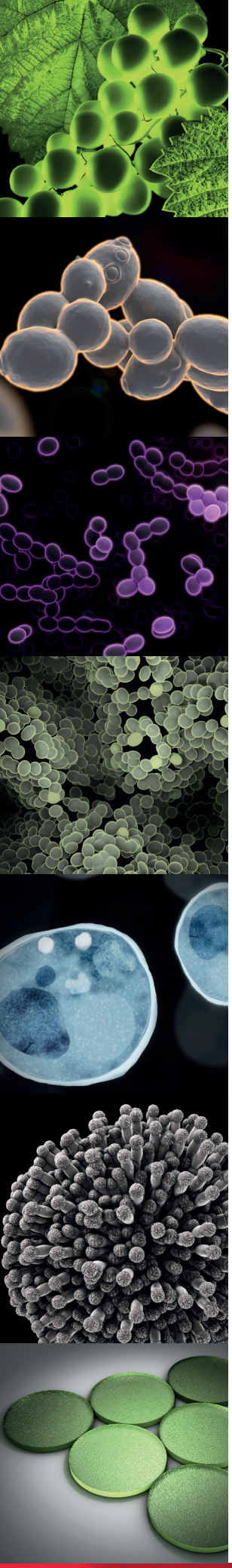

CO-INOCULAÇÃO DE BACTÉRIA ENOLÓGICA COM LEVEDURA SELECIONADA: DE TENDÊNCIA A UMA PRÁTICA RECONHECIDA

Sibylle Krieger-Weber, Eveline Bartowsky e Magali Déléris-Bou.
Lallemand Enologia, Blagnac, França

Introdução

A fermentação malolática (FML) é o resultado da atividade metabólica da bactéria lática (BAL) na descarboxilação enzimática do ácido L-málico em ácido L-lático e dióxido de carbono. A FML altera a acidez, permite uma melhor estabilidade e influencia os perfis sensoriais; aspetos considerados benéficos para a qualidade do vinho. A FML pode ocorrer durante ou após a fermentação alcoólica e é conseguida através de uma ou mais espécies de BAL. Estirpes de quatro géneros foram identificadas como sendo os principiais microrganismos envolvidos na FML: *Lactobacillus, Leuconostoc, Oenococcus* e *Pediococcus* (du Toit et al., 2011). Nem todas as BAL indígenas são eficientes e algumas podem produzir aromas e gostos indesejados ou "off-flavours" afetando negativamente a qualidade do vinho. A *Oenococcus oeni* é a espécie predominante e a mais adequada para conseguir uma FML completa em condições difíceis, tendo ainda um impacto positivo no perfil sensorial do vinho.

A tendência visando reduzir ou evitar as adições de SO_2 e o aumento de pH dos mostos devido ao aquecimento global, aumenta o risco de crescimento excessivo de bactérias de contaminação que podem afetar a qualidade do vinho. Existem vários aromas e sabores indesejados que podem surgir numa FML descontrolada, sabemos perfeitamente que algumas bactérias espontâneas/indígenas podem produzir elevadas quantidades de aminas biogénicas (principalmente a histamina, putrescina e cadaverina) que podem prejudicar a saúde, para além de ter um impacto negativo no perfil sensorial ou, em casos menos graves mascarar ou fazer diminuir a perceção dos aromas varietais. Sabemos ainda que algumas bactérias (*O. oeni* e *L. plantarum*) libertam cinamil esterease, enzima responsável pelo "corte" da ligação entre ésteres de ácido tartárico e ácidos hidroxicinâmicos, o que provoca um aumento das formas livres – i.e. ácido cumárico, ferúlico,… - que são os precursores da produção de fenóis voláteis por *Brettanomyces spp*.

Selecting the approriate wine bacteria is thus crucial in the development and stability of the wine, from a quality point of view (reduction of faults), sensory point of view (wine style) as well as from an economic point of view (quality wine, earlier release date).

A importância da inoculação com uma bactéria bem caraterizada

Uma gama completa de bactérias *Oenococcus oeni* foram selecionadas e caracterizadas para assegurar uma FML rápida e completa sob as diferentes condições do vinho. A utilização de uma bactéria selecionada tal como VP41™, O-MEGA™, ALPHA™, PN4™, ou Silka™ permite um melhor controlo sobre a degradação do ácido L-málico e garante a não produção de aminas biogénicas e precursores de etilfenóis. Para além das características técnicas, cada bactéria é exaustivamente caracterizada no seu impacto sensorial. Vários trabalhos mostram que os compostos produzidos pelas BAL impactam de forma importante no aroma e sabor do vinho, assim como vários estudos mostram que diferentes BAL, produzem efeitos sensoriais diferentes nos vinhos. Por exemplo, geralmente, a VP41™ contribui para a produção de vinhos *frutados*, a O-MEGA™ revela vinhos frescos e a ALPHA™ aumenta o equilíbrio dos vinhos. Simultaneamente, o timing de inoculação bacteriana e as populações existentes após a inoculação também influenciará o perfil sensorial (Abrahamse e Bartowsky, 2012).

Mais recentemente, uma nova geração de *Lactobacillus plantarum* foi selecionada a fim de oferecer uma solução para as consequências do aquecimento global, ao ser capaz de levar a cabo muito rapidamente e de uma forma segura a FML, quando é inoculada um dia após a levedura (co-inoculação), na vinificação de vinhos tintos com um pH elevado. A *L. plantarum* usa uma via homofermentativa para o metabolismo do açúcar e, por conseguinte, não produz ácido acético quando cresce em mosto. O *L. plantarum* ML Prime™ foi caracterizado por ter um excelente desempenho e impacto sensorial da FML e selecionado por garantir que não há produção de aminas biogénicas ou de precursores de fenóis voláteis.

Um *timing* diferente da inoculação

Tradicionalmente, quando a bactéria enológica era utilizada, a inoculação era realizada no final da fermentação alcoólica (FA). A partir de 1980, investigadores exploraram a possibilidade de inocular a BAL em mosto aquando da levedura ou pouco após a levedura, no início da fermentação alcoólica.

Atualmente, foram identificados 2 períodos diferentes do processo de vinificação em que se pode inocular a BAL no vinho. (Figura 1).

A co-inoculação com levedura:

- A bactéria selecionada é inoculada entre 24 e 48 horas após a inoculação da levedura (entre 48 e 72 horas se o SO_2 total é 80 a 100 ppm). Esta técnica está a ficar muito popular dado os seus múltiplos benefícios.

A inoculação pós fermentação alcoólica:

- A bactéria selecionada é inoculada logo no final ou após a conclusão da FA.

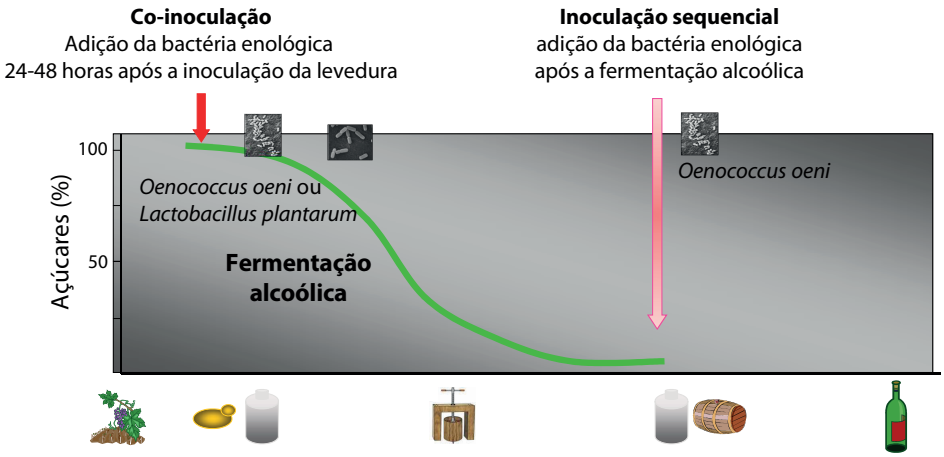

Figura 1. *Timing* da inoculação da bactéria enológica

Benefícios da co-inoculação com uma bactéria enológica selecionada

Tempo, facilidade de processos e segurança

Uma inoculação 24 ou 48 horas após a adição da levedura garante que a bactéria selecionada encontrará todos os nutrientes essenciais e pode adaptar-se lentamente ao aumento da concentração de álcool durante a fermentação. Esta técnica garante níveis de sobrevivência mais elevados e a vitalidade da bactéria inoculada, o que se traduz numa melhor implantação e num domínio precoce da FML. Isto permite não só dominar/suprimir a flora de BAL indígena, como outras espécies heterofermentativa de *Lactobacillus, Pediococci*, bem como limitar o desenvolvimento de *Brettanomyces spp*.

Ao aplicar estratégias de co-inoculação, os vinhos inoculados com a nossa bactéria selecionada não conterão aminas biogénicas tais como a histamina e a tiramina, que podem frequentemente surgir durante a FML espontânea ou em inoculações muito tardias.

Por fim, a conclusão da FML é mais rápida em comparação com a inoculação sequencial, o que permite uma estabilização do vinho mais cedo, a fim de evitar um potencial desenvolvimento de contaminação microbiana (Figura 2). Os vinhos ficam estáveis e prontos para um lançamento comercial mais rápido do que com os vinhos produzidos com uma FML sequencial ou espontânea.

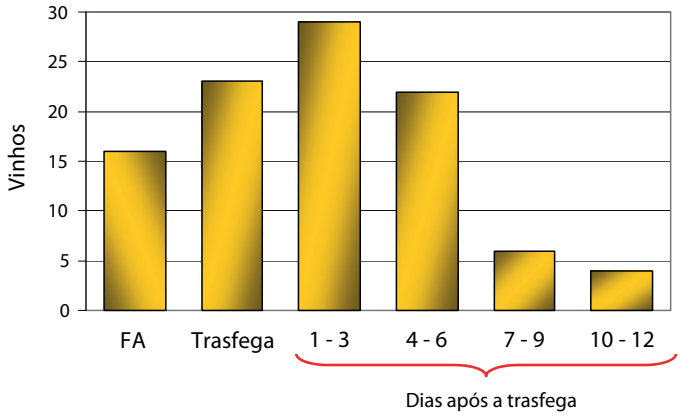

Figura 2. Frequências dos vinhos que terminaram a FML antes do final da fermentação alcoólica (antes da FA), na trasfega e 1-3, 4-6, 7-9, 10-12 dias após a trasfega

Ferramentas de biocontrolo para limitar a contaminação e o crescimento por *Brettanomyces*

Foi demonstrado que algumas bactérias (O. oeni e L. plantarum) têm a capacidade de degradar os ácidos hidroxicinâmicos presentes no vinho na sua forma livre, sendo precursores da produção de fenóis voláteis pela levedura Brettanomyces spp. (Osborne et al 2012). Os fenóis voláteis produzidos durante a contaminação por Brettanomyces aumentam de forma importante a quantidade de off-flavours: aromas de estábulo, animal/cavalo, medicinal/químico. Este estudo salientou que algumas bactérias O. oeni aumentam os níveis de ácido cumárico (na sua forma livre) no vinho. Se a Brettanomyces spp. está presente no vinho, metabolizará rapidamente estes percursores levando a um aumento do nível de etilfenóis no vinho e a sua consequente depreciação (Figura 3).

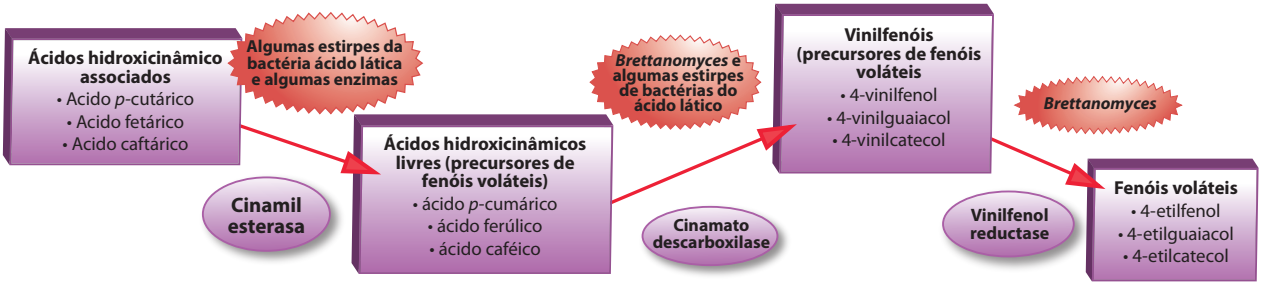

Figura 3. Produção de fenóis voláteis

Os resultados mostraram que dependendo da bactéria inoculada, diferentes concentrações de ácidos cinámicos livres podem ser encontrados. Assim sendo, é importante utilizar bactérias selecionadas com atividade cinamil esterase negativa a fim de evitar a produção de precursores de fenóis voláteis. Todas as nossas bactérias enológicas selecionadas foram testadas e confirmou-se que não contêm atividade cinamil esterase tal como demonstrado na Figura 2.

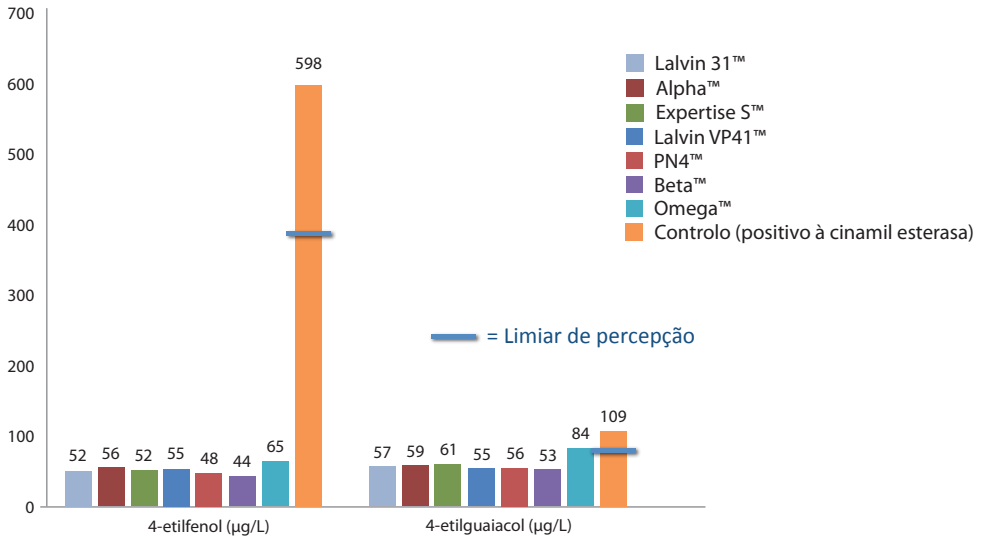

Figura 4. Produção de fenóis voláteis quando diferentes estirpes de BAL são usadas para a fermentação malolática

Vários estudos do IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin - França) mostraram que a co-inoculação com bactéria reduz o intervalo entre a fermentação alcoólica e a fermentação malolática e, consequentemente, o desenvolvimento de *Brettanomyces* durante o período mais sensível em que o vinho está desprotegido.

Neste estudo foram monitorizadas as populações de levedura e bactéria num vinho contaminado por *Brettanomyces*. Uma parte do vinho foi inoculado com bactéria enológica selecionada (Figura 5) e outra realizou FML espontânea (bactéria indígena) (Figura 6) com o objetivo de verificar de que forma a bactéria pode afetar o crescimento de *Brettanomyces spp*. Com a co-inoculação de bactéria enológica selecionada, não houve crescimento de *Brettanomyces spp*. (mesmo com uma grande contaminação) mais, de facto a população de *Brettanomyces spp*. diminuiu, à medida que a população de bactéria enológica selecionada aumenta. Pelo contrário, com uma FML espontânea, a população de *Brettanomyces spp*. manteve um nível de contaminação elevado até o 11º dia (data da trasfega) e, após a trasfega, um novo aumento de *Brettanomyces* foi observado, devido a um lento desenvolvimento da população de bactéria espontânea. Os níveis finais de

Brettanomyces são significativamente diferentes nos vinhos co-inoculados e nos vinhos controlo: há 10 vezes mais células de *Brettanomyces spp*. no vinho controlo do que nos vinhos co-inoculados. Estes resultados confirmam a forte competição entre a nossa bactéria enológica selecionada e a *Brettanomyces*, que se deve a um domínio precoce e a uma excelente viabilidade e vitalidade das nossas bactérias. A importância de utilizar a co-inoculação como ferramenta para controlar o crescimento do *Brettanomyces spp*. foi já recomedada pelo OIV no seu documento sobre as boas práticas vitivinícolas (OIV Oeno-264-2014).

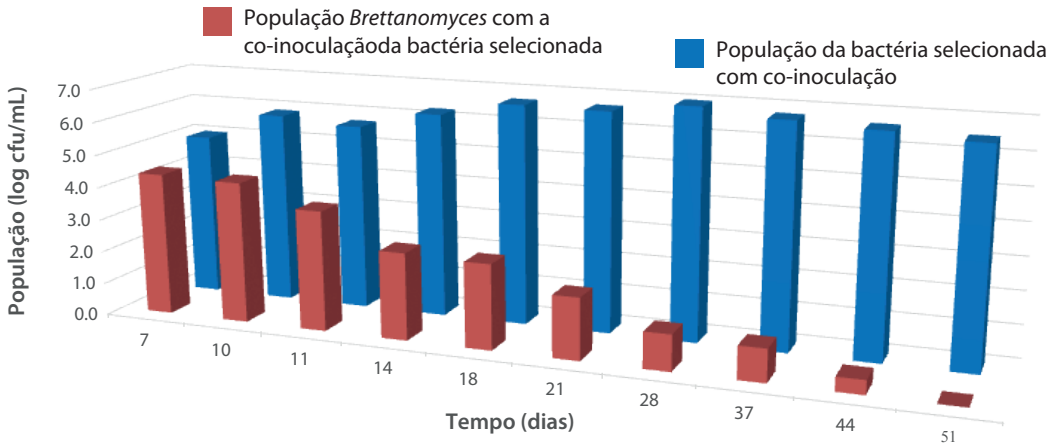

Figura 5. Crescimento de *Brettanomyces* durante a co-inoculação com bactéria no Pinot Noir (Borgonha, França)

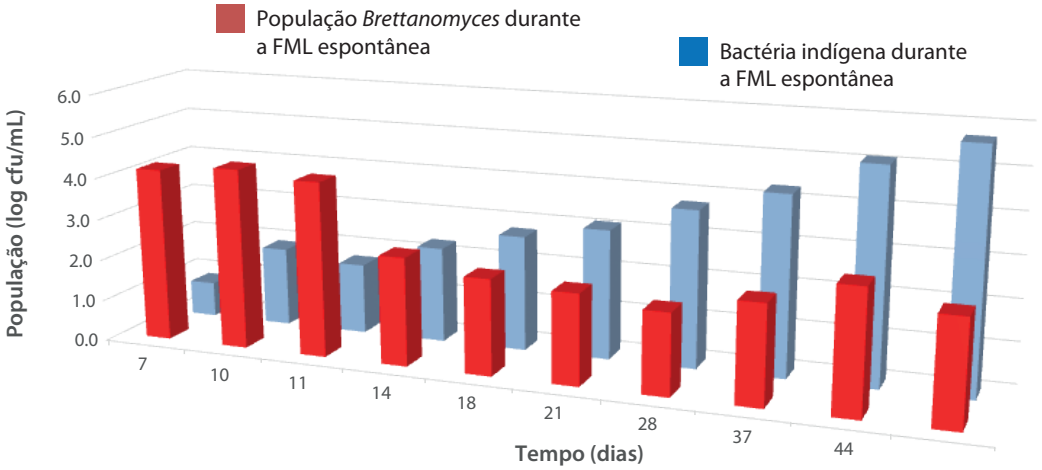

Figura 6. Crescimento de *Brettanomyces* durante a FML espontânea no Pinot Noir (Borgonha, França)

Impacto sensorial do *timing* de inoculação da bactéria enológica

O momento de inoculação, a interação com a levedura, a presença de precursores fomentando a produção de compostos aromáticos, o pH e as condições térmicas, são tudo critérios que regulam a expressão aromática dos vinhos. A escolha da bactéria enológica e o *timing* de inoculação tornou-se num elemento chave a ter em consideração para desenvolver um perfil específico do vinho.

Com a co-inoculação o perfil aromático do vinho é diferente quando comparado com a inoculação sequencial da mesma bactéria; os vinhos são frequentemente considerados mais frutados, mais equilibrados e mais encorpados em comparação com os vinhos inoculados no final da fermentação alcoólica (Figura 7). Muitas vezes no caso de inoculação sequencial os vinhos são inoculados muito tarde, uma vez que o enólogo aguarda que a FML espontânea aconteça e só no caso de esta não suceder é que procede à inoculação do vinho como uma bactéria selecionada, algumas semanas depois do final da FA. . Na co-inoculação, após a conclusão da FML, os vinhos jovens estão mais integrados e harmoniosos.

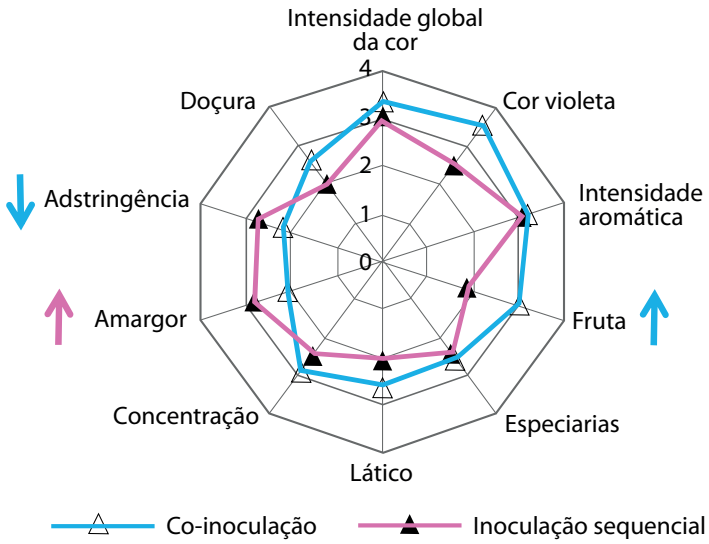

Figura 7. Descritores sensoriais da fermentação dos vinhos Malbec com *S.cerevisiae* e *Oenococcus oeni* (Uvaferm Alpha™) durante a co-inoculação e a inoculação sequencial.

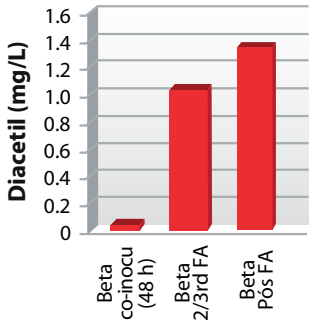

Figura 8. Impacto do *timing* da inoculação na concentração de diacetilo nos vinhos Chardonnay

A co-inoculação de levedura e BAL selecionadas têm também uma implicação importante no estilo no que concerne à produção de diacetilo. Os nossos estudos mostraram que a co-inoculação produz frequentemente estilos mais vocacionados para o frutado do vinho ao contrário dos estilos láticos, amanteigados, frutos secos que são produzidos quando a FML é iniciada após a conclusão da fermentação alcoólica (inoculação sequencial). Pelo contrário, a co-inoculação limita a produção de diacetilo e, no caso de ser produzido, acabará por diminuir devido à presença da levedura que o converte em 2,3-butanodiol, que tem um limiar de perceção bastante mais elevado e por conseguinte não impactante no perfil do vinho. Consequentemente, o caráter frutado dos vinhos brancos e rosés serão reforçados com a estratégia da co-inoculação na FML (Figura 8).

Gestão da acidez volátil

Apesar do metabolismo heterofermentativo da *Oenococcus oeni* e do risco teórico da produção de acidez volátil na presença de açúcares, múltiplas experiências (Semon *et al*., 2001; Rosi *et al*., 2003; Jussier *et al*., 2006) e vários anos de prática das empresas vitícolas mostraram que não há produção significativa de ácido acético a partir dos açúcares durante o crescimento da BAL ou durante a FML. Não há diferenças significativas nos níveis da acidez volátil encontrados nos vinhos de co-inoculação quando comparados com inoculação sequencial. Mais recentemente, um estudo levado a cabo por Zapparoli *et al*., (2009) em vinhos com teores elevados de álcool mostraram que nas castas Corvina e Rondinella, utilizadas para a produção do vinho Amarone, os níveis de ácido acético eram similares ou inferiores quando a co-inoculação era aplicada, em comparação com a inoculação sequencial. Algumas condições reconhecidas (boa gestão da fermentação alcoólica: a escolha de uma estirpe de levedura fiável, um bom controlo da temperatura e uma estratégia de nutrição adaptada) são essenciais para assegurar um baixo nível de acidez volátil no vinho produzido.

Custos a ter em consideração

Recorrer à co-inoculação significa uma FML mais rápida, fiável e completa. Isto irá reduzir significativamente a necessidade de aquecer cubas ou a adega; um passo necessário para iniciar a FML em muitas adegas onde as temperaturas descem rapidamente no final da fermentação alcoólica, dificultando ou mesmo impossibilitando o arranque de uma FML inoculada ou espontânea.

Realizámos um estudo em Espanha, em 2016 que incluía fermentações maloláticas controladas recorrendo à co-inoculação com Lalvin VP41™ em comparação com a fermentação espontânea. Os vinhos eram armazenados a 20° C até a FML estar concluída. A Figura 9 resume a experiência. A FML com co-inoculação foi muito rápida (terminou 5 dias após o final da FA). A cuba com a FML espontânea apresentou um início tardio (terminou 45 dias após o final da FA), durante este longo lapso de tempo, a energia consumida para aquecer a cuba foi significativa, na ordem de 150 kWh/hL.

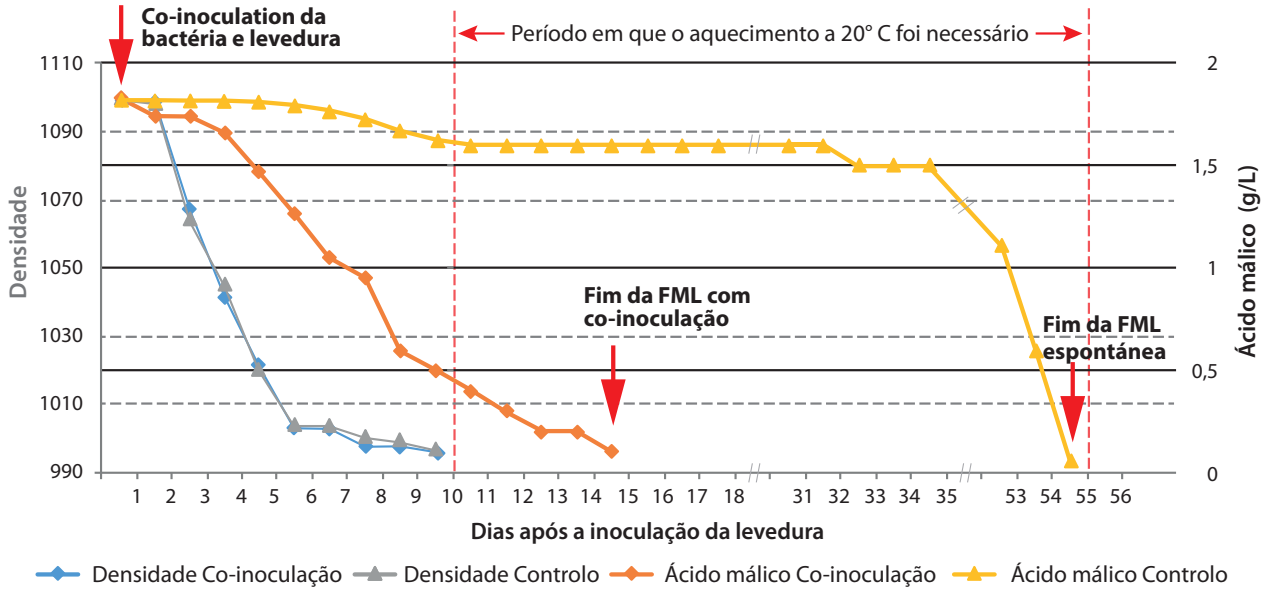

Figura 9. A FML num Tempranillo (Espanha) com 13.2% de álcool, – pH 3.5 apresenta diferenças no metabolismo do ácido málico comparando a co-inoculção e a FML espontânea.

O gasto energético para o ensaio da FML espontânea teve um custo calculado de 10 € / hL (o custo pode variar atendendo ao preço do KWH de cada país, da potência do equipamento de aquecimento, da temperatura exterior, do volume do vinho, da duração da FML); entre outros estudos realizados durante vários anos, este novo resultado obtido veio confirmar que o custo energético é muito mais elevado do que o custo de inoculação com uma bactéria enológica selecionada. Para além deste gasto energético, vários outros custos diretos foram economizados tal como a monitorização analítica do vinho e ainda os custos ocultos derivados de uma eventual redução da qualidade do vinho. Temos comprovado que a inoculação com as nossas bactérias enológicas fornece garantias na qualidade do vinho final (um biocontrolo versus um desenvolvimento do *Brettanomyces spp*. e de outras bactérias láticas indesejadas como *Pediococcus spp*., a ausência de risco de produção de aminas biogénicas e o facto de ajudar a modular o estilo sensorial do vinho).

Um novo conceito de *Lactobacillus plantarum* selecionada para a co-inoculação no mosto de vinho tinto com um pH elevado

Despite the infallible results showing no important increase in VA during co-inoculation with *O. oeni*, some winemakers still consider co-inoculation with *Oenococcus oeni* as risky because of their obligatory heterofermenative properties. They wrongly fear co-inoculation although this practice has more than proven itself to be a secure choice also for high pH reds (above 3,5- 3,6) in which the native microflora is more critical.

INa vinificação de uvas muito maduras, produzindo mostos com um pH mais elevado, a utilização da nova geração de cultura "starter" de BAL enológica selecionada da espécie *Lactobacillus plantarum* oferece várias vantagens: a *L. plantarum* tem um metabolismo homofermentativo que permite uma fermentação sem produção de ácido acético a partir dos açucares (hexoses). Alguns *Lactobacillus spp*. podem atuar muito eficientemente sob as condições do vinho, dado que possuem várias caraterísticas favorecendo a FML, especialmente num ambiente com um pH elevado, tal como demonstrado na aplicação patenteada (EP1631657). A seleção de uma "boa" *Lactobacillus plantarum* para o vinho não é fácil.

Isolada na Universidade Católica del Sacro Cuore em Itália, a nossa bactéria ML prime™ provou ser uma *L. plantarum* muito eficiente sob as condições do vinho. Garante uma FML rápida e segura, concluída num prazo de 3 a 7 dias, dependendo das condições. Devido a um processo de produção otimizado e específico, o ML Prime™ demonstra uma atividade enzimática e malolática muito elevada, resultando numa rápida FML ainda durante a fermentação alcoólica bem como outras propriedades enológicas interessantes. O ML Prime™ é uma opção inigualável e efetiva para a co-inoculação e uma FML ultrarrápida e livre de riscos. (Figura 10)

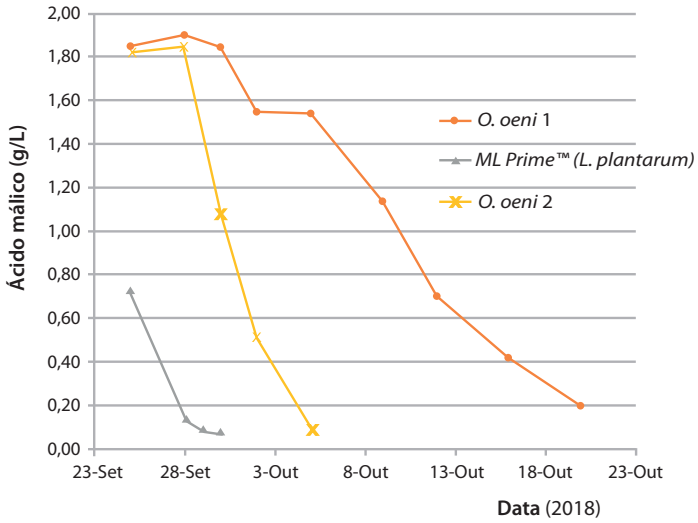

Figura 10. A fermentação malolática com ML Prime™ comparada com duas estirpes de *Oenococcus oeni*

Conclusão

A co-inoculação é a prática de inoculação de uma bactéria enológica selecionada no início da fermentação alcoólica, pouco após a inoculação da levedura. Esta técnica tem vindo a ganhar crescente popularidade não só porque garante uma fermentação malolática rápida e completa, mas também porque tem várias vantagens que lhe são reconhecidas pelos vinificadores e pelos profissionais do sector do vinho. Em França e em Espanha por exemplo, quase 50% da FML é atualmente realizada com co-inoculação. A co-inoculação desempenha um papel fundamental para um processo de FML rápido e seguro, uma estabilização do vinho mais precoce e ainda uma diminuição dos custos e da energia. Limita também o desenvolvimento de micro-organismos de contaminação reduzindo o aparecimento de "off-flavours", e garantindo a qualidade do vinho.

Referências bibliográficas

Abrahamse, C., and E. Bartowsky. 2012a. Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition. *World J Microbiol Biotechnol*. 28: 255-265.

Azzolini, M., Tosi, E., Vagnoli, P., Krieger, S., and G. Zapparoli (2010). Evaluation of technological effect of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Ital. J. Food Sci*. 3(22): 257-263.

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

Jussier, D., Morneau, A. and R. Mira de Orduña. 2006. Effect of Simultaneous Inoculation with Yeast and Bacteria on Fermentation Kinetics and Key Wine Parameters of Cool-Climate Chardonnay. *Applied and environmental microbiology*. 72. 221-7.

Osborne, J.P., A. Dube Morneau, and R. Mira de Orduna. 2006. Degradation of free and sulfur-dioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine. *J. Appl. Microbiol*. 101:474-479.

Rosi, I., Fia, G. and V.Canuti. 2003. Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Aust. J. Grape Wine Res*. 9: 194-199.

Semon, M, Edwards, C., Forsyth, D. and C. Dinn. 2001. Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 7: 52 - 59.

Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, and I. Pretorius . 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Austral J Grape Wine Res*. 11:139–173

Zapparoli G., Tosi E., Azzolini M., Vagnoli P., and S. Krieger S. 2009. Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in high-alcohol wines. *S Afr J Enol Vitic*.; 30:49–55.