

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE VINHOS INOCULADOS COM BACTÉRIAS LÁCTICAS

ARLETE MENDES FAIA

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

RESUMO

A fermentação maloláctica foi induzida pela inoculação com diversas estirpes em vários lotes, de vinhos diferentes, após o esgotamento total dos açúcares pelas leveduras. Foram utilizadas várias estirpes de bactérias lácticas isoladas de vinhos e pertencentes às espécies *Leuconostoc oenos*, *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus delbruekii*. Procedeu-se à análise química dos vinhos resultantes, incluindo a determinação de alguns compostos voláteis por cromatografia gasosa. De acordo com os resultados obtidos não foram detectadas diferenças significativas entre os vinhos fermentados com as várias estirpes. Todavia, observou-se um acréscimo na concentração total dos álcoois superiores nalguns vinhos e noutros um decréscimo quando comparados com o controlo. Isto leva-nos a admitir que provavelmente a composição do vinho terá maior influência que a estirpe na formação destes compostos. Observou-se também um acréscimo no teor de acetaldeído num dos ensaios e um decréscimo no valor deste composto noutra experiência. Detectou-se ainda um problema de antagonismo entre a espécie *Lactobacillus delbruekii* e uma estirpe indígena.

INTRODUÇÃO

A fermentação maloláctica, descarboxilação do ácido L(-) málico a ácido L(+) láctico, pela actividade metabólica de bactérias lácticas, tem sido considerada indispensável à qualidade dos vinhos tintos. Nos vinhos muito ácidos, é particularmente importante pela redução de acidez e elevação do pH que provoca. Pelo contrário, nos vinhos com acidez baixa pretende-se apenas, com a sua ocorrência, a obtenção de estabilidade microbológica e melhoria no aroma e sabor dos vinhos. A modificação do aroma é atribuída à formação de ácido láctico e outros produtos como a acetoina, o diacetilo e o 2,3-butanodiol (Fornachon

e Lloyd, 1965; Kunkee, 1967 e 1974; Mascarenhas, 1984). Além disso, tem sido observado um acréscimo na concentração de compostos voláteis nomeadamente ácido acético, alguns ésteres, succinato de etilo (Pilone *et al.*, 1966) lactato de etilo e 2,3-butanodiol (Zeeman *et al.*, 1982) e ainda vários álcoois superiores (Radler, 1972). Porém, enquanto alguns autores salientam os benefícios da inoculação com estirpes bacterianas seleccionadas a fim de evitar maus aromas associados a fermentações espontâneas (Beelman *et al.*, 1977 e 1980; Giannakopoulos *et al.*, 1984), outros não observaram diferenças significativas nas características químicas e organolépticas dos vinhos, desacidificados por diversas estirpes (Pilone e Kunkee, 1965) ou desacidificados quimicamente (Castino *et al.*, 1975).

Por isso, o objectivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação, com diversas espécies de bactérias lácticas, nas características químicas dos vinhos, principalmente na concentração de álcoois superiores.

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos e condições de crescimento

Foram utilizadas neste trabalho várias estirpes de *Leuconostoc oenos*, *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus delbrukii*. As estirpes mantidas no frigorífico a 5° C, foram repicadas para TGB caldo e posteriormente repicadas para GB. Após uma semana de incubação a 25° C, o crescimento foi avaliado por turbidimetria e a inoculação dos vinhos foi efectuada com aproximadamente o mesmo número de células em todas as estirpes.

Meios de cultura

TGB — Este meio de cultura é constituído por 2 % de trip-tona, 0,5 % de peptona, 0,5 % extracto de levedura, 0,5 % de glicose, 0,1 % de extracto de fígado e 0,005 % de Tween 80. Todos estes ingredientes foram adicionados a sumo de tomate diluído (5 vezes) e o pH foi acertado a 4,5 com ácido fosfórico. O meio de cultura GB tem igual composição química não se fazendo porém a adição do sumo de tomate.

Vinhos

Foram utilizados neste ensaio vinhos das colheitas de 1986 e 1987, de proveniência diversa, após esgotamento total dos açúcares. Antes da inoculação, os vinhos foram centrifugados a 10 000 g durante 15 minutos, sendo seguidamente distribuídos em garrações de 2,5 litros, em triplicado. Parte dos vinhos foram também esterilizados por filtração, através de membranas de 0,2 μm de poro e distribuídos em frascos de 500 ml, em duplicado. Procedeu-se seguidamente à inoculação dos vinhos (1%) e em todos os ensaios foram utilizados como controlos vinhos não inoculados.

Análises efectuadas

A acidez titulável e a acidez volátil foram determinadas pelos métodos descritos por Ribereau-Gayon *et al.* (1971). O dióxido de enxofre livre e combinado foram avaliados pelo método de Ripper. O pH foi determinado por potenciometria, num aparelho ORION 601A com eléctrodo combinado.

O desaparecimento do ácido málico e o aparecimento do ácido láctico foram avaliados qualitativamente por cromatografia em papel, diariamente durante a primeira semana e depois uma vez por semana.

A avaliação quantitativa dos compostos voláteis dos vinhos foi efectuado num cromatógrafo VARIAN 3700. Utilizou-se uma coluna 1540-10% Carbovax-WAW de 60 a 80 mesh e com 7,5 metros. Como fase móvel utilizou-se o azoto e um fluxo de 25 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ e um detector FID. Os resultados foram registados e integrados num VARIAN CDS 401. As condições de funcionamento do cromatógrafo gasoso foram as seguintes: temperatura do detector 210° C, do injectore 180° C, e da coluna 91° C. Injectou-se 0,5 μl de destilado e foi utilizado o 4-metil-2-pentanol como padrão interno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na colheita de 1981 iniciámos o isolamento de estirpes bacterianas de vinhos tintos, após a ocorrência da fermentação maloláctica. As estirpes foram identificadas, pelo sistema API e por métodos convencionais, tendo-se verificado que a maioria

se englobava na espécie *Leuconostoc oenos* (Mendes Faia, 1987). Na colheita de 1985 os vinhos apresentaram uma acidez fixa inferior ao normal e surgiram cocos aos pares e em tétradas, identificados como *Pediococcus damnosus*. A actividade maloláctica das várias estirpes foi avaliada pela sua inoculação em vinhos, obtidos por microvinificação no laboratório. Utilizaram-se como controlos as estirpes *Leuconostoc oenos* ML34 e *Lactobacillus delbruekii* CUCI, provenientes da colecção do Prof. Kunkke — Departamento de Viticultura e Enologia da Universidade da Califórnia, Davis. Verificámos que a descarboxilação do ácido málico foi mais rápida nos vinhos inoculados com as estirpes indígenas. Posteriormente foram estudadas (Mendes Faia, 1987) as características das espécies isoladas as quais são, apresentadas resumidamente no Quadro 1. Todas as estirpes de *Leuconostoc oenos* metabolizaram a glicose, a frutose e a manose e ainda as pentoses, D-ribose e L-arabinose. Pelo contrário, as estirpes de *Pediococcus damnosus* não metabolizaram pentoses nem ácido cítrico — principais fontes de acetato nos vinhos — e, além disso, a produção de diacetilo + acetoína não foi mais elevada do que a observada em *Leuconostoc oenos* (Mendes Faia, 1987). Estas foram as razões que nos levaram a utilizar neste estudo uma estirpe de *Pediococcus damnosus*, embora sejam do nosso conhecimento as referências na literatura sobre efeitos nefastos desta espécie em algumas bebidas alcoólicas (Rainbow, 1975).

De acordo com os resultados que obtivemos neste estudo, sumarizados nos Quadros 2, 3, 4 e 5, para o mesmo vinho, não houve variação significativa na formação de álcoois superiores entre estirpes. No entanto, a actividade metabólica das bactérias provocou diferenças significativas na concentração dos álcoois nos vinhos inoculados, quando comparados com os controlos. Nos vinhos 1 e 3, observou-se um acréscimo significativo destes compostos, particularmente devido aos teores mais elevados dos álcoois amílico + isoamílico e isobutílico. Estes resultados foram observados em todas as estirpes, embora em *Leuconostoc oenos* 8A esse acréscimo tenha sido menor. No vinho 2, pelo contrário, houve um decréscimo significativo na concentração dos referidos álcoois superiores. Estes resultados levaram-nos a admitir que, provavelmente, a composição do vinho terá maior influência que a estirpe nos metabolitos produzidos.

QUADRO 1

Características das espécies de *Leuconostoc oenos* e *Pediococcus damnosus* isoladas dos vinhos da região de Trás-os-Montes e Alto Douro (Mendes Faia, 1987)

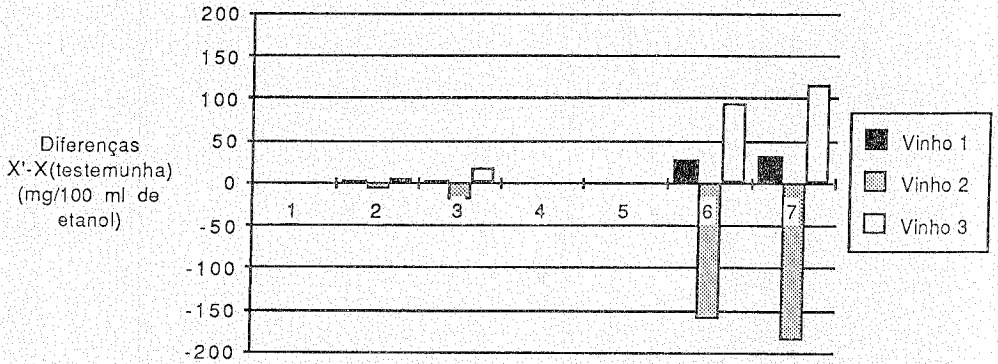
Summary of characteristics of Leuconostoc oenos and Pediococcus damnosus isolated from wines of the Trás-os-Montes and Alto Douro region

| Características | <i>Leuconostoc oenos</i> | <i>Pediococcus damnosus</i> |
|--|--------------------------|-----------------------------|
| Morfologia | | |
| Coloração de Gram | + | + |
| Presença de catalase | - | - |
| Ácido láctico a partir da glicose | + | + |
| CO ₂ a partir da glicose | + | - |
| Produção de amônia a partir da L-arginina | - | - |
| Isômero de ácido láctico produzido a partir da glicose | D | DL |
| Descarboxilação do ácido L-málico em presença de glicose | + | + |
| Utilização do ácido cítrico em presença da glicose | + | - |
| Crescimento em TGB (pH 4.0), com 10 % de etanol | + | + |
| Crescimento em TGB com pH | | |
| | 3.5 | + |
| | 4.0 | + |
| | 4.5 | + |
| | 5.0 | + |
| | 5.5 | + |

QUADRO 2

Varição dos teores em alcoóis superiores nos vinhos inoculados com *Leuconostoc oenos* 8A

Differences in higher alcohols content in wines inoculated with Leuconostoc oenos 8A

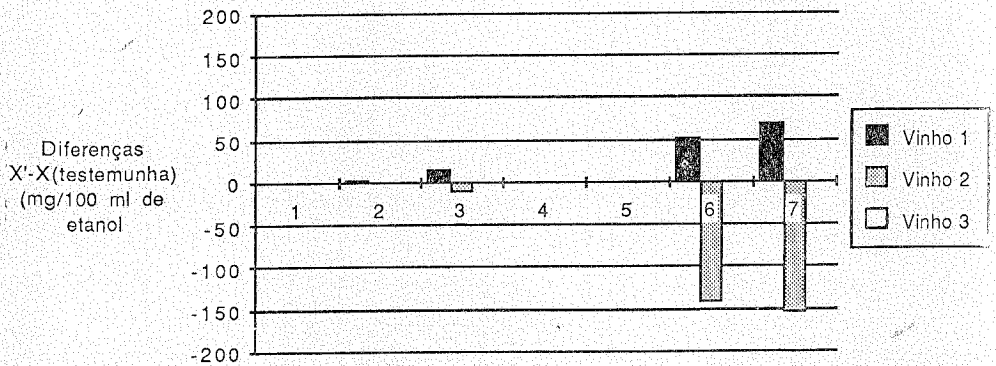


1: 2-butílico; 2: n-propílico; 3: isobutílico; 4: alílico; 5: n-butílico; 6: amílico + isoamílico; 7: total.

QUADRO 3

Varição dos teores em alcoóis superiores nos vinhos inoculados com *Leuconostoc oenos* ML34

Differences in higher alcohols content in wines inoculated with Leuconostoc oenos ML34



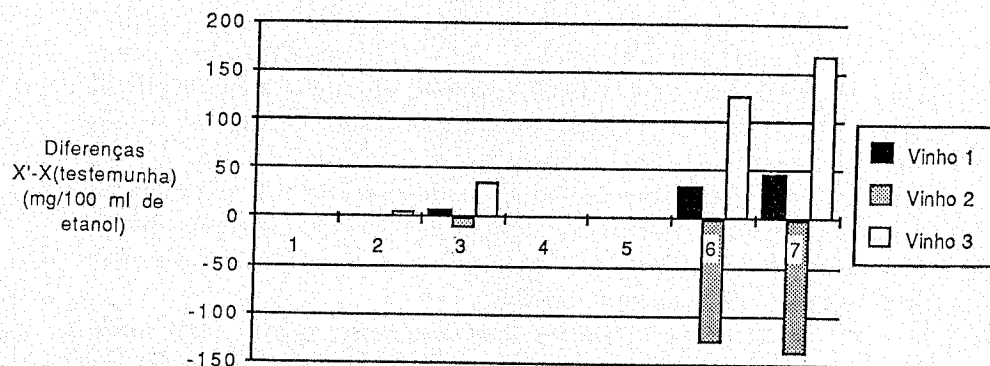
1: 2-butílico; 2: n-propílico; 3: isobutílico; 4: alílico; 5: n-butílico; 6: amílico + isoamílico; 7: total.

O vinho 3 não foi inoculado com a estirpe ML34 por estar contaminada.

QUADRO 4

Variação dos teores em alcoóis superiores nos vinhos inoculados com *Pediococcus damnosus* 12A

*Differences in higher alcohols content in wines inoculated with *Pediococcus damnosus* 12A*

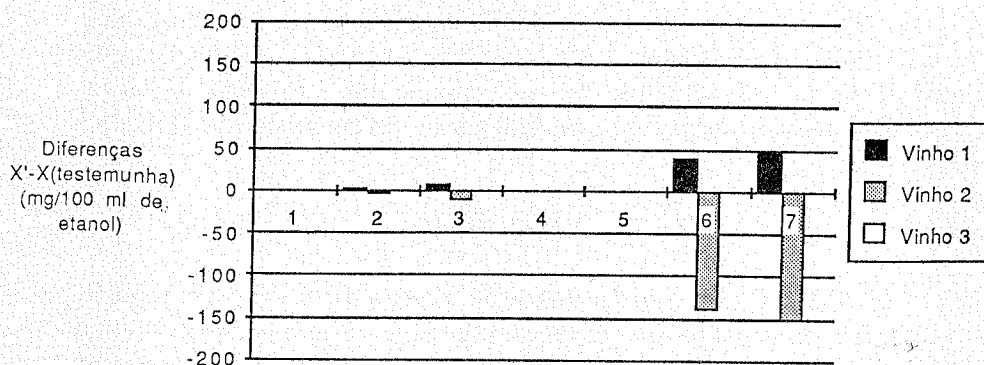


1: 2-butílico; 2: n-propílico; 3: isobutílico; 4: alílico; 5: n-butílico; 6: amílico + isoamílico; 7: total.

QUADRO 5

Variação dos teores em alcoóis superiores nos vinhos inoculados com *Lactobacillus delbruekii* CUC1

*Differences in higher alcohols content in wines inoculated with *Lactobacillus delbruekii* CUC1*



1: 2-butílico; 2: n-propílico; 3: isobutílico; 4: alílico; 5: n-butílico; 6: amílico + isoamílico; 7: total.

A fermentação maloláctica não foi efectuada no vinho 3 inoculado com a estirpe CUC1.

Enquanto que a produção de álcoois superiores pelas bactérias lácticas é referida por Radler (1972 e 1986), desconhecendo-se porém os substractos a partir dos quais são produzidos (Radler, 1986), não há referências na literatura sobre a utilização bacteriana destes álcoois. Além disso, houve também um decréscimo no teor de acetaldeído no vinho 2 de 127,2 para 69,0 e um acréscimo no vinho 3 de 5 para 38,65, expresso em mg/100 ml de etanol. O acréscimo do teor em acetaldeído no vinho 3 pode ser devido exclusivamente ao seu arejamento na medida em que o teor em SO₂ era relativamente baixo. O decréscimo na concentração de acetaldeído no vinho 2 poderá ser devido à utilização bacteriana do produto, facto já observado por Fornachon em vinhos australianos (Fornachon, 1963).

A inoculação dos vinhos provoca, regra geral, uma aceleração da desacidificação biológica. Porém, a centrifugação dos vinhos a 10 000 g durante 15 minutos nem sempre é suficiente para eliminar a microflora indígena. Nestes casos, a fermentação maloláctica ocorre também nas testemunhas. Tal foi o caso dos vinhos 2 e 3 da colheita de 1987. Enquanto que no vinho 3, submetido a centrifugação, a FML verificou-se ao fim de 1,6 semanas em todos os lotes, no vinho 2 algo de diferente ocorreu. O desaparecimento do ácido málico foi detectado após 10,7 e 16,1 semanas respectivamente nos vinhos inoculados com as estirpes ML34 e 12A enquanto nos controlos se verificou ao fim de 29,4 semanas. Nos lotes inoculados com a estirpe CUCI houve um atraso de 14,6 semanas. Isto levou-nos a admitir que algumas estirpes podem produzir substâncias que inibem a actividade de outras estirpes de bactérias lácticas, verificando-se neste caso problemas de antagonismo bacteriano.

CONCLUSÕES

A ocorrência da fermentação maloláctica provoca modificações na composição química dos vinhos, nomeadamente nos teores de álcoois superiores. A matéria-prima parece ter maior influência do que a estirpe na composição final do vinho. A inoculação com estirpes seleccionadas pode conduzir, nalguns casos, a problemas de antagonismo com as estirpes indígenas.

RÉSUMÉ

Caractérisation chimique de vins inoculés avec des bactéries lactiques

Après la fin de la fermentation alcoolique, plusieurs lots de différents vins ont été inoculés avec quelques souches de bactéries lactiques pour induire la fermentation malolactique. On a utilisé plusieurs souches de bactéries lactiques, isolées à partir de vins, des espèces *Leuconostoc oenos*, *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus delbruekii*. À la fin, les vins ont été analysés; certains composés volatils ont été déterminés par chromatographie gazeuse. D'après les résultats obtenus, on a pas décelé différences significatives parmi les différents vins. Cependant, on a observé une augmentation de la concentration totale des alcools supérieurs de quelques vins, tandis que d'autres présentent une diminution, vis-à-vis le contrôle. D'après ces résultats, nous pouvons admettre que la composition du vin aura une plus grande influence que la souche bactérienne dans la formation de ces composés. Dans un essai, on a aussi observé une augmentation de la teneur d'éthanal et, dans un autre, une diminution. Un antagonisme entre *Lactobacillus delbruekii* et une souche indigène a été observé.

SUMMARY

Chemical characterization of wines inoculated with lactic acid bacteria

Malolactic fermentation was induced in separate lots of different wines by inoculation with various strains after dryness. Strains of lactic acid bacteria isolated from wines and identified as *Leuconostoc oenos*, *Pediococcus damnosus* and *Lactobacillus delbruekii* were used. The resultant wines were subjected to chemical analyses including gas chromatography. No significant differences were detected within the wines fermented with different strains. An increase and a decrease on the total concentration of higher alcohols were detected in the wines. According to these results, the wine composition probably has a higher effect on the formation of alcohols than the strain. In addition, a higher production of acetaldehyde was detected in one experiment and a reduction of its level was observed in another, when compared with the control wines. Antagonism problems within the strain *L. delbruekii* and a indigenous strain were detected.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beelman, R.; A. Gavin e R. Keen
1977 A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malolactic fermentation in eastern wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 28 (3): 159-165.
- Beelman, R.; F. McArdle e G. Duke
1980 Comparison of *Leuconostoc oenos*. strains ML34 and PSU-1 to induce malolactic fermentation in Pennsylvania red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 31 (3): 269-276.
- Castino, M.; L. Usseglio-Tomasset e A. Gandini
1975 Factors which affect the spontaneous initiation of the malolactic fermentation in wines. The possibility of transmission of inoculation

- and its effect on organoleptic properties. Em: «Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr, C. V. Cutting e G. C. Whiting (eds.): 139-148.
- Fornachon, J. C. M.
1963 Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. *J. Sci. Food Agric.* 14: 857-862.
- Fornachon, J. C. M. e B. Lloyd
1965 Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. *J. Sci. Food Agric.* 16: 710-716.
- Giannakopoulos, P. I.; P. Markakis e G. S. Howell
1984 The influence of malolactic strain on the fermentation and wine quality of three eastern red wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic* 35 (1): 1-4.
- Kunkee, R. E.
1967 Malolactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 9: 235-279.
1974 Malolactic fermentation and winemaking. Em: Chemistry of winemaking. D. Webb (Ed). *Advances in Chemistry series* 137: 151-170.
- Mascarenhas, M. A.
1984 The occurrence of malolactic fermentation and diacetyl content of dry table wines from Northeastern Portugal. *Am. J. Enol. Vitic.* 35 (1): 49-51.
- Mendes Faia Mascarenhas Ferreira, M. A.
1987 Crescimento e metabolismo de bactérias lácticas provenientes de vinhos da região de Trás-os-Montes — sua intervenção na fermentação maloláctica. Tese de Doutoramento, UTAD, 163 pgs.
- Pilone, G.; R. E. Kunkee e D. Webb
1966 Chemical characterization of wines fermented with various malolactic bacteria. *Appl. Microbiol.* 14 (4): 608-615.
- Pilone, G. e R. E. Kunkee
1965 Sensory characterization of wines fermentation with several malolactic strains of bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (4): 224-230.
- Radler, F.
1972 Problematik des bakteriellen säureabbaus. *Weinberg und Keller*, Band 19: 357-370.
1986 Microbial biochemistry. *Experientia* 42, Birkhäuser Verlag CH-4010 Basel/Switzerland: 884-893.
- Rainbow, C.
1975 Beer spoilage lactic bacteria. Em: «Lactic acid bacteria in beverages and food». J. Carr, C. Cutting e G. Whiting (eds.): 149-157.
- Ribereau-Gayon, J.; E. Peynaud; P. Ribereau-Gayon e P. Sudraud
1971 *Traité d'Oenologie — Sciences et techniques du vin*. Vol. 1. Dunod, Paris.
- Zeeman, W.; J. P. Snyman e C. J. Van Wyk
1982 The influence of yeast strain and malolactic fermentation on some volatile bouquet substances and on quality of table wines. *Grape and Wine Centennial Symposium Proceedings, 1980, UC Davis*. D. Webb (eds.): 79-90.