentou a maior intensidade ($1,902_{OD}$), estando estatisticamente distinto de todas as demais bactérias testadas. As que exibiram os menores valores foram CS (17) 8, CS (17) 41, *L. plantarum* e *O. oeni* ($1,620_{OD}$), o que está de acordo com estudo realizado por Magyar et al., (2013) os quais relatam que a fermentação malolática conduzida utilizando-se bactérias láticas autóctones resulta em vinhos mais intensos, sendo que os mais jovens exibem maiores valores para vermelho e violeta, comportamento este que pode ser observado nos resultados apresentados na (Figura 26).

Para tonalidade (Tabela 12), que indica a importância relativa do amarelo sobre o vermelho (ZAMORA, 2003), a maior medida obtida foi a das cepas comerciais ($1,149_{OD}$), enquanto o menor valor foi o do vinho controle ($0,505_{OD}$). Todos os isolados exibiram valores intermediários, corroborando com as absorbâncias encontradas para o amarelo, vermelho e teor de antocianinas.

Em relação a colaboração de cada comprimento de onda na composição da cor (Figura 28) o vinho sem inoculação apresentou maior percentual de pigmento vermelho (57,37 %) e o menor de amarelo (28,95 %), seguido de PN (17) 75, CS (16) 3B1, ME (16) 1A1 e PN (17) 65, em contrapartida as cepas comerciais exprimiram percentagem menor de pigmento vermelho e maior de amarelo, sendo *L. plantarum* (V-40,63 % e A-47,50 %) e *O. oeni* (V-41,07 % e A-46,43 %), valores estes que ratificam os resultados obtidos para a intensidade de cor e tonalidade. Diversos autores reportam que a FML influencia consideravelmente na cor dos vinhos tintos (BURNS, et al., 2013; IZQUIERDO-CAÑAS et al., 2016), interferindo especialmente na leitura de 420 nm, (taninos condensados) e 520 nm (antocianinas e

catequinas), uma vez que a mesma afeta diretamente estes compostos (BURNS, et al., 2015) devido a mudança de pH que ocorre durante a sua realização.

Figura 26: Contribuição percentual dos pigmentos amarelo, vermelho e violeta para a composição global da cor dos vinhos estudados. (A) – CS(16) 3B1; (B) ME (16) 1A1; (C) ME (16) 5A1; (D) ME (16) 5B1; (E) CS (17) 2; (F) CS (17) 5; (G) CS (17) 8; (H) CS (17) 10; (I) CS (17) 41; (J) ME (17) 23; (L) ME (17) 26; (M) PN (17) 65; (N) PN (17) 75; (O) *L. plantarum*; (P) *O. oeni* e (Q) sem inoculação.



Na Tabela 13, encontram-se os resultados dos parâmetros cinéticos e estequiométricos para os isolados e as cepas comerciais após 1080 horas de FML. Na Figura 27, pode-se observar

a evolução das curvas de crescimento ($_{OD}$), consumo de ácido L-málico (r_s), produção de ácido L-lático (r_p) durante os 45 dias fermentação malolática em vinho tinto.

Tabela 13: Parâmetros cinéticos e estequiométricos obtidos para os 13 isolados e cepas comerciais em 45 dias de FML (1080 h) em vinho tinto.

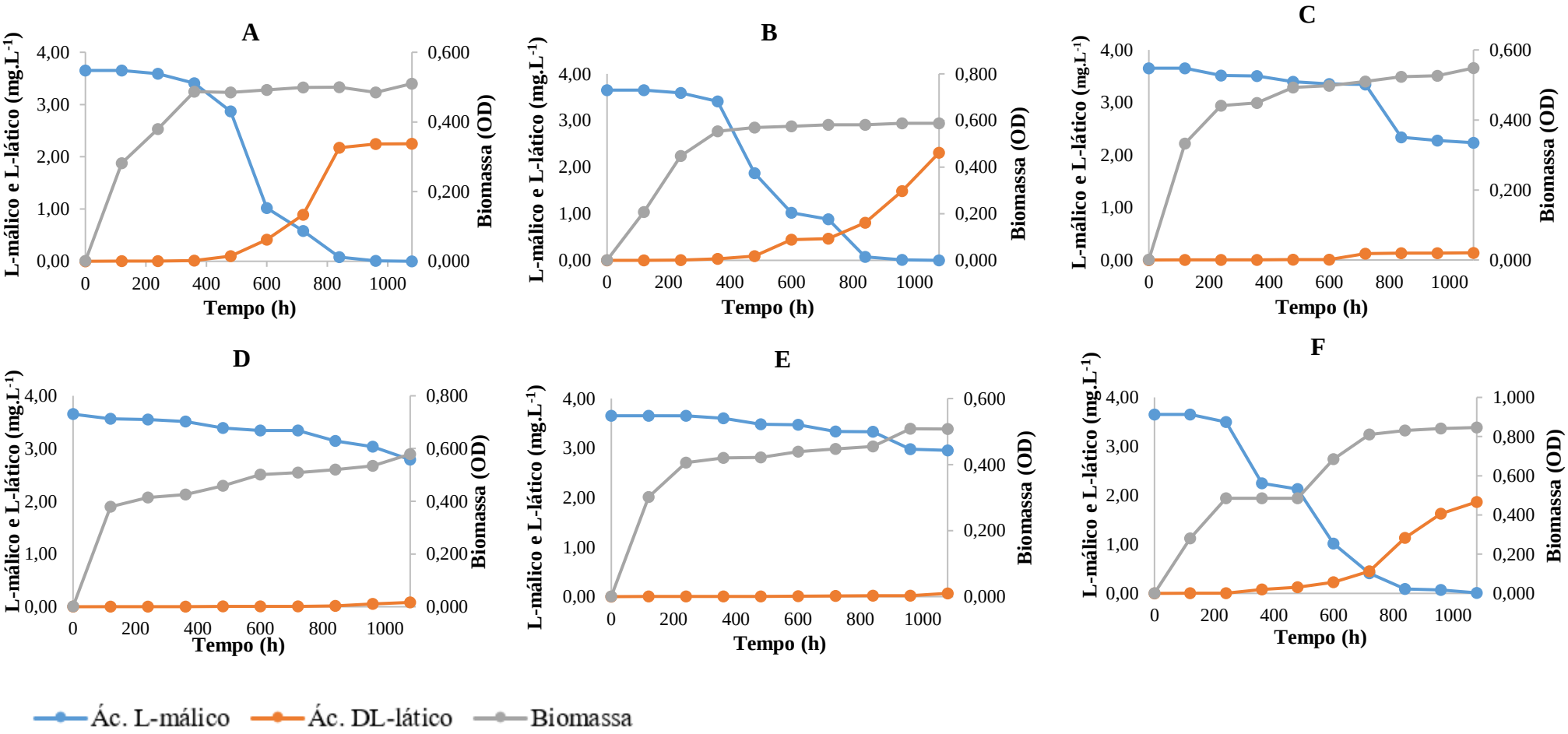
Isolados	Parâmetros Cinéticos/Estequiométricos				
	Biomassa ($_{OD}$)	**r_s ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)**	**r_p ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)**	**$Y_{p/s}$**	**Rendimento (%)**
CS (16) 3B1	$0,510^{d} \pm 0,001$	$3,35^{a} \pm 0,01$	$2,08^{a} \pm 0,02$	$620,13^{a} \pm 0,01$	$97^{a} \pm 1$
ME (16) 1A1	$0,590^{d} \pm 0,000$	$3,35^{a} \pm 0,05$	$2,13^{a} \pm 0,02$	$636,41^{a} \pm 0,01$	$99^{a} \pm 2$
ME (16) 5A1	$0,550^{d} \pm 0,002$	$1,28^{d} \pm 0,01$	$0,12^{c} \pm 0,01$	$97,70b^{c} \pm 0,06$	$06^{d} \pm 2$
ME (16) 5B1	$0,580^{d} \pm 0,003$	$0,77^{e} \pm 0,01$	$0,07^{c} \pm 0,01$	$96,89^{c} \pm 0,06$	$03^{d} \pm 2$
CS (17) 2	$0,510^{d} \pm 0,003$	$0,62^{e} \pm 0,02$	$0,06^{c} \pm 0,01$	$98,36^{c} \pm 0,08$	$03^{d} \pm 1$
CS (17) 5	$0,850^{a} \pm 0,002$	$3,34^{a} \pm 0,03$	$1,72^{a} \pm 0,01$	$516,32^{a} \pm 0,12$	$83^{b} \pm 3$
CS (17) 8	$0,680^{c} \pm 0,004$	$2,23^{b} \pm 0,05$	$0,08^{c} \pm 0,05$	$40,13^{d} \pm 0,04$	$04^{d} \pm 3$
CS (17) 10	$0,570^{d} \pm 0,001$	$2,97^{b} \pm 0,12$	$1,21^{b} \pm 0,08$	$436,00^{b} \pm 0,01$	$69^{c} \pm 1$
CS (17) 41	$0,780^{b} \pm 0,014$	$1,32^{d} \pm 0,13$	$0,03^{c} \pm 0,12$	$25,92^{e} \pm 0,01$	$01^{d} \pm 4$
ME (17) 23	$0,750^{b} \pm 0,002$	$1,76^{c} \pm 0,08$	$0,05^{c} \pm 0,01$	$28,81^{e} \pm 0,05$	$02^{d} \pm 3$
ME (17) 26	$0,780^{b} \pm 0,006$	$3,35^{a} \pm 0,01$	$2,05^{a} \pm 0,01$	$610,92^{a} \pm 0,01$	$95^{a} \pm 2$
PN (17) 65	$0,540^{d} \pm 0,004$	$3,33^{a} \pm 0,05$	$2,00^{a} \pm 0,01$	$597,51^{a} \pm 0,01$	$97^{a} \pm 2$
PN (17)75	$0,440^{e} \pm 0,003$	$3,34^{a} \pm 0,02$	$1,92^{a} \pm 0,03$	$574,86^{a} \pm 0,11$	$93^{a} \pm 2$
L. plantarum	$0,670^{c} \pm 0,001$	$3,33^{a} \pm 0,01$	$1,82^{a} \pm 0,01$	$548,30^{a} \pm 0,02$	$88^{ab} \pm 1$
O. oeni	$0,580^{d} \pm 0,001$	$3,35^{a} \pm 0,01$	$2,14^{a} \pm 0,02$	$637,51^{a} \pm 0,03$	$99^{a} \pm 1$

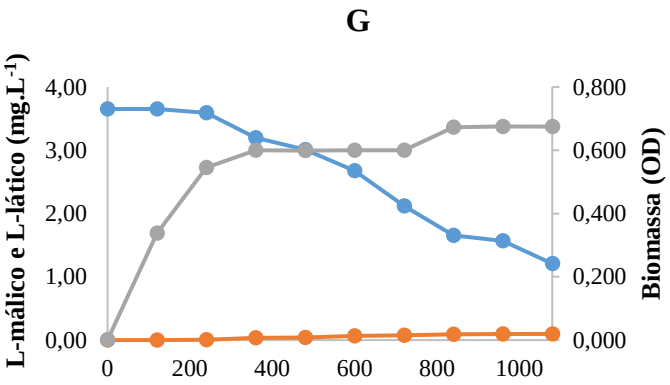
*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente a p<0,05, segundo ANOVA e teste de Tukey.
** r_S: consumo de substrato; r_P: formação de produto; $y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto.

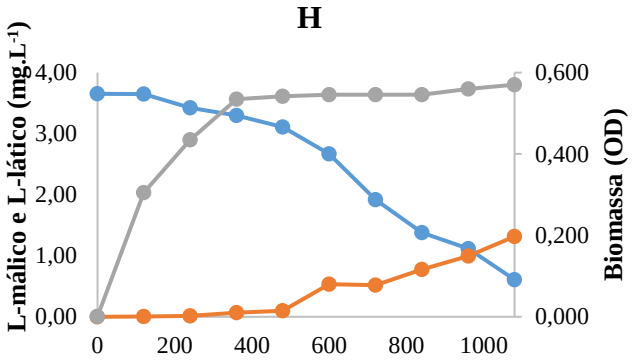
A cepa comercial *O. oeni* apresentou biomassa ($0,58_{OD}$) similar aos isolados CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, ME (16) 5A1, ME (16) 5B1 e CS (17) 2. Enquanto, que o *L. plantarum* exibiu valor ($0,67_{OD}$) estatisticamente igual ao isolado CS (17) 8, (Tabela 13). DIERINGS et al., (2013) obtiveram taxas de crescimento entre 0,28 a $1,49_{OD}$ para BALs autóctones isoladas de maçã durante FML em sidra, similares a este estudo. Porém, para Guilherme et al., (2009) o crescimento ($2,8_{OD}$) foi quase dez vezes superior utilizando suco de caju e meio com 125 $g.L^{-1}$ açúcares totais. De acordo com Ines (2007), as BALs dão preferência por consumir pentoses e hexoses primordialmente e somente quando estas são exauridas do meio, as mesmas passam a degradar as demais fontes de carbono disponíveis, como o ácido L-málico.

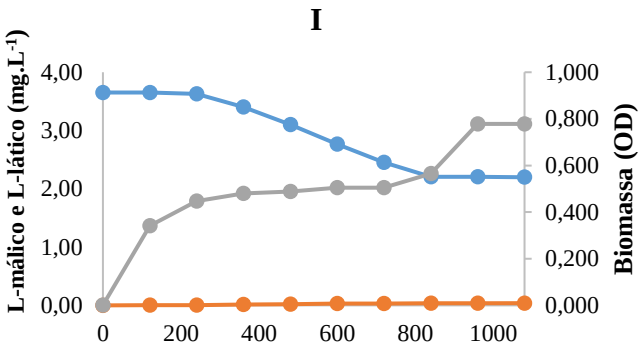
Para o consumo de substrato (r_s) (Tabela 13), as cepas *O. oeni* e *L. plantarum* foram os que mais se destacaram, com uma média para descarboxilação de ácido L-málico de 3,34 $mg.L^{-1}.h^{-1}$, seguidos dos isolados CS (15) 3B1, ME (16) 1A1, CS (17) 5, ME (17) 26, PN (17) 65 e PN (17) 75.

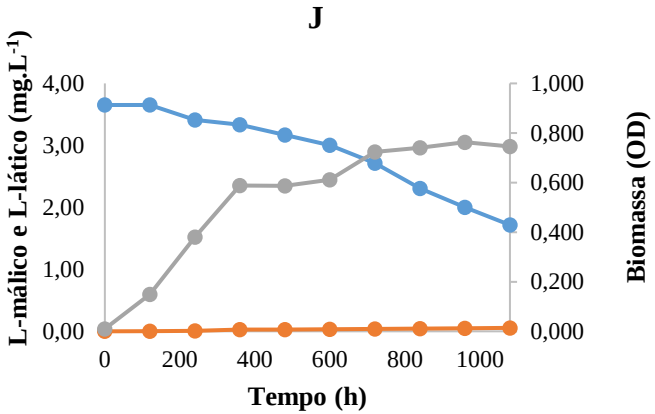
Figura 27: Cinética de crescimento celular (biomassa), consumo de ácido L-málico e síntese de ácido L-lático durante 45 dias (1080 hs) de FML em vinho tinto: (A) – CS(16) 3B1; (B) ME (16) 1A1; (C) ME (16) 5A1; (D) ME (16) 5B1; (E) CS (17) 2; (F) CS (17) 5; (G) CS (17) 8; (H) CS (17) 10; (I) CS (17) 41; (J) ME (17) 23; (L) ME (17) 26; (M) PN (17) 65; (N) PN (17) 75; (O) *L. plantarum*; (P) *O. oeni*.

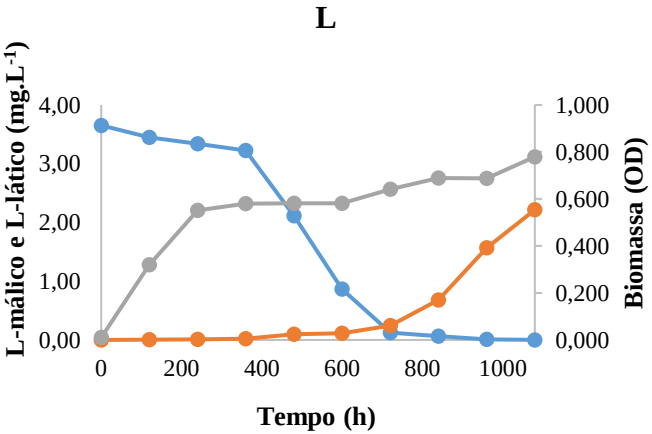


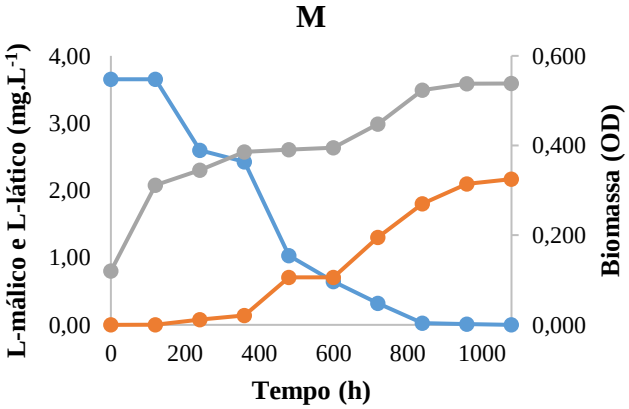

G
L-málico e L-lático (mg.L-1)
Biomassa (OD)
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
0
200
400
600
800
1000

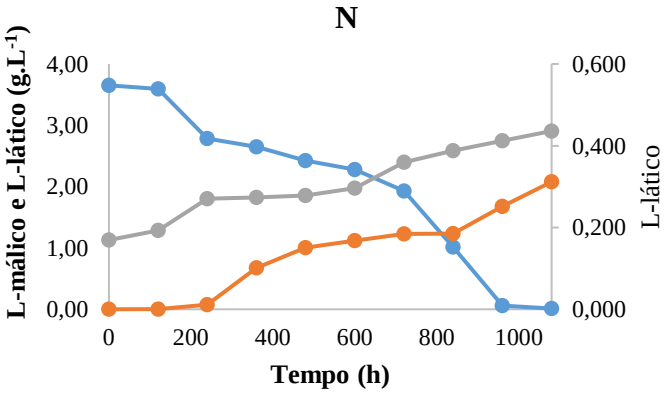

H
L-málico e L-lático (mg.L-1)
Biomassa (OD)
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
0,600
0,400
0,200
0,000
0
200
400
600
800
1000

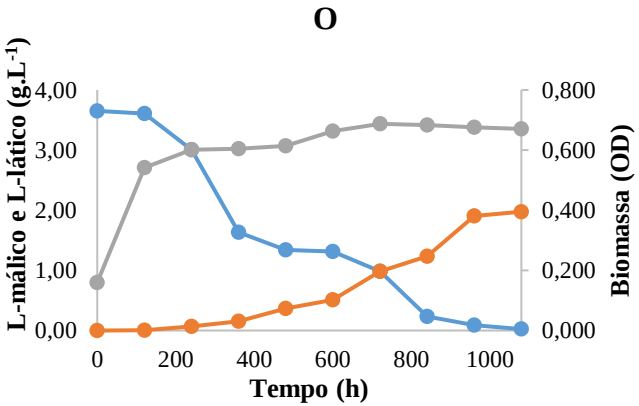

I
L-málico e L-lático (mg.L-1)
Biomassa (OD)
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
1,000
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
0
200
400
600
800
1000

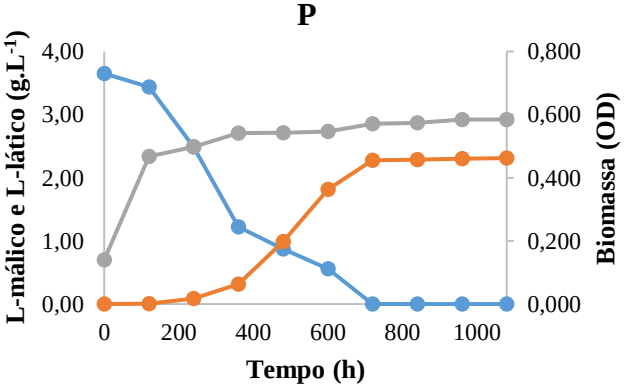

J
L-málico e L-lático (mg.L-1)
Biomassa (OD)
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
1,000
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
0
200
400
600
800
1000
Tempo (h)


L
L-málico e L-lático (mg.L-1)
Biomassa (OD)
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
1,000
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
0
200
400
600
800
1000
Tempo (h)


M
L-málico e L-lático (mg.L-1)
Biomassa (OD)
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
0,600
0,400
0,200
0,000
0
200
400
600
800
1000
Tempo (h)


N
L-málico e L-lático (g.L-1)
L-lático
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
0,600
0,400
0,200
0,000
0
200
400
600
800
1000
Tempo (h)


O
L-málico e L-lático (g.L-1)
Biomassa (OD)
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
0
200
400
600
800
1000
Tempo (h)


P
L-málico e L-lático (g.L-1)
Biomassa (OD)
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
0
200
400
600
800
1000
Tempo (h)

No entanto, os menores valores para a degradação do malato foram das cepas autóctones ME (16) 5B1 e CS (17) 2, 0,77 e 0,62 $mg.L^{-1}.h^{-1}$, respectivamente. Para Bravo-Ferrada et al., (2016), o consumo de substrato médio, foi de 3,2 $mg.L^{-1}.h^{-1}$, em 96 h de cultivo, empregando BALs isoladas na Patagônia (gênero *Lactobacillus*), em meio vínico (ácido tartárico 5 $g.L^{-1}$, ácido L-málico 4,5 $g.L^{-1}$, ácido acético 0,6 $g.L^{-1}$, glicose 2 $g.L^{-1}$, frutose 2 $g.L^{-1}$, 14 % etanol v/v e pH 3.5).

Os resultados obtidos para a formação de produto (r_p), foram proporcionais aos valores de consumo do substrato (Figura 27). A maior eficiência foi observada para as cepas comerciais e os isolados CS (15) 3B1, ME (16) 1A1, CS (17) 5, ME (17) 26, PN (17) 65 e PN (17) 75, com valores médios para a síntese de lactato de 2 $mg.L^{-1}.h^{-1}$. No entanto, os menores valores para produção do ácido L-lático cepas autóctones ME (16) 5B1 e CS (17) 2, esta correlação está apresentada na Figura 29 A-P. Em fermentação de suco de caju Guilherme et al., (2009), utilizando *L. mesenteroides* obtiveram resultados superiores aos deste estudo, com meio de cultura contendo inicialmente 125 $g.L^{-1}$ açúcares totais, indicando que a BAL utilizaram a glicólise para sintetizar o lactato. Em FML utilizando cepas comerciais de *O. oeni*, Peixoto (2012) observou valor médio de 3,28 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ síntese de lactato durante 336 h de ensaio.

O fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) apresentou valores elevados para os micro-organismos que apresentaram o maior consumo de substrato (r_s) e maior produtividade (r_p). O rendimento (%) foi calculado a partir da razão da concentração de ácido L-lático teórica e experimental, multiplicado por 100 e os dados estão elencados na Tabela 13. A cepa *O. oeni* apresentou 99 % de rendimento, sendo estatisticamente igual aos isolados: CS (16) 3B1 – 97 %, ME (16) 1A1 – 99 %, ME (17) 26 – 95 %, PN (17) 65 – 97 % e PN (17) 75 – 93 %. Já para *L. plantarum* o rendimento foi de 88 % semelhante a cepa CS (17) 5. O micro-organismo autóctone CS (17) 10 apresentou valor de 69 % de rendimento. Os demais isolados tiveram rendimento inferior a 10 % na síntese de lactato. Carvalho (2011) utilizou BALs isoladas e *L. casei* para fermentação de cachaça, as mesmas apresentaram rendimentos de 25 e 58 %, respectivamente.

5.4 PERFIL GENOTÍPICO - IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BAL SELECIONADAS

Para os ensaios de PCR-RAPD e 16S rDNA, foram selecionadas as 6 cepas autóctones do ensaio em vinho tinto após os 45 dias de fermentação (Tabela 15), que apresentaram

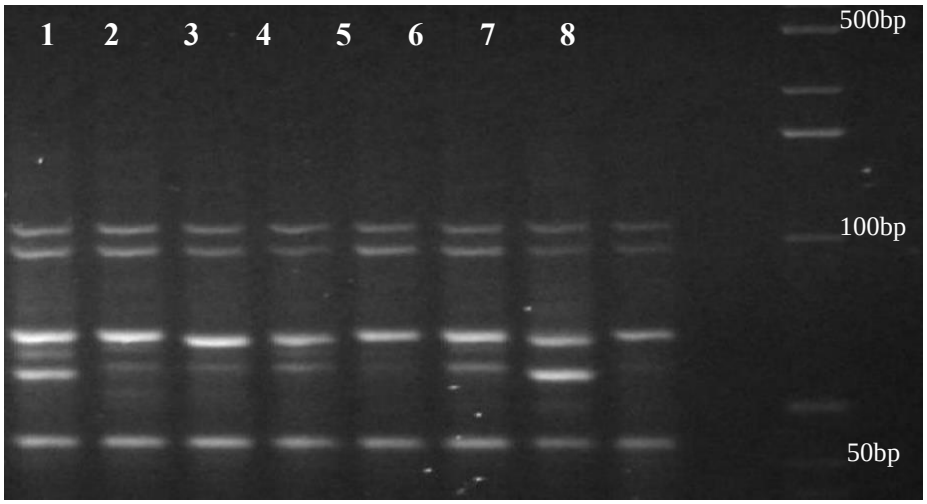
resultados estatisticamente similares ou superiores às bactérias comerciais *L. plantarum* e *O. oeni* para: pH, acidez total titulável, teor de ácido L-málico e L-lático, concentração de antocianinas, tonalidade, percentual de pigmento vermelho, formação de produto, taxa de conversão de substrato em produto e percentagem de rendimento.

Para o ensaio de RAPD os primers selecionados resultaram em 76 fragmentos, sendo 63,2 % polimórficos e 36,8 % monomórficos. A quantidade de bandas por primer (Tabela 14) variou entre 6 e 9, como pode ser visto na Figura 28, que apresenta as bandas para o primer OPA 12. Não houve bandas específicas.

Tabela 14: Lista de Iniciadores (primers), sequência de nucleotídeos e número de fragmentos observados.

Primer	Sequência (5'-3')	Número de bandas
OPA 09	GGGTAACGCC	10
OPA 11	CAATCGCCGT	9
OPA 12	TCGGCGATAG	6
OPA 16	AGCCAGCGAA	10
OPA 20	GTTGCGATCC	12
OPX 02	TTCCGCCACC	8
OPX 08	CAGGGGTGGA	9
OPB 01	GTTTCGCTCC	10
	Total de bandas	74

Figura 28: Gel de RAPD para o primer OPA 12. Na sequência: (1) - *L. plantarum*, (2) - CS (17) 5, (3) - CS (16) 3B1, (4) - ME (17) 26, (5) - ME (16) 1A1, (6) - PN (17) 65, (7) - PN (17) 75, (8) - *O. oeni* e o marcador de peso molecular.



Fonte: autor (2018).

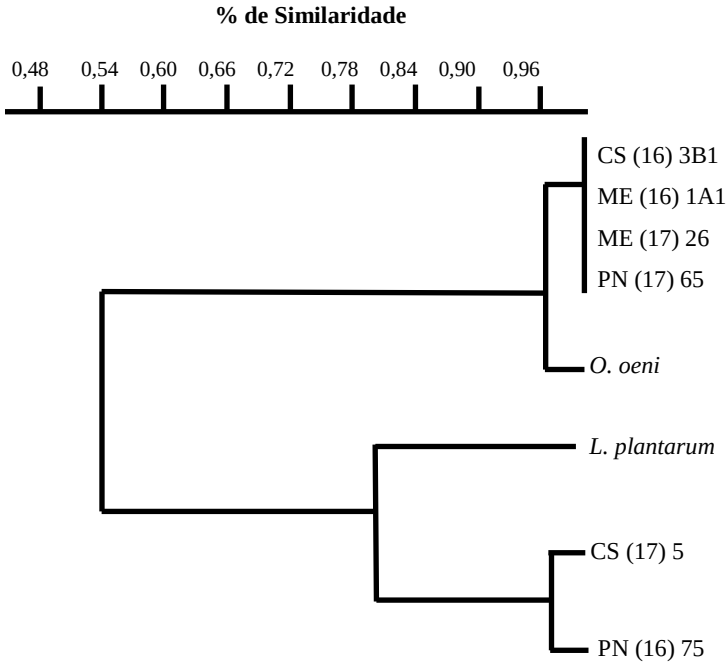
Tabela 15: Isolados selecionados para fermentação em vinho tinto – critérios.

Seleção	Isolados	Parâmetros de seleção									
		Físico-químicos				Cromáticos			Cinéticos		
		pH ≥ 3,27	**ATT ≤ 4,47 g.L^{-1}**	**L-málico ≤ 0,60 g.L^{-1}**	**L-lático ≥ 1,98 g.L^{-1}**	**Antocianina ≥ 184 mg.L^{-1}**	**Tonalidade ≤ 0,926$_{OD}$**	**Vermelho ≥ 45 %**	**r_p ≥ 0,0017 g.L^{-1}.h^{-1}**	**$Y_{p/s}$ ≥ 0,516325**	**Rendimento ≥ 80 %**
1	CS (16) 3B1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	ME (16) 1A1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	ME (16) 5A1	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-
	ME (16) 5B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CS (17) 2	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-
3	CS (17) 5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	CS (17) 8	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-
	CS (17) 10	X	X	X	X	X	-	-	-	-	-
	CS (17) 41	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-
	ME (17) 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	ME (17) 26	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	PN (17) 65	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	PN (17)75	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

*Onde X, representa que o micro-organismo atendeu ao critério.

Com base no dendrograma apresentado (Figura 29), observa-se a formação de dois grupos distintos (corte em 0,54), onde encontram-se respectivamente: a) grupo 1 - as BALs em formato de cocos (96 % de similaridade): *O. oeni* e os isolados CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, ME (17) 26, e PN (17) 65, os quais tem 100 % de similaridade, com elevada probabilidade de serem o mesmo micro-organismo; e b) grupo 2 – as BALs em forma de bacilos (78 % de semelhança): *L. plantarum* e os micro-organismos autóctones CS (17) 5 e PN (17) 75, os quais possuem 94 % de semelhança entre si.

Figura 29: Dendrograma obtido pela análise de PCR-RAPD, utilizando o índice de Similaridade de Jaccard.



Zavaleta et al., (1997) observaram este mesmo padrão de agrupamento para bactérias isoladas de vinho utilizando o ensaio de RAPD. Manera et al., (2017), em estudo com 16 cepas autóctones de BALs provenientes da Patagônia, utilizaram a técnica de PCR-RAPD com o primer M13, e obtiveram 12 genótipos, com a formação de 2 grupos onde alocaram-se separadamente cocos e bacilos.

A partir dos resultados obtidos com a técnica de RAPD ficou evidente que existem micro-organismos idênticos presentes em diferentes variedades de *Vitis vinifera* e que para diferenciá-los é necessário o uso de métodos genotípicos específicos, incluíndo 16S rDNA, PCR multiplex e sequenciamento genético (DICKS e ENDO, 2009).

A primeira descrição do uso da técnica 16S ARDRA em BALS isoladas do vinho foi feita por Rodas et al., (2003), neste estudo o método foi capaz de discriminar 32 das 36 espécies de referência testadas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Weissella*. Os autores concluíram que o protocolo descrito permite uma rápida e confiável identificação em nível de espécie da maioria das bactérias presentes no processo de vinificação, mas apresenta uma limitação quando os organismos apresentam uma grande homologia na sequência do rDNA 16S, porém *L. plantarum* e *L. pentosaceus* não são diferenciados por esta técnica, sendo necessária realização de PCR multiplex (DICKS e ENDO, 2009).

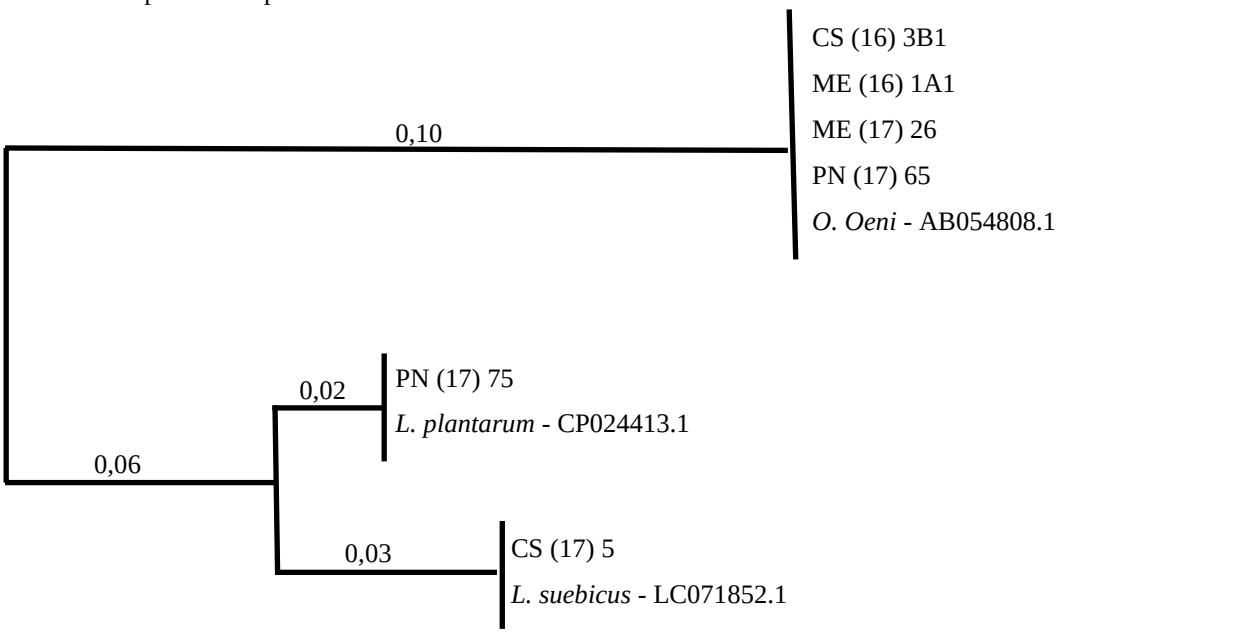
As sequências obtidas via 16S rDNA para os 6 isolados e as 2 bactérias comerciais em comparação com os dados disponíveis no GenBank, permitiram sua identificação conforme Tabela 16 e Figura 30.

Tabela 16: Identidade genética dos isolados e bactérias 'starter' comerciais.

Isolado	Classificação	E. value	Identidade	Acessos
COM 1	*Oenococcus oeni*	0.0	99%	AB054808.1
CS (16) 3B1	*Oenococcus oeni*	0.0	90%	AB054808.1
ME (16) 1A1	*Oenococcus oeni*	0.0	97%	AB054808.1
ME (17) 26	*Oenococcus oeni*	0.0	98%	AB054808.1
PN (17) 65	*Oenococcus oeni*	0.0	97%	AB054808.1
CS (17) 5	*L. suebicus*	0.0	95%	LC071852.1
PN (17) 75	*L. plantarum*	0.0	96%	CP024413.1
COM 2	*L. plantarum*	0.0	99%	CP024413.1

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

Figura 30: Árvore filogenética obtida através de 16S rDNA, estabelecida pelo método de Máxima Verossimilhança com Bootstrap de 500 réplicas.



Os cocos isolados [CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, ME (17) 26, PN (17) 65] e a bactéria comercial (COM1) demonstraram similaridade superior a 90% com o acesso realizado GenBank referente a espécie *Oenococcus oeni* (AB054808.1), conforme Tabela 16 e Figura 30. Conforme Lorentzen e Lucas (2019), na literatura existem apenas 3 espécies de *Oenococcus* descritas, obtidas de diferentes substratos, *O. oeni* (uvas, mosto e vinho), *O. kitaharae* (Shochu – fermentado japonês de arroz e batata) e *O. alcoholitolerans*, a terceira e mais recentemente espécie descrita do gênero (cachaça e bioetanol). Este último micro-organismo tolera até 48% de teor alcoólico e apresenta o gene da enzima malolática, porém sua capacidade de conduzir a FML ainda não foi testada (CIBRARIO et al., 2016).

Para os bacilos (Tabela 16 e Figura 30), identificou-se que o isolado CS (17) 5 foi 95 % similar a *L. suebicus* (LC071852.1). Luz (2018) descreveu o isolamento do mesmo micro-organismo em amostras de vinho C. Sauvignon e Isabel na Serra Gaúcha. Apesar de o mesmo não ter sido descrito até o momento como precursor de FML nesta região, o mesmo apresenta características desejáveis para sua realização: é uma bactéria hetero-fermentativa, produz CO_2, etanol, acetato e DL-Lactato a partir de glicose e ácido L-málico (DICKS e ENDO, 2009), além de ser utilizada para fermentação de cidra na Espanha (PUERTAS et al., 2014). Além disso, em ensaio de FML (LUZ, 2018), esta espécie suportou de 40 a 60 $mg.L^{-1}$ de metabissulfito de potássio, o que é de bastante interesse na indústria vinícola, uma vez que este composto é utilizado como conservante. A cepa autóctone PN (17) 75 foi 96 % correspondente a *L. plantarum* (CP024413.1), esta última é amplamente utilizada na FML, por tolerar etanol em níveis supériores a 15 % e pH abaixo de 3,0 (LERENA et al., 2016).

5.5 MICROVINIFICAÇÃO

Para o ensaio de microvinificação foram escolhidos os isolados das variedades de C. Sauvignon e Merlot geneticamente similares a *O. oeni* [CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, ME (17) 26)] e *L. suebicus* [CS (17) 5], conforme Quadro 4. O experimento foi conduzido por 45 dias, a cada 5 dias coletou-se 0,5 mL de amostra com pipeta estéril para avaliação da evolução da FML por cromatografia em papel.

Quadro 4: Tratamentos, padrão, controle e testemunha da FML em vinho tinto.

Bloco 1 **Vinho C. Sauvignon**	**Bloco 2** **Vinho Merlot**
Isolado CS (16) 3B1	Isolado ME (16) 1A1
Isolado CS (17) 5	Isolado ME (17) 26
O. oeni - padrão	*O. oeni* - padrão
Controle CS	Controle ME
Testemunha CS	Testemunha ME

5.5.1 Análises físico-químicas

Para as Análises físico-químicas, além dos isolados (tratamentos), foi utilizada uma estirpe comercial de *O. oeni* (padrão), o vinho sem inoculação (controle) e o vinho antes do início da FML (testemunha).

Os resultados obtidos para as análises físico-químicas e cromáticas para os vinhos de C. Sauvignon encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17: Parâmetros físico-químicos e características cromáticas (médias e desvio padrão) avaliados após 45 dias, ao final da FML para vinho C. Sauvignon.

Amostras C. Sauvignon	**Parâmetros físico-químicos**						
	Álcool (%)	**pH**	**ATT ($g.L^{-1}$)**	**AV ($g.L^{-1}$)**	**L-málico ($g.L^{-1}$)**	**L-lático ($g.L^{-1}$)**	**Açúcares ($g.L^{-1}$)**
CS (16) 3B1	$10,78^{a} \pm 0,04$	$3,30^{a} \pm 0,01$	$4,68^{b} \pm 0,05$	$0,78^{c} \pm 0,08$	$0,02^{c} \pm 0,01$	$1,81^{a} \pm 0,04$	$2,75^{a} \pm 0,07$
CS (17) 5	$10,79^{a} \pm 0,01$	$3,27^{a} \pm 0,00$	$4,63^{b} \pm 0,05$	$1,05^{a} \pm 0,04$	$0,21^{b} \pm 0,07$	$1,61^{b} \pm 0,05$	$2,77^{a} \pm 0,12$
O. oeni	$10,78^{a} \pm 0,04$	$3,30^{a} \pm 0,02$	$4,68^{b} \pm 0,03$	$0,87^{b} \pm 0,12$	$0,01^{c} \pm 0,08$	$1,84^{a} \pm 0,11$	$2.75^{a} \pm 0,04$
Controle CS	$10,80^{a} \pm 0,14$	$3,18^{b} \pm 0,01$	$7,11^{a} \pm 0,06$	$0,90^{b} \pm 0,08$	$3,18^{a} \pm 0,08$	$0,06^{c} \pm 0,01$	$2,85^{a} \pm 0,06$
Testemunha CS	$10,72^{a} \pm 0,03$	$3,17^{b} \pm 0,01$	$7,12^{a} \pm 0,01$	$0,73^{c} \pm 0,04$	$3,24^{a} \pm 0,04$	$0,01^{c} \pm 0,02$	$2,88^{a} \pm 0,05$
Amostras C. Sauvignon	**Parâmetros cromáticos**						
	Antocianinas ($mg.L^{-1}$)	**420nm amarelo**	**520nm vermelho**	**620nm violeta**	**Intensidade**	**Tonalidade**	**IPT**
CS (16) 3B1	$243,20^{c} \pm 0,08$	$0,559^{a} \pm 0,001$	$1,081^{a} \pm 0,002$	$0,230^{a} \pm 0,001$	$1,870^{a} \pm 0,001$	$0,517^{b} \pm 0,014$	$1031^{a} \pm 12$
CS (17) 5	$272,95^{b} \pm 0,05$	$0,549^{a} \pm 0,001$	$1,021^{ab} \pm 0,001$	$0,220^{a} \pm 0,001$	$1,790^{b} \pm 0,002$	$0,538^{b} \pm 0,015$	$1022^{a} \pm 45$
O. oeni	$249,48^{c} \pm 0,12$	$0,561^{a} \pm 0,002$	$0,941^{b} \pm 0,001$	$0,223^{a} \pm 0,001$	$1,725^{c} \pm 0,002$	$0,596^{a} \pm 0,009$	$1028^{a} \pm 17$
Controle CS	$313,89^{a} \pm 0,26$	$0,551^{a} \pm 0,001$	$1,092^{a} \pm 0,002$	$0,240^{a} \pm 0,002$	$1,883^{a} \pm 0,002$	$0,505^{c} \pm 0,010$	$1032^{a} \pm 27$
Testemunha CS	$315,23^{a} \pm 1,05$	$0,555^{a} \pm 0,001$	$1,102^{a} \pm 0,001$	$0,251^{a} \pm 0,001$	$1,908^{a} \pm 0,012$	$0,504^{c} \pm 0,008$	$1035^{a} \pm 34$

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente a $p<0,05$, segundo ANOVA e teste de Tukey.

Nas amostras inoculadas em vinho C. Sauvignon, o teor alcoólico não apresentou discrepância significativa entre o controle e os fermentados, com valores médios de 10,78 %. No entanto, o pH e a acidez total dos tratamentos diferiram significativamente ($p<0,05$) do controle (pH 3,18 e acidez 7,11 $g.L^{-1}$). O CS (16) 3B1, CS (17) 5 e *O. oeni* apresentaram pH mais elevado (3,30, 3,27 e 3,30) e menor acidez total (4,68, 4,63 e 4,68 $g.L^{-1}$ ác. tartárico). Para a acidez volátil, geralmente associada ao aroma de vinagre, o maior valor (1,05 $g.L^{-1}$ de ácido acético) foi do isolado CS (17) 5, e o menor (0,78 $g.L^{-1}$ de ácido acético) do isolado CS (16) 3B1. O controle, juntamente com a testemunha demonstraram os maiores valores para ácido L-málico (3,18 e 3,24 $g.L^{-1}$) e os menores para o L-lático (0,06 e 0,01 $g.L^{-1}$); CS (16) 3B1 e *O. oeni* exibiram comportamento similares entre si ($p>0,05$), com malato de 0,02 e 0,01 $g.L^{-1}$ e lactato de 1,81 e 1,84 $g.L^{-1}$, respectivamente. Os açúcares totais residuais foram similares ($p>0,05$) para todos os fermentados.

Em relação as características cromáticas (Tabela 17) para o vinho C. Sauvignon houve variação ($p<0,05$) para o teor de antocianinas, sendo que a testemunha e o controle apresentaram os maiores valores (315,23 e 313,89 $mg.L^{-1}$), seguida de CS (17) 5 (272,95 $mg.mL^{-1}$), *O. oeni* e CS (17) 3B1 (± 245 $mg.L^{-1}$). Para as cores amarela e violeta as diferenças não foram significativas ($p>0,05$). Para o comprimento de onda relativo à cor vermelha o isolado CS (16) 3B1 ($1,081_{OD}$) apresentou valor estatisticamente igual ao controle ($1,092_{OD}$), porém a estirpe CS (17) 5 ($1,021_{OD}$) apresentou similaridade com o controle tanto quanto com *O. oeni* ($0,941_{OD}$). Conforme esperado, o fermentado que exibiu o menor valor para intensidade ($1,725_{OD}$) e maior para tonalidade ($0,596_{OD}$) foi o de *O. oeni*, pois o mesmo obteve a mais alta absorbância para a cor amarela ($0,561_{OD}$) e a menor para a vermelha ($0,941_{OD}$). Os compostos fenólicos apresentaram valores estaticamente iguais para todos os tratamentos.

Quando comparados os resultados obtidos para os parâmetros do vinho testemunha (TE) e o controle (CO), elencados na tabela 17, pode-se afirmar que este último não realizou a fermentação malolática, pois os valores de pH (CO: 3,17 e TE: 3,18), acidez total (CO: 7,11 e TE: 7,12 $g.L^{-1}$ ác. tartárico), ácido L-málico (CO: 3,18 e TE: 3,24 $g.L^{-1}$) e ácido L-lático (CO:0,06 e TE:0,01 $g.L^{-1}$) mantiveram-se próximos, não diferindo estatisticamente.

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas e cromáticas para os vinhos de Merlot encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18: Parâmetros físico-químicos e características cromáticas (médias e desvio padrão) avaliados ao final da FML para vinho Merlot.

Amostras Merlot	Parâmetros físico-químicos						
	Álcool (%)	pH	ATT ($g.L^{-1}$)	AV ($g.L^{-1}$)	L-málico ($g.L^{-1}$)	L-lático ($g.L^{-1}$)	Açúcares ($g.L^{-1}$)
ME (16) 1A1	$11,46^{a}$ ±0,08	$3,40^{a}$ ±0,01	$3,92^{c}$ ±0,10	$0,99^{a}$ ±0,07	$0,07^{c}$±0,01	$1,71^{a}$ ±0,12	$2,89^{a}$±0,01
ME (17) 26	$11,45^{a}$ ±0,06	$3,37^{a}$ ±0,01	$4,39^{b}$ ±0,05	$0,87^{b}$ ±0,02	$0,41^{b}$±0,06	$1,09^{b}$ ±0,08	$2,88^{a}$±0.17
O. oeni	$11,45^{a}$ ±0,04	$3,41^{a}$ ±0,01	$3,92^{c}$ ±0,09	$0,81^{b}$ ±0,06	$0,01^{c}$±0,02	$1,82^{a}$ ±0,01	$2,86^{a}$±0,04
Controle ME	$11,45^{a}$ ±0,03	$3,32^{b}$ ±0,01	$6,86^{a}$ ±0,05	$1,05^{a}$ ±0,07	$2,97^{a}$±0,04	$0,00^{c}$ ±0,02	$2,89^{a}$±0,03
Testemunha ME	$11,45^{a}$ ±0,01	$3,31^{b}$ ±0,01	$6,90^{a}$ ±0,02	$0,81^{b}$ ±0,02	$2,98^{a}$±0,05	$0,01^{c}$ ±0,01	$2,91^{a}$±0,01
Amostras Merlot	**Parâmetros**						
	Antocianinas ($mg.L^{-1}$)	**420nm amarelo**	**520nm vermelho**	**620nm violeta**	**Intensidade**	**Tonalidade**	**IPT**
ME (16) 1A1	$209,52^{b}$±2,74	$0,421^{b}$±0,001	$0,970^{b}$±0,002	$0,250^{b}$±0,001	$1,641^{b}$±0,065	$0,434^{b}$±0,005	1130^{a} ±31
ME (17) 26	$189,12^{b}$±0,54	$0,412^{b}$±0,001	$0,952^{b}$±0,001	$0,231^{b}$±0,001	$1,595^{c}$±0,061	$0,433^{b}$±0,015	1125^{a} ±28
O. oeni	$201,02^{b}$±2,19	$0,421^{b}$±0,001	$0,931^{b}$±0,002	$0,246^{b}$±0,002	$1,598^{c}$±0,059	$0,452^{a}$±0,003	1124^{a} ±17
Controle ME	$225,02^{a}$±0,54	$0,450^{a}$±0,001	$1,053^{a}$±0,001	$0,252^{b}$±0,001	$1,755^{a}$±0,071	$0,427^{c}$±0,010	1129^{a} ±42
Testemunha ME	$228,41^{a}$±3,29	$0,451^{a}$±0,001	$1,071^{a}$±0,002	$0,265^{a}$±0,002	$1,787^{a}$±0,072	$0,421^{c}$±0,013	1129^{a} ±27

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente a p<0,05, segundo ANOVA e teste de Tukey.

Para as amostras inoculadas em vinho Merlot (Tabela 18), também não houve (p>0,05) variação para o teor alcoólico (11,45%±0,01). O menor pH e a maior acidez foram da testemunha (pH: 3,31 e ATT: 6,90 $g.L^{-1}$ ác. tartárico), seguida das cepas autóctones e *O. oeni*. Da mesma maneira, que no vinho C. Sauvignon, nas amostras onde o ácido L-málico foi consumido observou-se a síntese de lactato, sendo que os maiores valores foram para *O. oeni* (1,82 $g.L^{-1}$), ME (16) 1A1 (1,72 $g.L^{-1}$) e ME (17) 26 (1,09 $g.L^{-1}$). O parâmetro de açúcares totais não variou significativamente (p>0,05) entre asa amostras.

A concentração de antocianinas foi menor para Merlot do que para C. Sauvignon, variou de 228,41 $mg.L^{-1}$ (Testemunha) a 189,12 $mg.L^{-1}$ [isolado ME (17) 26], o que pode ser observado na Tabela 18. O conteúdo de antocianinas observado está de acordo com o encontrado na literatura para as variedades de uvas selecionadas. Tsanova-Savova et al., (2002) em estudo similar, observaram que os vinhos Merlot e Cabernet Sauvignon apresentaram teores de antocianinas totais acima de 100 $mg.L^{-1}$. Cliff et al., (2007) demonstraram que o vinho C. Sauvignon tem maior conteúdo de antocianinas totais, poliméricas, monoméricas e co-pigmentadas do que os vinhos Merlot. Para a cor amarela, os vinhos, controle e testemunha (0,450 e $0,451_{OD}$) diferenciaram-se estatisticamente (p<0,05) dos demais. Para o pigmento vermelho o menor valor foi atribuído a *O. oeni* e os isolados ME (17) 26 e ME (16) 1A1, com valores de $0,931_{OD;}$ $0,952_{OD;}$ e $0,970_{OD}$, respectivamente. Já para a cor violeta não houve

diferença estatística entre os tratamentos e o controle (p>0,05), porém a testemunha apresentou o maio valor (0,265 $_{OD}$). O vinho com maior intensidade foi a testemunha (1,787$_{OD}$), seguido do controle (1,755$_{OD}$), ME (16) 1A1 (1,641$_{OD}$), ME (17) 26 (1,595 $_{OD}$) e *O. oeni* (1,598$_{OD}$). A tonalidade exibiu comportamento inverso a intensidade, onde *O. oeni* obteve o maior valor (0,452 $_{OD}$) e a testemunha o menor (0,421 $_{OD}$).

Da mesma maneira que para o vinho C. Sauvignon, quando comparados os resultados obtidos para os parâmetros no vinho testemunha (TE) e o controle (CO) da variedade Merlot, conforme Tabela 18, pode-se afirmar que o mesmo não realizou a fermentação malolática, pois os valores de pH (TE: 3,31 e CO: 3,32), acidez total (TE: 6,90 e CO: 6,86 g.L^{-1} ác. tartárico), ácido L-málico (TE: 2,98 e CO: 2,97 g.L^{-1}) e ácido L-lático (TE:0,01 e CO:0,00 g.L^{-1}) mantiveram-se próximos, não diferindo estatisticamente.

5.5.2 Análise Sensorial

Para as Análises físico-químicas, além dos isolados (tratamentos), foi utilizada uma estirpe comercial de *O. oeni* (padrão) e o vinho sem inoculação (controle CS).

Inicialmente, foram recrutados 18 participantes, após a realização dos testes de seleção e das etapas do treinamento foram selecionados 13 provadores, os quais apresentaram 75% de conformidade para a identificação e repetibilidade dos termos descritores (Apêndice VI).

Na Tabela 19 e Figura 33 são apresentadas as médias das pontuações (n = 13) conferidas aos atributos apreciados durante a avaliação sensorial do vinho C. Sauvignon.

Tabela 19: Médias e desvio padrão das notas relativas aos atributos avaliados para vinho tinto C. Sauvignon.

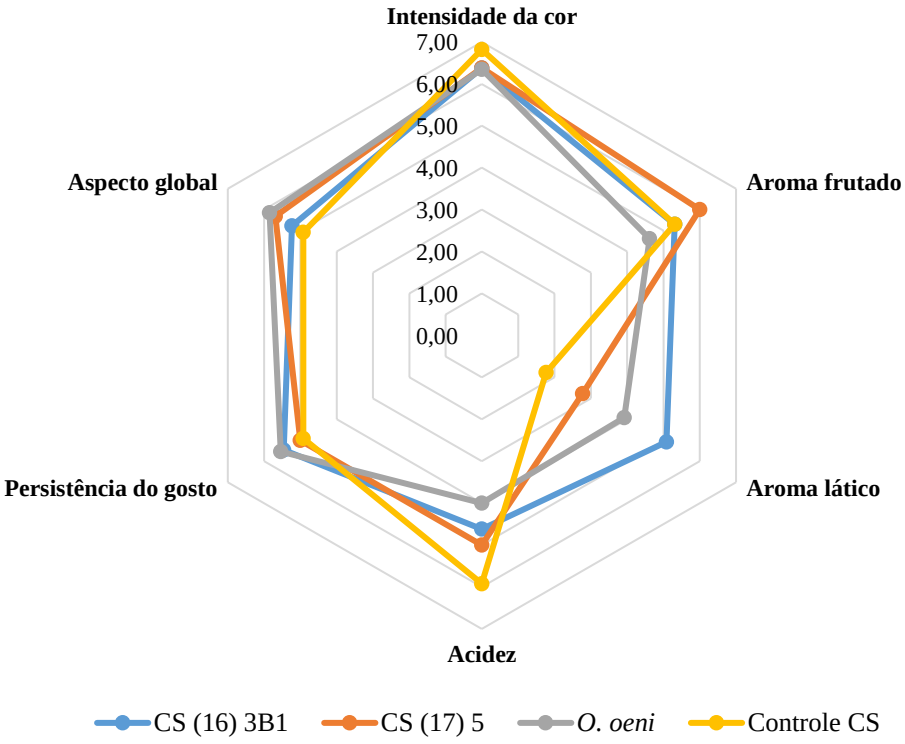
Bloco 1 C. Sauvignon	**Atributos avaliados**					
	Intensidade da cor	**Aroma frutado**	**Aroma lático**	**Acidez**	**Persistência do gosto**	**Aspecto global**
CS (16) 3B1	6,38^{b} ±1,05	5,30^{b} ±0,85	5,08^{a} ±0,49	4,62^{c} ±0,77	5,46^{a} ±0,78	5,23^{b} ±0,83
CS (17) 5	6,38^{b} ±1,04	6,00^{a} ±1,08	2,77^{c} ±1,09	5,00^{b} ±1,08	5,00^{b} ±1,22	5,69^{a} ±0,95
O. oeni	6,35^{b} ±0,69	4,62^{c} ±1,04	3,92^{b} ±1,12	4,00^{c} ±1,08	5,54^{a} ±0,66	5,85^{a} ±0,99
Controle CS	6,82^{a} ±1,65	5,31^{b} ±0,48	1,77^{d} ±0,73	5,92^{a} ±0,76	4,92^{b} ±0,95	4,92^{c} ±0,76

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente a p<0,05, segundo ANOVA e teste de Tukey.

Para o Bloco 1 - C. Sauvignon (Tabela 19), em relação ao atributo intensidade da cor, o vinho testemunha diferenciou-se estatisticamente (P<0,05) dos demais, sendo o que obteve maior nota (6,82). Este atributo pode ser comparado ao valor obtido instrumentalmente (Tabela 17),

onde esta amostra apresentou o maior teor de antocianinas (313,89 mg.L^{-1}), intensidade de cor (1,883$_{OD}$) e menor tonalidade (0,505$_{OD}$), o que fica evidente uma vez que a mesma apresentou alto índice de pigmento vermelho. Cliff et al., (2007) apontam que os vinhos jovens apresentam maiores concentrações de antocianinas totais, monoméricas e co-pigmentadas do que os vinhos de safras mais antigas. As amostras avaliadas sensorialmente foram produzidas na safra de 2018, com apenas 6 meses de engarrafamento, ou seja, são consideradas vinhos jovens.

Figura 31: Perfil de características do vinho C. Sauvignon após fermentação malolática com cepa comercial e isolados.



Para os aromas, os provadores constataram maior intensidade do frutado (Tabela 19 e Figura 31) para a amostra CS (17) 5, seguido dos demais tratamentos. O aroma lático, muitas vezes característico após a fermentação malolática, foi mais percebido (5,98) para as amostras de CS (16) 3B1 seguido de *O. oeni* (3,92). Para a acidez, os julgadores consideraram como o vinho mais ácido (5,92) a testemunha e o menos ácido (4,00) o fermentado com *O. oeni*. Segundo Rizzon e Miele (2009) a FML substitui o ácido L-málico pelo L-lático, o que culmina na redução da acidez do vinho, agregando maciez, complexidade e diferentes aromas e *flavors*, com destaque para as notas amanteigadas e frutadas.

No quesito persistência do gosto, o isolado CS (16) 3B1 e *O. oeni* foram estatisticamente iguais (5,5), diferenciando-se ($p<0,05$) da testemunha e de CS (17) 5. Em relação ao aspecto global, o vinho que apresentou melhor característica foi o produzido com 'starter' de *O. oeni*, seguido dos isolados CS (16) 3B1 e CS (17) 5, com pontuações médias de 5,85, 5,73 e 5,29, respectivamente.

Os provadores destacaram ainda *flavor* de pimentão verde, característico das uvas C. Sauvignon, nas quais o 3-metox-isobutil-pirazina não foi devidamente metabolizado. Este *flavor*, é percebido sobretudo quando a maturação das uvas é insuficiente, principalmente nas provenientes das regiões mais frias (RIBÉREAU-GAYON, 2003). Oliveira (2011), em análise sensorial, obteve médias elevadas para sabor apimentado em vinhos de C. Sauvignon elaborados com uvas oriundas da Serra gaúcha, onde considerou este atributo como característica regional.

A análise de Correlação de Pearson (Tabela 20), permitiu compreender como os atributos sensoriais relacionaram-se com os parâmetros físico-químicos avaliados, ou seja, se os mesmos apresentaram correlação direta (positiva) ou inversa (negativa). O teor alcoólico, a concentração de açúcares e o índice de polifenóis totais foram desconsiderados pois não foram significativos na análise de variância.

A intensidade de cor visual estabeleceu correlação positiva com o atributo de acidez sensorial (0,887) e os parâmetros físico químicos de acidez total (0,997), ácido L-málico (0,998), antocianinas (0,923) e intensidade de cor (0,637). Houve correlação negativa para o aroma lático (-0,751), persistência do gosto (-0,684), aspecto global (-0,812), ácido lático (-0,995) e tonalidade (-0,610), conforme Tabela 20. Esta analogia está de acordo com a literatura, pois os vinhos mais intensos, que apresentam cores mais vivas possuem maior acidez, devido a presença de ácido L-málico e a cor se apresenta mais viva, devido a estabilidade das antocianinas (MIELE, 2010).

O aroma frutado (Tabela 20), teve correlação negativa com a persistência do gosto (-0,704).

Os dados apresentados na Tabela 20, demonstram que o aroma lático teve correlação positiva com o teor de ácido L-lático (0,885), porém foi negativo para acidez sensorial (-0,772), acidez total (-0,741) ácido L-málico (-0,784) e antocianinas (-0,939), valores estes que reforçam a ocorrência da FML para os isolados CS (16) 3B1, CS (17) 5 e para *O. oeni*.

A acidez sensorial (Tabela 20), convergiu com a acidez total (0,851), o ácido L-málico (0,882), açúcares (0,922), as antocianinas (0,920) e a intensidade de cor (0,745). Este atributo divergiu da persistência do gosto (-0,898), aspecto global (-0,795), ácido L-lático (-0,905) e tonalidade (-0,821).

Tabela 20: Correlação de Pearson para os parâmetros físico-químicos, cromáticos e atributos sensoriais do vinho C. Sauvignon.

Variáveis	Intensidade visual	Aroma frutado	Aroma lático	Acidez sensorial	Persistência do gosto	Aspecto global	Acidez total	Ácido málico	Ácido lático	Antocianinas	Intensidade de cor	Tonalidade
Intensidade visual	**1**											
Aroma frutado	0,057	**1**										
Aroma lático	**-0,751**	-0,335	**1**									
Acidez sensorial	**0,887**	0,510	**-0,772**	**1**								
Persistência do gosto	**-0,684**	**-0,704**	**0,885**	**-0,898**	**1**							
Aspecto global	**-0,812**	-0,151	0,301	**-0,795**	0,453	**1**						
Acidez total	**0,997**	-0,014	**-0,741**	**0,851**	**-0,641**	**-0,790**	**1**					
Ácido málico	**0,998**	0,056	**-0,784**	**0,882**	**-0,699**	**-0,777**	**0,997**	**1**				
Ácido lático	**-0,995**	-0,113	**0,810**	**-0,905**	**0,741**	**0,770**	**-0,990**	**-0,998**	**1**			
Antocianinas	**0,923**	0,304	**-0,939**	**0,920**	**-0,886**	**-0,608**	**0,909**	**0,938**	**-0,955**	**1**		
Intensidade de cor	**0,637**	0,355	-0,156	**0,745**	-0,438	**-0,953**	0,597	0,594	-0,597	0,463	**1**	
Tonalidade	**-0,610**	-0,583	0,281	**-0,821**	0,612	**0,881**	-0,557	-0,575	0,595	-0,535	**-0,965**	**1**

Os valores em negrito são diferentes de zero com um nível de significância $p<0,05$.

A persistência do gosto (Tabela 20), estabeleceu relação positiva apenas com a concentração de ácido L-lático (0,741), porém teve correlação negativa com acidez total (-0,641), ácido L-málico (-0,699) e antocianinas (-0,886). Assim, pode-se dizer que a FML exerce influência no quesito persistência do gosto devido a síntese de ácido L-lático em detrimento da descarboxilação do ácido L-málico.

Para o aspecto global, observou-se correlação positiva foi com o teor de ácido L-lático (0,770) e a tonalidade (0,881). As demais foram negativas: acidez total (-0,790), ácido L-málico (-0,777), antocianinas (-0,608) e intensidade de cor (-0,953), de acordo com os valores elencados na Tabela 20.

A acidez total (Tabela 20), teve correlação positiva com a concentração de ácido L-málico (0,997), açúcares (0,976) e antocianinas (0,909), a correlação foi negativa para o ácido L-lático (-0,990).

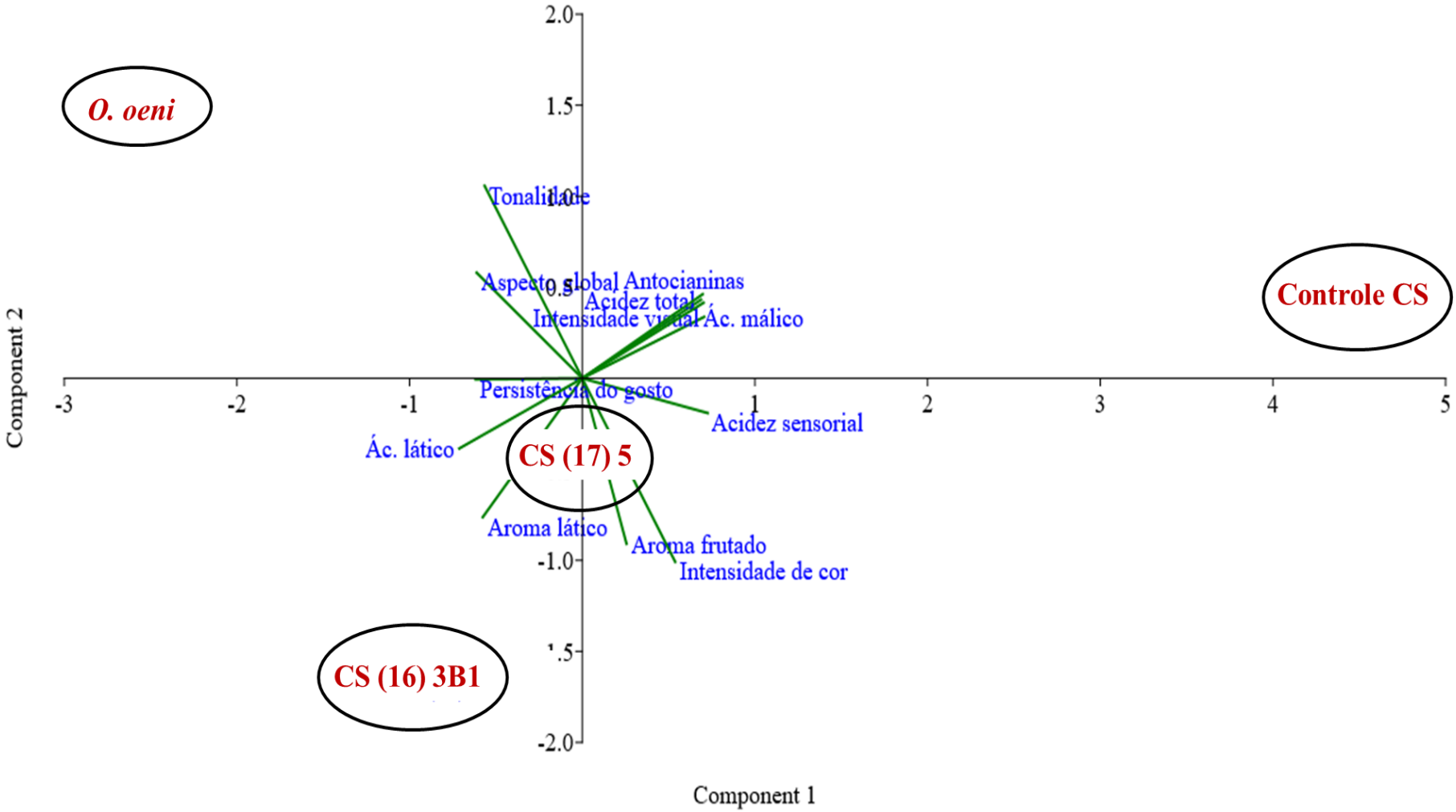
Conforme esperado, o teor de ácido L-málico obteve correlação negativa em relação ao teor de ácido L-lático (-0,998), uma vez que o segundo é sintetizado no vinho a partir da degradação do primeiro. A correlação positiva foi observada para as antocianinas (0,938), ou seja, quanto mais ácido o vinho, as antocianinas se mantem estáveis pelos açúcares residuais dando maior intensidade ao vinho (INES, 2009). Já o ácido L-lático correlacionou-se negativamente com as antocianinas (-0,955).

Na Tabela 20, pode-se observar que a intensidade de cor esteve correlacionada negativamente com a tonalidade (-0,965), o que está de acordo com Ines (2009), o mesmo relata que vinhos mais intensos possuem maior quantidade de pigmentos vermelhos, em contrapartida exibem menores valores de tonalidade (pigmentos amarelos e castanhos).

A análise de componentes principais - PCA (Figura 32), permitiu correlacionar os parâmetros físico químicos e sensoriais. A mesma demonstrou que os componentes 1 e 2 foram capazes de explicar 87,93 % da variação, onde o eixo 1 contribuiu com 72,56 % e o eixo 2 com 14,55 %.

Os valores obtidos na PCA corroboram com a ANOVA (Tabelas 17 e 19). O gráfico demonstra que o controle ficou completamente separado dos demais tratamentos. O mesmo apresentou correlação com o teor de ácido málico, acidez total, acidez sensorial, concentração de antocianinas e intensidade de cor visual, atributos para os quais recebeu as maiores pontuações dos provadores, além disso ficou plotado opostamente aos parâmetros de teor de ácido lático e aroma lático, o que reforça o não acontecimento da FML.

Figura 32: Análise de componentes principais para os parâmetros físico-químicos, cromáticos e atributos sensoriais do vinho C. Sauvignon.



Para CS (17) 5, a maior correlação foi em relação a característica aroma frutado, aroma lático e persistência, também apresentou correlação com a acidez sensorial.

O isolado CS (16) 3B1 destacou-se em relação ao teor de ácido lático e aroma lático, oposto ao teor de ácido L-málico e a acidez. A cepa comercial de *O. oeni* correlacionou-se em relação aos atributos de aspecto global e tonalidade, estando oposta a acidez, acidez sensorial, ácido L-málico e antocianinas. Segundo Biasoto et al., (2010), o ácido L-lático é o ácido orgânico mais comum quantificado em vinhos tintos provenientes de *Vitis vinífera* após a FML.

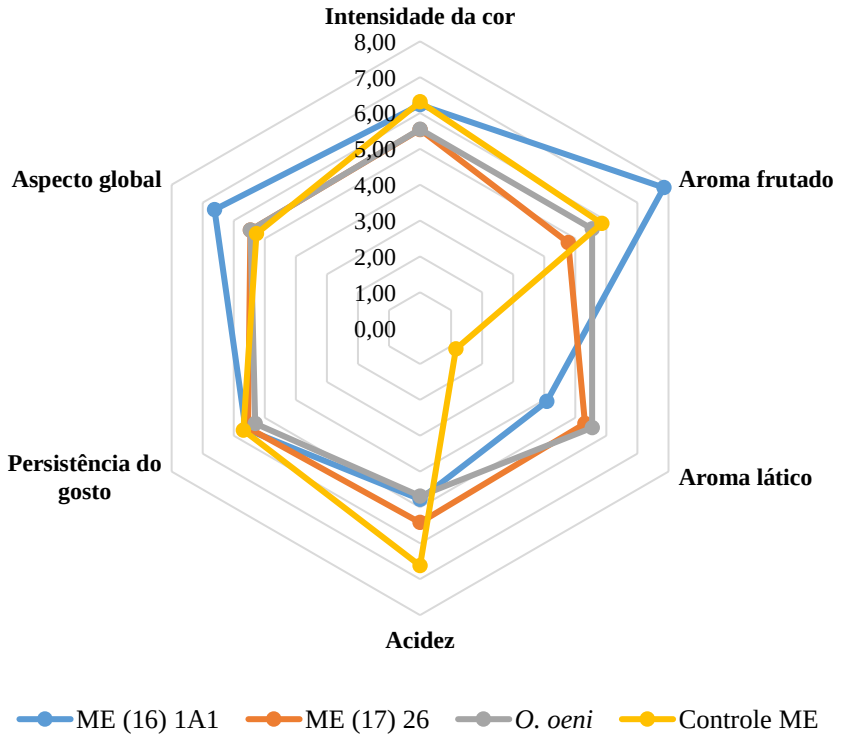
Na Tabela 21 e Figura 33 estão elencadas as médias das pontuações (n = 13) conferidas aos atributos apreciados durante a avaliação sensorial do vinho Merlot.

Tabela 21: Médias e desvio padrão das notas relativas aos atributos avaliados para vinho tinto Merlot.

Bloco 2 Merlot	**Atributos avaliados**					
	Intensidade da cor	**Aroma frutado**	**Aroma lático**	**Acidez**	**Persistência do gosto**	**Aspecto global**
ME (16) 1A1	6,23^{a} ±1,44	7,85^{a} ±0,80	4,08^{b} ±0,88	4,77^{c} ±0,93	5,62^{a} ±0,77	6,62^{a} ±0,87
ME (17) 26	5,54^{b} ±1,62	4,77^{c} ±0,73	5,31^{a} ±0,75	5,42^{b} ±0,77	5,54^{a} ±0,66	5,46^{b} ±0,66
O. oeni	5,55^{b} ±1,80	5,54^{b} ±0,78	5,54^{a} ±0,88	4,68^{c} ±0,87	5,31^{a} ±0,48	5,46^{b} ±0,52
Controle ME	6,31^{a} ±1,95	5,85^{b} ±0,99	1,15^{c} ±0,38	6,62^{a} ±0,82	5,69^{a} ±0,75	5,27^{c} ±0,73

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente a p<0,05, segundo ANOVA e teste de Tukey.

Figura 33: Perfil de características do vinho Merlot após fermentação malolática com cepa comercial e isolados.



Para o bloco 2 – Merlot (Tabela 21 e Figura 33), as amostras com maiores notas para intensidade de cor foram a testemunha (6,31) e o isolado ME (16) 1A1 (6,23), que obtiveram os maiores valores instrumentais para as antocianinas e intensidade de cor e o menor para tonalidade, conforme Tabela 18. Em relação ao aroma frutado, a maior nota foi 7,85 atribuída ao isolado ME (16) 1A1, seguida da testemunha, *O. oeni* e ME (17) 26. O aroma lático foi percebido de maneira similar para ME (17) 26 e *O. oeni* com nota média de 5,42. Os vinhos Merlot tem seu aroma secundário corriqueiramente associado a frutas vermelhas, groselha, manteiga, grama, alcaçuz e carvalho (GAMBARO et al., 2003), o que explica as notas atribuídas. Conforme Tabela 21, o vinho com maior acidez foi a testemunha (6,62), seguido de ME (17) 26 (5,42), ME (16) 1A1 e *O. oeni* (4,72), estas notas corroboram com os valores obtidos instrumentalmente, de acordo com a ANOVA (Tabela 18).

Quanto a persistência do gosto (Tabela 21 e Figura 33), não foram observadas diferenças estatísticas ($p>0,05$). Já para o aspecto global o isolado ME (16) 1A1 obteve a maior pontuação (6,62), seguido de *O. oeni* e ME (17) 26. Para este lote, os provadores enfatizaram aroma marcante para frutas vermelhas e iogurte de morango. Segundo Gloria (2005), uma das características da variedade de uva Merlot é a expressão de aroma de frutas vermelhas e groselha. O amargor, um *off-flavor*, também foi destacado para a amostra ME (17) 26, a qual recebeu a menor nota (4,77) para aroma frutado. Sáenz-Navajas et al., (2010), observaram que a percepção do amargor está inversamente relacionada a este aroma, ou seja, quanto menos frutado o vinho mais amargo ele se apresenta. Gloria (2005), destaca que o amargor está geralmente associado a presença de aminas biogênicas, as quais podem ter sido metabolizadas por este isolado durante a FML.

A Correlação de Pearson (Tabela 22) com base nos valores médios atribuídos ao vinho Merlot, mostrou informações relevantes sobre as características físico-químicas e sensoriais. Os parâmetros que não apresentaram diferença significativa para a análise de variância foram desconsiderados: teor alcoólico, açúcares e polifenóis.

A intensidade de cor avaliada sensorialmente correlacionou-se de maneira positiva com o aroma frutado (0,697), a persistência do gosto (0,810), o teor de antocianinas (0,880), e a intensidade de cor instrumental (0,829), porém a correlação foi negativa para o aroma lático (-0847) e a tonalidade (-0,654), conforme Tabela 22.

O aroma lático convergiu com o teor de ácido L-lático (0,846) e tonalidade (0,707), porém foi divergente da acidez sensorial (-0,851), persistência do gosto (-0,776), acidez total (-0,918), teor de ácido L-málico (-0,932), antocianinas (-0,914) e intensidade instrumental da cor (-0,997), o que pode ser observado na Tabela 22.

Tabela 22: Correlação de Pearson para os parâmetros físico-químicos, cromáticos e atributos sensoriais do vinho Merlot.

Variáveis	Intensidade visual	Aroma frutado	Aroma lático	Acidez sensorial	Persistência do gosto	Aspecto global	Acidez total	Ácido málico	Ácido lático	Antocianinas	Intensidade de cor	Tonalidade
Intensidade visual	**1**											
Aroma frutado	**0,697**	**1**										
Aroma lático	**-0,847**	-0,220	**1**									
Acidez sensorial	0,477	-0,296	**-0,851**	**1**								
Persistência do gosto	**0,810**	0,356	**-0,776**	**0,673**	**1**							
Aspecto global	0,382	**0,892**	0,164	-0,564	0,210	**1**						
Acidez total	0,569	-0,185	**-0,918**	**0,976**	**0,632**	-0,530	**1**					
Ácido málico	0,597	-0,150	**-0,932**	**0,968**	**0,641**	-0,504	**0,999**	**1**				
Ácido lático	-0,476	0,296	**0,846**	**-0,999**	**-0,682**	0,558	**-0,971**	**-0,964**	**1**			
Antocianinas	**0,880**	0,448	**-0,914**	0,596	0,568	0,009	**0,741**	**0,766**	-0,586	**1**		
Intensidade de cor	**0,829**	0,201	**-0,997**	**0,845**	**0,728**	-0,200	**0,924**	**0,937**	**-0,840**	**0,929**	**1**	
Tonalidade	**-0,654**	-0,142	**0,707**	**-0,734**	**-0,971**	-0,055	**-0,649**	**-0,648**	**0,745**	-0,420	**-0,656**	**1**

Os valores em negrito são diferentes de zero com um nível de significância $p<0,05$.

O aroma frutado foi correlacionado significativamente com o aspecto global (0,892), o que está apresentado na Tabela 22. Na mesma Tabela, observa-se que a acidez sensorial se apresentou com correlação positiva para a persistência do gosto (0,673), acidez total (0,976), ácido L-málico (0,968) e intensidade de cor (0,845). O mesmo atributo teve correlação negativa em relação a ácido L-lático (-0,999) e tonalidade (-0,734).

Para o atributo persistência do gosto a convergência ocorreu para acidez total (0,632), ácido L-málico (0,641) e intensidade de cor (0,728). A divergência foi observada para a concentração de ácido L-lático (-0,682) e tonalidade (-0,971), (Tabela 22).

A acidez total teve correlação positiva com a concentração de ácido L-málico (0,999), de antocianinas (0,741) e a intensidade de cor (0,924). A correlação foi negativa para ácido L-lático (-0,971) e tonalidade (-0,649), (Tabela 22)

Da mesma maneira que a acidez total, o teor de ácido málico apresentou correlação negativa com a concentração de ácido L-lático (-0,964) e tonalidade (-0,648), e positiva com as antocianinas (0,766) e a intensidade de cor (0,937).

Inversamente, o teor de ácido L-lático teve correlação negativa com a intensidade de cor (-0,840) e positiva com a tonalidade (0,745).

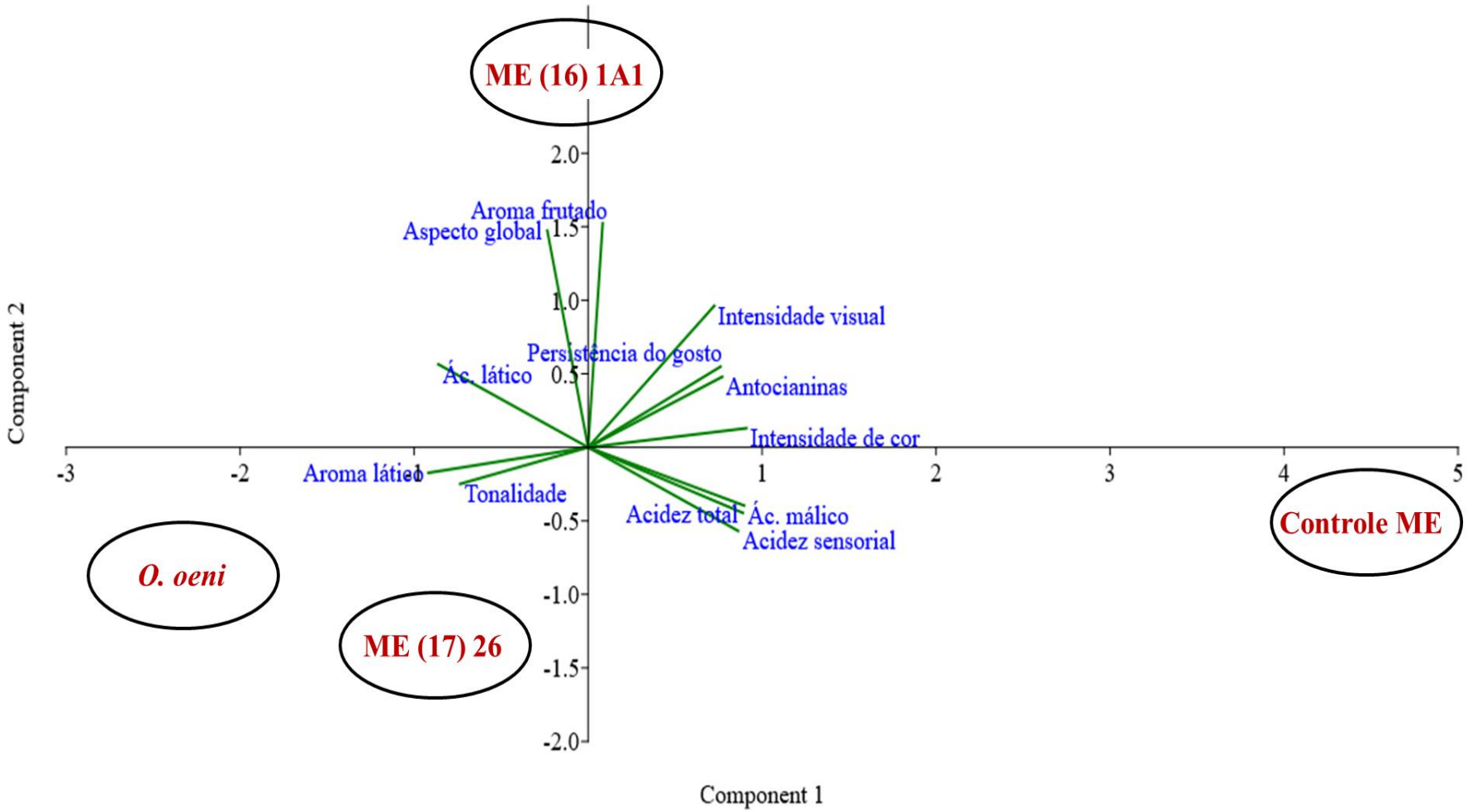
As antocianinas tiveram correlação positiva com a intensidade de cor (0,630). Enquanto a intensidade de cor foi negativa para tonalidade (0,656).

A análise de componentes principais - PCA (Figura 34), demonstrou que 92 % da variação pode ser explicada pelos eixos 1 (67,4 %) e 2 (24,6 %).

Comparando os componentes principais, o perfil sensorial (Figura 34 e Tabela 21) e os parâmetros físico-químicos (Tabela 22) pode-se dizer que o mesmo está correlacionado com a análise de variância.

A controle diferenciou-se dos demais tratamentos, apresentando correlação com os atributos de acidez sensorial, acidez total, intensidade de cor e teor de ácido L-málico. O mesmo ficou posicionado opostamente cepa de *O. oeni* e o isolado ME (17) 26, os quais exibiram proximidade com os atributos de aroma lático e tonalidade, parâmetros estes característicos de vinhos que efetivaram a FML. A bactéria nativa ME (16) 1A1 exibiu maior proximidade para os atributos aroma frutado e aspecto global, porém a mesma ficou no mesmo quadrante para ácido L-lático, o que demonstra a ocorrência da FML. Lee et al., (2006) relataram em estudo de análise sensorial com vinhos tintos, que a ocorrência de ácido L-lático se correlacionou de maneira fraca com o aroma de frutas vermelhas, sendo assim, o aroma frutado, provavelmente proporcionado pelo octanoato ou hexanoato de etila, sobrepõe-se sensorialmente ao aroma lático (GOLDNER, et al., 2010).

Figura 34: Análise de componentes principais para os parâmetros físico-químicos, cromáticos e atributos sensoriais do vinho Merlot.



No Quadro abaixo (Quadro 5) encontra-se o resumo dos resultados obtidos através das técnicas aplicadas no presente estudo.

Quadro 5: Resumo dos resultados obtidos após os ensaios de seleção bioquímica e identificação genética.

45 amostras de vinho tinto

↓

245 colônias diversas

↓

68 características morfológicas de BAL
49 Gram +
49 Catalase -

↓

47 isolados cresceram em Vinho Sintético
33 aumentaram o pH
18 apresentaram mancha lático após 60 dias de FML
13 apresentaram o loci para as enzima precursoras da FML

↓

13 aumentaram o pH em vinho tinto
13 reduziram a acidez total titulável
6 completaram a descarboxilação do ácido L-málico
6 apresentaram rendimento de produto (Lactato) superior a 80%

↓

Identificados geneticamente
CS (16) 3B1 - *O. oeni,*
ME (16) 1A1- *O. oeni,*
ME (17) 26 - *O. oeni,*
PN (17) 65 - *O. oeni,*
PN (17) 75 - *L. plantarum*
CS (17) 5 - *L. suebicus*

↓

Características sensoriais
CS (16) 3B1- redução da acidez, intensidade, aroma lático, persistência do gosto.
CS (17) 5- redução da acidez, aroma lático.
ME (16) 1A1- redução da acidez, aroma frutado, aroma lático, aspecto global, persistência
ME (17) 26- persistência do gosto, aspecto global, aroma lático.

↓

Potencial de aplicação como iniciadores de FML

6. CONCLUSÕES

As amostras obtidas permitiram o isolamento de 245 colônias de micro-organismos do vinho, incluindo bactérias, bolores e leveduras; Destas, 49 isolados apresentaram características de BALs, destes 47 foram capazes de utilizar o ácido L-málico como fonte de carbono no ensaio com vinho sintético; 13 das cepas autóctones investigadas apresentaram as enzimas responsáveis pela fermentação malolática (MDH, EM, OADC e L-LDH,);

Os micro-organismos: CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, CS (17) 5, ME (17) 26, PN (17) 65 e PN (17) 75, mantiveram a atividade malolática quando testados em vinho tinto apresentando após 45 dias de fermentação: pH superior a 3,27; acidez total inferior a 4,47g.L^{-1}; descarboxilação de ácido L-málico em detrimento da síntese de ácido L-lático, preservação do teor de antocianinas e pigmento vermelho; bem como consumo de substrato de 3,34 mg.L^{-1}.h^{-1} e formação de produto de 2mg.L^{-1}.h^{-1}. O rendimento foi superior a 80%;

Foi possível identificar geneticamente os isolados citados no parágrafo anterior pela técnica de 16S rDNA. Sendo caracterizados como: a) *Oenococcus oeni* (acesso AB054808.1) [CS (16) 3B1, ME (16) 1A1, ME (17) 26 e PN (17) 65], b) *Lactobacillus plantarum* (acesso CP024413.1) [PN (17) 75] e c) *Lactobacillus suebicus* (acesso LC071852.1) [CS (17) 5];

Quanto a cinética fermentativa e parâmetros físico-químicos, os isolados CS (16) 3B1 (em vinho C. Sauvignon) e ME (17) 26 (em vinho Merlot) comportaram-se como a cepa comercial de *O. oeni*, finalizando a FML em cerca de 35 dias. As cepas autóctones CS (17) 5 (em vinho C. Sauvignon) e ME (16) 1A1 (em vinho Merlot), finalizaram a FML em 45 dias. Os quatro isolados atuaram aumentando o pH e reduzindo a acidez total titulável, devido a síntese de ácido L-lático.

Em relação a avaliação sensorial, pode-se dizer que, os vinhos obtidos a partir de C. Sauvignon foram considerados mais intensos, quando comparados com a cepa comercial, sendo que: a) isolado CS (16) 3B1, obteve as maiores notas para o aroma lático e a persistência do gosto; b) isolado CS (17) 5, recebeu a maior nota para aroma frutado, a menor para aroma lático, sendo que a mesma exibiu o melhor aspecto global.

CS (17) 5, identificado *L. suebicus* foi capaz de conduzir a FML, fato este até então não descrito na literatura.

Para os vinhos elaborados com a variedade Merlot, destacam-se boas notas para persistência do gosto e aspecto global, quando comparados com *O. oeni*. O isolado ME (16) 1A1, recebeu a maior pontuação para aroma frutado, persistência do gosto e aspecto global. Já a cepa autóctone ME (17) 26, recebeu maior nota para o atributo aroma lático.

Pode-se dizer que os isolados avaliados comportaram-se estatisticamente similares em relação a cepa comercial para as análises físico-químicas, porém, os mesmos ganharam pontuações mais altas para os atributos de aromas lático e frutado, intensidade, persistência do gosto e aspecto global, demonstrando assim, que exprimem características aromáticas mais intensas, sendo assim, apresentam potencial para uso na indústria enológica, como iniciadores da Fermentação Malolática.

7. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Identificar geneticamente todos isolados que apresentaram os sítios ativos para as enzimas MDH, EM, OADC e L-LDH;
- ✓ Testar a presença da enzima malolática para os isolados;
- ✓ Realizar fermentações com os isolados identificados, em diferentes tipos de vinhos: tintos, roses e brancos, avaliando a possibilidade de o potencial malolático ser aplicado a diferentes espécies viníferas;
- ✓ Avaliar a capacidade destas BALs produzirem aminas biogênicas;
- ✓ Desenvolver culturas ‘starter’ adaptadas aos vinhos da Serra Gaúcha com os isolados: CS (16) 3B1, ME (16) 1A1 e ME (17) 26, identificados como *Oenococcus oeni*; e CS (17) 5, identificado como *Lactobacillus suebicus.*

8. 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.

ALFENAS, A. C. (Ed.). *Eletroforese de iso-enzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e micro-organismos*. Viçosa, MG: UFV, 1998.

ANVISA. RDC N° 123, DE 4 DE NOVEMBRO DE 2016. http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-123-de-4-de-novembro-de-2016.pdf/view. Acesso em 03 de junho de 2019.

ARAÚJO, J.L.P., et al. Mercados de uvas de mesa e de vinho. In: SOARES, J.M.; LEÃO, P.C.S. (Ed. Téc.). A vitivinicultura no 40 semiárido brasileiro. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina; **Embrapa Semi-Árido**, p. 737-756, 2009.

AUAD, L. I. Seleção de bactérias láticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de *listeria monocytogenes*. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

AUSUBEL, F.M., et al.. (1992) – *Short protocols in molecular biology*. John Willey & Sons Inc., Inglaterra.

AVILA, L.D. de; DAUDT, C.E. Indução da fermentação malolática em vinho tinto com a cultura lactica viniflora oenos. **Ciência Rural**, Santa Maria, **27** (2): .325-330, 1997.

BARTOWSKY, E. Bacterial spoilage of wine and approches to minimize it. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48: p. 149-156, 2009.

BARTOWSKY, E. (2005) – *Oenococcus oeni* malolatic fermentation – moving in to the molecular arena. **Australian Journal of Grape and Wine Res 11** (2): 174-187.

BAILEY, J.; OLLIS, D. *Fundamentals of Biochemical Engineering*. [s.l.] McGraw-Hill College, 1986.

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

BETTERIDGE, A., et al. Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. **Trends in Biotechnology**, v. 33, p.547-553, 2015.

BIASOTO, A.C.T.; et al. Flavour characterisation of red wines by descriptive analysis and ESI mass spectrometry. **Food Quality and Preference**, v. 21, p. 755-762, 2010.

BINATTI, R.L., 2015. Avaliação da Fermentação Maloláctica em Vinhos de Altitude Com Bactérias Ácido-Lácticas Autóctones Selecionadas. *Dissertação* (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2015.

BIRSE, M. J. 2007. The color of the red wine. 306 p. *Tese* (Doctorate of School of Agriculture, Food & Wine ofFaculty of Sciences) -University of Adelaide, Austrália, 2007.

BOTELHO, L. G.; et al. (2015). Resistência in vitro de bactérias ácido láticas isoladas de iogurtes brasileiros ao suco gástrico e sais biliares. **Revista Científica Univiçosa**, Viçosa, **1**, (1): 1 - 6, dez. 2015.

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

BRASIL, (1988). Ministério da Agricultura. Lei Nº 7.678 de 8 de novembro de 1988. http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/ivegetal/bebidas-arquivos/lei-no-7-678-de-8-de-novembro-de-1988.doc/view. Acesso 08 de junho de 2019.

BRAVO-FERRADA BM, et al. (2016) Growth and consumption of L-malic acid in wine-like medium by acclimated and non-acclimated cultures of Patagonian *Oenococcus oeni* strains. **Folia Microbiology**. DOI 10.1007/s12223-016-0446-y.

BRAVO-FERRADA BM, et al. (2013) Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. **World Journal Microbiology and Biotechnology 29**:1537-1549

BUCKENHUSKES, H.J. (2001) – Fermented vegetables. In: Doyle, M.P.; Beuchat, R & Montville, J. (Eds.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. ASM Pess. Washington.

BURNS, T. R.; OSBORNE, J. P., 2015. Loss of Pinot noir wine color and polymeric pigment after malolactic fermentation and potential causes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 66, n. 2, p. 130-137.

BURNS, T. R.; OSBORNE, J. P., 2013. Impact of malolactic fermentation on the color and color stability of Pinot noir and Merlot wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, p. ajev. 2013.

CARVALHO, B. T. 2011. Fermentação consorciada leveduras/bactérias láticas aplicada à produção de cachaça como possibilidade de melhoria do padrão de qualidade. *Dissertação* (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2011.

CASPRITZ G, RADLER F. Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. **Journal of Biology and Chemestry.** 1983; 258:4907-10.

CHEYNIER, V., et al. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. **American Journal of Enology Viticulture.** 57:298-305.

CIBRARIO A, et al. (2016) Carbohydrate metabolism in *Oenococcus oeni*: a genomic insight. **BMC Genomics** 17:984.

CLIFF, M. A., et al. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurementand sensory analysis of BC commercial red wines. **Food Research International** 40 (2007) 92–100.

COSTELLO, P.J., et al. 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**, **18**: 287-301, 2012.

DAMASIO, M. H., COSTELL, E. (1991). Análisis sensorial descriptivo: Generación de descriptores y selección de catadores. **Revista de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos, 31**(2), 165-178.

DAVIS, C.; et al. (1985) – Properties of wine lactic acid bactéria: their potential enological significance. **Americam Journal of Enology and Viticulture 39**: 137-142.

DE BORTOLI, E., et al. (2007) – Evaluation of enological characteristics of autochthonous yest strains selected for the production of Prosecco II.19 wine. *8th International Symposium of Enology of Bordeux.*

DEPARTAMENT OF VITICULTURE AND ENOLOGY (Estados Unidos). University Of California (Ed.). *Viticulture & Enology*. 2014. Disponível em: Acesso em: 20 set. 2017.

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., et al. 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.

DICKS, L.; VAN VUUREN, H. (1988) - Identification and physiological characteristics of heterofermentative strains of *Lactobacillu*s from South African red wines. J**ournal of Applied Bacteriology** 64: 505–513.

DIERINGS, L.R., et al. Population dynamics of mixed cultures of yeast and lactic acid bacteria in cider conditions. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 56, n. 5, p. 837-847, Oct. 2013.

DOYLE, J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from frech tissue. *Focus*, **12**:13-15. 1987.

DREOSTI, I.E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition**, **16**, (7/8), p. 692-694, 2000.

DU TOIT, M.; PRETORIUS, I. (2000) – Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons for nature's own arsenal. **South African Journal Enology and Viticulture 21** (special issue): 74-96.

FENSTERSEIFER, L.C. (2017). Caracterização físico química de vinho Pinot Noir com fermentação malolática realizada por bactérias ácido láticas autóctones da Serra Gaúcha. *Trabalho de Conclusão de Curso*. IFRS, campus Bento Gonçalves. 2017.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p. 1995.

FLESCH P. The malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activity of bacteria, decomposing L-malic acid. Arch Mikrobiol 1969; 68:259- 77.

FONTAN, R. C. I., et al. Cinética da fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia. P. 203-210**. B. CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 2, jul./dez. 2011.

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.

FUGELSANG, K.C., 1997. Wine Microbiology. *Chapman & Hall*, New York.

GALLAND, D., et al. (2003) – Absence of malolactic activity is a characteristic of H^+-ATPase-deficient mutants of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. **Applied Environmental Microbiology 69** (4): 1973-1979.

GAMBARO, A., et al. Aroma characterization of commercial red wines of Uruguay. **Journal of Sensory Studies**, v.18, p. 353-366, 2003.

GARCÍA-RUIZ, A, et al. Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardiiand, Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. **Journal of Applied Microbiology**, **107**, p.1042-1053, 2009.

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

GOLDNER, M.C.; ZAMORA, M.C. Effect of polyphenol concentrations on astringency perception and its correlation with gelatin index of red wine. **Journal of Sensory Studies**, v.25, p. 761-777, 2010.

GUILHERME, A. A., et al. Avaliação da produção de ácido lático por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, **29**(4): 738-747, 2009.

HAMMER Ø; HARPER DAT. (2006) Paleontological Data Analysis. Oxford: Blackwells. 351 p.

HENICK-KLING, T. (1995) – Control of malolactic fermentation in wine: Energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. **Journal of Applied Bacteriology 9** (Suppl.): 29s-37s.

IBGE, 2019. *Sistema de recuperação automática.* https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/uva-e-maca, acesso em 2 de fevereiro de 2019.

IBGE, 2016. *Sistema de recuperação automática.* https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/uva-e-maca, acesso em 4 de julho de 2018.

IBGE, 2015. *Sistema de recuperação automática.* https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/uva-e-maca, acesso em 28 de setembro de 2016.

IBRAVIN, 2018. Instituto Brasileiro do Vinho. Cadastro Vinícola. https://www.ibravin.org.br/Noticia/qualidade-marca-a-safra-de-uva-2018-no-rio-grande-do-sul/367, acesso em 7 de fevereiro de 2019.

IBRAVIN, 2017. Instituto Brasileiro do Vinho. Estudo do Mercado Brasileiro de Vinhos Tranquilos e Vinhos Espumantes Quantitativo - Demanda. https://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/downloads/1455901177.pdf, acesso em 7 de fevereiro de 2019.

INES, A; et al. (2009). Revisão: As bactérias do ácido lático do vinho. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, **24** (1), 1-23.

INES, A.F.H., 2007. Abordagem polifásica na caracterização e selecção de bactérias do ácido láctico de vinhos da Região Demarcada do Douro. 198 p. *Tese* (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) (2019). https://www.iso.org/standard/9002.html. Acesso em 24 de janeiro de 2019.

IZQUIERDO-CAÑAS, P. M., et al. Effects of malolactic fermentation on colour stabilityand phenolic composition of Petit Verdot red wines (2016). **Wine Studies**; 5:5795.

IZQUIERDO, P.M., et al. (2004) - Selection of lactic bacteria to induce malolactic fermentation in red wine of cv. Cencibel. **Vitis**, **43**, 149-15.

JAENISCH, F. R. F., et al. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, [s.l.], **40**, (2), p.354-358, fev. 2010.

KIST, B. B., et al. Anuário Brasileiro de Fruticultura, 2018. http://www.editoragazeta.com.br/flip/anuario-fruticultura 2018/files/assets/common/downloads/publication.pdf. Acesso em 7 de fevereiro de 2019.

KLAENHAMMER, T., et al. (2002) – Discovering lactic acid bactéria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82** (1-4): 29-58.

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.

KORKES S; OCHOA S. Adaptive conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus.* J Biol Chem 1948; 176:463-4; PMID:18886184.

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

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

LANDETE, J. M.; FERRER, S.; MONEDERO, V.; ZÚÑIGA, M. Malic Enzyme and Malolactic Enzyme Pathways are Functionally Linked but Independently Regulated in *Lactobacillus casei* BL23. Applied and Environmental Microbiology p. 5509–5518. September 2013, Volume 79, Number 18.

LEE, S-J.; et al. Development of Korean red wines using *Vitis labrusca* varieties: instrumental and sensory characterization**. Food Chemistry**, v. 94, p. 385-393, 2006.

LEE, J.; et al. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.88, n.5, p. 1269-1278, 2005.

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., et al. Malolactic fermentation: the ABC's of MLF. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 31, p.186-212, 2010.

LOMBARDI, S. J., et al. Effect of Phenolic Compounds on the Growth and L-Malic Acid Metabolism of *Oenococcus oeni.* **Journal of Life Sciences**, (**6**): 1225-1231, 2012.

LOPES, R. V. V.; SILVA, F. L. H.; Elaboração de fermentados a partir do figo-da-índia. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 2, p. 305-315, 2006.

LORENTZEN, M. P. G.; LUCAS, P. M. Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.

LUZ, G, C. 2018. Seleção de Bactérias para Fermentação Malolática em vinhos. 2018. *Dissertação* – UCS, Caxias do Sul.

MAGYAR, J., et al. 2013. The influence of delayed malolactic fermentation on Pinot Noir phenolic profiles. *The Australian Research Institute*.

MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**. 2007 Feb;189(4):1199-208.

MANERA C., et al. 2017. Aislamiento y selección de cepas psicrotolerantes de bacterias lácticas enológicas de laregión pa-tagónica. *In IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico* – CONCyT 2017. http://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/6684.

MAMLOUK, D., et alEvaluation and optimization of bacterial genomic DNA extraction for no-culture techniques applied to vinegars. Food Microbiology, v.28, p.1374-1379, 2011.

MEILGAARD, M., et al. *Sensory evaluation techniques*. 4.ed. Boca Raton: *CRC Press*, 2006. 448 p.

MELÉNDEZ, M. E., et al. Psychophysical parameters of colour and the chemometric characterisation of wines of the certified denomination of origin ”Rioja“. **Analytica Chimica Acta**, v.446, p.159–169, 2001.

MELLO, L.M.R. (2017). Panorama da Produção de Uvas e Vinhos no Brasil. Campo e Negócios, pag. 54-56. Disponível em https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/159111/1/MelloCampoNegocio-V22-N142-P54-56-2017.pdf. Acesso 26 de junho de 2018.

MIELE, A., et al. Discrimination of Brazilian red wines according to the viticultural region, varietal, and winery origin. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.268-275, 2010.

MIELE, A. Técnicas de análise sensorial de vinhos e espumantes (2006). *Toda Fruta*. Disponível em:<http://www.todafruta.com.br>. Acesso em: 18 dez. 2017.

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

MORRENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M.C. (2005) – Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45** (4): 265-286.

OIV – Internacional Organization of Vine and Wine. (2016) - *Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts.* Edition 2018. Disponível em: http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-analysis/compendium-international-methodsanalysis-wines-and-musts-2-vol. Acesso em 20 de maio de 2018.

OLIVEIRA, L.C. 2011. Avaliação química e sensorial de vinhos tintos produzidos nas regiões do “Vale do São Francisco” E DA “Serra Gaúcha”. *Dissertação*. Universidade Federal da Bahia. 2011.

ORLA-JENSEN, S. (1919) – The lactic acid bactéria. **Mémomial Academic Royalt. Science Danemark**, Sect. Sci., sér., 5.

PEIXOTO, C. S.F. 2012. Produção de compostos de enxofre por bactérias láticas do vinho durante a fermentação malolática. *Tese.* Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa. 2012. 74p.

POFFO, F.; SILVA, M. A. C. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, **31** (2): 303-307, 2011.

PRAMATEFTAKI, P., et al. (2006) – Evolution of malolactic bacteria and biogenic amones during spontaneous malolactic fermentations in a Greek winery. **Letters in Applied Microbiology 43** (2): 155-160.

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**, v. **64**, n. 9, p.2949-2955, 4 jun. 2014. Microbiology Society. http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.059980-0.

RIBÉREAU-GAYON, P., et al. (2006) – Handbook of Enology – The microbiology of wine and vinifications, (1), *John Wiley & Sons Ltd*, West Sussex, England.

RIBÉREAU-GAYON. P. (2003). Tratado de Enología: química del vino, estabilización y tratamientos. Buenos Aires: *Hemisfério Sur*, V.2.537p.

RIBÉREAU-GAYON, P.; SUDRAUD, P. (1991). Tecnologia enológica moderna. 1ª Edizione *AEB.* Itália.

RIZZON, L. A. (2010). Metodologia para análise de vinho. Brasília, DF, *Embrapa* Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 120 p.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Características analíticas de vinhos Merlot da "Serra Gaúcha". **Ciência Rural**, v. 39, n.6, p.1913-1916, 2009.

RIZZON, L.A.; D'ALL AGNOL I. (2007) - *Vinho Tinto*. Coleção Agroindústria Familiar. EMBRAPA informação tecnológica. Brasília.

RODAS, A. M., et al. 16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.412-422, 2003.

ROTTAVA, I. (2010). Seleção de microrganismos e otimização da biotransformação de monoterpenos. 2010. 0 f. *Tese* (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SÁENZ-NAVAJAS, M-P, et al. An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. **Food Chemistry**, v.121, p. 1139-1149, 2010.

SCHÜMANN, C., et al. (2013) Malolactic enzyme from *Oenococcus oeni* Heterologous expression in *Escherichia coli* and biochemical characterization. Bioengineered 4:3, 147–152.

SCHÜTZ, M.; RADLER F. 1974. Das Vorkommen von Malatenzym und Malo-Lactat-Enzym bei verschiedenen Milchsäurebakterien. **Arch. Microbiol**. 96:329–339.

SOLIERI, L., et al. (2010) - 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**, **108**: 285–298.

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.

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.

SYBESMA, W., et al. (2006) – Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups and industry. **Electronic Journal of Biotechnology 9** (4): 424-448.

TAMURA, K., et al. (2007): Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution, 24**, 1596-1599.

TOPISIROVIC, L., et al. (2006) – Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **Internacional Journal of Food Microbiology 112**: 230-235.

TORTORA, G.J., et al. (2006) – Microbiologia. 8ª edição, 1ª reimpressão, *Artmed*, Porto Alegre-RS.

TSANOVA-SAVOVA, S., RIBAROVA, F. (2002). Free and conjugated myricetin, quercetin, and kaempferol in Bulgarian red wines. **Journal of Food Compositions and analyses** 15:639-645.

VAQUERO, I., et al. (2004) – Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. **Internacional Journal of Food Microbiology 96** (2): 199-204.

VASCONCELOS, N.M., et al. (2013) - Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5 Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. *Embrapa Agroindústria de Alimentos*, Fortaleza. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103342/1/BPD13017.pdf>.

VIGENTINI, I., et al. (2009) – Survey on indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from red wine of Valtellina, a cold climate wine growing Italian area. **International Journal of Food Microbiology 136**: 123-128.

WELLS, A.; J.P. OSBORNE. 2012. Impact of acetaldehyde and pyruvic acid bound sulfur dioxide on wine lactic acid bacteria. **Letters of Applied Microbiology**. 54:187-194.

WIBOWO, D., et al. (1985) – Ocurrence and growth of lactic acid bactéria in wine: a Review. **American Journal of Enology and Viticulture 36** (4): 302-313.

ZAMORA, F., 2003. Elaboración y crianza del vino tinto*:* Aspectos científicos y práticos. 1ª ed. AMV Ediciones. *Ediciones Mundi-Prensa*. Espanha (Madrid).

ZAPPAROLI, G., et al. (2004) – Typical metabolic traits of two *Oenococcus oeni* strains isolated from Valpolicella wines. **Letters Applied in Microbiology 39** (1).

ZAVALETA A.I, et al.. Intraspecific genetic diversity of Oenococcus oeni as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. **Applied Environmental Microbiology**, 1997, **63**(4):1261-7.

APÊNDICES

APÊNDICE I: Parecer de aprovação do CEP-IFRS para Análise Sensorial dos vinhos.

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL DE APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS AUTÓCTONES ISOLADAS NA REGIÃO DA SERRA GAÚCHA

Pesquisador: SHANA PAULA SEGALA MIOTTO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 95133618.7.0000.8024

Instituição Proponente: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Universidade Reg. Int. do Alto do Uruguai e das Missões - URI - Campus Erechim
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul BG

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.066.465

Apresentação do Projeto:

As bactérias ácido láticas são micro-organismos responsáveis pela fermentação malolática nos vinhos, processo que converte o ácido L-Málico em
ácido DL-Lático, proporcionando estabilização microbiológica e maior palatabilidade. Esta fermentação ocorre naturalmente nos vinhos tintos, o que
demonstra a existência de micro-organismos autóctones capazes de realizar esta desacidificação. O objetivo deste trabalho será avaliar as
características sensoriais de vinhos elaborados a partir de bactérias ácido láticas isoladas de vinhos tintos (Cabernet Sauvignon, Merlot e Pinot Noir)
da serra gaúcha e testar sua potencial aplicação na indústria vinícola. A partir dos resultados espera-se que as bactérias nativas, quando
comparadas as cepas comerciais Lactobacillus plantarum e Oenococcus oeni, apresentem potencial malolático, melhorando a qualidade organoléptica dos vinhos independente da variedade de uva da qual forem isoladas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Como trata-se de avaliação sensorial existe a necessidade de ingestão da amostra, portanto existem riscos na participação do voluntário caso o mesmo seja alérgico a uva e seus subprodutos, álcool e produtos fermentados, sendo assim, o mesmo não deverá participar desta avaliação.

Benefícios:

A ingestão de bebidas derivadas da uva pode beneficiar a saúde devido a presença de compostos como as antocianinas, taninos (compostosantioxidantes) e o resveratrol (anti-inflamatório).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As alterações solicitadas no parecer anterior foram parcialmente atendidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados e em conformidade com a legislação vigente.

Recomendações:

O projeto detalhado deveria ter seu cronograma atualizado em consonância com as Informações Básicas do Projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

O projeto está aprovado e, após a finalização da última etapa, conforme cronograma cadastrado na Plataforma Brasil, o pesquisador possui o prazo de 60 dias para envio do relatório final via Plataforma.

Endereço: Rua General Osório, 348
Bairro: CENTRO **CEP:** 95.700-086
UF: RS **Município:** BENTO GONCALVES
Telefone: (54)3449-3340 **E-mail:** cepesquisa@ifrs.edu.br

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1156471.pdf	19/11/2018 15:11:01		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_BALs_result_preli.docx	19/11/2018 15:10:20	SHANA PAULA SEGALA MIOTTO	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta.pdf	19/11/2018 14:52:42	SHANA PAULA SEGALA MIOTTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Assentimento.jpg	19/11/2018 14:52:25	SHANA PAULA SEGALA MIOTTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_corrigido.pdf	19/11/2018 14:14:57	SHANA PAULA SEGALA MIOTTO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	03/08/2018 15:15:05	SHANA PAULA SEGALA MIOTTO	Aceito
Outros	Ficha.pdf	03/08/2018 14:20:47	SHANA PAULA SEGALA MIOTTO	Aceito
Outros	Termo_consentimento.pdf	03/08/2018 14:17:45	SHANA PAULA SEGALA MIOTTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BENTO GONCALVES, 07 de Dezembro de 2018

Assinado por:
MARCELO MALLET SIQUEIRA CAMPOS
(Coordenador(a))

APÊNDICE II: Termo de assentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da avaliação sensorial de seis (08) amostras de vinho, para teste de aceitação e preferência, com a necessidade da ingestão do produto. Caso seja alérgico a uva e seus subprodutos, não deverá participar desta avaliação. Serão mantidos todos os preceitos ético-legais durante e após o término da pesquisa, de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Para participar desta avaliação você não terá nenhum custo e nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e em caso de desistência, não acarreta a qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo idealizador do estudo. O idealizador irá tratar sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Apesar disso, você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de qualquer dano eventualmente produzido pela pesquisa. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

Eu, _____, portador(a) do RG ou CPF nº _____, fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas. Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntário(a), do estudo "ANÁLISE SENSORIAL DE VINHOS ELABORADOS COM BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS AUTÓCTONES DA SERRA GAÚCHA".

Bento Gonçalves, ____de _____de _____.

_____ _____

Assinatura do (a) participante Assinatura do (a) pesquisador(a)

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, poderei consultar:

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Federal do Rio Grande do Sul

E-mail: cepesquisa@ifrs.edu.br/ **Telefone:** (54) 3449-3340

Endereço: Rua General Osório, 348, Centro, Bento Gonçalves, RS, CEP: 95.700-000

Pesquisador(a) principal: Shana Paula Segala Miotto

Telefone para contato: (54) 3455 – 3200, ramal 412

E-mail para contato: paula.miotto@bento.ifrs.edu.br

APÊNDICE III: Ficha para avaliação sensorial vinhos tintos submetidos FML.

Ficha de avaliação sensorial de vinho tinto	
Avaliador:_____ Código amostra:_____	Data ___/___/___
Avalie as amostras de vinhos tintos, conforme as instruções repassadas (Prove as amostras na sequência recebida, entre cada amostra limpe o palato utilizando água, caso necessário solicite mais amostras/água ao orientador) e expresse seu conceito marcando com um traço vertical na escala não- estruturada.	
Pouco intensa	Intensidade da cor _____ Muito intensa
Fraco	Aroma frutado _____ Forte
Fraco	Aroma Lático _____ Forte
Fraca	Acidez _____ Forte
Ligeira	Persistência do Gosto _____ Persistente
Desgostei muitíssimo	Aspecto Global _____ Gostei muitíssimo
Comentários:	

APENDICE IV: Características morfológicas dos 245 isolados obtidos de vinhos tintos na Serra Gaúcha nas safras de 2016 e 2017.

Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)	Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)
1	CS (16) 1A1	X	X	-	-	-	124	CS (17) 112	X	X	-	X	X
2	CS (16) 2A1	X	X	-	-	-	125	CS (17) 113	-	-	-	-	-
3	CS (16) 3A1	X	X	-	X	X	126	CS (17) 114	-	-	-	-	-
4	CS (16) 4A1	X	X	-	X	X	127	ME (16) 1A1	X	X	-	X	X
5	CS (16) 1B1	-	-	-	-	-	128	ME (16) 2A1	X	X	-	X	X
6	CS (16) 2B1	-	-	-	-	-	129	ME (16) 3A1	-	-	-	-	-
7	CS (16) 3B1	X	X	-	X	X	130	ME (16) 4A1	-	-	-	-	-
8	CS (16) 4B1	X	-	X	X	X	131	ME (16) 5A1	X	X	-	X	X
9	CS (16) 1C1	-	-	-	-	-	132	ME (16) 1B1	-	-	-	-	-
10	CS (16) 2C1	-	-	-	-	-	133	ME (16) 2B1	X	X	-	X	X
11	CS (16) 3C1	X	-	X	X	X	134	ME (16) 3B1	-	-	-	-	-
12	CS (16) 4C1	X	-	X	X	X	135	ME (16) 4B1	-	-	-	-	-
13	CS (17) 1	-	-	-	-	-	136	ME (16) 5B1	X	X	-	X	X
14	CS (17) 2	X	-	X	X	X	137	ME (17) 1	X	-	X	-	-
15	CS (17) 3	-	-	-	-	-	138	ME (17) 2	X	-	X	-	-
16	CS (17) 4	-	-	-	-	-	139	ME (17) 3	-	-	-	-	-
17	CS (17) 5	X	X	-	X	X	140	ME (17) 4	-	-	-	-	-
18	CS (17) 6	-	-	-	-	-	141	ME (17) 5	-	-	-	-	-
19	CS (17) 7	-	-	-	-	-	142	ME (17) 6	-	-	-	-	-
20	CS (17) 8	X	X	-	X	X	143	ME (17) 7	-	-	-	-	-
21	CS (17) 9	-	-	-	-	-	144	ME (17) 8	-	-	-	-	-
22	CS (17) 10	X	X	-	X	X	145	ME (17) 9	-	-	-	-	-
23	CS (17) 11	-	-	-	-	-	146	ME (17) 10	-	-	-	-	-

Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)	Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)
24	CS (17) 12	-	-	-	-	-	147	ME (17) 11	-	-	-	-	-
25	CS (17) 13	-	-	-	-	-	148	ME (17) 12	X	X	-	-	-
26	CS (17) 14	X	X	-	X	X	149	ME (17) 13	-	-	-	-	-
27	CS (17) 15	-	-	-	-	-	150	ME (17) 14	-	-	-	-	-
28	CS (17) 16	X	X	-	X	X	151	ME (17) 15	X	-	X	-	-
29	CS (17) 17	-	-	-	-	-	152	ME (17) 16	-	-	-	-	-
30	CS (17) 18	-	-	-	-	-	153	ME (17) 17	X	-	X	-	-
31	CS (17) 19	-	-	-	-	-	154	ME (17) 18	-	-	-	-	-
32	CS (17) 20	-	-	-	-	-	155	ME (17) 19	-	-	-	-	-
33	CS (17) 21	-	-	-	-	-	156	ME (17) 20	-	-	-	-	-
34	CS (17) 22	-	-	-	-	-	157	ME (17) 21	-	-	-	-	-
35	CS (17) 23	-	-	-	-	-	158	ME (17) 22	-	-	-	-	-
36	CS (17) 24	-	-	-	-	-	159	ME (17) 23	X	X	-	X	X
37	CS (17) 25	-	-	-	-	-	160	ME (17) 24	-	-	-	-	-
38	CS (17) 26	-	-	-	-	-	161	ME (17) 25	-	-	-	-	-
39	CS (17) 27	-	-	-	-	-	162	ME (17) 26	X	-	X	X	X
40	CS (17) 28	-	-	-	-	-	163	ME (17) 27	-	-	-	-	-
41	CS (17) 29	-	-	-	-	-	164	ME (17) 28	-	-	-	-	-
42	CS (17) 30	-	-	-	-	-	165	ME (17) 29	-	-	-	-	-
43	CS (17) 31	-	-	-	-	-	166	PN (17) 1	-	-	-	-	-
44	CS (17) 32	-	-	-	-	-	167	PN (17) 2	-	-	-	-	-
45	CS (17) 33	X	-	X	X	X	168	PN (17) 3	-	-	-	-	-
46	CS (17) 34	X	-	X	X	X	169	PN (17) 4	-	-	-	-	-
47	CS (17) 35	-	-	-	-	-	170	PN (17) 5	-	-	-	-	-
48	CS (17) 36	-	-	-	-	-	171	PN (17) 6	-	-	-	-	-
49	CS (17) 37	-	-	-	-	-	172	PN (17) 7	-	-	-	-	-
50	CS (17) 38	X	-	X	X	X	173	PN (17) 8	-	-	-	-	-

Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)	Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)
51	CS (17) 39	X	X	-	X	X	174	PN (17) 9	X	X	-	-	-
52	CS (17) 40	-	-	-	-	-	175	PN (17) 10	-	-	-	-	-
53	CS (17) 41	X	-	X	X	X	176	PN (17) 11	-	-	-	-	-
54	CS (17) 42	-	-	-	-	-	177	PN (17) 12	-	-	-	-	-
55	CS (17) 43	-	-	-	-	-	178	PN (17) 13	-	-	-	-	-
56	CS (17) 44	X	-	X	X	X	179	PN (17) 14	-	-	-	-	-
57	CS (17) 45	-	-	-	-	-	180	PN (17) 15	X	X	-	-	-
58	CS (17) 46	-	-	-	-	-	181	PN (17) 16	-	-	-	-	-
59	CS (17) 47	-	-	-	-	-	182	PN (17) 17	-	-	-	-	-
60	CS (17) 48	X	-	X	X	X	183	PN (17) 18	-	-	-	-	-
61	CS (17) 49	-	-	-	-	-	184	PN (17) 19	X	X	-	-	-
62	CS (17) 50	X	-	X	X	X	185	PN (17) 20	-	-	-	-	-
63	CS (17) 51	-	-	-	-	-	186	PN (17) 21	-	-	-	-	-
64	CS (17) 52	X	-	X	X	X	187	PN (17) 22	X	X	-	-	-
65	CS (17) 53	-	-	-	-	-	188	PN (17) 23	-	-	-	-	-
66	CS (17) 54	-	-	-	-	-	189	PN (17) 24	-	-	-	-	-
67	CS (17) 55	-	-	-	-	-	190	PN (17) 25	-	-	-	-	-
68	CS (17) 56	X	-	X	X	X	191	PN (17) 26	-	-	-	-	-
69	CS (17) 57	-	-	-	-	-	192	PN (17) 27	-	-	-	-	-
70	CS (17) 58	-	-	-	-	-	193	PN (17) 28	-	-	-	-	-
71	CS (17) 59	-	-	-	-	-	194	PN (17) 29	-	-	-	-	-
72	CS (17) 60	-	-	-	-	-	195	PN (17) 30	-	-	-	-	-
73	CS (17) 61	-	-	-	-	-	196	PN (17) 31	-	-	-	-	-
74	CS (17) 62	-	-	-	-	-	197	PN (17) 32	-	-	-	-	-
75	CS (17) 63	-	-	-	-	-	198	PN (17) 33	-	-	-	-	-
76	CS (17) 64	-	-	-	-	-	199	PN (17) 24	-	-	-	-	-
77	CS (17) 65	-	-	-	-	-	200	PN (17) 25	-	-	-	-	-

Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)	Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)
78	CS (17) 66	-	-	-	-	-	201	PN (17) 36	-	-	-	-	-
79	CS (17) 67	-	-	-	-	-	202	PN (17) 37	-	-	-	-	-
80	CS (17) 68	-	-	-	-	-	203	PN (17) 38	X	X	-	X	X
81	CS (17) 69	-	-	-	-	-	204	PN (17) 39	X	X	-	X	X
82	CS (17) 70	-	-	-	-	-	205	PN (17) 40	X	X	-	X	X
83	CS (17) 71	X	X	-	-	-	206	PN (17) 41	-	-	-	-	-
84	CS (17) 72	X	X	-	-	-	207	PN (17) 42	-	-	-	-	-
85	CS (17) 73	-	-	-	-	-	208	PN (17) 43	-	-	-	-	-
86	CS (17) 74	-	-	-	-	-	209	PN (17) 44	-	-	-	-	-
87	CS (17) 75	-	-	-	-	-	210	PN (17) 45	X	-	X	-	-
88	CS (17) 76	X	-	X	-	-	211	PN (17) 46	X	-	X	-	-
89	CS (17) 77	-	-	-	-	-	212	PN (17) 47	X	-	X	-	-
90	CS (17) 78	-	-	-	-	-	213	PN (17) 48	-	-	-	-	-
91	CS (17) 79	-	-	-	-	-	214	PN (17) 49	-	-	-	-	-
92	CS (17) 80	-	-	-	-	-	215	PN (17) 50	-	-	-	-	-
92	CS (17) 81	-	-	-	-	-	216	PN (17) 51	-	-	-	-	-
94	CS (17) 82	X	-	X	X	X	217	PN (17) 52	-	-	-	-	-
95	CS (17) 83	-	-	-	-	-	218	PN (17) 53	X	-	X	-	-
96	CS (17) 84	-	-	-	-	-	219	PN (17) 53	X	-	X	-	-
97	CS (17) 85	X	-	X	X	X	220	PN (17) 55	X	X	-	-	-
98	CS (17) 86	-	-	-	-	-	221	PN (17) 56	X	X	-	-	-
99	CS (17) 87	-	-	-	-	-	222	PN (17) 57	-	-	-	-	-
100	CS (17) 88	X	X	-	X	X	223	PN (17) 58	-	-	-	-	-
101	CS (17) 89	-	-	-	-	-	224	PN (17) 59	X	X	-	X	X
102	CS (17) 90	-	-	-	-	-	225	PN (17) 60	-	-	-	-	-
103	CS (17) 91	X	X	-	X	X	226	PN (17) 61	-	-	-	-	-
104	CS (17) 92	-	-	-	-	-	227	PN (17) 62	X	X	-	X	X

Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)	Nº	Isolado	Cor Branca	Coco	Bacilo	Catalase (-)	Gram (+)
105	CS (17) 93	-	-	-	-	-	228	PN (17) 63	-	-	-	-	-
106	CS (17) 94	X	X	-	X	X	229	PN (17) 64	-	-	-	-	-
107	CS (17) 95	-	-	-	-	-	230	PN (17) 65	X	X	-	X	X
108	CS (17) 96	-	-	-	-	-	231	PN (17) 66	-	-	-	-	-
109	CS (17) 97	X	X	-	X	X	232	PN (17) 67	-	-	-	-	-
110	CS (17) 98	-	-	-	-	-	233	PN (17) 68	X	X		X	X
111	CS (17) 99	-	-	-	-	-	234	PN (17) 69	-	-	-	-	-
112	CS (17) 100	X	-	X	X	X	235	PN (17) 70	-	-	-	-	-
113	CS (17) 101	-	-	-	-	-	236	PN (17) 71	X	X	-	X	X
114	CS (17) 102	X	-	X	X	X	237	PN (17) 72	-	-	-	-	-
115	CS (17) 103	-	-	-	-	-	238	PN (17) 73	-	-	-	-	-
116	CS (17) 104	-	-	-	-	-	239	PN (17) 74	-	-	-	-	-
117	CS (17) 105	-	-	-	-	-	240	PN (17) 75	X	-	X	X	X
118	CS (17) 106	X	-	X	X	X	241	PN (17) 76	-	-	-	-	-
119	CS (17) 107	-	-	-	-	-	242	PN (17) 77	X	-	X	X	X
120	CS (17) 108	X	-	X	X	X	243	PN (17) 78	-	-	-	-	-
121	CS (17) 109	-	-	-	-	-	244	PN (17) 79	-	-	-	-	-
122	CS (17) 110	-	-	-	-	-	245	PN (17) 80	X	-	X	X	X
123	CS (17) 111	-	-	-	-	-							

*Onde X, representa que o micro-organismo atendeu ao critério.

APÊNDICE V: Médias simples de pH obtidas de 49 isolados de BAL durante 60 dias de FML em vinho sintético.

	Dias de Fermentação												
Isolado	**0**	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**	**35**	**40**	**45**	**50**	**55**	**60**
CS (16) 3A1	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,21	3,21	3,21	3,23	3,25
CS (16) 3B1	3,20	3,20	3,23	3,23	3,23	3,25	3,29	3,35	3,38	3,38	3,38	3,38	3,38
CS (16) 3C1	3,20	3,20	3,21	3,21	3,21	3,23	3,26	3,27	3,30	3,31	3,31	3,31	3,31
CS (16) 4A1	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (16) 4B1	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (16) 4C1	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,21	3,21	3,21	3,21	3,23
ME (16) 1A1	3,20	3,20	3,21	3,26	3,32	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39
ME (16) 2A1	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,23	3,25	3,29	3,35
ME (16) 2B1	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,21	3,23	3,26	3,30
ME (16) 5A1	3,20	3,20	3,20	3,23	3,23	3,23	3,23	3,23	3,23	3,28	3,30	3,32	3,33
ME (16) 5B1	3,20	3,20	3,20	3,23	3,25	3,28	3,30	3,30	3,32	3,32	3,32	3,32	3,32
CS (16) 2	3,20	3,20	3,23	3,23	3,23	3,25	3,29	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35
CS (17) 5	3,20	3,20	3,22	3,23	3,23	3,28	3,33	3,35	3,39	3,35	3,35	3,35	3,35
CS (17) 8	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,23	3,23	3,23	3,25	3,29	3,35	3,35	3,35
CS (17) 10	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,22	3,23	3,23	3,28	3,33	3,35	3,36	3,36
CS (17) 14	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,23	3,25	3,29	3,31
CS (17) 16	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,25	3,29	3,31	3,25	3,29	3,31	3,31
CS (17) 33	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,23	3,23	3,23	3,23
CS (17) 34	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 38	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 39	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,21	3,23	3,26	3,27
CS (17) 41	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,24	3,30	3,32	3,31	3,34	3,34	3,34
CS (17) 44	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 48	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 50	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20

	Dias de Fermentação												
Isolado	**0**	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**	**35**	**40**	**45**	**50**	**55**	**60**
CS (17) 52	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 56	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,21	3,23	3,26	3,27
CS (17) 82	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,23	3,23	3,23	3,23
CS (17) 85	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,21	3,21	3,21	3,21	3,21	3,21
CS (17) 88	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 91	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 94	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 97	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 100	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,25	3,31	3,31	3,32	3,32	3,32	3,32
CS (17) 102	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,24	3,28	3,30	3,30	3,30	3,30	3,30
CS (17) 106	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,21	3,20	3,21	3,21	3,21	3,22	3,23
CS (17) 108	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
CS (17) 112	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20
ME (17) 19	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,23	3,25	3,29	3,31
ME (17) 23	3,20	3,20	3,20	3,20	3,22	3,21	3,22	3,23	3,24	3,26	3,26	3,26	3,33
ME (17) 26	3,20	3,20	3,23	3,23	3,23	3,25	3,29	3,35	3,38	3,38	3,38	3,38	3,38
PN (17) 59	3,20	3,20	3,20	3,21	3,23	3,23	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	3,28
PN (17) 62	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,23	3,25	3,29	3,29	3,25
PN (17) 65	3,20	3,23	3,23	3,23	3,25	3,29	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35	3,38
PN (17) 68	3,20	3,20	3,20	3,22	3,21	3,22	3,23	3,24	3,26	3,26	3,26	3,29	3,29
PN (17) 71	3,20	3,20	3,24	3,24	3,28	3,32	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36	3,36	3,28
PN (17) 75	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,20	3,23	3,25	3,29	3,29	3,34
PN (17) 77	3,20	3,20	3,20	3,22	3,21	3,22	3,23	3,24	3,26	3,26	3,26	3,26	3,26
PN (17) 80	3,20	3,23	3,23	3,23	3,25	3,29	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35	3,25
L. plantarum	3,20	3,22	3,23	3,23	3,28	3,33	3,35	3,39	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35
O. Oeni	3,20	3,23	3,25	3,25	3,31	3,39	3,40	3,40	3,40	3,40	3,40	3,40	3,40

APÊNDICE VI: Valores obtidos para pF de amostra e pF de repetição (entre parênteses) gerados para cada atributo pelos julgadores durante treinamento.

	Atributos							
Julgadores (J)	**Intensidade da cor**	**Aroma lático**	**Aroma frutado**	**Acidez**	**Persistência do gosto**	**D**	**R**	**T**
J 1	0,0818 (0,0985)	0,0376 (0,6237)	0,3432 (0,1342)	0,0645 (0,4650)	0,0002 (0,7827)	0	0	0
J 2	0,1804 (0,8144)	0,0902 (0,9505)	0,0539 (0,8993)	0,0087 (0,6434)	0,0006 (0,3536)	0	0	0
J 3	0,2398 (0,3402)	**0,6093** (0,2405)	**0,8149** (0,6359)	**0,8672** (0,7867)	**0,6793** (0,1404)	4	0	4
J 4	0,0346 (0,2115)	**0,9276** (0,3044)	0,2695 **(0,0377)**	**0,9821** (0,8872)	**0,8761** (0,5720)	3	1	4
J 5	0,1038 (0,7789)	0,2078 (0,2905)	0,0141 (0,4386)	0,3266 (0,8142)	0,0001 (0,8237)	0	0	0
J 6	0,3093 (0,3791)	0,4322 (0,2227)	0,0049 (0,6323)	0,3645 (0,8320)	0,0001 (0,9211)	0	0	0
J 7	0,1170 (0,0652)	0,0024 **(0,0022)**	0,2391 (0,3815)	**0,8408** (0,2048)	**0,7038** (0,4879)	2	1	3
J 8	0,8904 (0,3806)	0,4273 (0,2252)	0,0165 (0,5191)	0,0510 (0,2785)	0,0004 (0,9955)	0	0	0
J 9	0,2055 (0,4736)	0,3359 (0,1809)	0,0746 (0,4953)	0,3635 (0,8120)	0,0003 (0,6527)	0	0	0
J 10	0,0043 (0,2406)	**0,6442** (0,2692)	0,2252 (0,6532)	**0,9931** (0,8974)	**0,5841** (0,2952)	3	0	3
J 11	0,0363 (0,2631)	**0,6309** (0,0111)	**0,6930** (0,8399)	0,0610 **(0,0441)**	**0,8863** **(0,0275)**	3	2	5
J 12	0,0004 (0,3557)	0,1681 (0,7454)	0,3427 (0,1891)	0,1398 (0,2180)	0,0001 (0,8501)	0	0	0
J 13	0,056 (0,1236)	0,0172 (0,6126)	0,1621 (0,0915)	0,0521 (0,9944)	0,0077 (0,9135)	0	0	0

Julgadores (J)	Atributos					D	R	T
	Intensidade da cor	Aroma lático	Aroma frutado	Acidez	Persistência do gosto			
J 14	0,0538 (0,3537)	0,0247 (0,2248)	0,0240 (0,6915)	0,0076 (0,1963)	0,0046 (0,2064)	0	0	0
J 15	0,3520 (0,4212)	0,1486 (0,2114)	0,0140 (0,4126)	0,0153 (0,2980)	0,0150 (0,8249)	0	0	0
J 16	0,1020 (0,8584)	0,0835 (0,9567)	0,0530 (0,5143)	0,0031 (0,3596)	0,0011 (0,6746)	0	0	0
J 17	0,4366 (0,0385)	0,0233 (0,6337)	0,0185 (0,7939)	0,0619 (0,4882)	0,0001 (0,7355)	0	0	0
J 18	0,0186 (0,4307)	0,0665 (0,6785)	0,4528 (0,3252)	0,0087 (0,1972)	0,0001 (0,5626)	0	0	0

Valores em negrito indicam a discriminação ou repetibilidade insuficientes. D = número de vezes em que o julgador não discriminou as amostras no nível de significância $p<0,50$; R = número de vezes em que o julgador não apresentou repetibilidade no nível de significância $p<0,50$. Total é dado por T=D+R.