



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE ENXOFRE POR BACTÉRIAS LÁTICAS DO
VINHO DURANTE A FERMENTAÇÃO MALOLÁTICA

por

Cristiana Sofia Ferreira Peixoto

Julho 2012



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE ENXOFRE POR BACTÉRIAS LÁTICAS DO
VINHO DURANTE A FERMENTAÇÃO MALOLÁTICA

PRODUCTION OF SULPHUR COMPOUNDS BY WINE LACTIC BACTERIA
TROUGHTOUT MALOLACTIC FERMENTATION

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de mestre em Microbiologia Aplicada

por

Cristiana Sofia Ferreira Peixoto

Local: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientação: José António Couto e Nathalie Moreira

Julho 2012

Resumo

Apesar de existir muita informação científica sobre o efeito da fermentação malolática (FML) na composição do vinho, pouco se conhece sobre o metabolismo dos compostos de enxofre pelas bactérias do ácido láctico (BAL) em vinhos. A produção e modificação de aromas pelas BAL ainda é objeto de estudo. O objetivo principal deste trabalho foi verificar o impacto da FML na componente volátil do vinho, especificamente nos compostos de enxofre, bem como tentar perceber os mecanismos de produção destes compostos. O catabolismo de aminoácidos contendo enxofre mereceram atenção especial, enquanto potenciais precursores de compostos de enxofre.

Foram utilizados vinhos tintos das castas Touriga Franca e Tinta Roriz, bem como vinhos sintéticos de composição definida e mostos sintéticos fermentados, cuja FML foi realizada através da inoculação com culturas de arranque (*Oenococcus oeni*). Nos vinhos sintéticos e mostos sintéticos foram utilizadas diferentes concentrações de metionina, cisteína, sulfato de amónio e fosfato de amónio de forma a avaliar comportamento das BAL. Foi monitorizado, em todas as fermentações realizadas, o crescimento dos microrganismos, a degradação do ácido L-málico e a produção de ácido L-láctico. No fim das fermentações, procedeu-se à análise dos compostos de enxofre através da cromatografia em fase gasosa com deteção por fotometria de chama (GC-FDP).

Os resultados obtidos nos vinhos e mostos sintéticos demonstraram a importância da metionina como precursor do metionol, sendo este o composto de enxofre produzido em maior quantidade. Verificou-se que quanto maior a concentração de metionina no meio maior a concentração de metionol. A adição de metionina levou à produção de outros compostos, para além do metionol, como tioestéres (acetato de *S*-tioetilo). Os resultados indicam que a cisteína, na presença de outros aminoácidos, também pode dar origem à síntese de metionol. A utilização de sulfato de amónio ou fosfato de amónio como única fonte de azoto, levou à não deteção de qualquer composto de enxofre. A fermentação alcoólica e a sua interação com a FML parecem ser determinantes nas concentrações finais de diferentes compostos de enxofre. A FML alterou o perfil dos compostos de enxofre obtido após a fermentação alcoólica. No essencial, conduziu à diminuição da concentração de alguns destes compostos (acetato de *S*-tiometilo, acetato de *S*-tioetilo, 3-(etiltio)-1-propanol, 4-(metiltio)-1-butanol e ácido 3-metiltiopropiónico), o que pode ser interpretado como uma ação positiva, uma vez que estes são, na sua maioria, prejudiciais para o vinho.

Abstract

Although several references on the effect of malolactic fermentation (MLF) on wine composition can be found on the scientific literature, very little information is available about the metabolism of sulfur compounds by lactic acid bacteria (LAB) in wine. The main objective of this work was the study of the impact of MLF in the volatile composition of wine, in particular on the sulfur compounds. Special attention was paid to the catabolism of sulfur containing amino acids as potential precursors for the production of sulfur compounds.

Red wines (Touriga Franca and Tinta Roriz grape varieties) as well as defined synthetic wines and synthetic fermented musts were inoculated with different strains of *Oenococcus oeni*. Different concentrations of methionine, cysteine, ammonium sulfate and ammonium phosphate were used to assess the influence on the production of sulfur compounds. In all fermentations, the bacterial growth, the degradation of L-malic acid and the production of L-lactic acid were followed. At the end of fermentation, the sulfur compounds were analysed by GC-FDP.

The results obtained in the synthetic wines demonstrated the importance of the methionine as principal precursor of methionol, which was the sulfur compound produced in greater quantity. It has been found quite clearly that the higher the concentration of methionine in the medium the higher the concentration of methionol produced. The addition of methionine led to the production of other compounds in addition to methionol as thioesters (*S*-ethylthio acetate). The results indicate that cysteine, in the presence of other amino acids, can also lead to the synthesis of methionol. No sulfur compound were detected when ammonium sulfate or ammonium phosphate were used as sole nitrogen sources.

The alcoholic fermentation and its interaction with MLF seem to be crucial for the final profile of sulfur compounds. MLF affected the concentration of several sulfur compounds obtained from the alcoholic fermentation. The bacterial activity lowered the concentration of some of these compounds (*S*-Methyl thioacetate, *S*-ethyl thioacetate, 3 - (Ethylthio)-1-propanol, 4-(Methylthio)-1-butanol and 3-Methylthiopropionic acid), which can be interpreted as a positive since these can be harmful to the wine quality.

Agradecimentos

Quero agradecer à Escola Superior de Biotecnologia por terem-me aceito no mestrado e, em especial, ao professor José António Couto e à Doutora Nathalie Moreira por ensinarem-me bastante durante este trabalho e pela disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

À minha família pelo apoio durante este percurso, que me levaram a alcançar o que alcancei até hoje. Ao meu pai e à minha mãe que ajudaram-me sempre, aos meus irmãos pela paciência e opiniões. Às pequenas Beatriz e Inês pelo carinho.

Ao Diogo, sem ti não tinha conseguido. Sem dúvida foste a pessoa mais paciente comigo, apoiaste-me sempre - que precisei e também quando não precisei - e nunca me deixaste mal. Obrigada!

Agradeço a todas as pessoas que me cruzei durante este ano no laboratório – Rita, Carla, Mário, Leandro, Jorge, Sara, Dagmara – pelos bons momentos e entreajuda e sobretudo à Joana que durante 2 anos esteve sempre comigo. À Catarina, Anita e Ana que conheci durante o mestrado. Quero também agradecer ao professor Francisco Campos e à Eng^a Cristina Santos pelo que ensinaram-me no laboratório e pela ajuda.

Por fim, quero agradecer aos meus amigos que estão comigo desde o início – à Maria, Elsa, Rui, Diana, Joana, Telma, Anabela, Daniel, Catarina e Hélder – fizeram destes 5 anos académicos o que eles foram. Obrigada pelas vossas opiniões e pela vossa amizade.

ÍNDICE

Resumo	2
Abstract	3
Agradecimentos.....	4
Lista de abreviaturas	7
1.Introdução	8
Bactérias do Ácido Lático	9
1.1. Características gerais e metabolismo dos carboidratos.....	9
1.2. Necessidades em azoto, vitaminas, minerais e fatores de crescimento	10
1.3. População bacteriana no mosto e vinho	11
1.4. Fermentação malolática.....	13
1.5. Produção de compostos aromáticos	15
1.5.1. Aromas benéficos.....	15
1.5.2. Deterioração do vinho	18
1.6. Composto de enxofre	20
2. Material e Métodos	25
2.1. Compostos químicos.....	25
2.2. Estirpes de bactérias lácticas e leveduras utilizadas.....	25
2.3. Vinhos e meios sintéticos.....	26
2.3.1. Vinhos sintéticos	26
2.3.1.1. Vinhos sintéticos com metionina e cisteína.....	27
2.3.1.2. Vinhos sintéticos com sulfato de amónio	28
2.3.1.3. Vinhos sintéticos com fosfato de amónio.....	28
2.3.2. Mosto sintético.....	28
2.3.3. Vinhos	29
2.4. Métodos analítico	29

2.4.1. Ácidos orgânicos.....	29
2.4.2. Análise de açúcares, etanol e glicerol	30
2.4.3. Compostos de enxofre	30
2.5. Análise estatística	33
3. Resultados e Discussão.....	34
3.1. Influência da adição de metionina e cisteína em vinhos sintéticos	34
3.2. Influência da FML em mosto sintético após fermentação alcoólica	42
3.3. Influência da FML no vinho.....	46
4. Conclusões gerais	52
5. Trabalhos futuros.....	53
Apêndice.....	54
Referências	65

Lista de Abreviaturas

FDP – detecção por fotometria de chama

GC – cromatografia gasosa

HPLC – cromatografia líquida de alta resolução

UV-vis – ultravioleta visível

T - temperatura

V-volume

nd – não identificado

n.s. – não significativo

Sig. – Nível de significância

Abreviações de género

O. – *Oenococcus*

S. - *Saccharomyces*

1. Introdução

Durante a vinificação, ocorre uma série de transformações bioquímicas, sendo fundamental a interação de diferentes microrganismos, sobretudo em duas etapas fundamentais. A etapa principal é a fermentação alcoólica, realizada pelas leveduras, enquanto as bactérias do ácido láctico (BAL) são responsáveis pela fermentação malolática. Dos diferentes géneros de leveduras, somente algumas estão associadas ao processo de vinificação: *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, e *Zygosaccharomyces* (Pretorius *et al.*, 1999; König *et al.*, 2009). Por outro lado, apenas 4 géneros de BAL estão associados com o vinho: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*. Na maioria dos casos, a espécie dominante na fermentação malolática é *Oenococcus oeni* (Davis *et al.*, 1986; Lonvaud-Funel, 1999; Moreno-Arribas & Polo, 2005).

A formação de aromas e sabores está dependente das vias metabólicas dos diferentes organismos, sendo benéfica, em muitas situações, para a qualidade do produto final. Contudo, a proliferação descontrolada de leveduras e bactérias durante a vinificação pode levar à presença de alguns compostos indesejáveis, com impacto sensorial a partir de certas concentrações. No caso da fermentação malolática, principalmente quando esta ocorre a um pH superior a 3.5, alguns cheiros negativos são descritos como, por exemplo, “urina de rato” e “odor animal”, devido à produção de acetamida e compostos fenólicos, respetivamente (Palacios, 2005). Nos compostos sulfurados, vários estudos realizados identificaram diferentes compostos, produzidos por leveduras, durante a fermentação alcoólica (Swiegers & Pretorius, 2007; Moreira *et al.*, 2008). Relativamente aos compostos de enxofre, poucos trabalhos são encontrados na bibliografia com relação à fermentação malolática (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004; Vallet *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, concluiu-se que as bactérias asseguram um enriquecimento aromático do vinho (Lerm *et al.*, 2010; Moreno-Arribas & Polo, 2005). A identificação de compostos de enxofre produzidos durante a fermentação malolática e a caracterização das vias metabólicas é muito importante uma vez que permite um maior entendimento sobre os compostos produzidos, possibilitando um maior controlo durante a vinificação e a produção de vinhos mais apazíveis.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o impacto da FML na componente volátil do vinho, principalmente ao nível dos compostos de enxofre. Foi feita a deteção e identificação de compostos de enxofre assim como a discussão dos possíveis mecanismos de produção.

Bactérias do Ácido Lático

1.1. Características gerais e metabolismo dos carboidratos

Pasteur estudou as BAL entre 1857 e 1863, mas apenas em 1973, Lister isolou a primeira cultura pura destas bactérias ("*Bacterium lactis*") (König *et al.*, 2009). Como já foi referido, existem 4 géneros importantes em vinhos e as características gerais, válidas para todas as BAL, são: organismos procariotas, dividem-se por fissão binária, coloração Gram-positivo, não móveis e não esporulados, anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos (requerem meio rico para fermentar), têm uma temperatura ótima entre 20° e 30°C e possuem uma forma esférica ou alongada, em pares ou pequenas cadeias (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a; Krieger, 2005).

As BAL são divididas de acordo com os produtos finais do metabolismo de açúcares (Figura 1.2). As hexoses, tais como a glucose, são fermentadas pelas bactérias do grupo homofermentativo produzindo mais de 85% de ácido láctico (via Embden-Meyerhof-Parnas). Esta via, inclui uma primeira fase de todas as reações de glicólise que conduzem ao piruvato e o aceitador de final de eletrões é o piruvato que é reduzido a ácido láctico. Por cada molécula de glucose utilizada são produzidas duas moles de lactato e de ATP (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a; Liu, 2002).

Por outro lado, temos o grupo heterofermentativo (via 6P-gluconato/fosfocetolase) que por cada mole de açúcar fermentada, produz CO₂, etanol e ácido acético, para além do ácido láctico. Podem ser também divididas em obrigatórias (são heterofermentativas para as pentoses) ou facultativas (são homofermentativas para hexoses). Nesta via, NADPH é gerado e a glicose é oxidada a ribulose-5-fosfato. Através de uma epimerização obtém-se a xilose 5-fosfato, que posteriormente é clivada, pela xilose 5-P fosfocetolase, em acetil-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, sendo que a primeira molécula pode ser, repetidamente, reduzida em etanal e etanol (regenerando continuamente as co-enzimas NADH+H⁺ ou NADPH+H⁺), enquanto a segunda molécula é metabolizada em ácido láctico. No fim, o acetil-fosfato é

reduzido a acetato, levando à produção de uma molécula de ATP (Krieger, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006a; Du Toit *et al.*, 2010). Assim, diferentes espécies podem ser divididas em diferentes grupos, sendo mais simples a sua identificação (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Metabolismo dos carboidratos pelas BAL (adaptado de Krieger, 2005).

Grupo	Fermentação de glucose	Espécies
	Heterofermentativo	<i>Lactobacillus casei</i>
	facultativo	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Células alongadas	Heterofermentativo	<i>Lactobacillus brevis</i>
	obrigatórias	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
	Homofermentativo	<i>Pediococcus damnosus</i>
Células redondas		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Heterofermentativo	<i>Oenococcus oeni</i>

É importante o conhecimento dos produtos formados pelas bactérias, de acordo com o seu metabolismo, pois são necessárias decisões com base nas características das bactérias por parte do produtor de vinho, possibilitando um melhor controlo sobre a FML (Du Toit *et al.*, 2011).

1.2. Necessidades em azoto, vitaminas, minerais e fatores de crescimento

Tal como vários organismos, as BAL necessitam de fontes de azoto para diversos fins. Tanto as proteínas como os aminoácidos são fonte de azoto, sendo que os aminoácidos podem ser utilizados como fonte de energia, síntese proteica, biossíntese, entre outros. Contudo, trabalhos realizados na área dos lacticínios sugerem que o metabolismo para síntese de aminoácidos está incompleto nas BAL, enquanto o mecanismo de hidrólise de proteínas está melhor desenvolvido (Ardö, 2006).

Há diversos ensaios, em relação a necessidades específicas de diferentes aminoácidos. Anteriormente, conclui-se que vários aminoácidos podem ser benéficos para as BAL, dependendo de estirpe para estirpe (Tabela 1.2). Para assegurar a formação de biomassa, foi

suficiente uma concentração de azoto entre 2 a 5 mg L⁻¹ e observou-se um maior crescimento com o aumento dos péptidos, como fonte de azoto (Krieger, 2005; Remize *et al.*, 2006).

Tabela 1.2. Diferentes aminoácidos essenciais para *O. oeni*.

Estudos	Possíveis aminoácidos essenciais
Fourcassie <i>et al.</i> , 1992	Ácido glutâmico, arginina, isoleucina e triptofano
Férnandez <i>et al.</i> , 2004	Leucina, glicina, metionina e prolina
Krieger, 2005	Ácido glutâmico (para todas as estirpes do estudo); serina, metionina, fenilalanina e tirosina (apenas para algumas estirpes)
Remize <i>et al.</i> , 2006	Ácido glutâmico e serina; metionina, fenilalanina e tirosina (utilizados em menor quantidade)

A utilização de adenina, xantina, guanina e uracilo são estimuladores para o crescimento celular e vitaminas do grupo B, purinas e pirimidinas devem estar presentes. Contudo, o mais importante é a utilização de manganês, sendo este o co-fator da enzima utilizada na fermentação malolática (Krieger, 2005).

1.3. População bacteriana no mosto e vinho

Apenas 100 células/g de BAL podem ser encontradas nas uvas, ao contrário das leveduras, que estão em maior número. *O. oeni* está presente maioritariamente em vinhos de pH baixo (<3.5), enquanto que *Pediococcus* e *Lactobacillus* crescem com valores superiores pH (>3.5). Em meio sintético, as BAL são inibidas a concentração em etanol de 8%, mas *O. oeni* tolera até 14% (König *et al.*, 2009).

O crescimento das bactérias depende da quantidade de açúcar e ácidos orgânicos disponíveis no mosto (König *et al.*, 2009). Contudo, a interação das BAL com outros microrganismos influencia a sua sobrevivência. Na presença de elevadas concentrações de azoto, a produção de SO₂ por algumas estirpes de *Saccharomyces*, pode afetar a fermentação malolática, inibindo *O. oeni* (Osborne & Edwards, 2006). Contudo, as leveduras podem

estimular a fermentação malolática uma vez que em resultado da sua autólise, há libertação de vitaminas e aminoácidos que as BAL podem utilizar para o seu crescimento.

Os seguintes quatro parâmetros influenciam a taxa de crescimento das BAL, no vinho: pH, temperatura, conteúdo em etanol e concentração de SO₂. Nenhum destes deve ser considerado independentemente (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a).

A influência do pH na FML, é um dos fatores mais importantes. Para além de influenciar o crescimento celular, vai afetar a atividade malolática das bactérias, a duração da fermentação e os substratos metabolizados (Serpa-Pimentel *et al.*, 1994). Ao contrário de um grande número de bactérias, as BAL conseguem desenvolver-se em valores de pH relativamente baixos, por volta dos 3.5, sendo mais difícil o crescimento por volta dos 3.0 e mais fácil acima dos 3.5 (Lonvaud-Funel, 1995). *O. oeni* é a espécie predominante a um pH inferior a 3.5 (Davis *et al.*, 1986). O pH habitual dos vinhos corresponde ao máximo da atividade malolática das células, porque a enzima tem uma atividade máxima, dentro da célula, a um pH próximo de 3.2, apesar do seu pH ótimo situar-se nos 5.8 (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a).

O SO₂ penetra nas células, na sua forma molecular, por difusão. No citoplasma, devido ao pH mais elevado, dissocia-se (é convertido no ião bissulfito) e reage com moléculas essenciais, como as enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos e vitaminas (Romano & Suzzi, 1993; Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a). Isto conduz ao cessar do crescimento e à morte celular. A inibição na enzima malolática do *Oenococcus* é aditiva aos efeitos no crescimento celular e já se observou a inibição da ATPase, diminuindo a viabilidade de *O. oeni* (Carreté *et al.*, 2002; Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a). Quanto menor o pH, maior o efeito inibitório do SO₂ (Krieger, 2005).

As bactérias são sensíveis ao etanol existente no meio assim como todos os outros microrganismos. Geralmente, bactérias isoladas em laboratório são inibidas por volta de um volume em etanol de 10%, mas este valor depende do género, espécie e estirpe. A sua presença leva a modificações importantes nas células, fazendo com que estas se adaptem fisiologicamente, diminuindo, o tempo de latência entre a fermentação alcoólica e a malolática (König *et al.*, 2009). O crescimento de *O. oeni* é estimulado por volta dos 6% de etanol, mas são inibidas a partir dos 14% (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a).

A temperatura é um dos fatores que deve ser controlado uma vez que interfere na velocidade de fermentação. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 20° e os 37°C, no entanto, as BAL são capazes de crescer entre 15° e os 45°C. Contudo, estas temperaturas são para condições laboratoriais. Em meios com álcool (como é o vinho), as temperaturas ideais situam-se entre 20° e 23°C. Por este motivo, usualmente, a temperatura recomendada para a realização da FML é 20°C (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a). A temperatura, juntamente com o pH inicial do vinho, também influencia a quantidade de compostos aromáticos sintetizados (Volschenk *et al.*, 2006).

1.4. Fermentação malolática

O termo “fermentação” não é muito correto. Mesmo assim, os produtores deram este nome por analogia com a fermentação alcoólica (Lonvaud-Funel *et al.*, 1999; König *et al.*, 2009).

O ácido málico é o ácido orgânico mais abundante, no vinho, juntamente com o ácido tartárico e o ácido cítrico. A fermentação malolática consiste na transformação de ácido L-málico (ácido dicarboxílico) em ácido L-lático (ácido monocarboxílico) e CO₂, através de uma descarboxilação, catalisado pela enzima malolática, sendo esta diferente da enzima málica que metaboliza o piruvato (Figura 1.1). O pH ótimo para a enzima malolática situa-se nos 5.8 e são necessários cofatores (NAD⁺ e Mn²⁺). A atividade malolática é estritamente dependente da integridade da membrana bacteriana, protegendo do efeito inibitório de vários componentes do vinho (ácidos carboxílicos, polifenóis) (Lonvaud-Funel *et al.*, 1999; Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a).

Através da FML, o vinho torna-se menos ácido e, simultaneamente, mais macio uma vez que o sabor ácido do ácido L-málico é substituído pelo sabor mais suave do ácido L-lático. A diminuição de substratos, como ácido L-málico, contribui para a estabilização microbiana e altera características organoléticas do vinho (Liu, 2002; Moreno-Arribas & Polo, 2005).

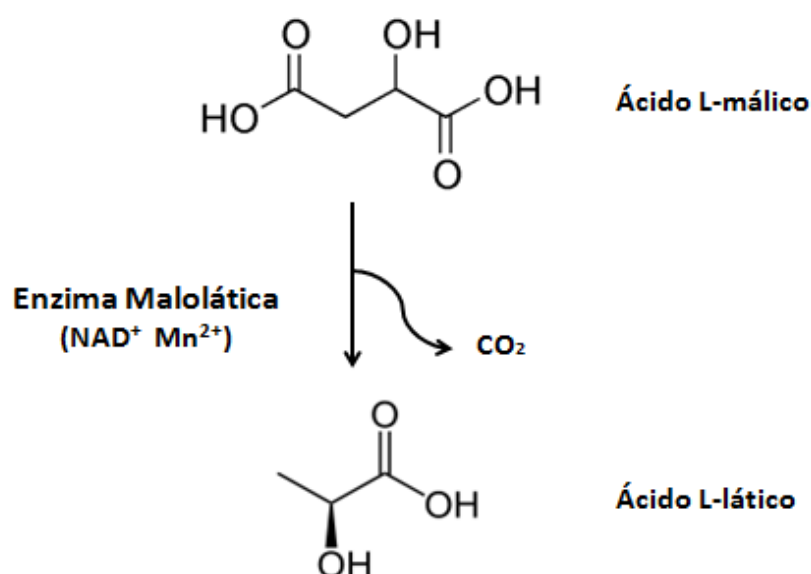


Figura 1.1. Metabolismo do ácido L-málico, durante a fermentação malolática.

Geralmente, durante os primeiros dias de fermentação alcoólica, a população de bactérias aumenta até cerca de 10^4 UFC mL⁻¹ e, até ao fim da fermentação alcoólica, diminui até 10^2 UFC mL⁻¹. Após a fermentação alcoólica, a população fica numa fase latente. Por volta das 10^2 - 10^3 UFC mL⁻¹, começa a fase de multiplicação, desde que os diferentes parâmetros, como pH, etanol e temperatura, sejam favoráveis (Lonvaud-Funel, 1995). Normalmente, a fase de multiplicação dura alguns dias, mas pode durar meses. Na maioria dos casos, *O. oeni* predomina no final da fermentação alcoólica e, posteriormente, durante a FML, sendo a melhor adaptada às condições de vinificação. A fermentação malolática começa quando a população bacteriana atinge os 10^7 UFC mL⁻¹, após um rápido crescimento em fase exponencial (Lonvaud-Funel *et al.*, 1999; Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a).

No fim da FML, todo o ácido L-málico é degradado e as bactérias entram numa fase de declínio. O vinho é então estabilizado através da adição de SO₂, caso contrário as bactérias podem sobreviver vários meses. Uma concentração de 40 mg L⁻¹ de SO₂ livre, é, normalmente, suficiente para eliminar estes microrganismos. Em vinhos com pH mais elevado, pode ser ineficiente, podendo ser encontrado valores elevados de células (algumas vezes entre os 10^5 ou 10^6 UFC mL⁻¹) mesmo após vários meses da produção do vinho. Muitas

vezes são necessários tratamentos físicos como o calor ou filtração para eliminar células viáveis (Lonvaud-Funel *et al.*, 1999; Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006a).

1.5. Produção de compostos aromáticos

As diferentes interações de diferentes fatores levam à formação de compostos cruciais para a qualidade final dos vinhos. As fermentações produzem aromas agradáveis e aumentam a complexidade organolética (Figura 1.2; Lonvaud-Funel, 1995). Neste aspeto, as bactérias não são diferentes das leveduras e diferentes estirpes levam à formação de aromas distintos, além de diferentes tipos de vinho (Martineau & Henick-Kling, 1995; Delaquis *et al.*, 2000; Boido *et al.*, 2009). Existem vários aromas associados à fermentação malolática (Figura 1.2), como o amanteigado, frutado, verde, floral, nozes, suado, picante, baunilha, fumo, amargo mel, fermento, tostado, terra, entre outros (Revel *et al.*, 1999; Liu, 2002; Palacios, 2005).

1.5.1. Aromas benéficos

Um dos compostos mais importantes produzidos pelas BAL é o diacetilo, que dá o aroma “amanteigado” aos vinhos (Lonvaud-Funel, 1995; Martineau & Henick-Kling, 1995). O metabolismo do citrato por *O. oeni* leva à produção de ácido acético e acetoina, sendo que o diacetilo é um metabolito secundário da degradação do ácido cítrico, um dos componentes em maior quantidade no mosto e no vinho (Ramos *et al.*, 1995; Bartowsky & Henschke, 2004). Uma concentração de diacetilo acima de 5 mg L^{-1} é considerada desagradável para o vinho, mas entre 1 a 4 mg L^{-1} é considerada benéfica, dando um sabor amanteigado ou a caramelo, de acordo com cada tipo de vinho (Martineau *et al.*, 1995; Bartowsky & Henschke, 2004). Diferentes estirpes podem influenciar, também, os compostos resultantes do ciclo do ácido cítrico (Malherbe *et al.*, 2012).

O aumento do amanteigado e do frutado, faz com que haja uma redução do carácter vegetativo/verde do vinho. A fermentação pode produzir também compostos capazes de dar a sensação de corpo, que se atribui à produção de polissacarídeos e o reforço do aroma frutado deve-se à formação de ésteres (Liu, 2002). Estudos realizados por Revel *et al.* (1999) com vinhos Sauvignon Blanc fermentados em madeira, permitiram verificar que os vinhos onde ocorreu a FML, houve um aumento de ésteres etílicos, bem como de compostos derivados de madeira, ao contrário do vinho controlo que não foi inoculado com nenhuma das bactérias utilizadas.

O. oeni apresenta capacidade glucosidásica. A capacidade de *O. oeni* de hidrolisar precursores aromáticos glicosilados sugere que diferentes tipos de enzimas, como proteases, esterases, citrato liases, descarboxilases e β -glucosidases podem influenciar o sabor final dos vinhos, ao hidrolisar precursores de aromas, como é apresentado na Tabela 1.3. Estas enzimas permitem a hidrólise dos precursores e consequente libertação dos aromas. Estudos demonstram que *O. oeni* foi capaz de formar vanilina e aumentar a concentração deste composto em barris, sugerindo que há um precursor na madeira de carvalho que pode ser convertido pelas bactérias (Bloem *et al.*, 2007; Bloem *et al.*, 2008).

A cor e corpo dos vinhos tintos podem ser alterados devido a modificações de compostos fenólicos, sendo que alguns fenóis precipitam ou sofrem alterações a nível estrutural. Assim, a fermentação malolática pode reduzir as antocianinas livres e a adstringência por reação de taninos e antocianinas (Lonvaud-Funel, 1999).

Tabela 1.3. Atividade de diferentes enzimas

Enzimas	Função
Proteases	Atuam em proteínas do vinho e diferentes polipéptidos, libertando aminoácidos livres (Du Toit <i>et al.</i> , 2011)
Esterases	Diferentes estirpes bacterianas podem hidrolisar diferentes ésteres, formando diferentes ésteres etílicos (Sumby <i>et al.</i> , 2010; Malherbe <i>et al.</i> , 2012)
Citrato liase	Responsável pela libertação de ácido acético e oxaloacetato, no metabolismo do ácido cítrico (Du Toit <i>et al.</i> , 2011)
Descarboxilases	Algumas LAB possuem descarboxilases de ácidos fenólicos, capazes de metabolizar derivados de compostos 4-vinilfenol e 4- etilfenol (Cavin <i>et al.</i> , 1997)
β-glucosidases	Clivagem enzimática de ligações glicosídicas, como α -L-arabinosídeos (Boido <i>et al.</i> , 2002, Ugliano <i>et al.</i> , 2003; D’Incecco <i>et al.</i> , 2004)

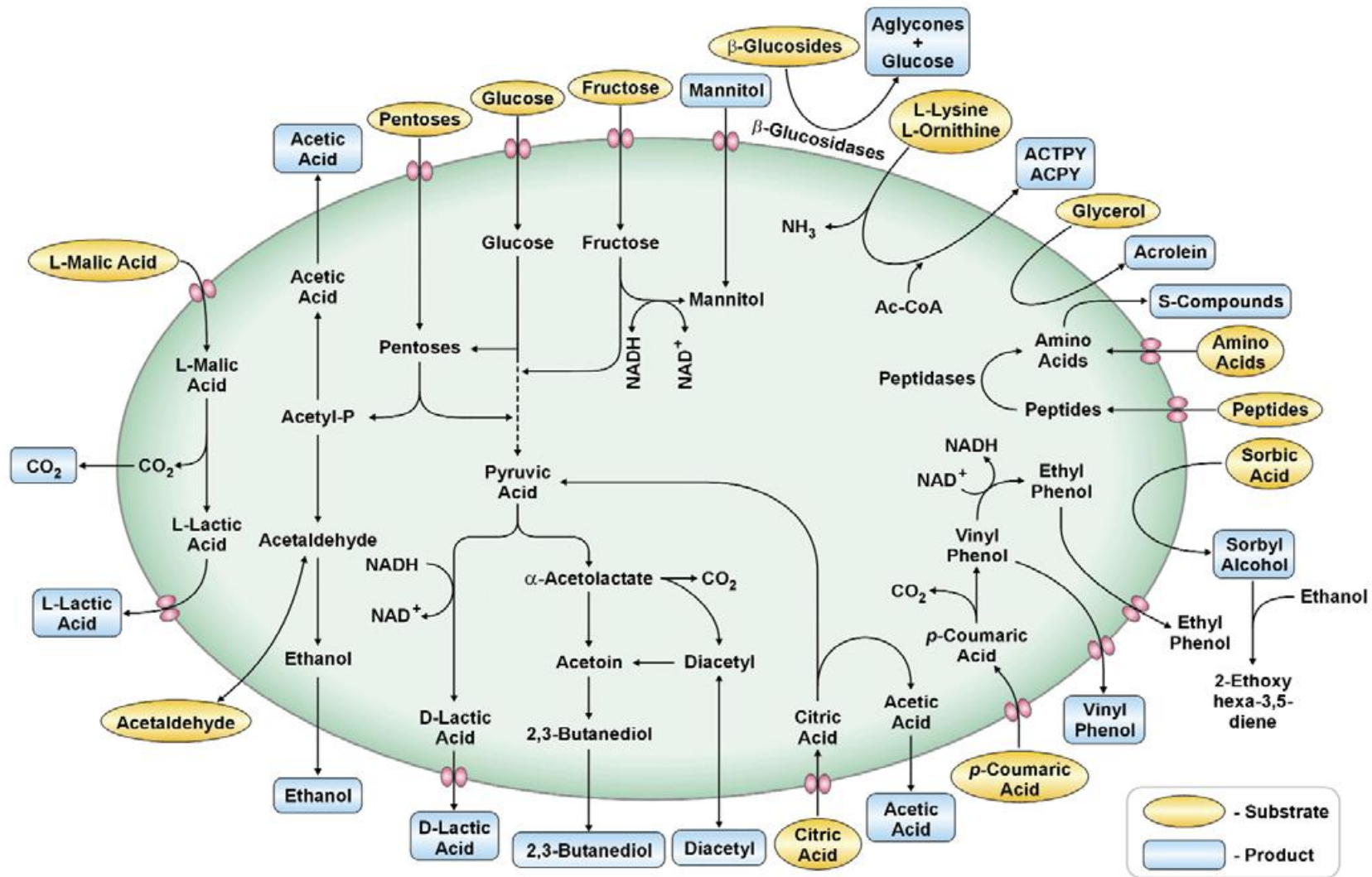


Figura 1.2. Vias metabólicas das bactérias do ácido láctico (de Swiegers *et al.*, 2005).

1.5.2. Deterioração do vinho

Quando as condições da FML são controladas, o papel das BAL é essencial para a produção de vinho. Contudo, quando não controlados os vários fatores, durante a fermentação podem-se formar cheiros e sabores indesejados. Um excesso de ácido acético, a síntese de glucano, aminas biogénicas e de precursores do etilcarbamato não são benéficos para o vinho.

Aumento da acidez volátil do vinho

Quando há um pH superior a 3.5, pode levar a um aumento excessivo de ácido acético, bem como outros odores desagradáveis, como o metálico e o terroso, geralmente conduzidos por *Lactobacillus* ou *Pediococcus*, ao contrário do que ocorre a um pH inferior a 3.5, menos suscetível a odores desagradáveis (Krieger, 2005). O “*piqûre lactique*” ocorre quando as BAL proliferam antes de todos os açúcares serem transformados em etanol, sendo que a quantidade de ácido acético depende da quantidade de hexoses fermentadas e da população total bacteriana (Lonvaud-Funel, 1999; Moreno-Arribas & Polo, 2005).

Aumento do amargor

A decomposição do glicerol leva à formação de acroleína e quando esta reage com os compostos fenólicos, como antocianinas ou taninos, observa-se a produção de aromas amargos (Palacios, 2005). O género *Lactobacillus*, nomeadamente *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fructivorans*, foram associados à formação deste composto (Moreno-Arribas & Polo, 2005; Palacios 2005).

Aumento da viscosidade

Por vezes, ocorre um aumento de viscosidade dos vinhos, causado pela produção de polissacarídeos extracelulares como o glucano e dextrano (Figura 1.3), através de açúcares residuais. Uma estirpe de *O. oeni* foi já associada a esta ocorrência, para além de algumas estirpes do género *Pediococcus* (de Nadra & de Saad, 1995; Wailling *et al.*, 2005). Ocorrendo um problema destes quando o vinho está na cuba, a sua resolução passa por tratamentos mecânicos e a sua deteção antes do engarrafamento leva a filtragens ou aquecimento do vinho (Lounvaud-Funel, 1999).

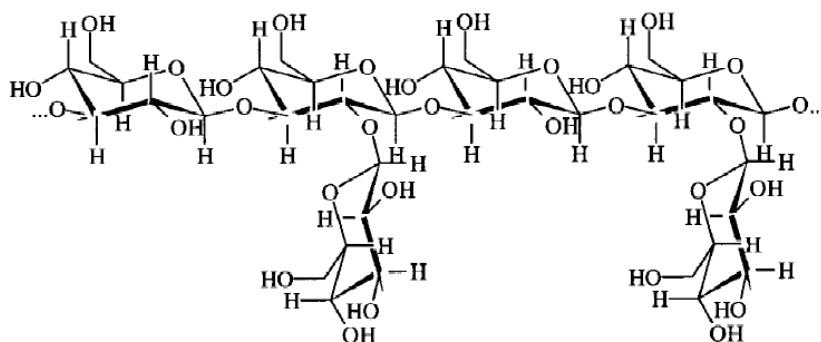


Figura 1.3. Estrutura de um polissacarídeo produzido por *Pediococcus damnosus* (adaptado de Lounvaud-Funel, 1999).

Urina de Rato

Lactobacillus e *O. oeni* podem produzir um aroma de urina de rato ou acetamida (Lounvaud-Funel, 1999). O metabolismo da ornitina e lisina levam à produção de compostos intermediários que originam estes compostos (Costello & Henschke, 2002).

Produção de fenóis voláteis

Nos vinhos tintos com pH elevado, os fenóis voláteis como o 4-vinilfenol, 4-vinilguaiaicol, 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol atribuem aos vinhos odores a suor de cavalo, medicinal ou estábulo, entre outros (Palacios, 2005). Apesar de os organismos principais por estes defeitos serem leveduras - *Brettanomyces* e *Dekkera* – muitos estudos comprovaram que estes compostos podem ser produzidos por algumas estirpes de *Pediococcus* e *Lactobacillus*, que em conjunto, levam a níveis de percepção elevados, podendo ser detetados no vinho (Lounvaud-Funel, 1999; Couto *et al.*, 2006; de Las Riva *et al.*, 2009).

Carbamato de etilo e aminas biogénicas

O carbamato de etilo é nocivo para a saúde humana. A arginina desaminase é responsável pela produção de citrulina a partir de arginina. A citrulina é convertida em ornitina e fosfato de carbamilo pela ornitina transcarbamilase e a reação final é catalisada pela carbamato cinase. O catabolismo de arginina contribui para o crescimento das LAB devido à geração de ATP, mas a citrulina e fosfato de carbamilo, são capazes de reagir com etanol para formar carbamato de etilo (Palacios, 2005, Lerm *et al.*, 2010).

As aminas biogénicas são produzidas durante a fermentação de bebidas pela descarboxilação de aminoácidos, como a histidina (Lounvaud-Funel, 2001). A histamina é a amina biogénica mais encontrada nos vinhos, que pode levar a problemas de saúde humana.

Existem várias aminas biogénicas no vinho, entre as quais a cadaverina e putrescina, apresentando um odor a putrefação, vinagre ou carnudo (Silla Santos, 1996; Palacios, 2005). A diminuição da concentração inicial de aminoácidos, através do seu consumo durante a fermentação alcoólica diminui o risco de produção de aminas biogénicas (López *et al.*, 2011).

1.6. Compostos de enxofre

No vinho, os compostos de enxofre possuem um papel importante em termos aromáticos. O metabolismo de compostos de enxofre embora mais estudado a nível da produção de queijo (Bonnarme *et al.*, 2000; Ardö, 2006), também o foi a nível do vinho (Landaud *et al.*, 2008).

Para facilitar a sua análise, estes são divididos em 2 grupos de acordo com a sua volatilidade: os compostos de enxofre leves ou voláteis são os que possuem um ponto de ebulição inferior a 90°C e os compostos de enxofre pesados ou menos voláteis apresentam um ponto de ebulição superior a 90°C (Mestres *et al.*, 2000). Os sulfuretos, mercaptanos, compostos heterocíclicos, tioestéres e tióis são as 5 categorias mais importantes no vinho, apresentando diferentes propriedades sensoriais (Tabela 1.4), na sua maioria negativos, apesar de, muitas vezes, encontrarem-se em concentrações abaixo do seu limite de perceção (Mestres *et al.*, 2000; Swiegers *et al.*, 2005).

Os compostos de enxofre leves são considerados um problema menor para o aroma do vinho, ao contrário dos compostos de enxofre pesados, porque podem ser eliminados por arejamento do vinho (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006b). Estes compostos leves incluem o H₂S, metanotiol, etanotiol, entre outros. Um dos descritores sensoriais do H₂S é “ovos podres” ou “sabor reduzido”, para o metanotiol é “alho” ou “água estagnada”, e no etanotiol é “alho” ou “gás natural” (Mestres *et al.*, 2000).

Os compostos de enxofre pesados, apresentados na Tabela 1.4, possuem aromas prejudiciais para o vinho a baixas concentrações, não podendo ser eliminados por arejamento, devido ao seu ponto de ebulição superior a 90°C. (Mestres *et al.*, 2000). Como o seu limite de perceção é baixo no vinho, muitas vezes são detetados olfativamente, apesar das suas baixas concentrações (Suárez-Lepe & Morata, 2012). O composto pesado encontrado em maior quantidade no vinho é um tioalcool: o metiltio-1-propanol ou metionol (Tabela 1.4). Outros tioalcoois presentes no vinho são o 2-mercaptoetanol, 3-mercapto-1-propanol, 4-(metiltio)-1-butanol, 3-(etiltio)-1-propanol e o 2-(metiltio)etanol (Landaud *et al.*, 2008).

O acetato de *S*-tiometilo, o acetato de *S*-tioetilo e o propionato de 3-(metiltio) etilo são três tioésteres encontrados no vinho que conferem cheiros a “queijo” ou “repolho” ou “metálico”, respetivamente, mas apresentam baixas concentrações no vinho. Os compostos heterocíclicos (o benzotiazole, dimetil sulfona e 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona) são geralmente encontradas a baixas concentrações e abaixo do seu limite de perceção (Tabela 1.4) e a dimetil sulfona não possui qualquer odor, no vinho. O ácido 3-metiltiopropiónico é um composto que pode ter um odor agradável para o vinho, apesar de conferir aromas desagradáveis. Outro composto com um aroma agradável para o vinho é o tiol 3-mercapto-1-hexanol, encontrado no Sauvignon blanc (Ribéreu-Gayon *et al.*, 2006b), que apesar da sua baixa concentração no vinho que é encontrada, tem também um limite de perceção baixo em água (Mestres *et al.*, 2000).

Tabela 1.4. Descrição dos aromas de alguns compostos de enxofre pesados e os seus limites de perceção e concentração no vinho (adaptado de Mestres *et al.*, 2000 e Landaud *et al.*, 2008 Moreira *et al.*, 2010)

Compostos	Aroma	Limite de perceção no vinho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração no vinho ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Metiltio-1-propanol (Metionol)	Batata, sopa, couve cozida, couve-flor	3200	140-5000
2-Mercaptoetanol	Aves, boxer, cheiro a quinta	100	0.13 – 18
4-Metiltio-1-butanol	Cebola, alho, terroso	600	0-181
2-(Metiltio) etanol	Feijão	640	0-139
3-Mercapto-1-propanol	Doce, batata, assado	Similar ao metionol	0-13.5
Propionato de 3-(metiltio) etilo	Sulfuroso ou metálico	1000	0-10
Acetato de <i>S</i>-tiometilo	Queijo, vegetais cozinhado	300 (em solução modelo)	0-10
Acetato de <i>S</i>-tioetilo	Repolho, queijo curado	60 (em solução modelo)	0-115
3-Mercapto-1-hexanol	Frutado, animal, maracujá	0.001 (em água)	0-56
Ácido 3-Metiltiopropiónico	Manteiga, rançoso	250	0-1811
Benzotiazole	Borracha	115	0-11
Dimetilsulfona	Inodoro	-	-
2-metiltetrahidrotiofen-3-ona	Metálico, gás natural	250	18.7-61.7

No vinho, existe uma grande variedade de estudos sobre a produção de compostos de enxofre por leveduras ao contrário do que ocorre com as BAL (Moreira *et al.*, 2002; Swiegers *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2011). Apesar de se observar uma baixa concentração de metionina e cisteína no sumo de uva (Landaud *et al.*, 2008), alguns estudos sugerem a utilização destes aminoácidos pelas BAL, como precursores de compostos de enxofre.

Pripis-Nicolau *et al.* (2004) demonstraram a capacidade das BAL para a produção de compostos de enxofre voláteis, tendo-se verificado a produção de metanotiol, dissulfureto de dimetilo, metionol e ácido 3-metiltiopropiónico, tendo como precursor a metionina. Mais tarde, Vallet *et al.* (2008) detetaram os mesmos compostos, em meio sintético. *O. oeni* e algumas espécies de *Lactobacillus* formaram metionol e ácido 3-metiltiopropiónico, havendo diferentes possibilidades de vias metabólicas para a formação destes compostos, propondo-se que a partir da metionina há formação de metionol. As enzimas envolvidas nestas vias bioquímicas ainda estão mal caracterizadas. O metional e 2-oxo-4-(metiltio)butírico foram identificados como intermediários do metabolismo de metionina. Metionol e o ácido 3-metiltiopropiónico foram produzidos a partir de metional através de uma oxidação e de uma redução, respetivamente (Figura 1.4). Em vinhos tintos, verificou-se um aumento significativo do ácido 3-metiltiopropiónico, após a fermentação malolática, podendo contribuir para a complexidade aromática (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004). Por outro lado, o ácido 2-oxo-4-(metiltio)butírico, demonstrou um papel central na síntese de compostos de enxofre, como precursor de metanotiol, havendo a possibilidade de estar envolvida uma enzima específica (Vallet *et al.*, 2008). Vallet *et al.* (2009) foram os primeiros a isolar e purificar um álcool desidrogenase a partir de *O. oeni* que pode estar envolvida na conversão do metional para metionol, porém a sua função ainda é incerta.

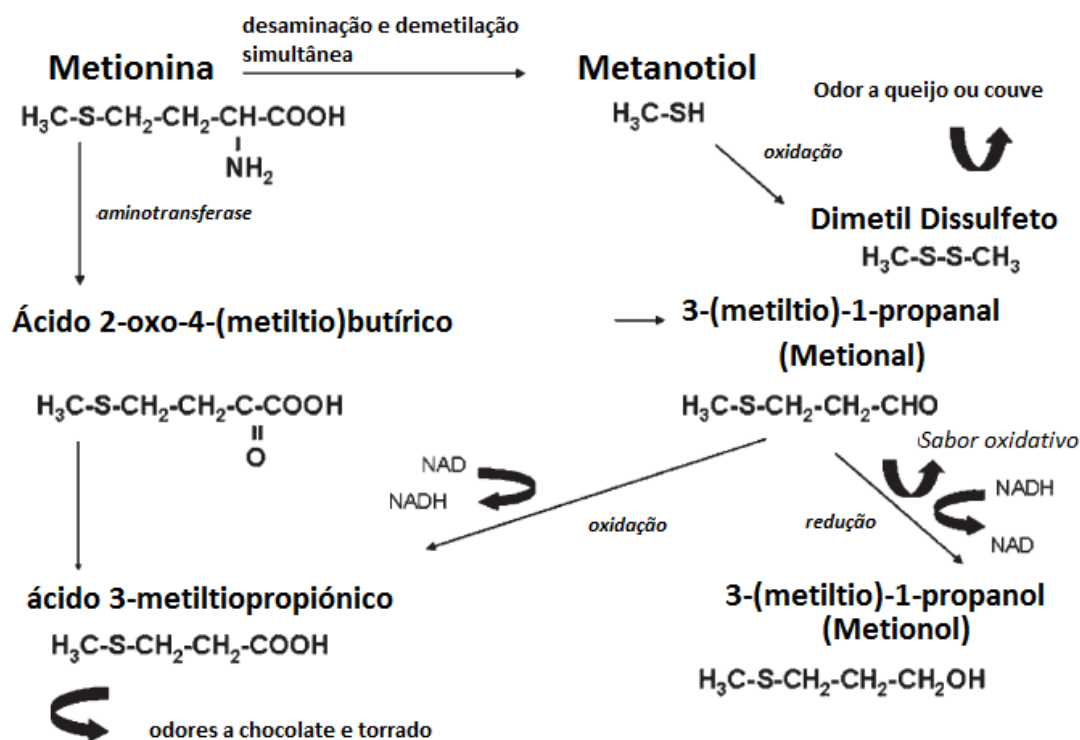


Figura 1.4. Via metabólica proposta para a degradação da metionina por *Oenococcus oeni*, em meio sintético (adaptado de König *et al.*, 2009).

Resultados de estudos anteriores indicaram que a FML pode influenciar significativamente as características aromáticas do vinho, devido ao aumento da concentração de compostos voláteis, como vários ésteres, contudo as concentrações de metionol (odor a “couve cozida”) foram inferiores ao seu limite de percepção, após a fermentação malolática (Ugliano & Moio, 2005).

A cisteína pode ser um precursor de compostos de enxofre heterocíclicos (por exemplo, tiazóis) e está associada aos aromas varietais dos vinhos Sauvignon Blanc (Tominaga *et al.*, 1998). Podem ocorrer reações entre compostos α -dicarbonilo (como o diacetil) e aminoácidos, entre os quais a cisteína, formando diversos aromas (florais, frutados, tostados, etc), dependendo do aminoácido utilizado (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004).

A adição de glutatona pode ter um efeito positivo em certas condições, como a diminuição de H_2S em vinho sintético. Além de ser positivo para o crescimento de *O. oeni*, em certas condições no vinho, a adição de glutatona com metionina pode acelerar a fermentação, sendo que o mesmo é observado com a adição de cisteína e glutatona (Swiegers *et al.*, 2005; König *et al.*, 2009).

Outros fatores, como transformações químicas ou bioquímicas, são apontados como possíveis causas da redução de aromas, podendo ser identificados após a fermentação malolática ou armazenamento (König *et al.*, 2009).

2. Material e Métodos

2.1. Compostos químicos

Os compostos utilizados foram: acetato de *S*-tiometilo, acetato de *S*-tioetilo, 2-mercaptoetanol, 2-(metiltio) etanol, 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona, propionato de 3-(metiltio) etilo, 3-mercapto-1-propanol, 3-(etiltio)-1-propanol, 4-(metiltio)-1-butanol, benzotiazole, dimetilsulfona, ácido 3-metiltiopropiónico e o 3-(metiltio)-1-propanol (metionol). Os diferentes compostos tinham uma pureza superior a 98% e eram das marcas Sigma-Aldrich (Espanha) e Fluka (Espanha). Os solventes e reagentes para análise química, como metanol, diclorometano, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e etanol 99.5%, foram comprados à Merk (Alemanha), à AGA (Portugal) e à Sigma-Aldrich. A glucose, frutose, ácido L-málico, ácido tartárico e todos os aminoácidos eram da marca Sigma-Aldrich (Espanha), exceto o MgSO₄.H₂O (Riedel-deHaën, Alemanha), o Yeast Nitrogen Base without amino acids and without ammonium sulfate (YNB, Difco, EUA), o Yeast Malt (YM, Difco, EUA), tween 80, arginina, triptofano e alanina (Merk, Alemanha). Todos os aminoácidos possuíam uma pureza superior a 98%.

2.2. Estirpes de bactérias lácticas e de levedura utilizadas

As estirpes de bactérias utilizadas foram *Oenococcus oeni* VP41 (Lallemand) e *Oenococcus oeni* alpha (Lallemand). As pré-culturas, para posterior inoculação dos diferentes vinhos sintéticos, foram crescidas em Man, Rogosa, Sharpe broth (MRS, Lab M, Reino Unido). O pH do meio foi ajustado a 4.5 com uma solução de HCl (concentração de 6M), antes de esterilizar (121°C, 15 minutos). As pré-culturas cresceram em aerobiose, sem agitação, durante 4 dias a 25°C. Para inoculação dos meios, centrifugou-se as culturas líquidas (10 min, 3000×g), removeu-se o sobrenadante e o *pellet* foi suspenso com o vinho e usado como inóculo.

As estirpes de leveduras utilizadas foram a *Saccharomyces cerevisiae* WAN (Uvaferm), *Saccharomyces cerevisiae* VL3 (Anchor Yeast) e *Saccharomyces cerevisiae* X5 (Laffort Enologie). As culturas foram preparadas em meio líquido Yeast Malt (YM, Difco, EUA), a 30°C. A inoculação foi feita por adição direta ao mosto sintético.

2.3. Vinhos e meios sintéticos

2.3.1. Vinhos sintéticos

A composição base do vinho sintético é apresentada na Tabela 2.1. Este vinho sintético foi elaborado tendo por base o vinho modelo descrito por Liu *et al.* (1994). Diferentes ensaios foram realizados utilizando diferentes tipos de vinhos sintéticos nos quais se fez variar o teor em metionina, cisteína, sulfato de diamónio e fosfato de diamónio. Na Figura 2.1 é apresentado um diagrama dos ensaios realizados. Em todos os meios o pH foi ajustado a 3.8 com HCl (6M). Os vinhos foram esterilizados por filtração com membranas de 0.45 μm de porosidade. Ao longo da fermentação foram realizadas contagens de células viáveis e foi analisado o teor em ácido L-málico e ácido L-lático. Para todos os ensaios utilizou-se um controlo (vinho não inoculado). Os ensaios foram feitos em triplicado ($v=500$ mL).

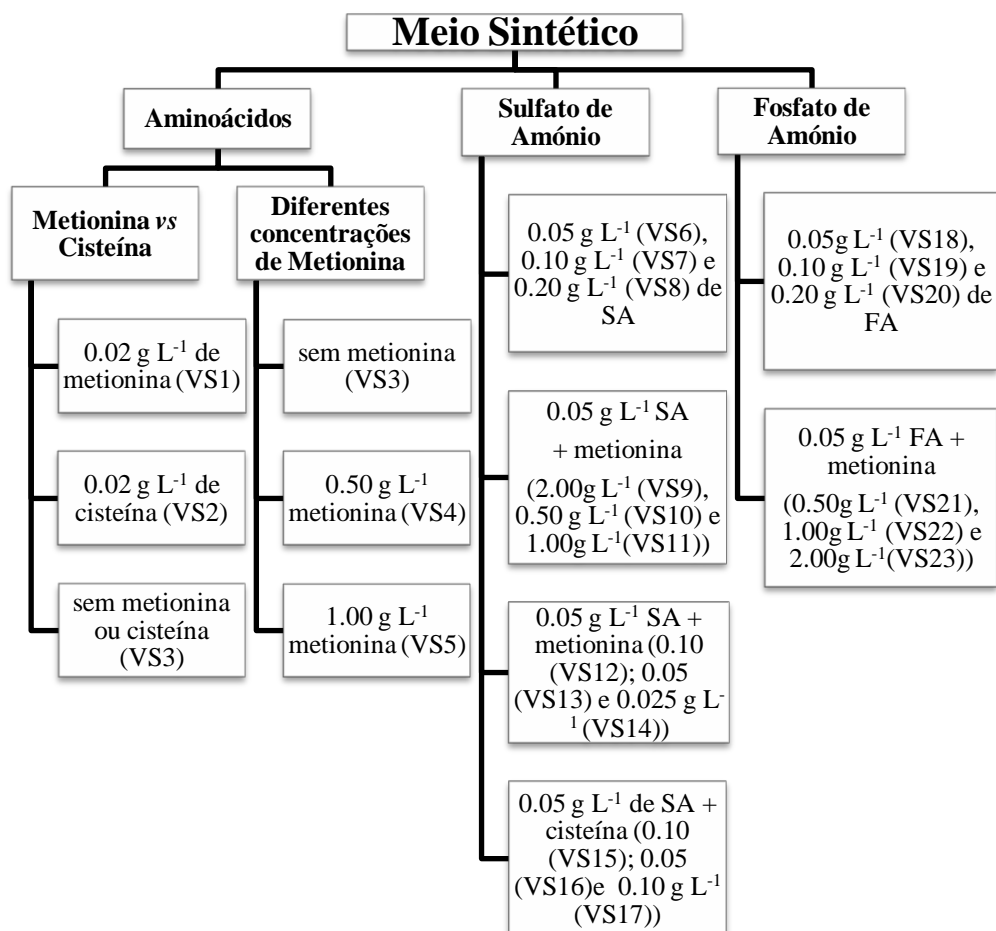


Figura 2.1. Diferentes ensaios com diferentes concentrações de metionina, cisteína, sulfato de amónio e fosfato de amónio.

2.3.1.1. Vinhos sintéticos com metionina e cisteína

Nos primeiros ensaios realizados com metionina e cisteína foi adicionado ao vinho sintético base um suplemento em aminoácidos cuja composição final é apresentada na Tabela 2.2.

Tabela 2.1. Composição da base do vinho sintético.

Compostos	g L⁻¹
Glucose	1.00
Frutose	1.00
Ácido L-málico	3.00
Ácido Tartárico	3.00
Yeast Nitrogen Base without aminoacids and ammonium sulfate	1.70
MgSO ₄ .H ₂ O	0.20
Etanol	84.00*
Tween 80	1.00*

* mL L⁻¹

Tabela 2.2. Composição em aminoácidos dos vinhos sintéticos

Aminoácidos	g L⁻¹
Arginina	5.00
Ácido aspártico	0.05
Alanina	0.08
Ácido glutâmico	0.20
Prolina	0.10
Serina	0.04
Histidina	0.02
Leucina	0.03
Fenilalanina	0.02
Lisina HCl	0.04
Triptofano	0.01
Isoleucina	0.03
Treonina	0.10
Tirosina	0.02
Valina	0.02

A metionina e cisteína foram adicionadas ao meio sintético, em separado, de forma a obter um teor final de 0.02 g L^{-1} (VS1 e VS2). Foi preparado também um meio sem adição destes aminoácidos (VS3). Após inoculação, os vinhos sintéticos foram condicionados a temperatura constante, sendo testadas duas temperaturas de incubação, a 20°C e 30°C .

Num segundo ensaio, foram elaborados vinhos sintéticos com diferentes concentrações de metionina: a 0.00 g L^{-1} (VS3), 0.50 g L^{-1} (VS4) e 1.00 g L^{-1} (VS5). Estes ensaios foram realizados à temperatura de 20°C .

2.3.1.2. Vinhos sintéticos com sulfato de amónio

Diferentes meios foram preparados de forma a fazer variar a concentração em sulfato de amónio, metionina e cisteína. Ao meio sintético base (Tabela 2.1) foram adicionadas diferentes concentrações de sulfato de amónio de forma a obter uma concentração final de 0.05 g L^{-1} (VS6), 0.10 g L^{-1} (VS7) e 0.20 g L^{-1} (VS8). Num segundo ensaio, a 0.05 g L^{-1} de sulfato de amónio, adicionou-se 2.00 g L^{-1} (VS9), 1.00 g L^{-1} (VS10) e 0.50 g L^{-1} (VS11) de metionina. No terceiro ensaio, a 0.05 g L^{-1} de sulfato de amónio adicionou-se 0.10 g L^{-1} (VS12), 0.05 g L^{-1} (VS13) e 0.025 g L^{-1} (VS14) de metionina, enquanto no último ensaio, alterou-se as concentrações, adicionando-se diferentes concentrações de cisteína ao sulfato de amónio. O vinho sintético foi mantido a uma temperatura de 20°C , após inoculação com as diferentes estirpes.

2.3.1.3. Vinhos sintéticos com fosfato de amónio

Ao vinho sintético base (Tabela 2.1) adicionou-se diferentes concentrações fosfato de amónio (VS18, VS19, VS20, VS21, VS22 e VS23) e de metionina (VS21, VS22 e VS23; Figura 2.1). O ensaio ocorreu a uma temperatura constante de 20°C , após inoculação.

2.3.2. Mosto sintético

O mosto sintético foi preparado com base no descrito por Ciani & Ferraro (1996). Foram preparadas 3 soluções: solução A (500 mL) – glucose (110.0 g L^{-1}) e frutose (110.0 g L^{-1}); solução B (250 mL)– ácido tartárico (6.00 g L^{-1}), ácido cítrico (0.50 g L^{-1} ; Sigma-

Aldrich, Espanha) e ácido L-málico (3.00 g L⁻¹); solução C (250 mL) – YNB (1.70 g L⁻¹), cloreto de cálcio (2.00 g L⁻¹; Sigma- Aldrich, Espanha), vitamin-free, casamino acids– CAA (2.00 g L⁻¹; Difco, EUA), arginina (0.80 g L⁻¹), L-triptofano (0.15 g L⁻¹) e L-prolina (0.70 g L⁻¹). O pH das soluções B e C foram acertados a 3.5 com NaOH (6M) e HCl (6M), respetivamente. As três soluções foram esterilizadas separadamente a 121°C, durante 20 min sendo depois misturadas assepticamente. No final, adicionou-se um suplemento com extrato de levedura (3.00 g L⁻¹) e peptona (3.00 g L⁻¹).

Os mostos foram inoculados com levedura (1%) e controlou-se a fermentação pela análise da glucose e frutose e da contagem de células viáveis. No final da fermentação alcoólica, inoculou-se os meios com *O. oeni* VP41. Os ensaios foram feitos em triplicado, com um volume de 500 mL à temperatura de 20°C

2.3.3. Vinhos

Foram utilizados dois vinhos da região do Douro. O primeiro foi produzido a partir de uvas tintas da casta Touriga Franca (Quinta da Veiga) e outro vinho a partir de uvas tintas da casta Tinta Roriz (Quinta da Assolveira).

O vinho foi filtrado, em condições estéreis, recorrendo-se a material estéril e filtros com um diâmetro de poro de 0.45 µm (Pall Corporation, EUA). Estas amostras foram inoculadas com *O. oeni*, em fase estacionária. A fermentação malolática decorreu a 20°C. Todas as experiências foram feitas em triplicado, utilizando um volume de 500 mL. Ao longo da fermentação foram realizadas contagens de células viáveis e análise do teor em ácido L-málico e ácido L-lático.

2.4. Métodos analíticos

2.4.1. Ácidos orgânicos

A análise de ácido L-málico e ácido L-lático nos vinhos tintos e vinhos sintéticos foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com base no método descrito por Chinnici *et al.* (2005). Os vinhos tintos foram sujeitos a uma extração em fase sólida (SPE), após ajuste do pH a 9-10 com uma solução de NaOH (1M). A SPE foi realizada sob

vácuo, com recurso a um *manifold* (Supelco, EUA). Os cartuxos foram inicialmente acondicionados com 4 mL de metanol e 4 mL de água ultrapura. Após passagem de 2 mL de amostra, lavou-se com 1 mL de água ultrapura. Os ácidos orgânicos foram recuperados com 4 mL de HCl (1M). Posteriormente, o extrato obtido foi injetado no HPLC. Os vinhos sintéticos foram filtrados com membranas de celulose (0.45 µm de poro), para posterior injeção no HPLC.

A concentração dos diferentes compostos foi determinada utilizando o equipamento Knauer K-1001. A separação dos compostos foi realizada numa coluna Aminex^R HPX-87H (300 × 7.8 MM, Bio-Rad) e a deteção por UV-vis ($\lambda=210$ nm). A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 2.5 mM, a um fluxo de 0.6 mL min⁻¹, a 40°C. Diferentes soluções padrão de concentração rigorosa foram preparadas de forma a obter as curvas de calibração apresentadas no apêndice 2.

2.4.2. Análise de açúcares, etanol e glicerol

A concentração de glucose, etanol e frutose foi determinada por HPLC, utilizando um cromatógrafo Knauer K-1001. A separação dos compostos foi executada por uma coluna Aminex^R HPX-87H (300 × 7.8 MM, Bio-Rad) e a deteção foi avaliada por índice de refração. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico a 2.5 mM d, ca um fluxo de 0.6 mL min⁻¹, a 40°C. Os mostos sintéticos foram filtrados com membranas de celulose (0.45 µm de poro), para injeção no HPLC. Diferentes curvas de calibração foram obtidas através da preparação de diferentes soluções padrão (Apêndice 2).

2.4.3. Compostos de enxofre

Os compostos de enxofre foram determinados de acordo com o método descrito por Moreira *et al.* (2004). A um volume de 50 mL de amostra foi adicionado acetato de (metil)tilo a 50 µg/L como padrão interno (concentração inicial de 50 mg L⁻¹) e 4 g de sulfato de sódio anidro. As amostras foram extraídas duas vezes, com 5 mL de diclorometano durante 5

min. Os 2 mL de fase orgânica obtida foi concentrada 10 vezes sob um fluxo de azoto ($1-2 \text{ mL min}^{-1}$). Os compostos de enxofre foram analisados num cromatógrafo gasoso 6850 Agilent Network GC System equipado com um detetor de fotometria por chama (FDP). A fase orgânica ($1 \mu\text{L}$) foi injetada (splitless) numa coluna CP-Wax 58C-FFAP (Chrompack) de $50 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ e $1.2 \mu\text{m}$ de espessura de filme. A programação de temperatura utilizada foi $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (0 min) até $220 \text{ }^\circ\text{C}$ (45 min) a $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Injetor e detetor foram mantidos a $220 \text{ }^\circ\text{C}$. O H_2 , a 1 mL min^{-1} , foi utilizado como gás de arraste. Hidrogénio e ar a 60 mL min^{-1} e make-up (azoto) a 50 mL min^{-1} . Na Figura 2.2 é apresentado um cromatograma exemplo de um vinho tinto.

Os compostos foram identificados através do seu tempo de retenção por comparação com o valor obtido das soluções padrão. Foram realizadas calibrações recorrendo a diferentes soluções padrão de concentração rigorosa, em solução hidroalcoólica (11% etanol v/v, pH 3.8), como é apresentado no apêndice 3.

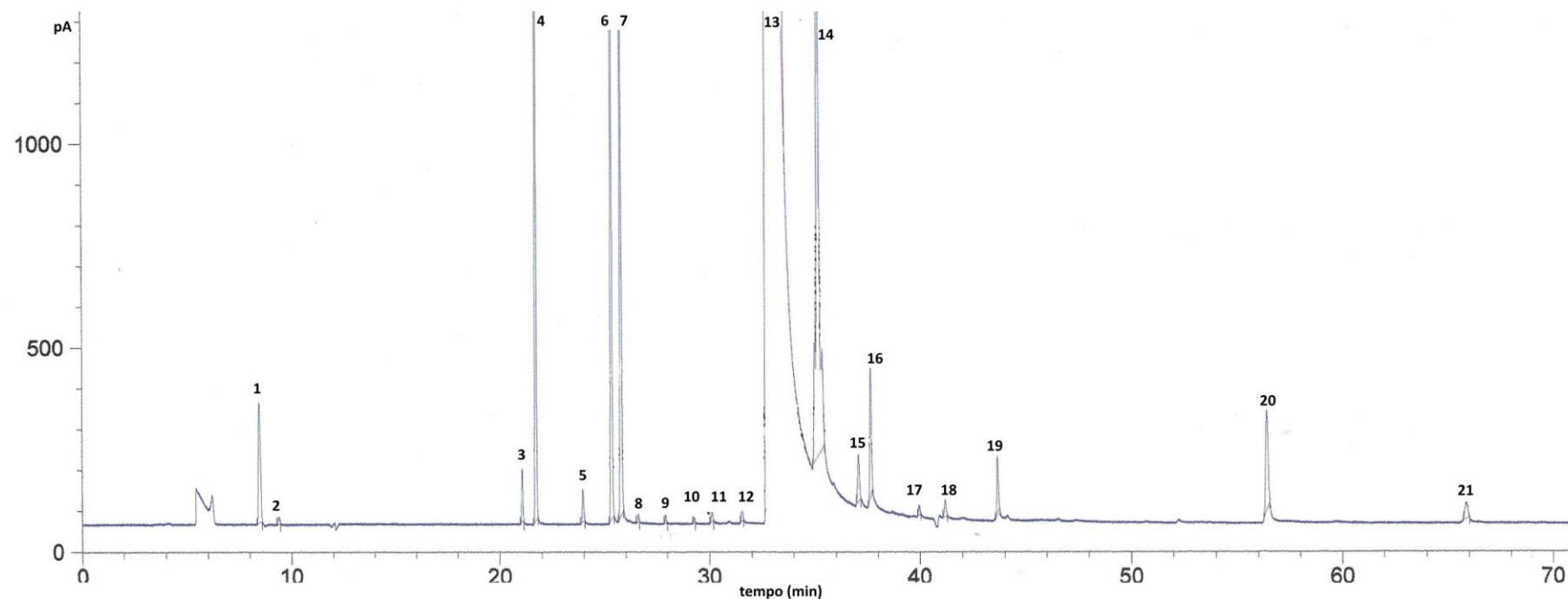


Figura 2.2. Cromatograma dos compostos de enxofre no vinho: (1) acetato de *S*-tiometilo; (2) acetato de *S*-tioetilo; (3) pico não identificado; (4) PI; (5) 2-mercaptoetanol; (6) 2-(metiltio) etanol; (7) 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona; (8) pico não identificado; (9) pico não identificado; (10) pico não identificado; (11) acetato de metionol; (12) pico não identificado; (13) metionol; (14) *cis*-metiltetrahidrofen-3-ona; (15) 3-(etiltio)-1-propanol; (16) 4-mercapto-1-butanol; (17) dimetilsulfona; (18) benzotiazole; (19) dimetilsulfona; (20) ácido 3-metiltiopropiónico; (21) pico não identificado. PI: padrão interno – acetato de (metiltio) etilo.

2.5. Análise estatística

Uma análise de variância (two-way ANOVA) foi aplicada aos dados experimentais destinadas a diferenciação dos efeitos “leveduras” e “FML”. Os resultados foram considerados significativamente diferente se o associado valor de p era inferior a 0.05. Os testes de Tukey foram aplicados aos pares, de comparação de médias. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS® 17.0 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, EUA).

3. Resultados e Discussão

3.1. Influência da adição de metionina e cisteína em vinhos sintéticos

Vinho base com solução de aminoácidos

Todos os vinhos sintéticos foram inoculados com *O. oeni* alpha ou *O. oeni* VP41. As FML que decorreram a 20°C ficaram concluídas em 8-10 dias, enquanto a 30°C observou-se o consumo total de ácido L-málico (3.00 g L⁻¹) em apenas 3 dias. À temperatura de 20°C, as contagens finais foram na ordem dos 10⁶ UFC mL⁻¹, enquanto a biomassa final a 30°C situou-se nas 10⁷ UFC mL⁻¹ para ambas as bactérias (Apêndice 1).

Nas Tabelas 3.1 e 3.2 são apresentadas as concentrações finais em compostos de enxofre dos ensaios com e sem a adição de metionina e cisteína (VS1, VS2 e VS3), a diferentes temperaturas.

Tabela 3.1. Concentração e desvio-padrão de compostos de enxofre nos vinhos sintéticos após a FML realizada por *O. oeni* alpha. VS1: com 0.20 g L⁻¹ de metionina, VS2: com 0.20 g L⁻¹ de cisteína, VS3: sem adição destes aminoácidos

Compostos (µg L ⁻¹)	T=20°C				T=30°C			
	VS1	VS2	VS3	Sig.	VS1	VS2	VS3	Sig.
Metionol	5.40 ^c (1.01)	3.68 ^b (0.15)	nd ^a	0.000	4.86 ^b (0.15)	3.19 ^b (0.17)	nd ^a	0.000
Acetato de S-tioetilo	2.62 ^b (0.87)	nd ^a	nd ^a	0.001	nd	nd	Nd	-
S1*	1.75 ^b (0.37)	0.048 ^a (0.010)	nd ^a	0.000	nd	nd	Nd	-

*composto não identificado

Valores que possuem diferentes letras (a, b, c), na horizontal, são diferentes com base no Tukey test ($p < 0.05$). nd – Não detetado. Sig. – Nível de significância.

Nas amostras fermentadas a 20°C contendo 0.20 g L⁻¹ de metionina (VS1), verificou-se a produção de metionol, acetato de S-tioetilo e de um composto não identificado (S1). Na amostra VS3, apesar de conter vários aminoácidos (Tabela 2.2), não se observou a produção de qualquer composto de enxofre, pois não continha fonte de enxofre. A adição de 0.20 g L⁻¹ de cisteína (VS2) ao vinho sintético conduziu à produção de metionol e do composto não

identificado (S2). Verifica-se que os vinhos sintéticos são significativamente diferentes relativamente aos teores em compostos de enxofre, apresentando o meio com metionina os teores mais elevados.

Nos vinhos fermentados a 30°C apenas se verificou a produção de metionol nos vinhos contendo metionina e cisteína. O teor em metionol quantificado nesses meios não é significativamente influenciado pelo aminoácido adicionado. A produção de apenas um composto, o metionol, no vinho sintético a 30°C pode ser explicada pela sua rápida fermentação.

Nenhum dos compostos de enxofre, metionol e acetato de *S*-tioetilo, ultrapassou o seu limite de perceção de 3200 µg L⁻¹ (em vinho) e 40 µg L⁻¹ (numa solução modelo), respetivamente.

Nos vinhos sintéticos fermentados pela *O. oeni* VP41, verificou-se a produção de metionol nos meios com adição de metionina e cisteína (tabela 3.2). No entanto, a adição de cisteína conduziu também à produção de um composto de enxofre desconhecido. Não se verificou a produção de acetato de *S*-tioetilo. Nos vinhos fermentados a 20°C, no meio com metionina observou-se uma maior produção de metionol do que a 30°C.

Tabela 3.2. Concentração e desvio-padrão de compostos de enxofre nos vinhos sintéticos após a FML realizada por *O. oeni* VP41. VS1: com 0.20 g L⁻¹ de metionina, VS2: com 0.20 g L⁻¹ de cisteína, VS3: sem adição destes aminoácidos

Compostos (µg L ⁻¹)	T=20°C				T=30°C			
	VS1	VS2	VS3	Sig.	VS1	VS2	VS3	Sig.
Metionol	2.76 ^b (0.51)	2.21 ^b (0.18)	nd ^a	0.000	1.60 ^b (0.01)	1.80 ^b (0.22)	nd ^a	0.000
S1*	nd ^a	0.801 ^b (0.166)	nd ^a	0.000	nd	nd	Nd	-

*composto não identificado

Valores que possuem diferentes letras (a, b, c), **na horizontal**, são diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). nd – não detectado, Sig. – Nível de significância.

Na amostra VS2, apesar de se ter adicionado cisteína e não metionina, verificou-se a produção de metionol, tal como aconteceu com *O. oeni* alpha. Estudos anteriores

demonstraram que algumas vias metabólicas de aminoácidos (ácido aspártico, serina e cisteína) levam à síntese de metionina, tanto nas leveduras como nas BAL (Figura 3.1 e 3.2; Swiegers *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2011). Este resultado sugere que o mesmo poderá acontecer nas bactérias durante a FML, levando à produção de metionol.

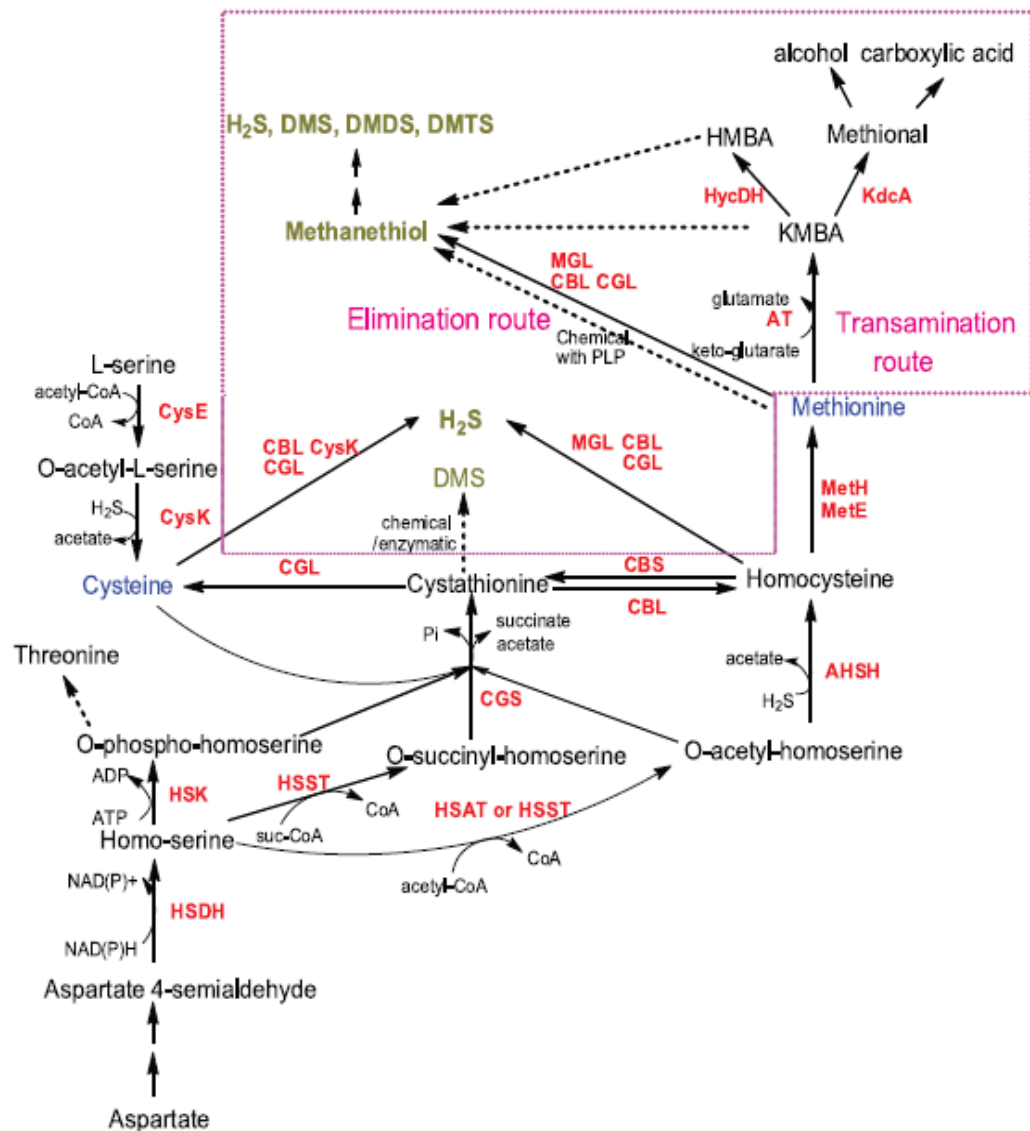


Figura 3.1.Metabolismo da cisteína e metionina pelas LAB (de Liu *et al.*, 2008)

Na amostra VS1 fermentada pela *O. oeni* alpha, a 20°C, observou-se a produção de acetato de *S*-tioetilo. O seu precursor, para leveduras e bactérias, é desconhecido, mas Liu *et al.* (2008) estudaram as enzimas envolvidas pelas BAL na formação de compostos de enxofre no queijo. Como é apresentado na Figura 3.1, a partir da cisteína e do ácido aspártico, pode

haver biossíntese de metionina e, por sua vez, de metanotiol. O metanotiol é um composto intermediário obtido por uma demetilação da metionina. Landaud *et al.* (2008) sugerem que as leveduras sintetizam os tioestéres (acetato de *S*-tiometilo e acetato de *S*-tioetilo, por exemplo) a partir de uma enzima que catalisa uma reação entre o metanotiol e a acetil-coenzima A (Figura 3.2). Um mecanismo semelhante pode estar envolvido na síntese deste tioestér pelas bactérias.

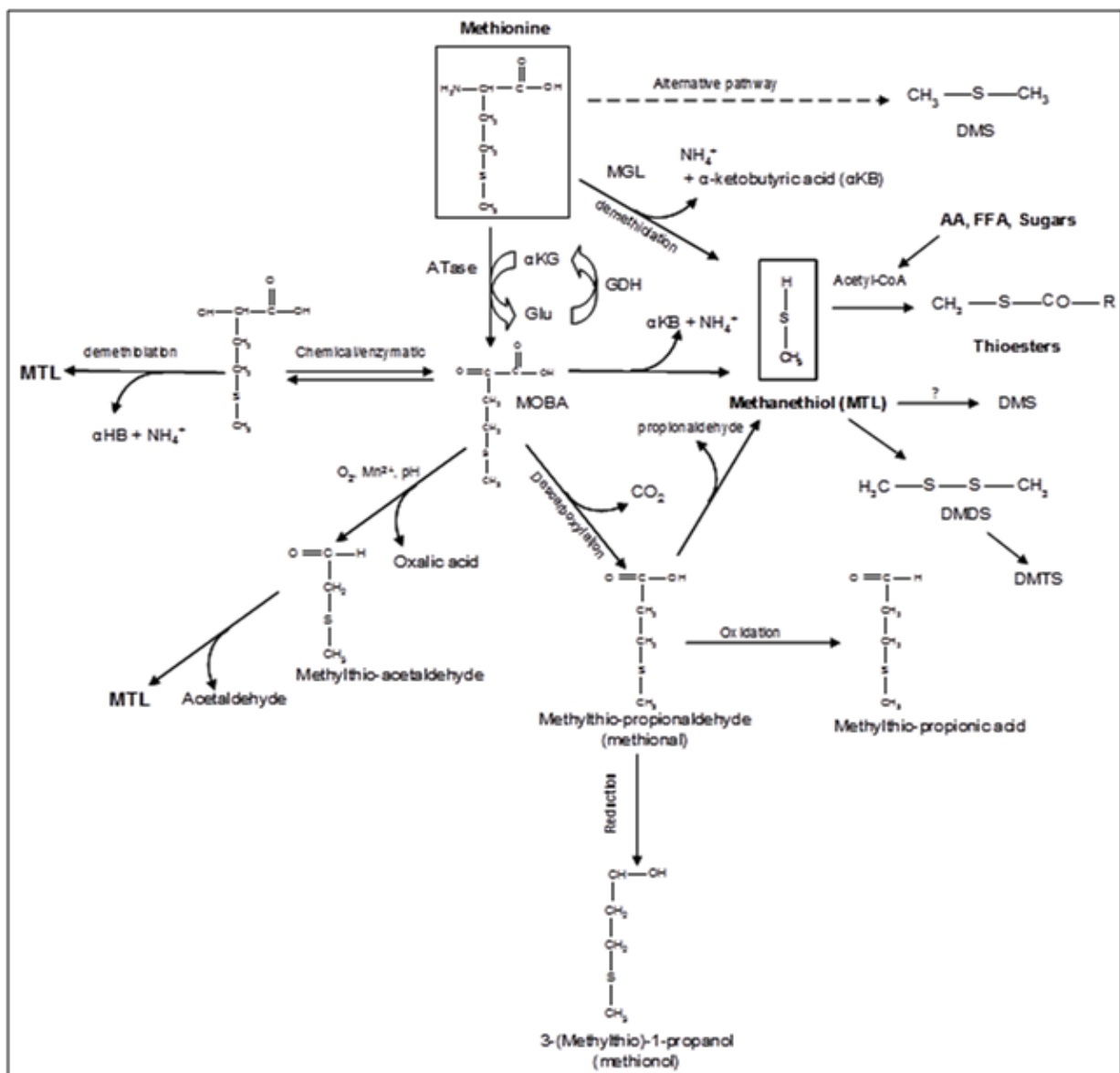


Figura 3.2. Representação esquemática do metabolismo de compostos de enxofre por levedura no vinho (de Landaud *et al.*, 2008)

Outros ensaios foram realizados aumentando a concentração em metionina inicial do vinho sintético, para 0.50 e 1.00 g L⁻¹, a 20°C. Verificou-se que quanto maior a quantidade de metionina do vinho sintético, maior a concentração de metionol produzida pelas bactérias, exceto para *O. oeni* VP41 que obteve-se uma maior concentração de metional a 0.50 g L⁻¹ (Tabela 3.3). A metionina é um precursor do metionol. Estudos anteriores demonstraram que a partir da metionina produz-se um composto intermediário, o metional. Este composto, também podem ser obtido pela descarboxilação do ácido 2-oxo-4-(metiltio)butírico, que por sua vez é reduzido a metionol (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004; Landaud *et al.*, 2008; Vallet *et al.*, 2008).

Tabela 3.3. Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvio-padrão de metionol nos vinhos sintéticos após a FML nos ensaios com metionina.

Metionina (g L ⁻¹)	<i>O. oeni</i> alpha	<i>O. oeni</i> VP41	Sig.
0.00	nd ^a	nd ^a	-
0.20	5.40 ^b (1.01)	2.76 ^a (0.051)	0.016
0.50	17.3 (4.9)	18.2 (0.7)	n.s.
1.00	20.6 (4.7)	14.5 (1.7)	n.s.

Valores que possuem diferentes letras (a, b), na horizontal, são diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). n.s. – não significativo. nd – Não detetado. Sig. – Nível de significância.

Comparando as duas estirpes bacterianas, na presença de 0.20 g L⁻¹ de metionina, a bactéria *O. oeni* alpha produziu um teor em metionol significativamente superior à *O. oeni* VP41. No entanto, nos vinhos com 0.50 e 1.00 g L⁻¹ de metionina, não se observaram diferenças significativas na quantidade de metionol produzida.

Vinho base com sulfato de amónio

Nestes vinhos base o objetivo foi observar se as bactérias produzem compostos de enxofre através do sulfato de amónio. Nos ensaios com sulfato de amónio e sem a adição de qualquer aminoácido (VS6, VS7 e VS8) não foram detetados quaisquer compostos de enxofre após a FML. Este resultado indica que, para as condições utilizadas, as bactérias não reduzem o sulfato de amónio. As leveduras sintetizam metionina e cisteína, através da sequência de redução do sulfato (Figura 3.3).

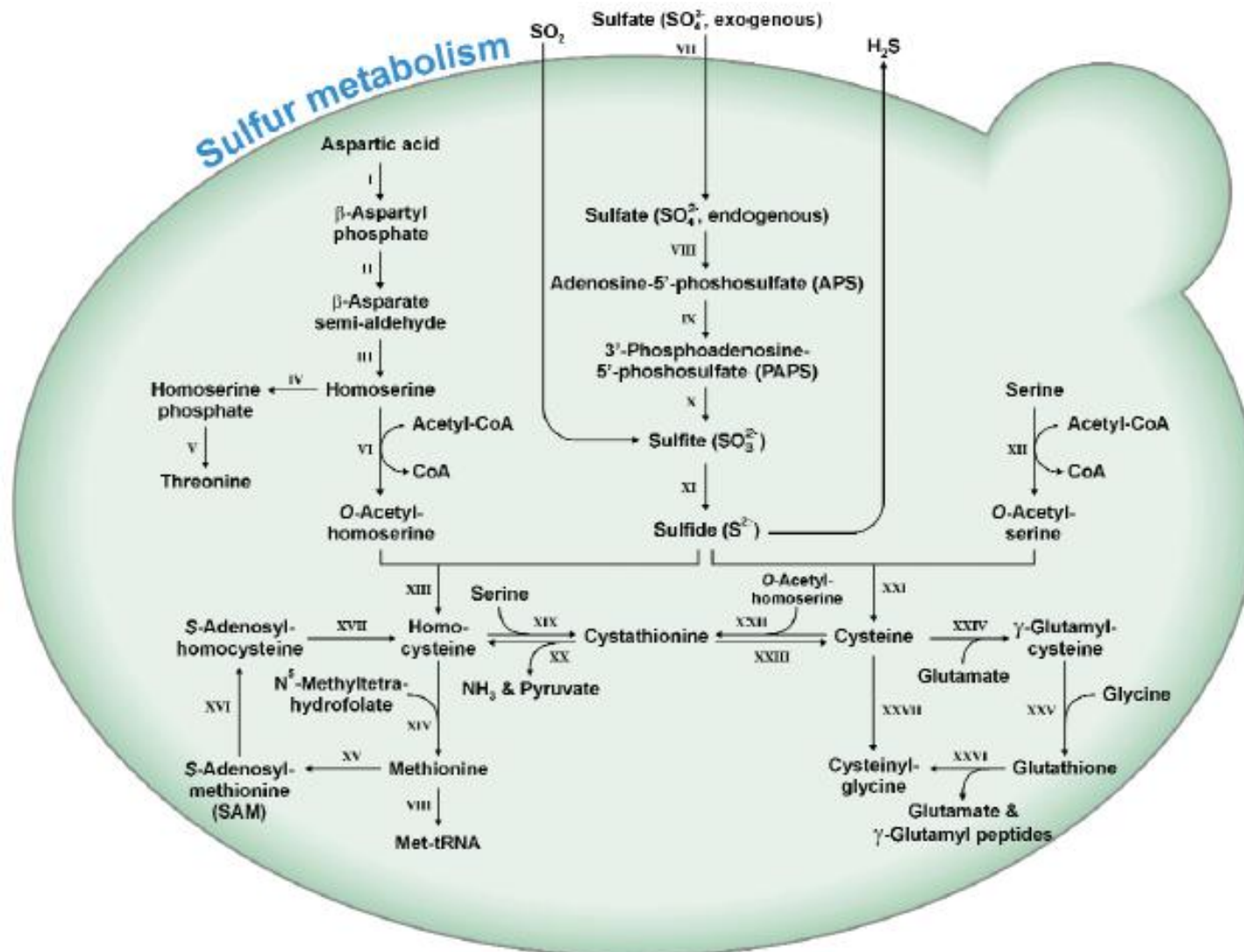


Figura 3.3. Esquema representativo do metabolismo do enxofre na levedura e a utilização de sulfato (de Swiegers *et al.*, 2005)

Realizaram-se ensaios adicionando-se metionina e sulfato de amônio. A quantidade de metionol produzida pelas bactérias no vinho sintético contendo sulfato de amônio com diferentes concentrações em metionina é apresentada na Tabela 3.4. Quanto maior a concentração de metionina existente no vinho, maior a produção de metionol pelas bactérias. Contudo o mesmo não se verificou para os meios VS12 (0.10 g L^{-1}) e VS13 (0.050 g L^{-1}). Estes resultados confirmam os obtidos anteriormente. Apenas se verificam diferenças significativas no teor em metionol produzido pelas bactérias nos vinhos sintéticos contendo 2.00 g L^{-1} e 0.50 g L de metionina.

Tabela 3.4. Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvio-padrão de metionol nos vinhos sintéticos após a FML

Vinho sintético	Sulfato de amônio (g L^{-1})	Metionina (g L^{-1})	Cisteína (g L^{-1})	<i>O. oeni</i> alpha	<i>O. oeni</i> VP41	Sig.
VS6	0.05	0.00	0.00	nd	nd	-
VS7	0.10	0.00	0.00	nd	nd	-
VS8	0.20	0.00	0.00	nd	nd	-
VS9	0.05	2.00	0.00	68.9 ^b (2.1)	40.6 ^a (5.3)	0.001
VS10	0.05	1.00	0.00	33.4 (13.1)	32.1 (6.7)	n.s.
VS11	0.05	0.50	0.00	16.3 ^a (0.8)	19.4 ^b (0.2)	0.002
VS12	0.05	0.10	0.00	3.75 (1.14)	2.54 (0.83)	n.s.
VS13	0.05	0.050	0.00	4.99 (2.67)	2.64 (0.06)	n.s.
VS14	0.05	0.025	0.00	2.47 (0.23)	2.34 (0.92)	n.s.
VS15	0.05	0.00	0.10	nd	nd	-
VS16	0.05	0.00	0.050	nd	nd	-
VS17	0.05	0.00	0.025	nd	nd	-

Valores que possuem diferentes letras (a, b), na **horizontal**, são diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). n.s. – não significativo. nd – Não detetado. Sig. – Nível de significância.

Não se verificou a presença de compostos de enxofre nos vinhos sintéticos contendo sulfato de amônio e cisteína (VS15, VS16 e VS17). Apenas na amostra VS17, inoculada com *O. oeni* VP41, verificou-se a produção de um composto desconhecido (S2) e com uma razão (área/área padrão interno) média de 0.067. Este resultado sugere que a produção de metionol a partir da cisteína, requer a presença de ácido aspártico, como no ensaio anterior, para que seja possível a produção de metionina e, posteriormente de metionol, como é sugerido pela via metabólica apresentada por Liu *et al.* (2008) (fig. 3.1).

Vinho base com fosfato de amónio

Os resultados dos ensaios realizados com a adição de 0.05 g L⁻¹, 0.10 g L⁻¹ e 0.20 g L⁻¹ de fosfato de amónio (VS18, VS19 e VS20), à temperatura de 20°C, são apresentados na Tabela 3.5. Tal como no caso do sulfato de amónia, não se verificou a produção de compostos de enxofre.

Tabela 3.5. Conteúdo em metionol ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvio-padrão para os ensaios com fosfato de amónia, após a FML, com e sem adição de metionina.

Vinho Sintético	Fosfato de amónio (g L ⁻¹)	Metionina (g L ⁻¹)	<i>O. oeni</i> alpha	<i>O. oeni</i> VP41	Sig.
VS18	0.05	0.00	nd	nd	-
VS19	0.10	0.00	nd	nd	-
VS20	0.20	0.00	nd	nd	-
VS21	0.05	0.50	20.2 ^b (1.0)	10.1 ^a (0.2)	0.000
VS22	0.05	1.00	71.0 ^b (1.0)	24.1 ^a (0.2)	0.000
VS23	0.05	2.00	82.4 ^b (0.7)	54.1 ^a (2.8)	0.000

Valores que possuem diferentes letras (a, b), **na horizontal**, são diferentes de acordo com o Tukey test ($p < 0.05$). nd – Não detetado. Sig. – Nível de significância.

Nos vinhos sintéticos com fosfato de amónio e com adições crescentes de metionina, de 0.50 g L⁻¹, 1.00 g L⁻¹ e 2.00 g L⁻¹ (VS21, VS22 e VS23, respetivamente) observou-se a produção crescente de metionol, tal como nos ensaios com sulfato de amónio (Tabela 3.5). Quanto maior a quantidade de metionina no vinho, maior a concentração de metionol no final da FML. Observaram-se diferenças significativas no teor de metionol produzido. A *O. oeni* alpha conduziu a uma maior produção de metionol que a *O. oeni* VP41, tal como foi observado nos ensaios anteriores.

Também verificou-se que para adições de 1.00 g L⁻¹ de metionina, comparando os vários ensaios, houve uma maior produção de metionol na presença de sulfato de amónio e fosfato de amónio, principalmente nos vinhos sintéticos fermentados com *O. oeni* alpha. Este resultado indica que a presença de sulfato de amónio e fosfato de amónio podem influenciar o metabolismo das bactérias.

3.2. Influência da FML em mosto sintético após fermentação alcoólica

Para verificar se a composição do vinho obtida após a fermentação alcoólica influencia a composição enxofrada obtida após a FML, efetuaram-se fermentações em mosto sintético. Este mosto foi inoculado com diferentes estirpes de *S. cerevisiae*. A Figura 3.4 mostra a evolução da fermentação alcoólica, durante 25 dias, a 20°C. Ao longo da fermentação alcoólica e, posteriormente, da FML, fez-se contagem de leveduras e depois de bactérias (Figura 3.4 A e 3.5, respetivamente). Depois da fermentação alcoólica, inoculou-se as diferentes amostras com *O. oeni* VP41.

A fermentação alcoólica foi dada como concluída a partir do momento em que a concentração conjunta de frutose e glucose eram constantes e inferiores as 5.0 g L⁻¹ (Figura 3.4 B, C e D). A FML demorou 16 dias e deu-se como finalizada após o consumo de todo o ácido L-málico.

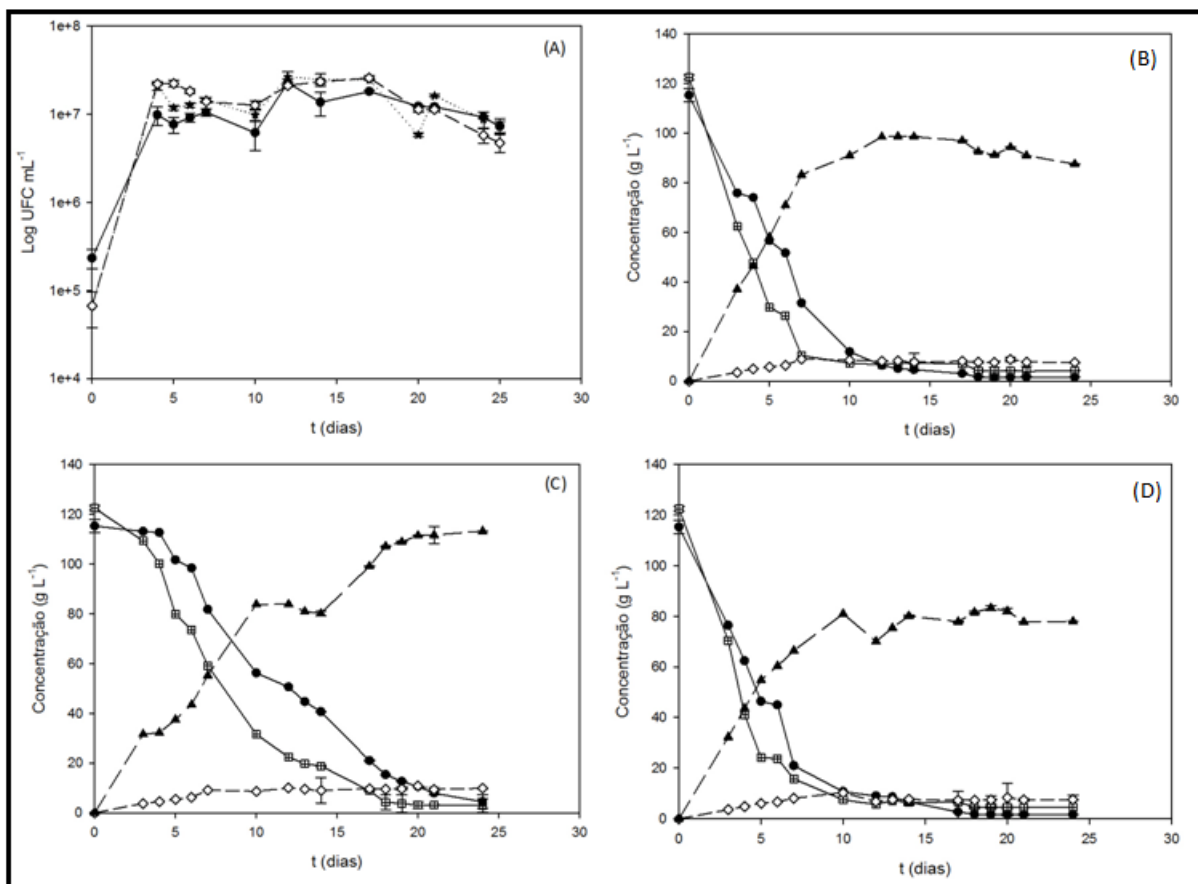


Figura 3.4. (A) Crescimento de *S. cerevisiae* WAN (◇), *S. cerevisiae* X5 (●) e *S. cerevisiae* VL3 (*) e utilização da glucose (■) e frutose (●) e produção de etanol (▲) e glicerol (◇) durante a fermentação alcoólica por (B) *S. cerevisiae* WAN, (C) *S. cerevisiae* X5 e (D) *S. cerevisiae* VL3.

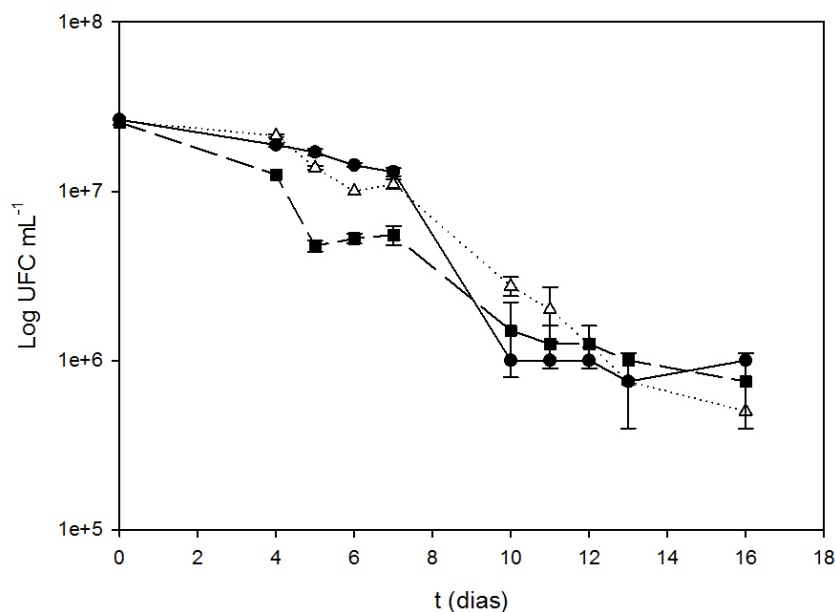


Figura 3.5. Evolução de *O. oeni* VP41 inoculada após a fermentação alcoólica realizada por *S. cerevisiae* WAN (Δ), *S. cerevisiae* X5 (\blacksquare) e *S. cerevisiae* VL3 (\bullet)

Os dados referentes à composição em compostos de enxofre dos vinhos sintéticos obtidos a partir de diferentes leveduras e pela bactéria foram sujeitos a uma análise ANOVA Two-way (Tabela 3.6). No final da fermentação alcoólica, observou-se que a estirpe de levedura influenciou a composição do vinho sintético relativamente ao teor em metionol, acetato de *S*-tiometilo, 2-mercaptoetanol, 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona e ácido 3-metiltiopropiónico. A FML não influenciou o teor em acetato de *S*-tiometilo e ácido 3-metiltiopropiónico. A interação entre levedura e FML afetou significativamente o teor em metionol, 2-mercaptoetanol e 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona.

Tabela 3.6. Nível de significância para os fatores ‘leveduras’, ‘FML’ e sua interação em diferentes compostos de enxofre.

Compostos	Leveduras	FML	Leveduras×FML
Metionol	0.000	0.034	0.026
Acetato de <i>S</i>-tiometilo	0.000	n.s.	n.s.
2-mercaptoetanol	0.000	0.000	0.000
2-metiltetrahidrotiofen-3-ona	0.000	0.004	0.000
Ácido			
3-metiltiopropiónico	0.004	n.s.	n.s.

n.s. – Não significativo.

No final da FML, em todas as amostras o metionol ficou abaixo do seu limite de percepção ($3200 \mu\text{g L}^{-1}$). Nas amostras fermentadas por *S. cerevisiae* X5 identificou-se o acetato de *S*-tiometilo, o 2-mercaptoetanol, o 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona e o ácido 3-metiltiopropiónico (Tabela 3.7). Os valores obtidos estão abaixo dos seus limites de percepção, em vinho, de $300 \mu\text{g L}^{-1}$ (em solução modelo), $100 \mu\text{g L}^{-1}$, $250 \mu\text{g L}^{-1}$ e $250 \mu\text{g L}^{-1}$, respetivamente (Mestres *et al.*, 2000; Landaud *et al.*, 2008).

Na amostra fermentada por *S. cerevisiae* VL3, após a FML, os limites de percepção para a 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona e o ácido 3-metiltiopropiónico também não foram ultrapassados (Tabela 3.7).

Na amostra fermentada por *S. cerevisiae* WAN, depois da FML, verificou-se uma concentração final de $312 \mu\text{g L}^{-1}$ de ácido 3-metiltiopropiónico, ultrapassando o seu limite de percepção de $250 \mu\text{g L}^{-1}$, mas o valor final de 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona ($57.4 \mu\text{g L}^{-1}$) ficou abaixo do seu limite de percepção de $250 \mu\text{g L}^{-1}$.

Em todos os meios, o composto encontrado em maior quantidade foi o metionol. Para um nível de significância $p < 0.05$, no ensaio com *S. cerevisiae* X5 observou-se uma diminuição significativa de metionol e de 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona, após a FML. Nos ensaios realizados com *S. cerevisiae* WAN verificou-se um aumento significativo do teor em 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona (Tabela 3.7). A *S. cerevisiae* VL3 produziu metionol, 2-mercaptoetanol, 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona e ácido 3-metiltiopropiónico. No fim da FML, o 2-mercaptoetanol não foi detetado.

Estudos sobre a produção de metionol e ácido 3-metiltiopropiónico em leveduras identificaram a metionina como seu precursor no vinho (Figura 3.2). A metionina é convertida em ácido 4-oxobutírico (MOBA), pela atividade de uma aminotransferase e o MOBA é descarboxilado em metional. Através de uma redução é obtido o metionol e de uma oxidação é obtido o ácido 3-metiltiopropiónico (Landaud *et al.*, 2008). Assim sendo é natural a presença destes dois compostos nas amostras de mosto sintético, após a sua fermentação alcoólica. Após a FML seria expectável o aumento destes dois compostos, pois as BAL produzem ambos, mas todos os aumentos e diminuições foram não significativos, porém após a fermentação alcoólica poderia existir uma menor quantidade de aminoácidos para as bactérias utilizarem durante a FML. Na amostra de *S. cerevisiae* VL3, após a FML verificou-se uma ligeira diminuição do ácido 3-metiltiopropiónico ($179 \mu\text{g L}^{-1}$ e $152 \mu\text{g L}^{-1}$

após a FML), mas é possível que dependendo da interação “levedura” e “FML”, haja variações na concentração dos diferentes compostos de enxofre, no final das fermentações.

Tabela 3.7. Concentração dos compostos de enxofre e desvio-padrão obtidos após a fermentação alcoólica pelas leveduras *S. cerevisiae* X5, VL3 e WAN, e após a FML por *O. oeni* VP41.

Composto ($\mu\text{g L}^{-1}$)	F. alcoólica	Após FML	Sig.
<i>S. cerevisiae</i> X5			
Metionol	138 (12)	50.6 (6.8)	0.000
Acetato de <i>S</i> -tiometilo	2.99 (0.33)	3.17 (0.22)	n.s.
2-mercaptoetanol	1.11 (0.21)	0.831 (0.003)	n.s.
2-metiltetrahidrotiofen-3-ona	23.2 (0.40)	16.1 (1.3)	0.0001
Ácido 3- metiltiopropiónico	118 (20)	208 (90)	n.s.
<i>S. cerevisiae</i> WAN			
Metionol	338 (35)	313 (2)	n.s.
Acetato de <i>S</i> -tiometilo	nd	nd	-
2-mercaptoetanol	nd	nd	-
2-metiltetrahidrotiofen-3-ona	40.8 (2.1)	57.4 (1.9)	0.001
Ácido 3-metiltiopropiónico	236 (49)	312 (33)	n.s.
<i>S. cerevisiae</i> VL3			
Metionol	229 (51)	246 (28)	n.s.
Acetato de <i>S</i> -tiometilo	nd	nd	-
2-mercaptoetanol	1.66 (0.34)	nd	0.001
2-metiltetrahidrotiofen-3-ona	21.5 (3.6)	25.1 (4.1)	n.s.
Ácido 3-metiltiopropiónico	179 (57)	152 (27)	n.s.

n.s. – não significativo. nd – Não detetado. Sig. – Nível de significância.

Para o 2-metiltetrahidrotiofen-3-ona não há ainda qualquer via metabólica descrita, tanto para leveduras, como para bactérias. Serão necessários mais estudos para a compreensão da sua síntese durante a produção de vinho.

O 2-mercaptoetanol é um composto que é obtido nos vinhos a baixas concentrações (aproximadamente $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$, Tabela 1.4). A sua síntese pelas leveduras tem vindo a ser estudada. Vermeulen *et al.* (2006) apresentaram uma hipótese para a sua metabolização, na cerveja, em que o 2-mercaptoetanol e o mercaptopropanol, seriam obtidos pela catabolização da cisteína e homocisteína, sendo uma hipótese para a explicação da sua formação no vinho pela fermentação alcoólica. Em nenhuma das amostras verificou-se o aumento de 2-mercaptoetanol, após a FML, mas sim a diminuição da sua concentração em duas amostras, apesar de *S. cerevisiae* WAN não foi significativa.

O acetato de *S*-tiometilo apenas foi produzido por *S. cerevisiae* X5 e não se verificaram diferenças significativas após a FML.

3.3. Influência da FML no vinho

Os vinhos produzidos a partir da casta Touriga Franca foram inoculados com as bactérias *O. oeni* alpha e *O. oeni* VP41. Esta casta apresentava 3.93 de pH e um grau alcoólico de 12.70%. A evolução do número de células ao longo da fermentação é apresentada na Figura 3.3 A.

A evolução do ácido L-málico durante a FML é apresentada na Figura 3.3 B. O valor inicial de ácido L-málico foi 1.26 g L^{-1} . A FML foi dada como concluída após o consumo de todo o ácido L-málico, verificado ao fim de 14 dias para *O. oeni* alpha e *O. oeni* VP41 e 18 dias para o controlo (FML espontânea). O valor final de ácido L-lático foi 1.00, 1.21 e 0.87 g L^{-1} para *O. oeni* alpha, *O. oeni* VP41 e controlo, respetivamente.

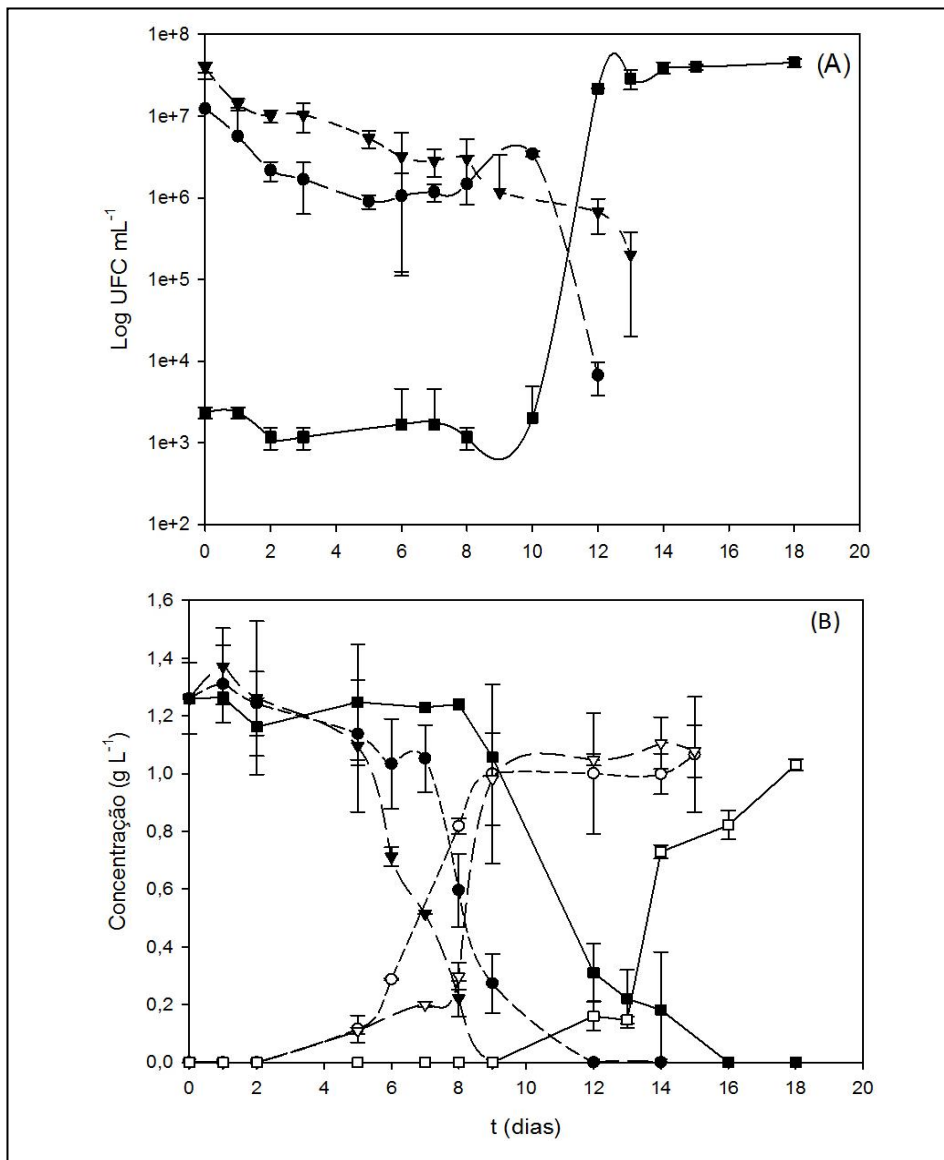


Figura 3.3. FML realizada no vinho Touriga Franca: (A) Crescimento das culturas *O. oeni* alpha (●), *O. oeni* VP41 (▼) e controlo (■). (B) Utilização do ácido L-málico por *O. oeni* alpha (●), *O. oeni* VP41 (▼) e controlo (■) e produção de ácido L-lático por *O. oeni* alpha (○), *O. oeni* VP41 (▽) e controlo (□).

O mesmo procedimento foi aplicado no vinho produzido a partir de uvas da casta Tinta Roriz (pH=3.89; álcool=14.45%). No entanto, não se verificou a ocorrência de FML. Após inoculação observou-se um n^o de células de 2.38E07 UFC mL⁻¹ e 7.37E07 UFC mL⁻¹ de *O. oeni* alpha e *O. oeni* VP41, respetivamente. Contudo, a partir do momento da inoculação verificou-se uma diminuição do n^o de células viáveis e a concentração de ácido L-málico diminuiu ligeiramente, mas a partir 7^o dia de fermentação manteve-se constante para todas as amostras, não se observando produção de ácido L-lático (Figura 3.4 B). No controlo, nunca se obteve qualquer contagem. Este vinho necessitaria de estirpes bacterianas com uma maior tolerância ao etanol.

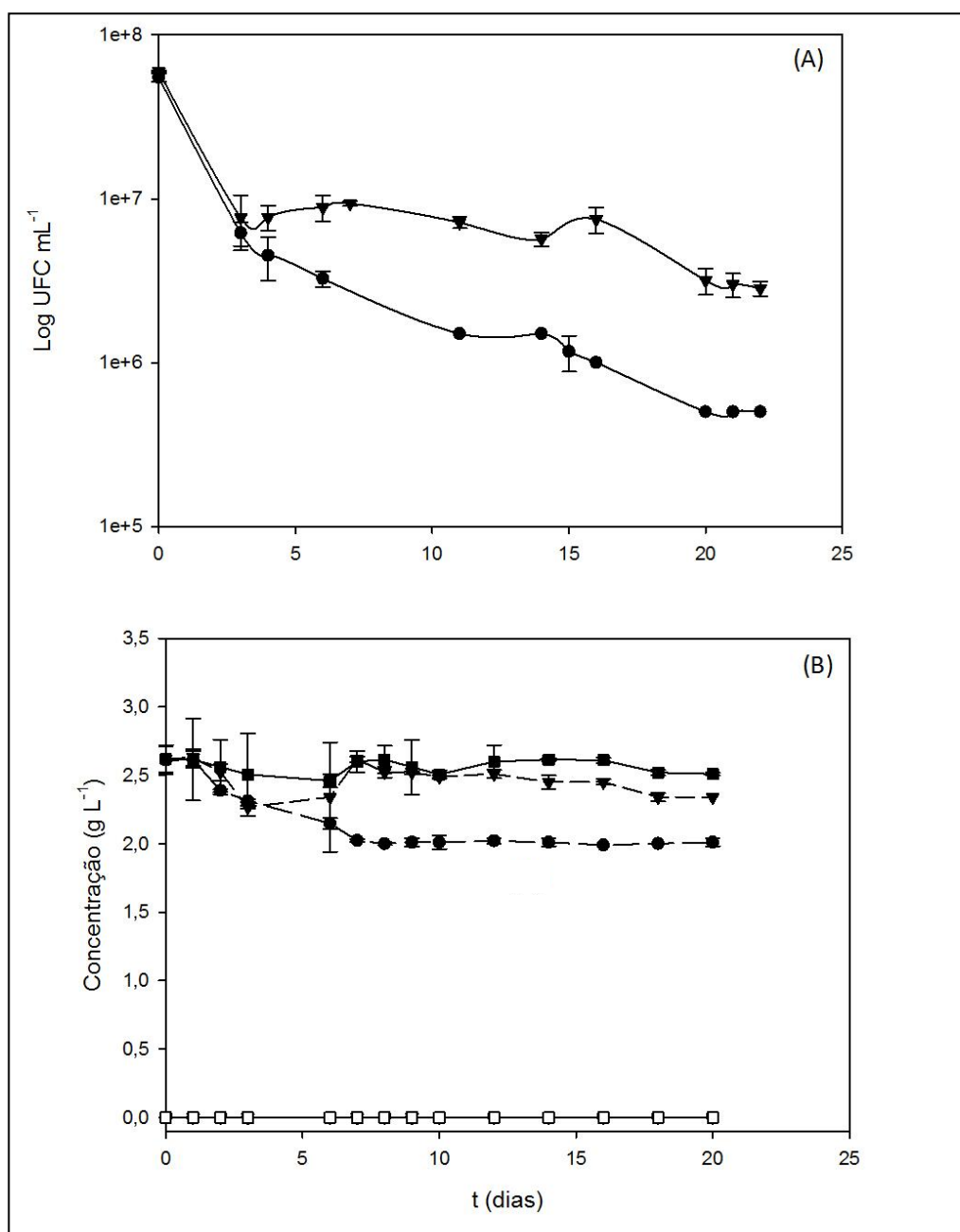


Figura 3.4. Tinta Roriz: (A) Crescimento das culturas *O. oeni* alpha (●) e *O. oeni* VP41 (▼). (B) Utilização do ácido L-málico por *O. oeni* alpha (●), *O. oeni* VP41 (▼) e controlo (■) e produção de ácido L-lático por *O. oeni* alpha (○), *O. oeni* VP41 (▽) e controlo (□).

A análise dos compostos de enxofre metionol, acetato de *S*-tioetilo, acetato de *S*-tioetilo, 2-mercaptoetanol, propionato de 3-(metiltio)etilo, 3-mercapto-1-propanol, 3-(etiltio)-1-propanol, 4-(metiltio)-1-butanol, benzotiazole, dimetilsulfona e ácido 3-metiltiopropiónico, do vinho Touriga Franca, antes e após a FML, mostra diferenças significativas para alguns compostos (Tabela 3.8). Para o metionol, 2-mercaptoetanol e o propionato de 3-(metiltio) etilo não se verificou variações significativas na sua concentração. Após a FML, verificou-se

uma diminuição do teor em acetato de *S*-tiometilo, acetato de *S*-tioetilo, 3-(etiltio)-1-propanol, 4-(metiltio)-1-butanol e ácido 3-metiltiopropiónico. No entanto, observou-se um aumento de 3-mercapto-1-propanol, benzotiazole e para o composto não identificado S3. Apesar de haver diferenças significativas para a dimetilsulfona, houve apenas uma ligeira diminuição na sua concentração, sendo esta mais acentuada no controlo, contudo este composto não tem grande impacto sensorial, pois é um composto inodoro.

Tabela 3.8. Conteúdo de compostos de enxofre ($\mu\text{g L}^{-1}$) e desvio-padrão no vinho Touriga Franca antes e após a FML.

Compostos	Antes da FML	Controlo	<i>O. oeni</i> alpha	<i>O. oeni</i> VP41	Sig.
Metionol	178 (19)	199 (36)	179 (23)	194 (32)	n.s.
2-Mercaptoetanol	2.45 (0.08)	2.14 (0.16)	2.24 (0.18)	2.19 (0.60)	n.s.
Propionato de 3- (Metiltio)etilo	1.51 (0.04)	1.74 (0.33)	1.75 (0.24)	1.96 (0.13)	n.s.
Acetato de <i>S</i> -tiometilo	26.8 ^b (0.40)	10.3 ^a (0.70)	12.2 ^a (7.2)	8.60 ^a (2.07)	0.000
Acetato de <i>S</i> -tioetilo	4.54 ^b (0.07)	nd ^a	nd ^a	nd ^a	0.000
3-(Etiltio)-1-propanol	62.9 ^b (4.9)	16.9 ^a (4.9)	17.5 ^a (5.0)	15.2 ^a (3.0)	0.000
4-(Metiltio)-1-butanol	247 ^b (21)	139 ^a (22)	148 ^a (42)	126 ^a (29)	0.000
Ácido 3-metiltiopropiónico	241 ^b (9.0)	nd ^a	nd ^a	nd ^a	0.000
3-mercapto-1-propanol	2.68 ^a (0.42)	3.89 ^{ab} (0.86)	5.24 ^{bc} (1.82)	6.71 ^c (1.37)	0.002
Benzotiazole	11.5 ^a (0.7)	17.6 ^b (1.0)	18.0 ^b (3.7)	15.8 ^{ab} (2.2)	0.007
S3*	nd ^a	17.5 ^b (0.9)	15.5 ^b (1.1)	48.4 ^c (8.9)	0.000
Dimetilsulfona	19.7 ^b (0.5)	11.7 ^a (1.2)	15.5 ^{ab} (3.8)	15.1 ^{ab} (4.8)	0.028

*Composto não identificado. A sua concentração foi calculada utilizando a calibração do metionol.

Valores que possuem diferentes letras (a, b, c), **na horizontal**, são diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). n.s.- Não significativo. Sig. – Nível de significância.

As duas bactérias tiveram um comportamento semelhante. Dos compostos com um limite de percepção conhecido, de acordo com a Tabela 1.4, todos apresentaram concentrações inferiores aos seus limites de percepção no final da FML.

Quanto à quantidade normalmente presente no vinho para o metionol ($140\text{-}5000\ \mu\text{g L}^{-1}$), 2-mercaptoetanol ($0.13\text{--}18\ \mu\text{g L}^{-1}$), propionato de 3-(metiltio)etilo ($0\text{-}10\ \mu\text{g L}^{-1}$), acetato de *S*-tioetilo ($0\text{-}115\ \mu\text{g L}^{-1}$), acetato de *S*-tioetilo ($0\text{-}56\ \mu\text{g L}^{-1}$), 3-(etiltio)-1-propanol ($6\text{-}68\ \mu\text{g L}^{-1}$), 4-(metiltio)-1-butanol ($0\text{-}181\ \mu\text{g L}^{-1}$), ácido 3-metiltiopropiónico ($0\text{-}1811\ \mu\text{g L}^{-1}$), 3-mercapto-1-propanol ($0\text{-}13.5\ \mu\text{g L}^{-1}$, em vinhos brancos) e benzotiazole ($0\text{-}11\ \mu\text{g L}^{-1}$), observou-se que vários compostos de enxofre obtidos para este vinho, após a FML, estão dentro dos valores normais presentes em vários vinhos, exceto o benzotiazole que está acima (Mestres *et al.*, 2000; Swiegers *et al.*, 2005; Landaud *et al.*, 2008, Moreira *et al.*, 2010).

Em relação ao ácido 3-metiltiopropiónico, que confere um aroma a “chocolate”, “manteiga” ou “rançoso” aos vinhos, verificou-se uma diminuição significativa após a FML, ao contrário de Pripis-Nicolau *et al.* (2004) que observou um aumento de 8-17%. No vinho, este composto possui um limite de percepção de $250\ \mu\text{g L}^{-1}$ e antes da FML possuía uma concentração de $241\ \mu\text{g L}^{-1}$. Na experiência com mosto sintético (capítulo 3.2), observou-se a diminuição deste composto após FML, numa das amostras, mas não foi significativa. Serão necessários mais estudos com vinho e diferentes estirpes para uma melhor caracterização da FML e a sua influência nos compostos de enxofre.

Estudos anteriores demonstraram que as estirpes de *O. oeni* convertem metionina a metionol (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004; Vallet *et al.*, 2008) e tanto as leveduras como as bactérias podem produzir este composto.

Poucos estudos identificaram vias metabólicas para as BAL e o seu envolvimento na produção de outros compostos de enxofre que não o metionol e o ácido 3-metiltiopropiónico.

Nos vinhos sintéticos (capítulo 3.1) apenas o metionol, ácido 3-metiltiopropiónico e acetato de *S*-tioetilo foram sintetizados pelas bactérias. Contudo, no vinho Touriga Franca, para além do metionol não ter sofrido aumentos significativos, o ácido 3-metiltiopropiónico e acetato de *S*-tioetilo diminuíram significativamente, não sendo detetados após a FML. A utilização dos compostos de enxofre pelas bactérias, durante a FML pode levar a variações significativas nas suas concentrações.

No vinho, o 2-mercaptoetanol não variou significativamente, tal como na amostra de mosto sintético inoculada com *S. cerevisiae* X5, enquanto na amostra com *S. cerevisiae* VL3 o 2-mercaptoetanol não foi detetado após a FML. Apesar dos aumentos de benzotiazole e 3-mercapto-1-propanol, não existe qualquer evidência de que as BAL sejam capazes de produzir estes compostos.

A interação dos fatores “levedura” e “FML” demonstrou ser significativa para a variação dos diferentes compostos de enxofres, podendo explicar o aumento e diminuição destes compostos, em diferentes experiências.

No futuro, será necessário proceder à identificação dos compostos não identificados (S1, S2 e S3) por cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa (GC-MS), indicando qual a composição da amostra, verificando qual o seu real impacto no aroma do vinho.

4. Conclusão gerais

Apesar de alguns trabalhos recentes indicarem a capacidade de *O. oeni* para produzir compostos de enxofre no vinho, o efeito da FML no perfil deste grupo de compostos é uma área ainda pouco estudada.

No vinho sintético, a produção de metionol esteve sempre ligada à existência de metionina ou cisteína no meio. Os resultados indicam que este aminoácido, em conjunto com outros, permite a síntese de metionina pelas BAL, a qual é depois convertida em metionol. Verificou-se que quanto maior a concentração de metionina no meio maior a concentração de metionol obtida. Os níveis obtidos dependem da estirpe de bactéria. *O. oeni* alpha produziu quantidades superiores de metionol do que *O. oeni* VP41. A adição de metionina levou à produção de outros compostos, para além do metionol, como o acetato de *S*-tioetilo. Pode-se concluir que, nas condições utilizadas, as bactérias não foram, aparentemente, capazes de metabolizar/produzir compostos de enxofre através do sulfato de amónio ou do fosfato de amónio como únicas fonte de azoto.

Este trabalho mostrou que a FML alterou o perfil dos compostos de enxofre obtido após a fermentação alcoólica. No vinho tinto, da casta Touriga Franca, verificou-se o aumento ou diminuição significativa de vários compostos e a presença de um composto não identificado com um aumento significativo, após a FML. O mesmo foi verificado na FML após a fermentação alcoólica de mosto sintético.

No vinho tinto, a FML conduziu à diminuição da concentração de vários compostos de enxofre (acetato de *S*-tiometilo, acetato de *S*-tioetilo, 3-(etiltio)-1-propanol, 4-(metiltio)-1-butanol e ácido 3-metiltiopropiónico) e o metionol não variou significativamente, o que é um bom indicador, uma vez que estes compostos são na sua maioria prejudiciais para o vinho.

Estes resultados indicam que o estudo do catabolismo da metionina e cisteína são de facto importantes para o perfil dos compostos de enxofre no vinho, assim como a importância da interação entre a fermentação alcoólica e FML para o perfil aromático do vinho, mais especificamente para os compostos de enxofre. Contudo, são necessários mais estudos para decifrar e confirmar as vias metabólicas utilizadas pelas BAL para a síntese de compostos de enxofre.

5. Trabalhos futuros

São necessários mais estudos para compreender as vias metabólicas dos compostos de enxofre, durante a fermentação malolática. Será importante repetir alguns ensaios com vinho tinto, porque geralmente diferentes castas têm perfis aromáticos distintos. Há várias possibilidades de elaborar vinhos sintéticos com diferentes concentrações de aminoácidos, retirando aos poucos diferentes aminoácidos e fazendo diferentes combinações, e estudar os mesmos com outras estirpes de BAL.

A utilização de glutathione nos vinhos para redução de compostos de enxofre tem vindo a ser estudada para as leveduras e o mesmo deve ser feito para as BAL, sendo esta uma possível fonte de enxofre para os microrganismos.

Apêndice

Apêndice 1 – Concentrações de ácido L-málico e ácido L-lático e biomassa final dos vinhos sintéticos, para as duas estirpes de *O. oeni*

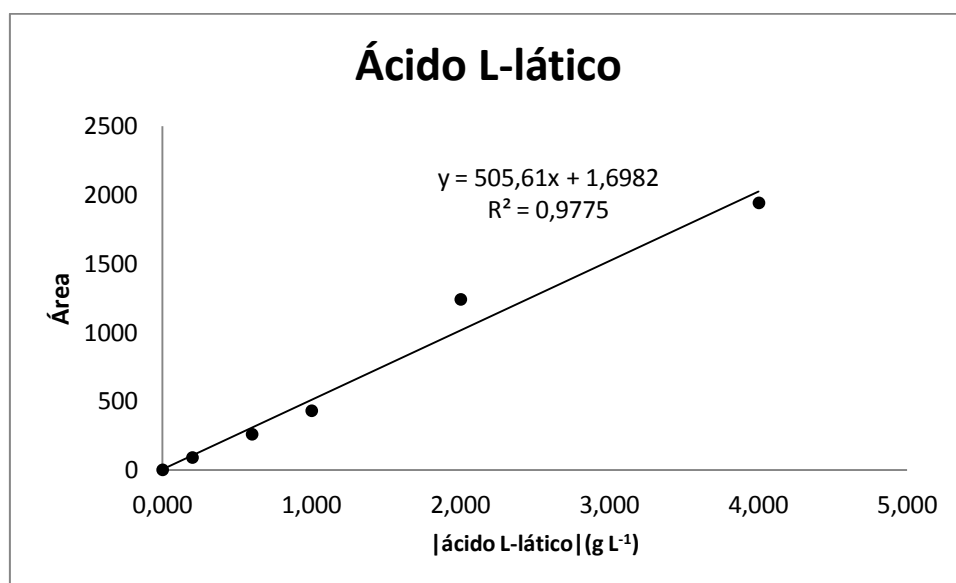
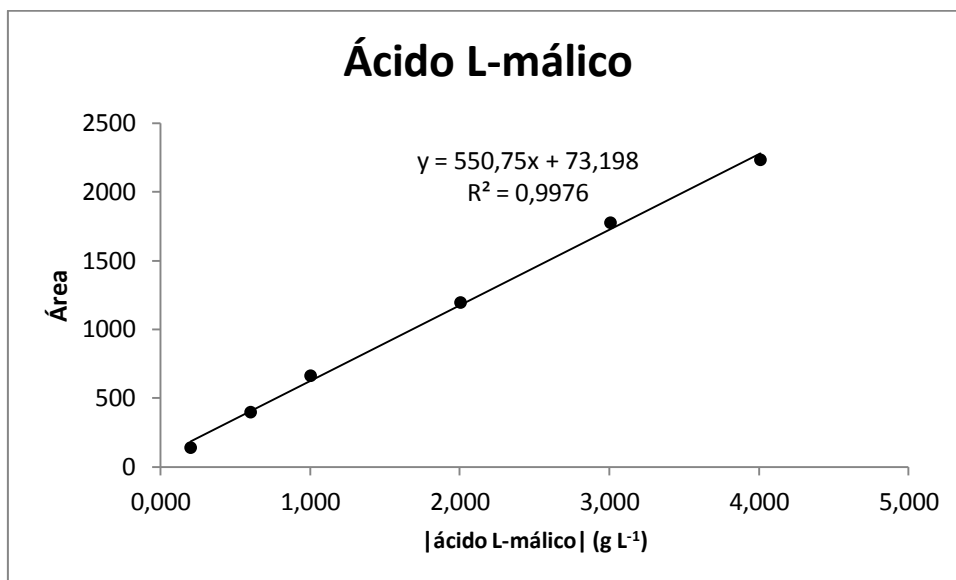
Tabela A.1. Concentrações de ácido L-málico e ácido L-lático e biomassa final dos vinhos sintéticos para *O. oeni* VP41.

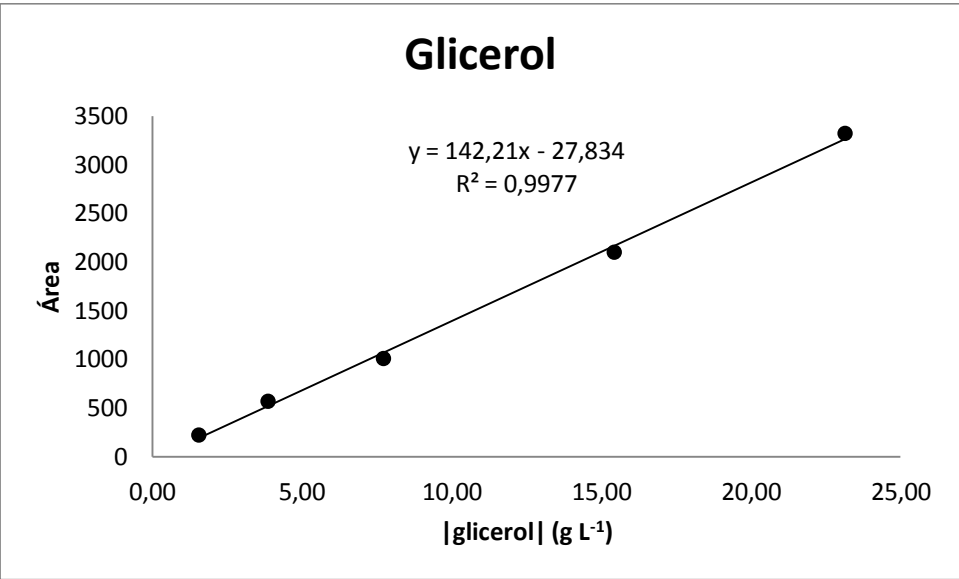
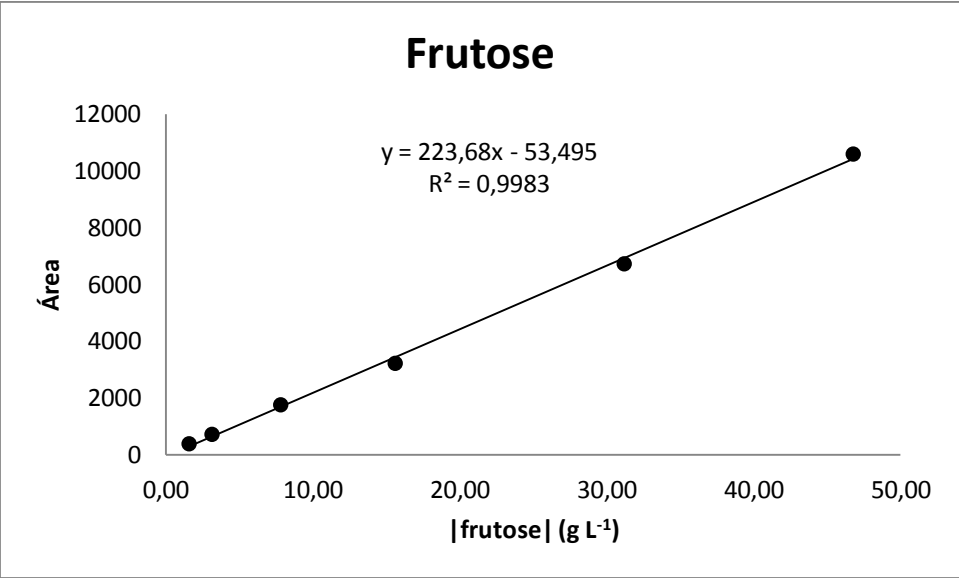
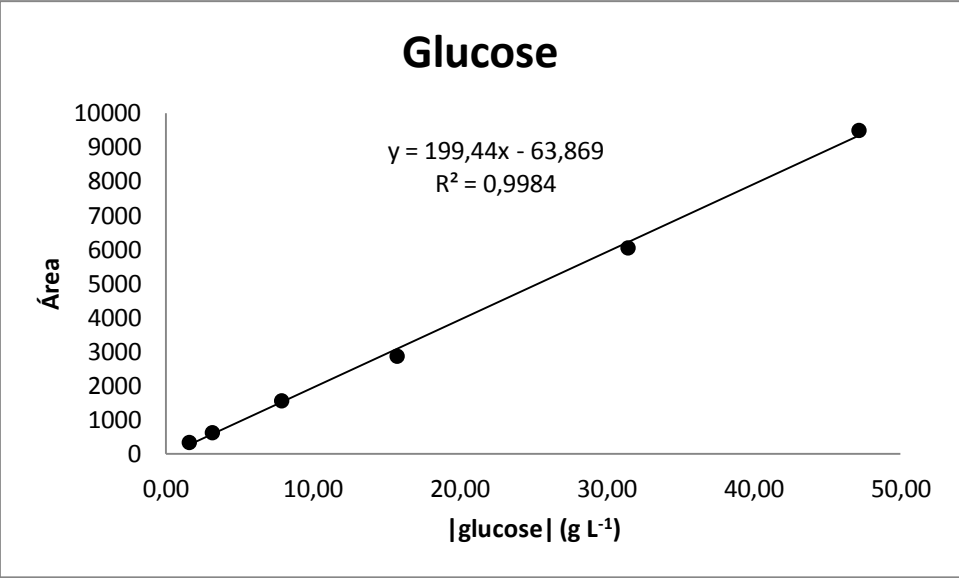
Vinho Sintético	Ácido L-málico (g L ⁻¹)		Ácido L-lático (g L ⁻¹)		Biomassa final (UFC mL ⁻¹)
	Inicial	Final	Inicial	Final	<i>O. oeni</i> VP41
VS1 30°C	3.01	0.00	0.00	2.91	3.25E+07
VS1 20°C	3.02	0.00	0.00	3.22	3.65E+06
VS2 30°C	3.00	0.00	0.00	3.09	3.55E+07
VS2 20°C	3.00	0.00	0.00	3.12	3.88E+06
VS3 30°C	3.00	0.00	0.00	3.23	2.25E+07
VS3 20°C	3.00	0.00	0.00	2.98	3.65E+06
VS4	3.01	0.00	0.00	2.89	1.24E+07
VS5	3.06	0.00	0.00	3.06	7.25E+06
VS6	3.09	0.00	0.00	3.12	1.48E+07
VS7	3.01	0.00	0.00	3.03	5.30E+06
VS8	3.01	0.00	0.00	2.99	5.85E+06
VS9	3.03	0.00	0.00	3.01	5.45E+06
VS10	3.02	0.00	0.00	3.01	5.45E+06
VS11	3.00	0.00	0.00	3.11	3.55E+06
VS12	3.00	0.00	0.00	3.21	5.20E+06
VS13	3.00	0.00	0.00	3.03	7.90E+06
VS14	3.01	0.00	0.00	2.95	5.10E+06
VS15	3.03	0.00	0.00	2.98	9.40E+06
VS16	3.02	0.00	0.00	2.94	8.15E+06
VS17	3.09	0.00	0.00	2.98	4.15E+06
VS18	3.00	0.00	0.00	2.99	8.70E+06
VS19	3.02	0.00	0.00	3.12	7.40E+06
VS20	3.00	0.00	0.00	3.11	9.05E+06
VS21	3.02	0.00	0.00	2.97	8.60E+06
VS22	3.03	0.00	0.00	2.97	8.60E+06
VS23	3.00	0.00	0.00	2.98	8.25E+06

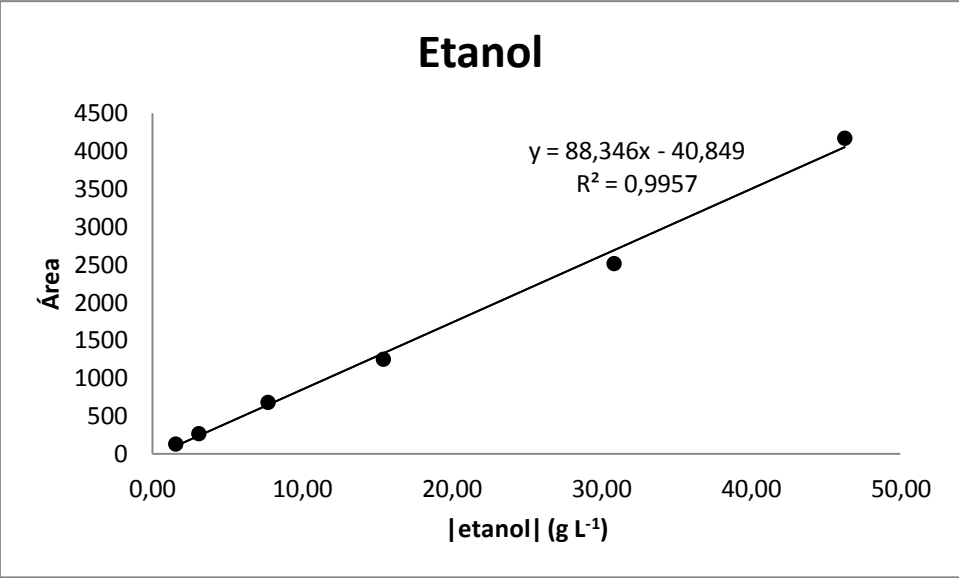
Tabela A.2. Concentrações de ácido L-málico e ácido L-lático e biomassa final dos vinhos sintéticos para *O. oeni* alpha.

Vinho Sintético	Ácido L-málico (g L ⁻¹)		Ácido L-lático (g L ⁻¹)		Biomassa final (UFC mL ⁻¹)
	Inicial	Final	Inicial	Final	<i>O. oeni</i> alpha
VS1 30°C	3.00	0.00	0.00	2.98	2.45E+07
VS1 20°C	3.00	0.00	0.00	2.98	3.47E+06
VS2 30°C	3.00	0.00	0.00	2.99	3.35E+07
VS2 20°C	3.00	0.00	0.00	2.97	3.80E+06
VS3 30°C	3.00	0.00	0.00	3.01	2.30E+07
VS3 20°C	3.00	0.00	0.00	2.91	4.00E+06
VS4	3.00	0.00	0.00	3.02	1.06E+07
VS5	3.00	0.00	0.00	2.99	1.23E+07
VS6	3.00	0.00	0.00	3.00	1.01E+07
VS7	3.00	0.00	0.00	3.00	7.30E+06
VS8	3.00	0.00	0.00	3.01	7.10E+06
VS9	3.00	0.00	0.00	3.12	4.45E+06
VS10	3.00	0.00	0.00	3.03	6.05E+06
VS11	3.00	0.00	0.00	3.06	7.35E+06
VS12	3.00	0.00	0.00	3.06	7.00E+06
VS13	3.00	0.00	0.00	3.02	5.35E+06
VS14	3.00	0.00	0.00	2.97	7.40E+06
VS15	3.00	0.00	0.00	3.08	5.80E+06
VS16	3.00	0.00	0.00	3.01	7.60E+06
VS17	3.00	0.00	0.00	2.93	8.30E+06
VS18	3.00	0.00	0.00	3.01	6.15E+06
VS19	3.00	0.00	0.00	3.12	7.00E+06
VS20	3.00	0.00	0.00	3.23	6.30E+06
VS21	3.00	0.00	0.00	3.12	7.30E+06
VS22	3.00	0.00	0.00	3.01	7.10E+06
VS23	3.00	0.00	0.00	3.10	8.30E+06

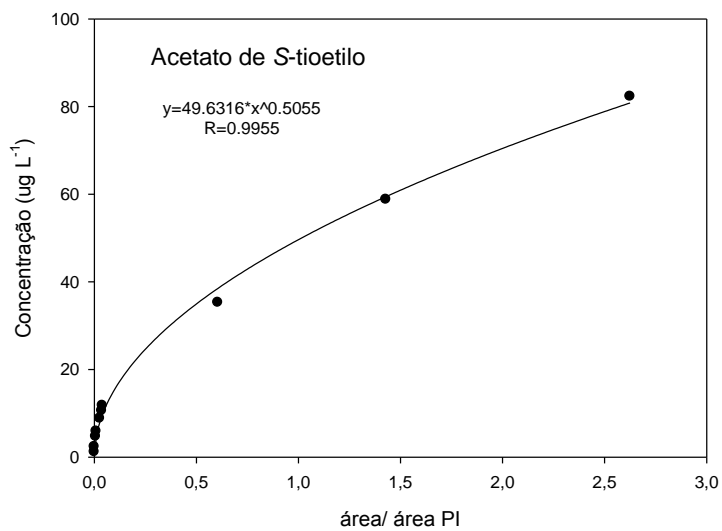
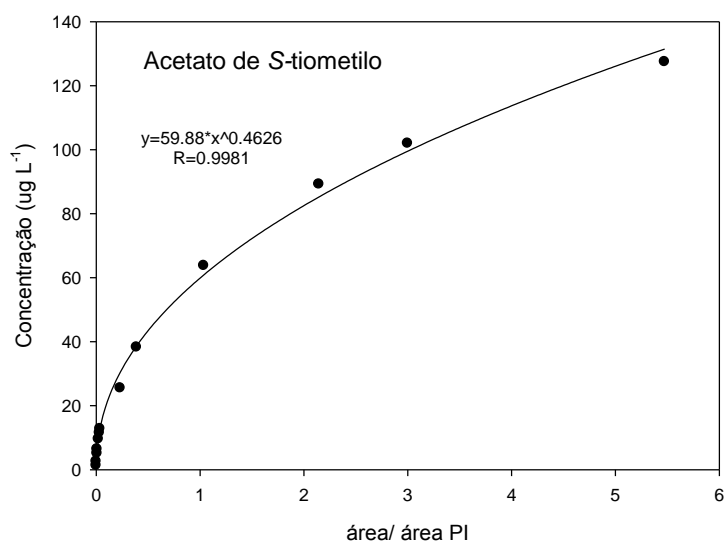
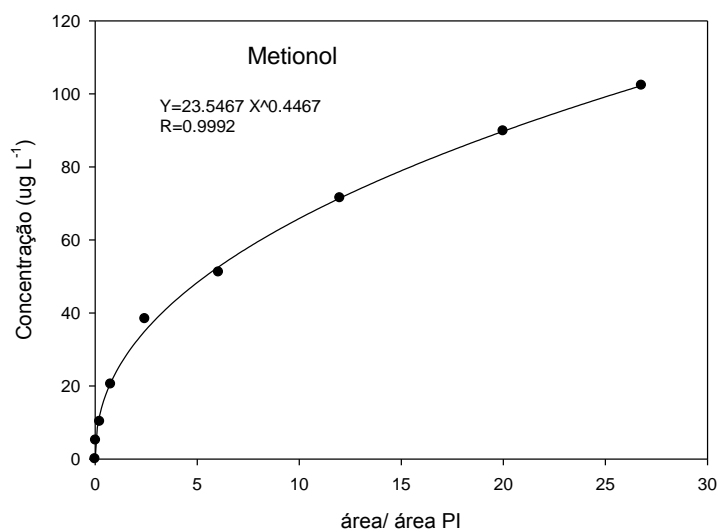
Apêndice 2 – Calibração para os compostos analisados por HPLC

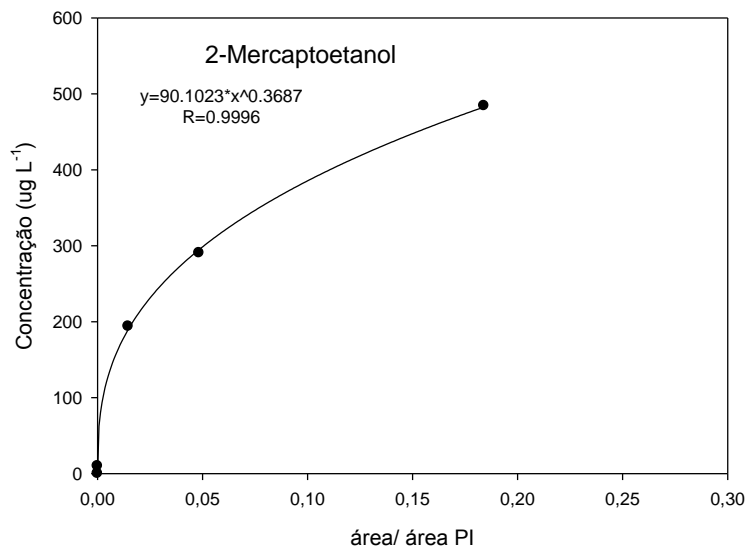
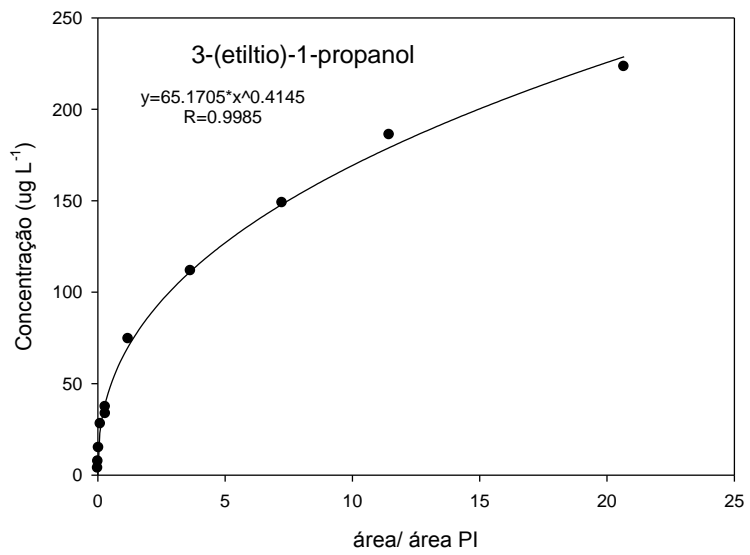
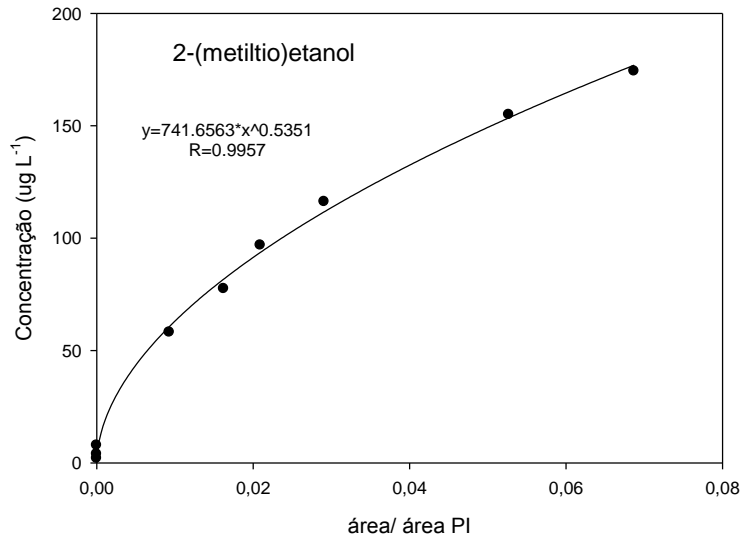


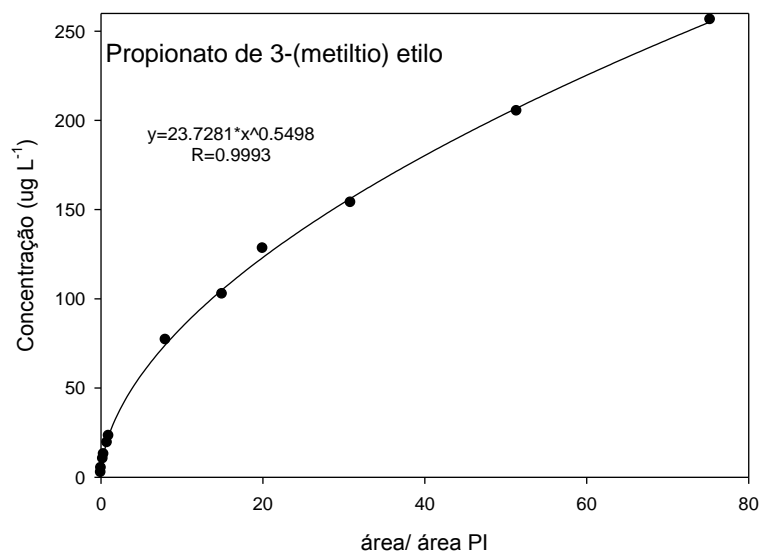
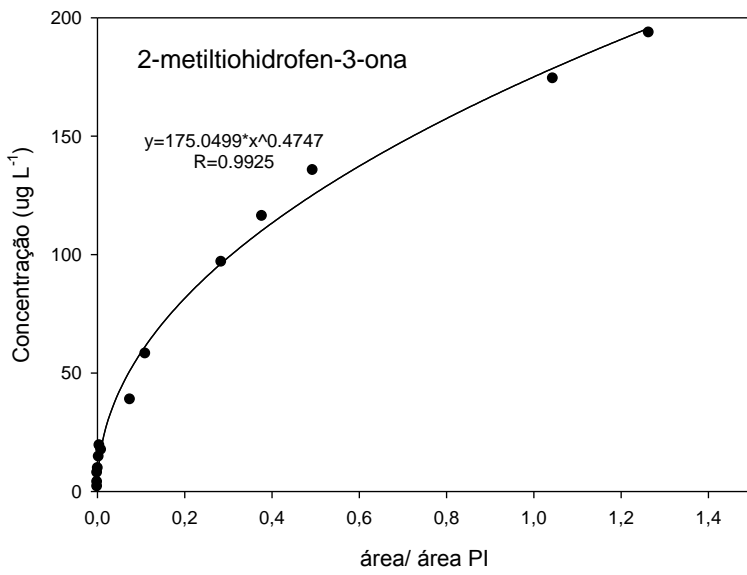
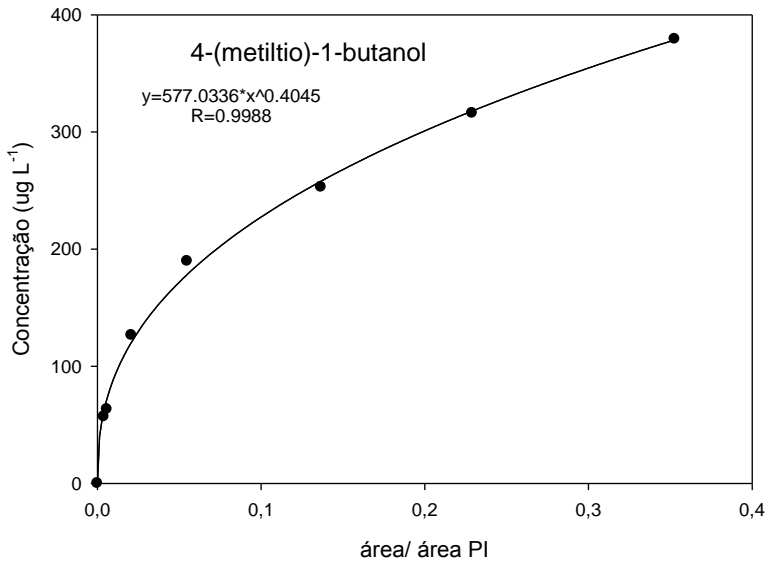


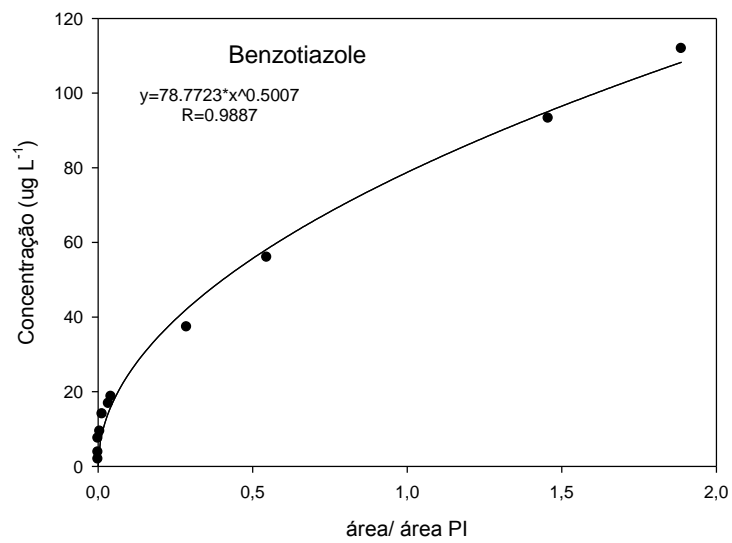
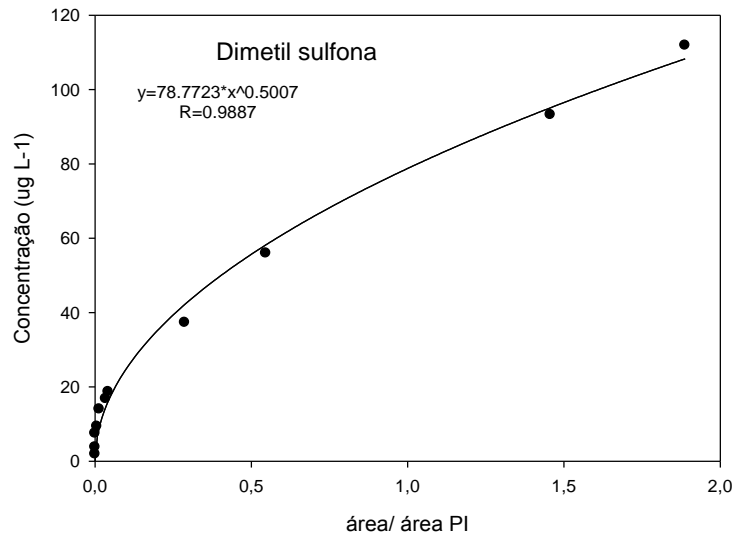
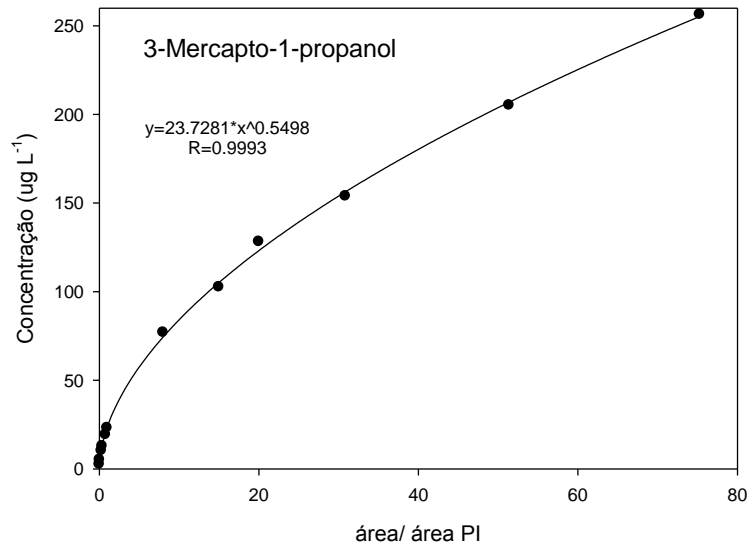


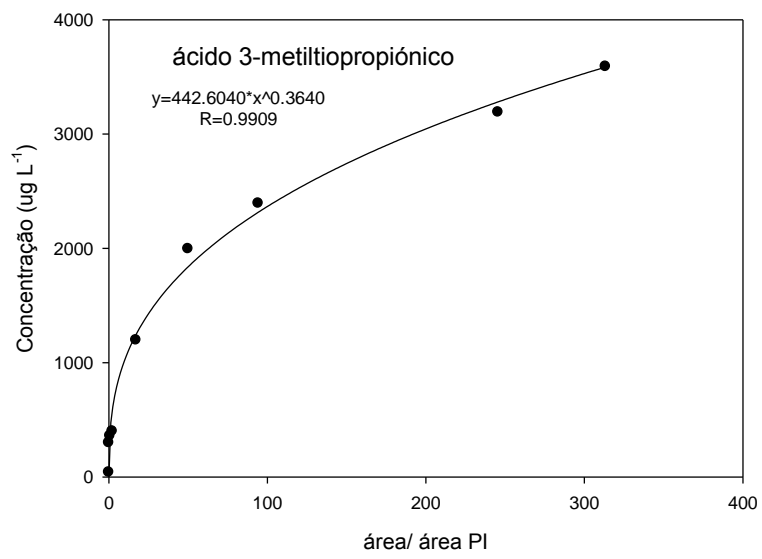
Apêndice 3 – Calibração dos compostos de enxofre analisados por GC-FDP











Referências

- Ardö, Y. 2006. Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* **24**: 238-242.
- Bartowsky, E.J. and Henschke, P.A. 2004. The 'buttery' attribute of wine - diacetyl – desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology* **96**: 235-252.
- Bloem, A., Bertrand, A., Lounvaud-Funel, A. and de Revel, G. 2007. Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology* **44**: 62-67.
- Bloem, A., Lounvaud-Funel, A. and de Revel, G. 2008. Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology* **25**: 99-104.
- Boido, E., Medina, K., Fariña, F., Carrau, F., Versini, G. and Dellacassa, E. 2009. The effect of bacterial strain and aging on the secondary volatile metabolites produced during malolactic fermentation of tannat red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 6271-6278.
- Bonnarme, P., Psoni, L. and Spinnler, H.E. 2000. Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5514-5517.
- Carreté, R., Vidal, M.T., Bordons, A. and Constantí, M. 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters* **211**: 155-159.
- Cavin, J.-F., Barthelmebs, L., Guzzo, J., Van Beeume, J., Samyn, B., Travers, J.-F. and Diviès, C. 1997. Purification and characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters* **147**: 291-295.
- Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C. and Amatti, A. 2004. Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* **18**: 121-130.
- Ciani, M. and Ferraro, L. 1996. Enhanced Glycerol Content in Wines Made with Immobilized *Candida stellata* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(1): 128-132.
- Costello, P.J. and Henschke, P.A. 2002. Mousy off-flavor of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-Ethyltetrahydropyridine, 2-

Acetyltetrahydropyridine, and 2-Acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 7079-7087.

Costello, P. 2005. The chemistry of malolactic fermentation. pp. 41-49 In: *Malolactic fermentation in wine* (R. Morenzoni & K.S. Spelcht), Lallemand Inc, Canada.

Couto, J.A., Campos, F.M., Figueiredo, A.R. and Hoog, T.A. 2006. Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*. **57**: 166-171.

D’Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lante, A., Spetolli, P. and Henchke, P. 2004. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology* **21**: 257-265.

Davis, C.R., Wibowo, D.J., Lee, T.H. and Fleet, G.H. 1986. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied and Environmental Microbiology* **51**: 539-245.

de Las Rivas, B., Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M. and Muñoz, R. 2009. Molecular screening of wine lactic acid bacteria degrading hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 490-494.

de Nadra, M.C.M. and de Saad, A.M.S. 1995. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *International Journal of Food Microbiology* **27**: 101-106.

de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A. and Bertrand, A. 1999. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(10): 4003-4008.

Du Toit, M., Engelbrecht, L. and Lerm, E. 2011. *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures - an Overview. *Food and Bioprocess Technology* **4**: 876-906.

Delaquis, P., Cliff, M., Kling, M., Girard, B., Hall, J. and Reynolds, A. 2000. Effect of two commercial malolactic starter cultures on the chemical and sensory properties of chancellor wines vinified with different yeasts and fermentation temperatures. *American Journal of Enology and Viticulture*. **51**: 42-48.

- Fernández, P.A.A., Saguir, F.M. and de Nadra, M.C.M. 2004. Effect of dipeptides on the growth of *Oenococcus oeni* in the synthetic medium deprived of amino acids. *Current Microbiology* **49**: 361-365.
- Fourcassie, P., Makaga-Kabinda, E., Belarbi, A., and Maujean, A. 1992. Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos* strain in 18 media deficient in one amino acid. *Journal of Applied Bacteriology* **73**: 489-496.
- König, H., Uden, G., and Frölich, J. 2009. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, German, 522.
- Krieger, S. 2005. The history of malolactic bacteria in wine. pp. 31-39 In: Malolactic fermentation in wine (R. Morenzoni & K.S. Spelcht), Lallemand Inc, Canada.
- Landaud, S., Helinck, S. and Bonnarme, P. 2008. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**: 1191-1205.
- Lerm, E., Engelbrecht, L. and du Toit, M. 2010. Malolactic fermentation: the ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture* **31**(2): 186-212.
- Liu, S.-Q, Pritchard, G.G., Hardman, M.J. and Pilone, G.J. 1994. Citrulline production and Ethyl carbamate (Urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**: 235-242.
- Liu, S.-Q. 2002. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology* **92**: 589-601.
- Liu, M., Nauta, A., Francke, C., & Siezen, R. J. 2008. Comparative genomics of enzymes in flavour-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4590–4600.
- Lonvaud-Funel, A. 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters* **126**: 209-214.
- Lonvaud-Funel, A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 317–331.

López, R., López-Alfaro, I., Gutiérrez, A.R., Tenorico, C., Garijo, P., González-Arenzana, L. and Santamaría, P. 2011. Malolactic fermentation of Tempranillo wine: contribution of the lactic acid bacteria inoculation to sensory quality and chemical composition. *International Journal of Food Science and Technology* **46**: 2373-2381.

Malherbe, S., Tredoux, A.G.J., Nieuwoudt, H.H. and du Toit, M. 2012. Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **39**: 477-494.

Martineau, B. and Henick-Kling, T. 1995. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *Journal of Applied Microbiology* **78**: 526-536.

Mestres, M., Busto, O. and Guasch, J. 2000. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A* **881**: 569-581.

Moreira, N., Mendes, F., Pereira, O., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I. 2002. Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Analytica Chimica Acta* **458**: 157-167.

Moreira, N., Guedes de Pinho, P. and Vasconcelos, I. 2004. Method for analysis of heavy sulphur compounds using gas chromatography with flame photometric detection. *Analytica Chimica Acta* **513**: 183-189.

Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T. and Vasconcelos, I. 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology* **124**: 231-238.

Moreira, N., Guedes de Pinho, P., Santos, C. and Vasconcelos, I. 2010. Volatile sulphur compounds composition of monovarietal white wines. *Food Chemistry* **123**: 1198-1203.

Moreira, N., Guedes de Pinho, P., Santos, C. and Vasconcelos, I. 2011. Relationship between nitrogen content in grapes and volatiles, namely heavy sulphur compounds, in wines. *Food Chemistry* **126**: 1599-1607.

- Moreno-Arribas, M.V. and Polo, M.C. 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**: 265-286.
- Osborne, J.P. and Edwards, C.G. 2006. Inhibition of malolactic fermentation by *Saccharomyces* during alcoholic fermentation under low- and high-nitrogen conditions: a study in synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **12**: 69-78.
- Palacios, A. 2005. Organoleptic defects caused by uncontrolled malolactic fermentation. pp. 71-7 In: *Malolactic fermentation in wine* (R. Morenzoni & K.S. Spelcht), Lallemand Inc, Canada.
- Pretorius, I.S., van der Westhuizen, T.J. and Augustyn, O.P.H. 1999. Yeast biodiversity in Vineyards and wineries and its importance to South African wine industry. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* **20**: 61-75.
- Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Bertrand, A. and Lonvaud-Funel, A. 2004. Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 1176-1184.
- Ramos, A., Lolkema, J.S., Konnings W.N. and Santos, H. 1995. Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(4): 1303-1310.
- Remize, F., Gaudin, A., Kong, Y., Guzzo, J., Alexandre, H., Krieger, S. and Guilloux-Benatier, M. 2006. *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. *Archives of Microbiology* **185**: 459-469.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B. and Lonvaud, A. 2006a. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd., England, 497.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B. and Lonvaud, A. 2006b. *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine: Stabilization and treatments*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd., England, 441.

- Romano, P., Suzzi, G. 1993. Sulphur dioxide and wine microorganisms. pp. 372-392 In: Wine Microbiology and Biotechnology. (Ed., Fleet, G.H). Harwood Academic Publishers, Switzerland, 510.
- Serpa-Pimentel, M., Silva, M.H., Cortês, I., Mendes Faia, A. 1994. Growth and metabolism of sugar and acids of *Leuconostoc oenos* under different conditions of temperature and pH. *Journal of Applied Microbiology* **76**(1): 42-48.
- Silla Santos, M.H. 1996. Biogenic Amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* **29**(2-3): 213-231.
- Sumby, K.M., Grbin, P.R. and Jiranek, V. 2010. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry* **121**: 1-16.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. and Pretorius, I.S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**: 139-173.
- Swiegers, J., Pretorius, I.S. 2007. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 954–960.
- Tominaga, T., Murat, M.-L. and Dubourdieu, D. 1998. Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 1044-1048.
- Ugliano, M., Genovese, A. and Moio, L. 2003. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 5073-5078.
- Ugliano, M. and Moio, L. 2005. Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 10134-10139.
- Vallet, A., Lucas, P., Lonvaud-Funel, A. and de Revel, G. 2008. Pathways that produce volatile sulphur compounds from methionine in *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* **104**: 1833-1840.

Vallet, A., Santarelli, X., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G., & Cabanne, C. 2009. Purification of an alcohol dehydrogenase involved in the conversion of methional to methionol in *Oenococcus oeni* IOEB 8406. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**: 87–94.

Volschenk, H., van Vuuren, H.J.J. and Viljoen-Bloom, M. 2006. Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification. *South African Journal of Enology and Viticulture* **27**(2): 123-135.

Walling, E., Gindreau, E. and Lonvaud-Funel, A. 2005. A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *International Journal of Food Microbiology* **98**: 53-62.

