

REVISÃO: AS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO DO VINHO – Parte II

REVIEW: WINE LACTIC ACID BACTERIA – Part II

António Inês¹, Tania Tenreiro², Rogério Tenreiro², Arlete Mendes-Faia¹

¹IBB-Centro de Genética e Biotecnologia (IBB-CGB), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Apartado 1013, 5001-813 Vila Real, Portugal

²Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Centro de Biodiversidade, Genómica Integrativa e Funcional (BioFIG), Edifício ICAT, Campus da FCUL, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

(Manuscrito recebido em 15.11.08 . Aceite para publicação em 15.12.08)

RESUMO

A fermentação maloláctica (FML), prática corrente em vinificação, é um processo de desacidificação biológica, realizado por bactérias do ácido láctico (BAL). A complexidade e diversidade da actividade metabólica das BAL sugerem que a FML pode afectar positiva ou negativamente a qualidade do produto final.

Nesta revisão apresenta-se uma caracterização geral das BAL em termos de taxonomia, metabolismo, habitats e aplicações industriais e o estado-da-arte sobre as BAL do vinho e do seu papel no processo de vinificação. Os efeitos benéficos (hidrólise dos glucosídeos pela acção de β -glucosidases) e nocivos (degradação da arginina e formação de carbamato de etilo; formação de aminas biogénicas, nomeadamente histamina, tiramina e putrescina) das BAL do vinho, bem como a temática das culturas 'starter', são igualmente explorados para ilustrar o interesse enológico deste grupo particular de microrganismos.

SUMMARY

Malolactic fermentation (MLF), the deacidification carried by lactic acid bacteria (LAB), is a longstanding process in winemaking and the complexity and diversity of the metabolic activity of LAB suggest that MLF can positively or negatively affect the quality of the final product. This review presents a general characterization of LAB in terms of taxonomy, metabolism, habitats and industrial applications, followed by a state-of-the-art on wine LAB and their role in the winemaking process. A particular emphasis is presented on the beneficial (the hydrolysis of glucosides by β -glucosidases) and harmful effects (the degradation of arginine and formation of ethyl carbamate; the formation of biogenic amines such as histamine, tyramine and putrescine) of wine LAB, as well as on the issue of starter cultures, to illustrate their oenological interest.

Palavras-chave: bactérias do ácido láctico, fermentação maloláctica, β -glucosidases, aminas biogénicas, vinho

Key words: lactic acid bacteria, malolactic fermentation, β -glucosidases, biogenic amines, wine

1.6 ISOLAMENTO E CULTURA DAS BAL DO VINHO

O isolamento das BAL a partir de amostras de uvas, de mostos e de vinhos, pode ser efectuado recorrendo a um dos seguintes procedimentos: (i) enriquecimento prévio da amostra em meio líquido, seguida da sementeira desta cultura em meio sólido; (ii) filtração por membranas da amostra, seguida de incubação da membrana em meio sólido; e (iii) inoculação directa da amostra em meio sólido. As duas primeiras técnicas pressupõem a existência de um número reduzido deste grupo de bactérias, por isso, recorre-se a um enriquecimento ou a uma concentração das BAL nas amostras de vinho que na terceira técnica é conseguida por uma centrifugação e diluições apropriadas quando o número de BAL é elevado. Esta última técnica é a mais utilizada, uma vez que permite a obtenção de colónias isoladas, passíveis de contagem, a caracterização pela sua morfologia e a utilização para posterior identificação.

Como microrganismos nutricionalmente fastidiosos, as BAL são cultivadas com melhores resultados em meios enriquecidos com sumos de vegetais ou de frutos. Apesar de existirem varias formulações de meios de cultura para o isolamento e cultivo das BAL de vinhos, os meios de cultura mais frequentemente utilizados são: MRS agar (de Man, Rogosa Sharpe), TJ (Tomato Juice) agar, MTJ agar (50% MRS, 50% TJ), Irrmann agar, ou formulações adaptadas de MRS agar adicionadas de sumo de uva, sumo de tomate, cisteína, ácido málico e vários açúcares (Wibowo *et al.*, 1985). Num estudo comparativo de meios de cultura utilizados no isolamento de BAL a partir de amostras de vinho, Pan *et al.* (1982) concluíram que nenhum dos meios, quando utilizado isoladamente, garantia a recuperação (isolamento) de todas as espécies presentes numa amostra, recomendando a utilização simultanea de MRS, TJ e Irrmann agar para obter dados ecológicos mais fidedignos. Como forma de ultrapassar as dificuldades de em laboratório utilizar por rotina os vários meios, Fleet (1993) sugere

a utilização de MRS agar suplementado com 20% de sumo de tomate e pH ajustado a 5,5, garantindo a obtenção de bons resultados. Tenreiro (1995) num estudo detalhado sobre diversos meios de cultura usados no isolamento de BAL do vinho, propõe um meio que permite o isolamento de todos os grupos de bactérias lácticas presentes no vinho: meio MTJ pH 5,0-5,5 suplementado com vancomicina.

Maiores eficiências e rendimentos no isolamento de BAL a partir de amostras de uvas, de mostos e de vinhos podem ser conseguidas: (i) pela adição de antibióticos ao meio de isolamento (100 mg/L de cicloheximida ou 50 mg/L de pimarcina) para inibição do crescimento de leveduras e bolores e (ii) incubação em atmosfera modificada, rica em CO₂ ou azoto que promove um crescimento mais rápido das BAL e também impede o desenvolvimento de bactérias acéticas e de fungos filamentosos (Lafon-Lafourcade e Joyeux, 1979; van der Westhuizen *et al.*, 1981; Pan *et al.*, 1982; Kelly *et al.*, 1989)

1.7 IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS BAL DO VINHO

Na área alimentar são de extrema importância prática a identificação correcta e a diferenciação ou tipificação dos microrganismos envolvidos nas diferentes etapas de processamento, desde a matéria prima até ao produto final, incluindo quer os responsáveis por processos fermentativos quer os contaminantes e/ou os agentes de deterioração.

Os métodos que podem ser utilizados na discriminação dos diferentes taxa (géneros, espécies e estirpes) de microrganismos podem ser classificados em: (i) fenotípicos (clássicos e quimiotaxonómicos), se estão direccionados para o fenótipo e (ii) genotípicos (ou moleculares), se têm como alvo os ácidos nucleicos. Os métodos fenotípicos clássicos baseiam-se em caracteres morfológicos, bioquímicos e fisiológicos; os métodos quimiotaxonómicos são direccionados para a célula e componentes celulares que não os ácidos nucleicos, alvo dos métodos moleculares.

O poder discriminante de um método de diferenciação ou tipificação define a sua capacidade para discriminar entre isolados muito semelhantes da mesma espécie, reconhecendo cada isolado não relacionado como único, e depende da variabilidade do alvo para o qual está direccionado no grupo particular de microrganismos em estudo. O potencial identificativo de um método de caracterização é determinado pela sua capacidade de permitir o posicionamento de isolados não identificados numa classificação pré-existente, *i.e.* permitir a discriminação dos isolados de uma determinada espécie relativamente a isolados pertencentes a espécies próximas. O potencial identificativo de um método depende assim do grupo de microrganismos em estudo e do sistema de classificação subjacente

(Tenreiro, 1995; Chambel, 2001). Um determinado método pode ter potencial identificativo e/ou poder discriminante a nível infraespecífico (Figura 4).

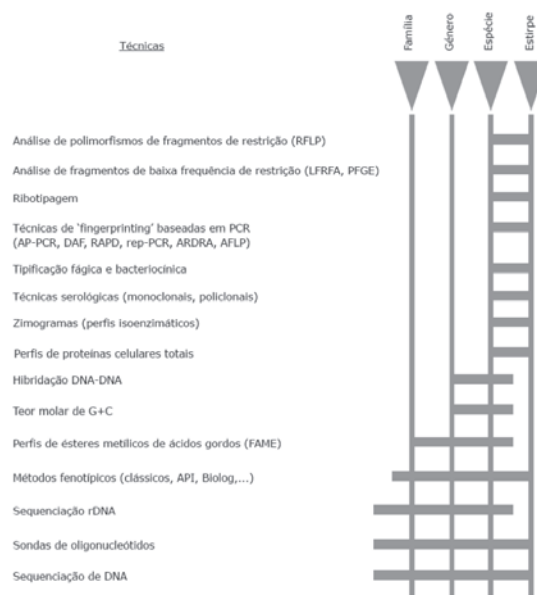


Fig. 4 - Resolução taxonómica de alguns métodos de identificação e/ou diferenciação aplicados actualmente (adaptado de Vandame *et al.*, 1996).

Taxonomic resolution of some of the currently used techniques for identification and/or differentiation (adapted from Vandame et al., 1996).

Assim, a selecção dos métodos a aplicar deve ser feita tendo em consideração o seu poder discriminante no grupo particular de microrganismos em estudo e o fim a que se destinam, identificação ou diferenciação.

Tradicionalmente, as BAL são classificadas pelas suas características morfológicas e bioquímicas. Contudo, os resultados obtidos são frequentemente ambíguos e os métodos utilizados são morosos. Outros métodos mais robustos, que têm sido aplicados com sucesso na identificação de BAL associadas ao vinho, incluem perfis de proteínas celulares totais, tipo de peptidoglicano da parede celular e perfis isoenzimáticos da lactato desidrogenase (Tracey e Britz, 1987; Dicks e van Vuuren, 1988). As técnicas moleculares permitem obter resultados menos controversos comparativamente a outros métodos (Zapparoli *et al.*, 1998; Sohler *et al.*, 1999).

1.7.1 Métodos fenotípicos

Métodos clássicos

Os métodos fenotípicos clássicos direccionados para caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos são usados em esquemas de identificação de microrganismos na maioria dos laboratórios de microbiologia. Estes métodos constituem a base para a descrição formal de diferentes taxa: desde espécie e subespécie até género e família e são usados na identificação e diferenciação das BAL (Vandamme

et al., 1996). Os caracteres morfológicos referem-se às características das células (forma, Gram, mobilidade) e das colónias (cor, forma). Os caracteres fisiológicos avaliam o crescimento em diferentes condições de cultura (temperatura, concentração de sal e tolerância a pH ácido e alcalino), como referido no ponto 1.2. Os caracteres bioquímicos são direccionados para a produção de diversos metabolitos e enzimas específicos, e incluem a fermentação da glucose (carácter homo e heterofermentativo) bem como os isómeros do ácido láctico produzido, perfis metabólicos resultantes da hidrólise de outros açúcares, hidrólise da arginina e da esculina, entre outros. Os testes miniaturizados de fermentação de açúcares na galeria API 50CH são largamente utilizados na identificação das BAL isoladas de vinho (Wibowo *et al.*, 1985; Davis *et al.*, 1988), embora a sua utilização tenha sido questionada por alguns investigadores (Pardo *et al.*, 1988; Jensen e Edwards, 1991). É importante salientar que dentro de uma espécie, as reacções de fermentação não são iguais para todas as estirpes. Já foram observadas variabilidades significativas nas reacções fermentativas de estirpes de *O. oeni* e de *Pc. parvulus* (Davis *et al.*, 1988; Fleet, 1993).

Tipagem fágica e bacteriocínica

Estes métodos de tipificação são utilizados para diferenciar estirpes a nível infraespecífico. A tipagem fágica é baseada nas diferenças de sensibilidade das estirpes a um conjunto de bacteriófagos. Este teste é de extrema importância na selecção de estirpes 'starter' para a indústria alimentar. Num estudo efectuado por Tenreiro (1995), usando 19 fagos em 30 estirpes de *O. oeni*, esta técnica revelou uma capacidade de tipificação de 47%, embora se tenha conseguido a discriminação total das estirpes tipificáveis quando se consideraram as eficiências de plaqueamento. A tipificação bacteriocínica baseia-se na sensibilidade às bacteriocinas (substâncias de natureza proteica que têm um efeito bactericida sobre outras bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes) e permite diferenciar estirpes muito próximas (Curk *et al.*, 1994).

Análise serológica

As técnicas serológicas avaliam o potencial antigénico dos constituintes celulares. A serotipagem tem como objectivo detectar diferenças de expressão dos antígenos de estirpes de uma mesma espécie. Esta técnica, ainda que apresentando algumas limitações, está descrita como sendo mais reprodutível e discriminante que a fagotipagem (Maslow *et al.*, 1993 citado por Tenreiro, 1995). Nas bactérias lácticas esta técnica é realizada de acordo com o método de Lancefield (Curk *et al.*, 1994).

1.7.2 Métodos quimiotaconómicos

Diversos componentes da célula bacteriana têm sido

usados em sistemas de tipificação para caracterizar as estirpes bacterianas a nível infraespecífico. Outros métodos analíticos mais sofisticados (*e.g.* pirólise acoplada a espectrometria de massa e análise do espectro infravermelho pela transformada de Fourier) permitem avaliar a composição química total das células bacterianas (Vandamme *et al.*, 1996). Independentemente do método aplicado é essencial a padronização de todo o procedimento experimental desde as condições de cultura das células (meio de cultura, temperatura de incubação) até às condições de extracção e separação analítica.

Perfis de ésteres metílicos de ácidos gordos

Na maioria das bactérias gram positivas os ácidos gordos podem ser obtidos por transesterificação a partir dos lípidos da membrana citoplasmática. A separação e identificação da mistura destes ésteres metílicos de ácidos gordos (FAMES, Fatty Acid Methyl Esthers) é efectuada por cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) (Kroppenstedt, 1985). Estes lípidos membranares são um grupo diverso de moléculas que podem ser usados como marcadores para a classificação e identificação de microrganismos, sendo por isso necessário que os extractos sejam produzidos em condições padronizadas. Esta técnica foi já aplicada na caracterização e identificação de *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp. e *Oenococcus oeni* (Tracey e Britz, 1989 cit. por Rodas *et al.*, 2005; Björkroth e Holzapfel, 2003 cit. por Koort, 2006; Guerrini *et al.*, 2003).

Análise de proteínas celulares totais

A expressão global de um genoma bacteriano resulta na síntese de cerca de 2000 proteínas diferentes. Estas moléculas constituem uma fonte de informação de elevado potencial para a caracterização, classificação, identificação e tipificação de bactérias (Jackman, 1985). A separação de uma mistura de proteínas celulares totais por electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) produz um perfil complexo (electroforegrama) que pode ser considerado como um 'fingerprint' característico de cada estirpe bacteriana (Curk *et al.*, 1994; Costas, 1990 cit. por Tenreiro, 1995). Vários estudos têm encontrado uma boa correlação entre os resultados de hibridação DNA-DNA e a análise dos perfis de proteínas celulares totais (Chambel, 2001; Semedo, 2005). A aplicação desta técnica para identificação e diferenciação de estirpes de BAL do vinho foi descrita por diversos autores (Dicks *et al.*, 1990; Couto e Hogg, 1994; Patarata *et al.*, 1994; Dicks *et al.*, 1995a; Dicks *et al.*, 1995b; Tenreiro, 1995).

Mobilidade electroforética de lactato desidrogenases

A mobilidade electroforética das L(+) e D(-) lactato desidrogenases (LDH) foi descrita como uma característica importante na classificação das BAL, nomeadamente na diferenciação de algumas espécies do género *Leuconostoc* (Garvie, 1986). Tenreiro

(1995) observou que a mobilidade electroforética da D-LDH de estirpes de *O. oeni* em gel de amido era cerca de 70 a 90% inferior relativamente à de estirpes pertencentes a espécies do género *Leuconostoc* e que os perfis electroforéticos desta enzima apresentavam um elevado polimorfismo naquela espécie. Estes polimorfismos foram também observados por outros autores (Dicks *et al.*, 1995b; Sato *et al.*, 2001).

Análise da composição da parede celular

A estrutura da mureína é considerada um marcador taxonómico importante para a caracterização de bactérias gram positivas. Entre espécies bacterianas, a estrutura química do peptidoglicano difere apenas na composição das cadeias laterais peptídicas, nas quais 3 aminoácidos são constantes (L-alanina, ácido D-glutâmico e D-alanina) (Dellaglio *et al.*, 1994).

1.7.3 Métodos baseados na análise do genoma total

Determinação do teor molar de guanina e citosina (mol% G+C)

Este foi um dos primeiros métodos moleculares usados em taxonomia bacteriana, sendo normalmente recomendado para a descrição de novas espécies e géneros. No Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey são incluídos estes valores para todas as espécies. Embora esta percentagem deva ser considerada, não apresenta potencial de identificação *per se*. Entre procariotas, o teor molar de G+C varia entre 20 e 80 mol%. Apesar deste parâmetro não reflectir a sequência de nucleótidos do genoma, teoricamente, moléculas de DNA com diferenças de teor molar de G+C entre 20-30 mol% podem não ter nenhuma sequência em comum. Actualmente aceita-se que organismos que apresentem diferenças superiores a 10-12 mol% não pertencem ao mesmo género e que 5 mol% é a variação comum dentro de uma espécie (Priest e Austin, 1993; Rosselló-Mora e Amann, 2001).

Hibridação DNA-DNA

A determinação da semelhança DNA-DNA é actualmente a técnica de referência ('gold standard') mais utilizada para descrever novas espécies de procariotas devido ao elevado grau de correlação observado entre semelhanças genómicas e semelhanças fenotípicas (Stackebrandt e Goebel, 1994). É geralmente aceite que um grupo de estirpes da mesma espécie devem partilhar um grau de semelhança DNA-DNA igual ou superior a 70% (Rosselló-Mora e Amann, 2001). Esta foi uma das técnicas utilizadas por diversos investigadores, que permitiu evidenciar as diferenças entre as espécies de *Leuconostoc*, e que levaram Dicks *et al.* (1995b) a propor a reclassificação de *Leuconostoc oenos* em *Oenococcus oeni* e Endo e Okada (2006) a definir a nova espécie deste género, *Oenococcus kitaharae*.

Análise de macrorestrição por PFGE

A macrorestrição baseia-se na restrição do DNA genómico com enzimas de corte pouco frequente (6-8 bp), seguida da separação dos fragmentos resultantes por electroforese em campo pulsado (PFGE, 'Pulsed-Field Gel Electrophoresis'). A utilização deste tipo de electroforese permite a separação de fragmentos de DNA com dimensões até 10 Mb. Este poder de separação de fragmentos de tão elevado peso molecular, comparativamente à electroforese convencional (20 a 50 Kb), resulta da utilização alternada de campos eléctricos em duas direcções, que originam a reorientação das moléculas em resposta à mudança de direcção do campo eléctrico. Dado que o tempo de reorientação das moléculas é proporcional à sua dimensão, a gama de massas moleculares resolvidas num determinado gel depende do tempo de aplicação do campo eléctrico em cada direcção (tempo de pulso). Os perfis de macrorestrição (constituídos por 5 a 20 bandas entre 10 a 800 Kb) obtidos após electroforese em campo pulsado, representam um 'fingerprint' identificativo que pode ser usado na diferenciação de estirpes bacterianas (Tenreiro, 1995). Esta técnica molecular tem-se revelado um dos métodos de tipificação com maior reprodutibilidade (Tenreiro, 1995; Chambel, 2001), sendo normalmente considerada como técnica 'gold standard' entre os métodos moleculares de tipificação (Olive e Bean, 1999). Estes factos justificam a sua aplicação na avaliação da diversidade intraespecífica em *O. oeni* por vários autores (Tenreiro *et al.*, 1994; Zavaleta *et al.*, 1997; Zapparoli *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001; Guerrini *et al.*, 2003).

RFLP ('Restriction Fragment Length Polymorphisms')

A análise de polimorfismos de dimensão de fragmentos de restrição baseia-se na digestão de DNA genómico com enzimas de corte frequente (4-6 bp) e na separação do elevado número de fragmentos obtidos por electroforese convencional. Quando se analisam directamente os perfis electroforéticos obtidos a técnica designa-se por RFLPs directos ou REA ('Restriction Endonuclease Analysis'). Embora esta análise seja dificultada pelo elevado número de fragmentos obtidos, Tenreiro (1995) num estudo com 30 estirpes de *O. oeni*, refere a utilidade desta técnica na confirmação da identidade de sub-grupos de estirpes não discriminados por outras técnicas de tipificação genómica (ribotipagem e análise de macrorestrição) e sugere a sua utilização como método final de discriminação.

PCR 'fingerprinting'

PCR 'fingerprinting' é uma designação genérica aplicada a metodologias baseadas em PCR e que originam um 'fingerprint' (impressão digital) de cada microrganismo. Apesar da grande diversidade de técnicas de PCR 'fingerprinting', todas têm em comum o facto de se basearem na amplificação de

diferentes regiões do genoma por PCR, utilizando apenas um 'primer' e condições de PCR pouco restritas ('low stringency'). Estas técnicas podem ser agrupadas de acordo com a região alvo do 'primer' no genoma. Assim, nas técnicas de RAPD ('Random Amplified Polimorphic DNA') e AP-PCR ('Arbitrarily Primed PCR') o 'primer' utilizado liga-se aleatoriamente em diferentes regiões do genoma, enquanto que nas restantes técnicas (BOX-, ERIC-, REP-, M13-, 'microsatellite-primed'-PCR) o 'primer' é dirigido para sequências repetidas espalhadas pelo genoma. Consoante o tipo de sequência repetida, as técnicas adquirem designações diferentes. Estas técnicas apresentam um potencial de discriminação muito elevado a nível de estirpe, tanto em procariontes como em eucariontes. No entanto, em todas estas técnicas o conteúdo informativo fornecido por um 'primer' pode ser completamente diferente de uma espécie para outra, podendo ser mais ou menos discriminante, já que depende da presença, número e localização de sequências complementares ao 'primer' no genoma dos microrganismos a caracterizar. São vários os trabalhos que utilizaram RAPDs na tipificação de estirpes de *O. oeni* (Zavaleta *et al.*, 1997; Zapparoli *et al.*, 2000; Reguant e Bourdon, 2003; Lechiancole *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006).

1.7.4 Métodos baseados na análise de segmentos do genoma

Sequenciação de rDNA 16S

Em 1994, Stackebrandt e Goebel apresentaram um estudo de correlação entre a sequenciação de rRNA 16S e a hibridação DNA-DNA. De acordo com este estudo, valores de homologia de rRNA 16S inferiores a 97% correspondem a valores de semelhança DNA-DNA inferiores a 50%, enquanto valores de homologia superiores a 97% podem corresponder a valores de semelhança DNA-DNA que variam entre 10-100%. Apesar de reconhecerem as vantagens práticas da sequenciação de rRNA em relação à hibridação DNA-DNA, estes autores concluem que o potencial de aplicação da análise de sequências de rRNA 16S está na determinação do nível a partir do qual é necessário realizar ensaios de hibridação DNA-DNA, que fixam em 97% de homologia. Estes autores propuseram ainda a inclusão da sequência de rRNA 16S numa descrição polifásica de espécie.

Actualmente, a dimensão das bases de dados disponíveis permite a identificação a nível de espécie de bactérias por comparação de sequências de rDNA 16S (para valores de homologia superiores a 97%). Esta metodologia permitiu a identificação de estirpes de *O. oeni* (Sato *et al.*, 2001; Du Plessis *et al.*, 2004) e contribuiu para a descrição de novas espécies de BAL, *v.g.* *Lactobacillus kunkeei* (Edwards *et al.*, 1998), *Lactobacillus nagelii* (Edwards *et al.*, 2000) e *Oenococcus kitaharae* (Endo e Okada, 2006).

Sequenciação de genes 'housekeeping'

Em 2002, o comité *ad hoc* para a reavaliação da definição de espécie em bacteriologia recomenda a determinação da sequenciação parcial de pelo menos cinco genes 'housekeeping' por uma abordagem de MLST ('Multi Locus Sequence Typing') como um dos métodos de diferenciação de estirpes a aplicar na caracterização da variabilidade infraespecífica (Stackebrandt *et al.*, 2002). De las Rivas *et al.* (2005) aplicaram este método a 18 estirpes de *O. oeni* provenientes de vinhos de diferentes países, usando os genes *gyrB* (subunidade B da DNA girase), *pgm* (fosfoglucomutase), *ddl* (D-alanina-D-Dalanina ligase), *recP* (transcetolase) e *mleA* (enzima maloláctica). Segundo os autores, a técnica revelou um poder discriminante superior ao da ribotipagem. Mais recentemente, Delaherche *et al.* (2006) aplicaram a técnica de MLST a 16 estirpes de *O. oeni*, utilizando 9 genes para avaliar a diversidade a nível intraespecífico e uma possível correlação entre a actividade maloláctica e a presença de mutações nos genes alvo.

Ribotipagem

A ribotipagem é uma variante dos RFLPs que combina a análise de fragmentos de restrição com hibridação, usando sondas específicas para rDNA de modo a reduzir o número de fragmentos a analisar. Tendo como alvo sequências do 'cluster' de genes ribossomais, o poder discriminante desta técnica está limitado pela variabilidade destas sequências, pela sonda utilizada e, principalmente, pela enzima de restrição seleccionada para um grupo particular de microrganismos. Tenreiro (1995) aplicou esta técnica na caracterização de estirpes de *O. oeni* isoladas de vinho, utilizando quatro enzimas de restrição e uma sonda dirigida para rDNA 16S, tendo verificado que esta apresentava um poder discriminante limitado, permitindo diferenciar apenas 7 a 13% das estirpes, consoante a enzima de restrição. Num estudo efectuado com estirpes isoladas de vinhos da região de Chianti, Viti *et al.* (1996), após a análise dos ribotipos obtidos com uma sonda dirigida para rDNA 16S+23S e comparando-os com os obtidos para outras espécies de BAL, identificaram as estirpes em estudo como pertencentes à espécie *O. oeni*.

PCR-RFLPs

Esta técnica baseia-se na amplificação de uma região genómica por PCR seguida de digestão com enzimas restrição de corte frequente (4-6 bp). A separação dos fragmentos obtidos é normalmente realizada por electroforese convencional em gel de agarose. Quando as regiões genómicas alvo pertencem aos operões ribossomais, a técnica é designada por ARDRA ('Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis'). Devido à pressão selectiva a que estão sujeitos, os genes ribossomais apresentam um elevado nível de conservação em todos os organismos. Pelo

contrário, no interior dos operões *rrn* e entre genes ribossomais adjacentes, existem sequências de DNA espaçador (ITS, 'Intergenic Transcribed Spacer') que estão sujeitas a uma menor pressão selectiva, apresentando por isso uma taxa de mutação superior.

Os padrões de 16S-ARDRA são, geralmente, característicos da espécie e tornam possível identificar a maioria das espécies de BAL isoladas do vinho. Esta técnica foi aplicada por Sato *et al.* (2001) e Rodas *et al.* (2003, 2005) e, mais recentemente por nós num trabalho de caracterização de bactérias lácticas dos vinhos da RDD (Inês, 2007). Os padrões de ITS-ARDRA são mais discriminantes e permitem a tipificação de estirpes. Esta técnica foi aplicada por Rodríguez *et al.* (2007) na diferenciação de estirpes de *Lactobacillus hilgardii*.

'Gene-specific' PCR

A identificação das BAL pode ser realizada utilizando 'primers' dirigidos para regiões particulares do genoma bacteriano. Estas regiões, apresentam sequências que são específicas da espécie e, por isso, podem ser usadas para distinguir estirpes de espécies diferentes. Por exemplo, a identificação a nível de espécie de estirpes de *O. oeni* é possível utilizando 'primers' específicos que têm como região alvo o rDNA 16S (Bartowsky e Henschke, 1999) ou o gene *mleA* (Zapparoli *et al.*, 1998). Outras espécies de BAL com relevância enológica têm sido identificadas recorrendo a esta técnica, nomeadamente, *Lactobacillus brevis* com 'primers' dirigidos para o gene rDNA 16S (Guarneri *et al.*, 2001), *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus* e *Lb. hilgardii* com 'primers' dirigidos para o gene *recA* (Quere *et al.*, 1997; Torriani *et al.*, 2001; Spano *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2007), e *Pediococcus damnosus* com 'primers' dirigidos para o plasmídeo responsável pela produção de exopolissacáridos (Gindreau *et al.*, 2001).

1.7.5 Outros métodos moleculares

Existem ainda métodos moleculares de aplicação directa na caracterização de amostras mistas que não necessitam de recorrer ao isolamento e cultura de microrganismos e que permitem caracterizar a diversidade microbiana presente nestas amostras. Estes métodos permitem, por exemplo, a identificação e monitorização dos microrganismos associados a processos fermentativos. As técnicas de PCR-TGGE ('Temperature Gradient Gel Electrophoresis'), PCR-DGGE ('Denaturing Gradient Gel Electrophoresis'), hibridação *in situ* ('FISH - Fluorescence *in situ* Hybridisation') e RT-PCR ou qRT-PCR ('Real-time PCR' e 'quantitative Real-time PCR') são alguns exemplos.

PCR-TGGE e PCR-DGGE são métodos moleculares que baseiam a discriminação das espécies unicamente sobre as diferenças das sequências nucleotídicas de

produtos de amplificação de genes alvo. Estes produtos são separados, de acordo com a sua sequência nucleotídica, por electroforese em condições desnaturantes, utilizando um gradiente de temperatura (TGGE) ou um gradiente químico (DGGE). A técnica de PCR-DGGE direccionada para o rDNA 16S foi utilizada por Lopez *et al.* (2003) para caracterizar todos os microrganismos do vinho (leveduras, bactérias do ácido láctico e bactérias acéticas). Renouf *et al.* (2006) e Spano *et al.* (2007) utilizaram a mesma técnica dirigida para o gene *rpoB* (sub-unidade catalítica da RNA polimerase) para caracterizar as BAL do vinho.

A técnica de FISH é amplamente aplicada na detecção, identificação e contagem directa ao microscópio de fluorescência, de bactérias e outros microrganismos. Normalmente utiliza sondas oligonucleotídicas dirigidas para o rRNA (5S, 16S e 23S) marcadas com fluorocromos. Esta técnica foi usada na detecção e identificação de BAL no vinho por Sohier e Lonvaud-Funel (1998), Blasco *et al.* (2003) e Hirschhäuser *et al.* (2005).

PCR em tempo real é um método rápido e fidedigno para fins de identificação e enumeração, que também permite a quantificação. A quantificação rápida de *O. oeni* e das outras espécies de BAL do vinho por esta técnica pode ser utilizada no controlo da FML, permitindo medidas correctivas para regular o crescimento bacteriano (Delaherche *et al.*, 2004; Pinzani *et al.*, 2004; Neeley *et al.*, 2005).

1.8 INTERESSE ENOLÓGICO DAS BAL DO VINHO

A complexidade e diversidade das actividades metabólicas das BAL no vinho, ilustrada na Figura 5, sugerem que a fermentação maloláctica é mais do que uma mera descarboxilação, podendo afectar positiva e/ou negativamente a qualidade do vinho (Bartowsky, 2005).

1.8.1 A fermentação maloláctica

A FML no vinho, considerada uma fermentação secundária (ou mais correctamente uma descarboxilação), ocorre normalmente no final da fermentação alcoólica, embora por vezes possa ocorrer em simultâneo ou não ocorrer. Este processo biológico de desacidificação é realizado pelas BAL envolvendo a conversão do ácido dicarboxílico L-málico, um dos principais ácidos orgânicos presentes no vinho, a um ácido monocarboxílico L-láctico e dióxido de carbono, resultando num acréscimo de pH e decréscimo da acidez titulável (Figura 6), que se reflecte na estabilidade microbiológica e qualidade organoléptica dos vinhos (Davis *et al.*, 1985; Liu, 2002; Bartowsky, 2005). No vinho, esta desacidificação biológica é normalmente conduzida por estirpes de *Oenococcus oeni*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lactobacillus*

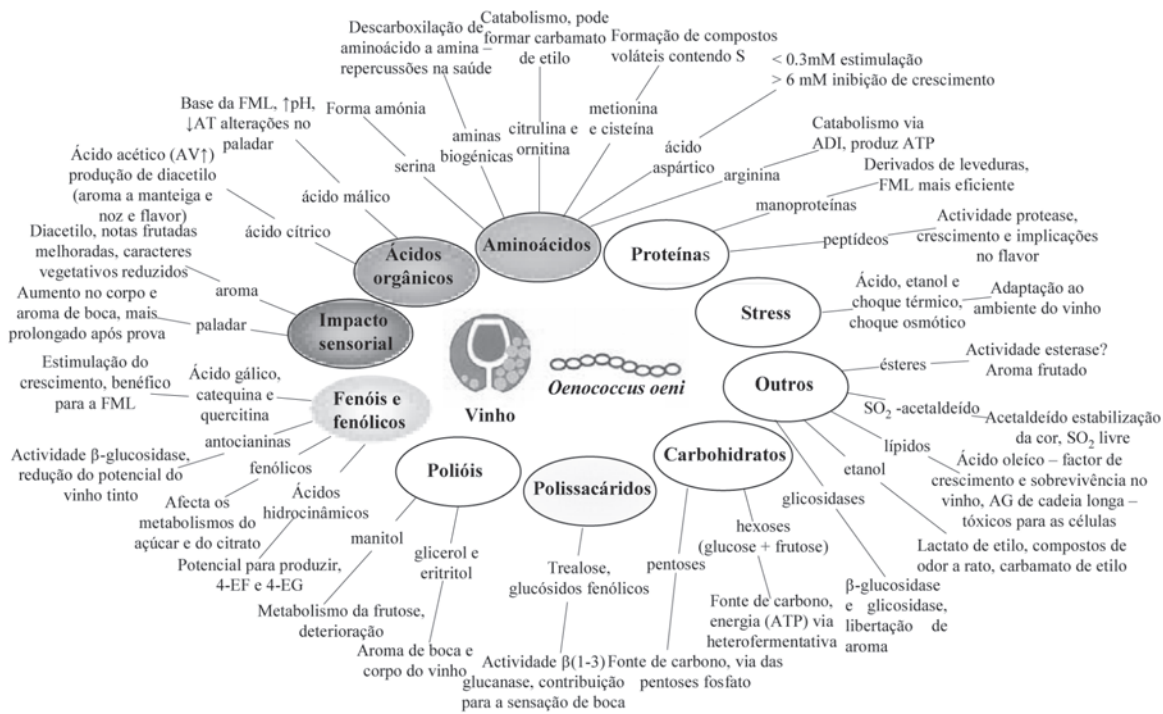


Fig. 5 - Sumário global das alterações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação maloláctica e metabolismo de *Oenococcus oeni* (adaptado de Bartowsky, 2005). ADI: arginina desaminase; AG: ácidos gordos; AT: acidez total; AV: acidez volátil; 4-EF: 4-etilfenol; 4-EG: 4-etilguaicol.

Overall summary of the biochemical changes which occur during the malolactic fermentation and *Oenococcus oeni* metabolism (adapted from Bartowsky, 2005). ADI: arginine deaminase; AG: fatty acids; AT: total acidity; AV: volatile acidity; 4-EF: 4-ethylphenol; 4-EG: 4-ethylguaicol.

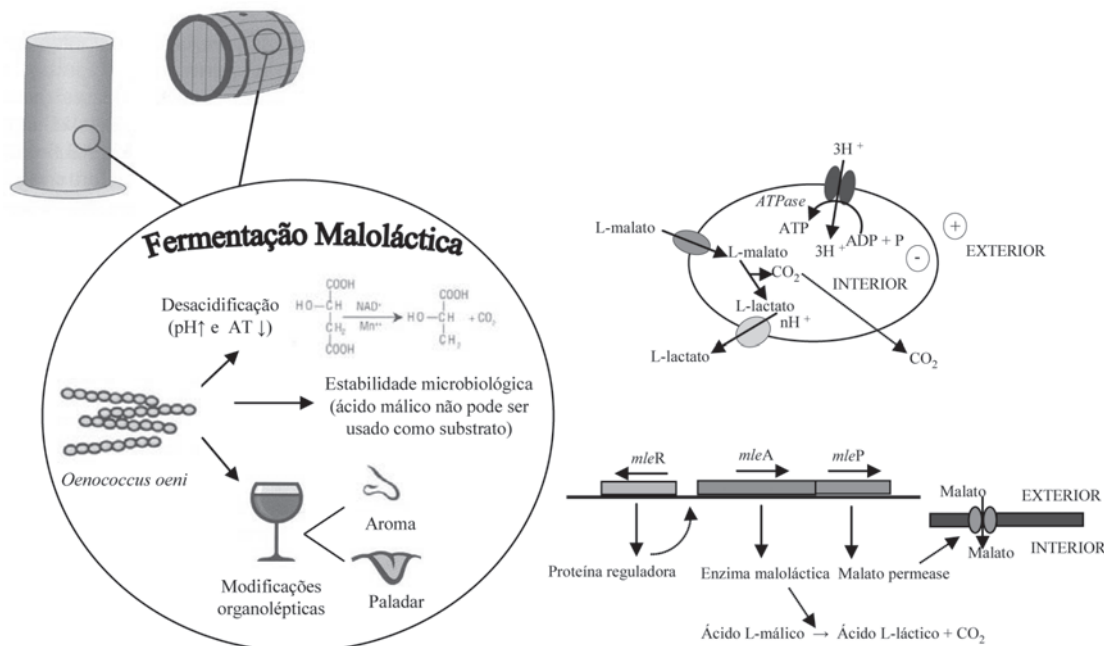


Fig. 6 - (a) As três principais consequências da FML: (i) A FML confere estabilidade microbiológica ao vinho pela remoção de uma possível fonte de carbono (ácido málico) para outros microrganismos; (ii) desacidificação do vinho pelo aumento no pH [0.1-0.2] e decréscimo na acidez titulável [AT]; e (iii) confere modificações sensoriais (aroma e paladar) ao vinho. (b) A descarboxilação do ácido L-málico para o ácido L-láctico envolve o transporte activo do ácido málico para o interior da célula, descarboxilação, e o transporte de ácido láctico para o exterior da célula para o meio envolvente. (c) Dos três genes envolvidos na reacção maloláctica, *mleA* codifica para a enzima maloláctica, *mleP* codifica para a malato permease e *mleR* codifica para um regulador transcricional (adaptado de Bartowsky, 2005).

The three main consequences of MLF: (i) MLF confers microbial stability to the wine through the removal of a possible carbon source (malic acid) for other organisms, (ii) deacidification of wine (increase in pH [0.1-0.2] and decrease in titratable acidity [TA]), and (iii) bestows sensory changes (aroma and palate) to the wine. The decarboxylation of L-malic acid to L-lactic acid involves the active transport of malic acid into the cell, decarboxylation, and the transport of lactic acid out of the cell into the surrounding medium. From the three genes involved in the malolactic reaction, *mleA* encodes the malolactic enzyme, *mleP* encodes the malate permease and *mleR* is a LysR-type regulatory protein (adapted from Bartowsky, 2005).

spp. e *Pediococcus* spp..

A FML é considerada indispensável à qualidade e até à estabilidade da maioria dos vinhos tintos. Nos mais ácidos é particularmente importante, pela redução da acidez e aumento do pH que provoca. A substituição do ácido málico pelo ácido láctico provoca uma melhoria no sabor dos vinhos, uma vez que o ácido láctico é menos agressivo ao paladar. Pelo contrário, nos de acidez baixa, pretende-se a obtenção de estabilidade microbiológica e, em ambos os casos, uma melhoria no aroma e sabor dos vinhos (Mendes-Faia, 1991).

Esta fermentação é mais frequente em vinhos tintos do que em rosados ou em brancos, diferença que se atribui aos teores mais elevados de SO₂ utilizados nos vinhos brancos, à sua maior acidez e, ainda, à redução de nutrientes nos mostos brancos quando se faz a defecação. Embora o desaparecimento do ácido málico não seja benéfico em termos de características organolépticas nos vinhos de regiões quentes, muitas vezes promove-se a ocorrência da FML seguida de uma acidificação com ácido tartárico. Há, no entanto, referências que indicam que em vinhos pouco ácidos a FML nem sempre provoca uma diminuição da qualidade (vinhos da Califórnia, África do Sul, Israel e região do Douro) (Mendes-Faia, 1991). Nos vinhos em que a FML é desejada, esta desacidificação biológica deve ocorrer o mais cedo possível, sempre antes do engarrafamento, para que se possa estabilizar o vinho.

A descarboxilação do ácido L-málico a ácido L-láctico é catalizada pela enzima maloláctica (MLE, EC 1.1.1.-), dependente de NAD⁺ e Mn²⁺. Os genes que codificam para a enzima maloláctica (*mleA*) e malato permease (*mleP*) encontram-se organizados num operão (Figura 6). Transcrito na direcção oposta a montante do operão *mleAP* localiza-se um putativo gene regulador (*mleR*) responsável pela produção de uma proteína reguladora da família tipo-LysR (Labarre *et al.*, 1996; Galland *et al.*, 2003).

Esta configuração genética, de certo modo simples, parece ser conservada em várias BAL do vinho, nomeadamente em *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus brevis*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus* (Kleerebezem *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2005).

Numa perspectiva da bioenergética celular, a FML confere vantagem às células bacterianas actuando como um mecanismo de transdução de energia quimiosmótica, gerando ATP adicional, via ATPase (Cox e Henick-Kling, 1989, 1990, 1995; Olsen *et al.*, 1991; Salema *et al.*, 1996). Em resumo, o acréscimo de pH intracelular produz uma força protomotriz (??P). Por cada molécula de malato que entra na célula e sofre descarboxilação, uma molécula de lactato sai da célula acompanhada de um H⁺, que é equivalente à translocação de um H⁺ para o exterior. A exportação do lactato a favor de um gradiente de concentração

fornece à célula energia para transportar os H⁺. O aumento da força protomotriz pode ser usado pela ATPase membranar para produção de ATP. No vinho e devido ao seu pH tão reduzido, não ocorre a glicólise e a FML será provavelmente a única via para *O. oeni* produzir ATP (Bartowosky, 2005).

1.8.2 Os efeitos benéficos das BAL no vinho

Para além do decréscimo na acidez, a FML produz melhorias nas características organolépticas e aumenta a estabilidade microbiológica dos vinhos (Davis *et al.*, 1985; Kunkee, 1991; Versari *et al.*, 1999; Arnink e Henick-Kling, 2005). A modificação do aroma observada após a FML deve-se ao ácido láctico, *per si*, menos agressivo, e ao aumento de uma série de outros compostos (Figura 7), nomeadamente, diacetilo, acetoína, 2,3-butanodiol, ésteres (lactato de etilo, succinato de dietilo) e alguns alcóois superiores e à libertação de agliconas aromáticas (Mascarenhas, 1984; Mendes-Faia, 1990; Martineau e Henick-Kling, 1995; Bartowosky *et al.*, 1997; Bartowosky e Henschke, 2000, 2004).

Há um conjunto de actividades enzimáticas detectadas em várias espécies de BAL que contribuem para uma maior complexidade do aroma dos vinhos após a FML. Dada a relevância das β -glucosidases no aroma, estas enzimas serão apresentadas em separado mais adiante. Outra actividade enzimática com relevância positiva em termos enológicos é a da enzima tanino-acil-hidrolase (E.C. 3.1.1.20), vulgarmente designada por tanase, que catalisa a hidrólise das ligações éster em taninos hidrolisáveis tais como o ácido tânico, libertando glucose e ácido gálico (Lekha e Lonsane, 1997 cit. por Vaquero *et al.*, 2004).

A actividade da tanino-acil-hidrolase, apesar de pouco dispersa entre as BAL, deve ser usada como critério na selecção de culturas malolácticas ‘starter’, uma vez que confere vantagens no processo de vinificação ao reduzir a adstringência e turvação no vinho (Vaquero *et al.*, 2004). Num ‘screening’ realizado por estes autores num conjunto de 78 estirpes pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*, a tanase apenas foi detectada em estirpes de *Lactobacillus plantarum*.

Ainda relativamente às modificações no aroma, provocadas pelas BAL, Pripis-Nicolau *et al.* (2004) verificaram que estirpes de *O. oeni* eram capazes de metabolizar a metionina, originando compostos de enxofre voláteis, particularmente ácido 3-metilsulfanil propiónico em vários vinhos tintos após a FML. Este composto, que é caracterizado por odores a chocolate e tostado contribui para a complexidade aromática produzida pela FML (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004). Os metabolitos produzidos com carácter negativo também ilustrados na Figura 7 serão discutidos no ponto seguinte desta revisão.

Relativamente à estabilidade microbiológica dos

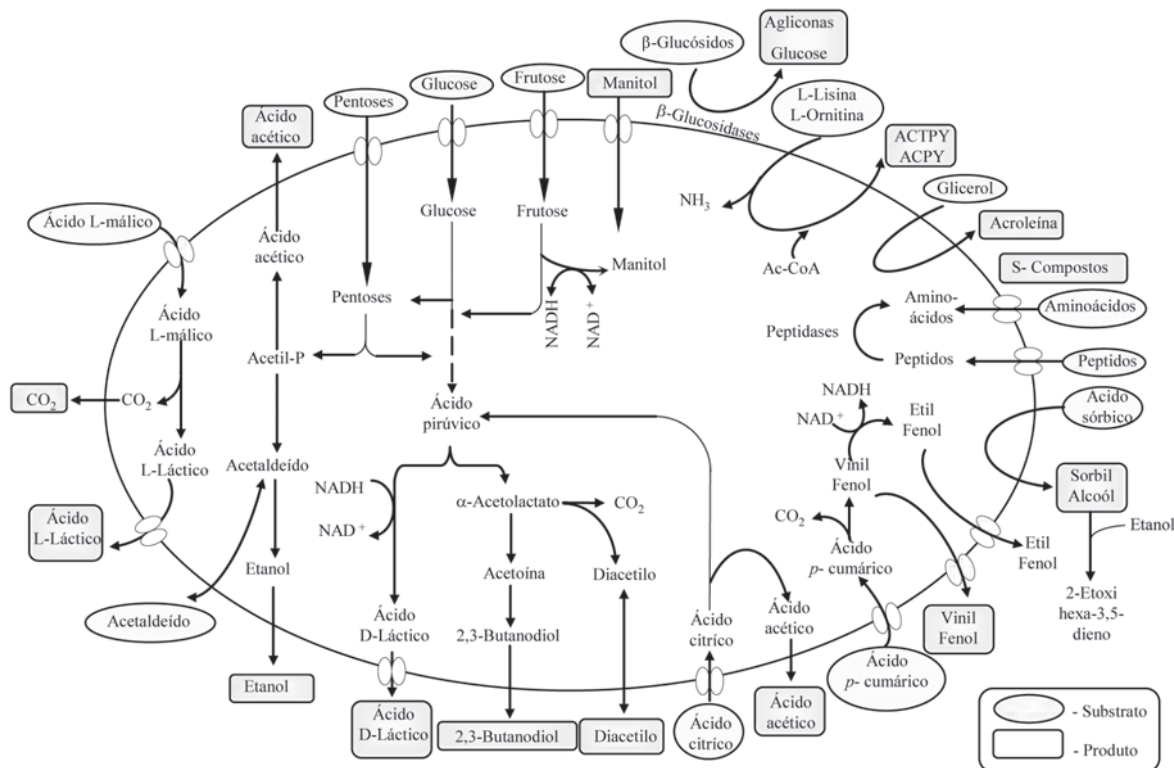


Fig. 7 - Representação esquemática da biossíntese de compostos aromáticos por bactérias maloláticas (adaptado de Swiegers *et al.*, 2005). ACTPY-2-acetil-tetra-hidropiridina; ACPY-2-acetil-1-pirrolina.

A schematic representation of the biosynthesis and modulation of flavour-active compounds by malolactic bacteria (adapted from Swiegers et al., 2005). ACTPY-2-acetyl-tetra-hydropyridine; ACPY-2-acetyl-1-pyrroline.

vinhos atingida após a FML, esta ocorre através da depleção de nutrientes e libertação de substâncias antimicrobianas pelas BAL (Pramateftaki *et al.*, 2006). Ao metabolizarem compostos que combinam o dióxido de enxofre (piruvato, oxoglutarato e acetaldeído) as BAL também contribuem para o aumento da estabilidade do vinho (Mendes-Faia, 1991; Osborne *et al.*, 2000, 2006).

A hidrólise dos glucosídeos pela acção de β -glucosidases

Na maioria dos casos, os β -glucosídeos são hidrolisados por β -glucosidases extracelulares ou associadas à parede celular (González-Candelas *et al.*, 1989) através de vias metabólicas semelhantes às descritas para a lactose pela acção da β -galactosidase. As β -glucosidases ou β -D-glucosídeo glucohidrolases (β G, EC 3.2.1.21) constituem um grupo de enzimas bem caracterizadas, biologicamente importantes, que catalizam a transferência do grupo glicosil entre nucleófilos de oxigénio. Esta reacção de transferência geralmente resulta na hidrólise de uma ligação β -glucosídica que liga resíduos de hidratos de carbono em aril-, amino-, ou alquil- β -D-glucosídeos, glucosídeos cianogénicos, oligossacáridos de cadeia curta e dissacáridos (Bhatia *et al.*, 2002). Em mostos e vinhos desempenham um papel importante na hidrólise dos precursores glucoconjugados e na libertação de compostos aromáticos activos (Palmeri e Spagna, 2007). O aroma das uvas inclui moléculas voláteis e odoríferas, sob a forma livre, especialmente terpenos (linalool,

geraniol, nerol, citronelol, β -terpineol, óxido de linalool) que conferem o carácter frutado a certas cultivares. Adicionalmente, estes compostos podem formar complexos glucosídicos não voláteis e sem aroma, designados por precursores do aroma (Mateo e Jiménez, 2000; van Rensburg e Pretorius, 2000). A existência destes precursores não voláteis é interessante sob um ponto de vista tecnológico, até por ser a fracção maioritária nos mostos e pela acção sequencial de glucosidases poderem libertar agliconas aromáticas. A hidrólise enzimática ocorre em duas fases, primeiro as ligações α -1,6 glucosídicas são clivadas pela acção de α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55), α -L-ramnospiranosidas (EC 2.2.1.40) ou de β -D-apiofuranosidas (EC 3.2.1.161) e os monoterpenil- β -D-glucosídeos correspondentes são libertados (arabinose, raminose, apiose e β -D-glucosídeos). Na segunda fase, ocorre a libertação da aglicona aromática após a acção da β -glucosidase (Colagrande *et al.*, 1994; Günata, 1994; Palmeri e Spagna, 2007).

Com o objectivo de realçar a fracção aromática dos vinhos têm sido estudadas várias β -glucosidases provenientes de diversos microrganismos, incluindo os relacionados com o ambiente vínico (Matthews *et al.*, 2004). Foram pesquisadas e detectadas β -glucosidases em leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e principalmente em espécies não *Saccharomyces* (Gunata *et al.*, 1990; Rosi *et al.*, 1994, 1995; MacMahon *et al.*, 1999; Mendes-Ferreira *et al.*, 2001; Strauss *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2004),

em estirpes de *Oenococcus oeni* (Grimaldi *et al.*, 2000; Boido *et al.*, 2002; Mansfield *et al.*, 2002; Ugliano *et al.*, 2003; Barbagallo *et al.*, 2004; D'Incenco *et al.* 2004; Grimaldi *et al.*, 2005a) e em estirpes de *Lactobacillus* spp. e de *Pediococcus* spp. (Grimaldi *et al.*, 2005b). Apesar de algumas actividades terem sido detectadas em substratos glucosilados artificiais, outras foram reveladas em vinho apesar de parcialmente inibidas pelas condições de vinificação (Matthews *et al.*, 2004). Barbagallo *et al.*, (2004) observaram que as estirpes de *O. oeni* mantinham actividade -glucosidásica em condições enológicas (pH, temperatura e etanol) e apresentavam elevada actividade maloláctica após inoculação em vinho. De acordo com estes autores, as BAL parecem expressar o conjunto de glucosidases necessárias para hidrolisar muitos dos glucósidos encontrados no vinho, aumentando a fracção do aroma livre. Para além do efeito no aroma, há a salientar a actividade antocianásica que algumas α -glucosidases podem apresentar. Estas enzimas hidrolisam as antocianinas ligadas aos açúcares, libertando as respectivas antocianinas, que são menos estáveis, e que por isso, se convertem espontaneamente em compostos castanhos ou descorados. Apesar da sua acção em vinhos tintos poder ser indesejável, estas enzimas têm sido propostas como meio de reduzir a intensidade da cor nos vinhos brancos ou rosés produzidos a partir de uvas tintas (Matthews *et al.*, 2004). São já conhecidas algumas sequências dos genes que codificam para as α -glucosidases de espécies enológicas, nomeadamente de *O. oeni* (AY489108) e de *Lb. plantarum* (AY489109).

1.8.3 Os efeitos nocivos das BAL no vinho

Para além dos aspectos benéficos da presença de BAL no vinho, estes microrganismos (em particular certas estirpes) podem exercer um efeito depreciativo na qualidade do vinho, se a sua proliferação ocorrer no tempo errado durante o processo de vinificação (du Toit e Pretorius, 2000). No Quadro III são apresentadas as alterações mais frequentes provocadas pelas BAL em vinhos, que incluem a produção de vários metabolitos indesejáveis, maus odores e turvação. Dos processos de deterioração referidos, serão apenas abordados com mais pormenor, a formação de carbamato de etilo e a produção de amins biogénicas (particularmente histamina, tiramina e putrescina) por constituírem assuntos do trabalho experimental.

O metabolismo dos aminoácidos

A utilização dos aminoácidos pelas BAL pode ter implicações a nível da qualidade e da segurança alimentar dos produtos fermentados. Para as bactérias esta utilização permite aumentar a sua capacidade de obtenção de energia, particularmente em meios com limitação de nutrientes e supostamente como resposta ao stress ácido (Marquis *et al.*, 1987; Cotter e Hill, 2003).

A degradação da arginina e formação de carbamato de etilo

As principais vias metabólicas de degradação de L-arginina utilizadas por microrganismos são: (i) a via da arginase-urease; (ii) a via da arginina transamidase; (iii) a via da arginina descarboxilase; e (iv) a via da arginina desaminase (Abdelal, 1979 cit. por Liu, 1993).

A via da arginina desaminase está amplamente distribuída em procariotas e, concretamente, encontra-se presente nalgumas BAL. Por esta via uma mole de L-arginina é convertida numa mole de ornitina e numa mole de dióxido de carbono e duas moles de NH₃. Esta via envolve três enzimas: arginina desaminase (ADI; EC 3.5.3.6), ornitina transcarbamilase (OTC; EC 2.1.3.3) e carbamato cinase (CK; EC 2.7.2.2) (Mira de Orduna *et al.*, 2001; Liu, 2002; Manca de Nadra *et al.*, 2003).

A arginina é um dos aminoácidos presente em maiores concentrações no mosto e no vinho. A sua utilização origina citrulina e carbamoil fosfato, precursores do carbamato de etilo, composto potencialmente carcinogénico. Este composto resulta duma reacção química espontânea envolvendo etanol e precursores que incluem a ureia, citrulina, carbamoil fosfato, N-carbamil, α e β -aminoácidos e alantoína (Ough *et al.*, 1988). A reacção de etanolise da citrulina e da ureia (proveniente do metabolismo da arginina pelas leveduras) para formar carbamato de etilo pode ocorrer a temperaturas elevadas ou a temperaturas normais de armazenamento (Ough *et al.*, 1988; Kodama *et al.*, 1994).

Os teores de carbamato de etilo admissíveis nos vinhos estão regulamentados em alguns países. Para vinhos de mesa é de 30 μ g/L, na União Europeia e no Canadá, enquanto que nos E.U.A. os valores são mais restritivos, sendo 15 μ g/L para vinhos de mesa e 60 μ g/L para vinhos fortificados (Arena e Manca de Nadra, 2005; Uthurry *et al.*, 2006).

O catabolismo da arginina, originando ornitina, amónia e CO₂ (ratio 1:2:1), providencia a várias BAL um processo adicional de obtenção de energia por fosforilação a nível do substrato (Abdelal, 1979 cit. por Konings, 2006). Aliás, esta é a única via catabólica de aminoácidos conhecida nas BAL que resulta na produção de ATP via fosforilação a nível do substrato (Christensen *et al.*, 1999). O ATP produzido pela via ADI pode ser usado noutros processos metabólicos que requerem energia na célula, conferindo às bactérias capazes de obter energia por este processo adicional, uma vantagem competitiva num ambiente tão hostil como é o vinho, devido ao seu pH ácido e conteúdo em etanol. O aumento do pH, resultante da produção de amónia, representa ainda um mecanismo de homeostasia de pH, semelhante ao que ocorre nas descarboxilações dos aminoácidos (Liu e Pilone, 1998; Tonon e Lonvaud-Funel, 2002).

A presença das três enzimas da via da ADI parece

QUADRO III
 Alterações provocadas pelas BAL nos vinhos
Changes in wine caused by LAB

Deteriorações	Microrganismos responsáveis	Referências bibliográficas
“Amargor” formação de acroléina a partir da degradação do glicerol	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus parvulus</i>	Davis <i>et al.</i> , 1988; Sponholz, 1993; Bartwosky e Henscke 1995; Fugelsang, 1997; Claisse e Lonvaud-Funel 2001
“Aroma a manteiga”, devido à produção excessiva de diacetilo	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Oenococcus oeni</i> <i>Pediococcus</i> spp.	Martineau e Henick-Kling 1995
Crescimento floculento	<i>Lactobacillus trichodes</i>	Amerine e Kunkee 1968
“Fermentação manítica” redução da frutose a manitol	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sponholz, 1993
Formação de fenóis voláteis (4- etilguaiaicol e 4-etilfenol) por degradação de ácidos fenólicos principalmente ácido ferúlico e ácido <i>p</i> -cumárico	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp.	Cavin <i>et al.</i> , 1993, 1997; Chatonnet <i>et al.</i> , 1997; Barthelmebs <i>et al.</i> 2000, 2001
Formação de glioxal e metilglioxal	<i>Oenococcus oeni</i>	De Revel e Bertrand, 1993
“Gordura” produção de polissacarídeos extracelulares que aumentam a viscosidade do vinho	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Sponholz, 1993; Manca de Nadra e Strasser de Saad, 1995; Giendreau <i>et al.</i> , 2001; Wallng <i>et al.</i> , 2001
“Odor a gerânio” redução do ácido sórbico a 2,4- hexadienol que esterifica com o etanol originado 2-etoxihexa-3,5-dieno, responsável pelo odor a gerânio	<i>Oenococcus oeni</i>	Crowell e Guymont 1975; Edinger e Splittstoesser 1986
“Odor a rato” ou a acetamida, produção de tetrahidropiridinas	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus cellobiosus</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>	Sponholz, 1993; Fugelsang, 1997; Costello <i>et al.</i> , 2001, 2002
“Produção de aminas biogénicas” (histamina, tiramina, putrescina, etc, descarboxilação de aminoácidos	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Oenococcus oeni</i> <i>Pediococcus damnosus</i>	Lonvaud-Funel e Joyeux 1994; Rollan <i>et al.</i> , 1995; Coton <i>et al.</i> , 1998a,1998b; Leitão <i>et al.</i> , 2000; Moreno-Arribas e Lonvaud-Funel 1999, 2001; Arena e Manca de Nadra, 2001; Moreno-Arribas <i>et al.</i> , 2000, 2003; Guerrini <i>et al.</i> , 2002
“Produção de precursores de carbamato de etilo	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus buchnerii</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Oenococcus oeni</i>	Liu e Pilone 1998; Liu 2002; Azevedo <i>et al.</i> , 2002
“Pico láctico” fermentação láctica dos açúcares; produção de ácido D-Láctico e produção excessiva de ácido acético implicado nos amúos de fermentação	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus kunkeei</i> <i>Lactobacillus nagelii</i> <i>Oenococcus oeni</i>	Ingledeew e Kunkee, 1985; Sponholz, 1993; Edwards <i>et al.</i> , 1998a, 1998b, 2000;
“Volta” degradação do ácido tartárico; deprecia a qualidade sensorial	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Sponholz, 1993; Martineau e Henick- Kling 1995

verificar-se na maioria dos lactobacilos heterofermentativos, leuconostocs e oenococos, embora estas já tenham sido detectadas em espécies homofermentativas de BAL isoladas de vinho. Contudo, a degradação da arginina por esta via, em todas as espécies, parece ser um fenótipo estirpe dependente (Spano *et al.*, 2006). Os genes envolvidos na degradação da arginina encontram-se organizados no operão *arc*. Apesar de este operão apresentar variações de estrutura entre diferentes espécies de BAL, estão sempre presentes os genes que codificam para a arginina desaminase (*arcA*); ornitina transcarbamilase (*arcB*) e carbamato cinase (*arcC*). Podem ainda estar presentes genes que codifiquem para transportadores antiporte arginina/ornitina (*arcD/arcD1/arcD2*), transami-nases (*arcT*), tRNA sintetases (*arcS*) e proteínas reguladoras (*arcR*) (Divol *et al.*, 2003). Este operão já foi descrito em estirpes de *Lactobacillus hilgardii* (Arena *et al.*, 1999, 2002), *Oenococcus oeni* (Mira de Orduna *et al.*, 2001; Tonon *et al.*, 2001a, 2001b, Nehmé *et al.*, 2006), *Lactobacillus plantarum* (Spano *et al.*, 2004, 2006), *Lactobacillus sake* (Zúniga *et al.*, 1998, 2002) e *Enterococcus faecalis* (Barcelona-Andres *et al.*, 2002).

No vinho, o contacto prolongado das BAL (viáveis e viáveis mas não cultiváveis) com as borras residuais das leveduras deve ser considerado como um factor de risco significativo para a formação acrescida de citrulina e, conseqüentemente, de carbamato de etilo (Liu e Pilone 1998; Tonon e Lonvaud-Funel, 2000; Terrade e Mira de Orduna, 2006). Por isso, não é aconselhável a utilização de estirpes de *Oenococcus oeni* que excretem citrulina como culturas ‘starter’. Alguns destes autores sugerem ainda que estirpes que possuam apenas a primeira enzima da via (ADI+, OTC-) ou estirpes que tenham ADI mas baixa actividade OTC devam ser excluídas num processo de selecção de ‘starters’ para a realização da FML.

A formação de amins biogénicas

As amins biogénicas são bases orgânicas de baixo peso molecular, que podem ser produzidas e degradadas durante a actividade metabólica normal dos animais, das plantas e dos microrganismos (Arena e Manca de Nadra, 2001). No homem, estas substâncias podem desempenhar um papel metabólico importante, relacionado com o crescimento (poliaminas) ou com funções dos sistemas nervoso e circulatório (histamina e tiramina). Quando ingeridas em excesso, podem provocar hipotensão, hipertensão, palpitações cardíacas (aminas vasoactivas), dores de cabeça (aminas psicoactivas) e várias reacções alérgicas (Lonvaud-Funel, 2001; De las Rivas *et al.*, 2005). As amins biogénicas são essencialmente formadas a partir da descarboxilação dos aminoácidos precursores (ten Brink *et al.*, 1990 cit. por Guerrini *et al.*, 2002; Lonvaud-Funnel, 1999; Marcobal *et al.*, 2006a, 2006b). Deste modo, as amins histamina, tiramina, triptamina, serotonina, 2-feniletilamina,

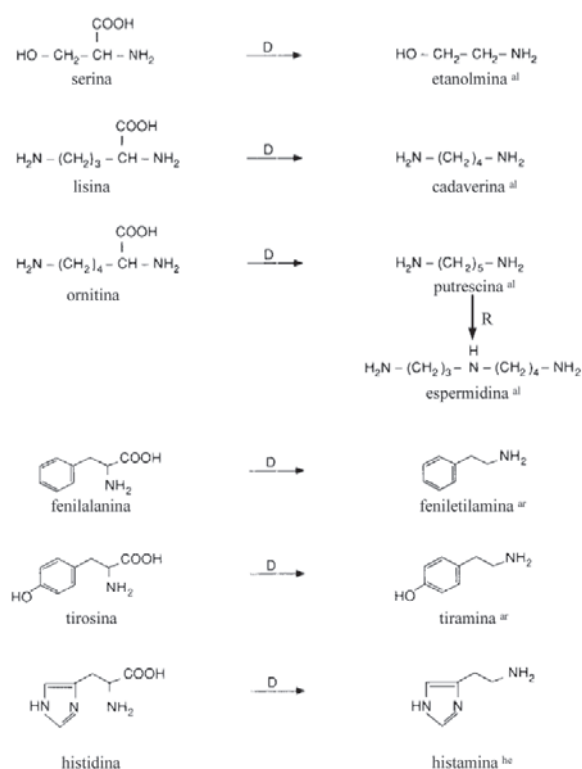


Fig. 8 - Algumas amins biogénicas e aminoácidos precursores (adaptado de Buckenhüskes, *et al.*, 1993). (D) Descarboxilação; (R) Espermidina é formada pela reacção da putrescina com um resíduo propilamina que provém da metionina. (al), alifática; (ar) aromática; (hc) heterocíclica. *Some biogenic amines and their precursors (adapted from Buckenhüskes, et al., 1993). (D) Decarboxylation. (R) Spermidine is formed by a reaction of putrescine with a propylamine residue which descends from methionine. (al), aliphatic; (ar) aromatic; (hc) heterocyclic.*

agmatina e cadaverina (Figura 8) são formadas a partir dos aminoácidos histidina, tirosina, triptofano, hidroxitriptofano, fenilalanina, arginina e lisina respectivamente (Buckenhüskes, 1993; Silla Santos, 1996; Kalac e Krí•ek, 2003). A putrescina pode ser formada a partir da ornitina ou da agmatina, e a espermidina e espermina são formadas a partir da putrescina pela ligação de grupos aminopropil catalizada pela espermidina sintase e espermina sintase (Teti *et al.*, 2002).

Durante os processos de fermentação de várias matérias primas para a obtenção de alimentos e bebidas, como por exemplo, queijo, enchidos, vegetais fermentados, cerveja e vinho pode ocorrer a formação de amins biogénicas pelas BAL. Muitas bactérias apresentam actividades descarboxiláticas, que favorecem o seu crescimento e sobrevivência em meios ácidos, pelo acréscimo do pH. No vinho, vários aminoácidos podem ser descarboxilados e, conseqüentemente, podem ser encontradas amins biogénicas, predominando a histamina, a tiramina, a putrescina, a isopentilamina e a â-feniletilamina (Radler e Fath, 1991; Bodmer *et al.*, 1999; Lonvaud-Funel, 2001; Moreno-Arribas *et al.*, 2003). Embora algumas amins biogénicas possam provir directamente das uvas e outras sejam resultantes da

actividade metabólica das leveduras *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* e das bactérias acéticas, normalmente as aminas biogénicas aumentam após a FML (Vidal-Carou *et al.*, 1990; Le Jeune *et al.*, 1995; Soufleros *et al.*, 1998; Lonvaud-Funel, 2001; Torrea-Goni e Ancín-Azpilicueta, 2001; Gardini *et al.*, 2005; Landete *et al.*, 2005; Pramateftaki *et al.*, 2006). Entre as BAL, a actividade descarboxilásica é específica da estirpe e dentro das diferentes espécies de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus* está distribuída aleatoriamente.

No vinho, contudo, os seus teores são muito inferiores aos descritos para outros alimentos, ainda que o etanol possa potenciar o efeito tóxico da histamina, pela inibição das amino oxidases. Actualmente, a maioria dos países da U.E., o Canadá recomendam teores de histamina não superiores a 10 mg/L, enquanto na Alemanha o limite é de 2 mg/L. Os efeitos potenciais nas transações comerciais de vinhos resultantes da imposição destes limites e a procura pelos consumidores cada vez maior de produtos saudáveis, isentos de substâncias tóxicas, devem constituir uma preocupação para os produtores nacionais. Para além da sua toxicidade, as aminas biogénicas, quando em concentrações elevadas, podem conferir alterações desagradáveis detectáveis sensorialmente, como por exemplo a putrescina e a cadaverina com aromas a fruta e carne podre, respectivamente.

O aparecimento de aminas biogénicas no vinho, tem sido associado à existência de aminoácidos precursores, de estirpes com actividade descarboxilásica, de factores que afectam o crescimento dessas estirpes, bem como algumas práticas enológicas (Lonvaud-Funel, 2001; González-Marco e Ancín-Azpilicueta, 2006; Martín-Álvarez *et al.*, 2006) como por exemplo o contacto prolongado com as borras (Lonvaud-Funel, 2001) e até o processo fermentativo. Os vinhos tintos apresentam um teor de aminas geralmente superior ao dos vinhos rosados, brancos e fortificados (Landete *et al.*, 2005; Leitão *et al.*, 2005; Bover-Cid *et al.*, 2006).

A histamina

A histamina é a amina biogénica mais frequentemente associada a intoxicações alimentares devido à sua elevada actividade biológica, provocando dores de cabeça, hipotensão e problemas digestivos (Fernández *et al.*, 2006a). É encontrada em diversos alimentos, nomeadamente, em peixes e derivados, enchidos, queijos, cerveja, vinhos e outros produtos fermentados (Slomkowska e Ambroziak, 2002; Kalac e Krí•ek, 2003; Fernández *et al.*, 2006).

A histidina descarboxilase (HDC, EC 4.1.1.22) é a enzima que converte a histidina a histamina e CO₂. Existem duas classes distintas de histidina descarboxilases: (i) as que requerem piridoxal fosfato como cofactor, presentes nos eucariotas e nas bactérias gram negativas; e (ii) as que utilizam um mecanismo catalítico diferente, baseado num grupo

piruvilo ligado covalentemente ao centro activo, características das bactérias gram positivas (Huynh e Snell, 1985; Vaaler *et al.*, 1986; van Poelje e Snell, 1990 cit. por Lucas *et al.*, 2005). Para além da via da histidina descarboxilase, outra via envolvida na degradação da histidina, a via da histidina amónia-liase (EC.4.3.1.3), tem sido descrita em bactérias. A histidina amónia-liase catalisa a primeira reacção de uma via de degradação que conduz à formação de glutamato. Contudo dentro do grupo das BAL apenas foi detectada em estirpes de *Streptococcus pyogenes* e parcialmente em *Streptococcus thermophilus* (Fernández e Zúñiga, 2006).

O gene que codifica para a histidina descarboxilase (*hdcA*) já foi caracterizado nas seguintes estirpes/ espécies de BAL: *Lactobacillus* sp. estirpe 30a (Vanderslice *et al.*, 1986; Copeland *et al.*, 1989), *Lactobacillus buchneri* (Martín *et al.*, 2005), *Lactobacillus hilgardii* (Lucas *et al.*, 2005), *Oenococcus oeni* (Coton *et al.*, 1998a; 1998b) e *Tetragenococcus muraticus* (GenBank AB125629, AB04087). Este gene está localizado no operão *hdcAB*, onde apresenta a jusante o gene *hdcB* de função desconhecida. O gene que codifica para o transportador histidina/histamina (*hdcP*) está localizado a montante deste operão e, em *Lactobacillus hilgardii*, o gene que codifica para uma histidil-tRNA sintetase (*hisRS*) está localizado a jusante. A comparação destes 'clusters' de genes revela uma elevada semelhança quer na organização quer na sequência em aminoácidos. Este facto, conjuntamente com a distribuição rara e a localização dos genes *hdc* num plasmídeo em *Lactobacillus hilgardii*, sugere que algumas estirpes adquiriram estes genes por transferência horizontal (Fernández e Zúñiga, 2006).

A combinação do transportador histidina/histamina e da histidina descarboxilase forma uma via típica de descarboxilação em bactérias. O transportador permite a entrada do substrato (precursor) para o interior da célula onde é descarboxilado e, simultaneamente, a excreção do produto para o exterior. Assim, a entrada do substrato e a excreção do produto são eventos acoplados (troca precursor/produto). Vias semelhantes foram descritas para outros aminoácidos e para di- e tricarboxilatos (Lucas *et al.*, 2005). Estas vias produzem uma força protomotriz por um mecanismo indirecto, designado por geração de força protomotriz secundária. Os dois componentes da força protomotriz são gerados em passos separados. O potencial de membrana é gerado pelo transportador devido à diferença de carga entre o precursor e o produto, *i.e.* histidina monovalente e histamina divalente. O gradiente de pH é gerado através do consumo de protões na reacção de descarboxilação catalizada pela descarboxilase. A produção de uma força protomotriz pela descarboxilação da histidina e troca electrogénica de histidina/histamina foi demonstrada em *Lactobacillus buchneri* (Molenaar *et al.*, 1993).

A tiramina

A tiramina é uma das aminas biogénicas mais abundantes em produtos alimentares fermentados como queijos, enchidos, cerveja e vinho (Rice e Koeler, 1976; Masson *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2006b, 2007). Diversos problemas toxicológicos têm sido associados à ingestão destes alimentos, resultantes das propriedades vasoactivas e psicoactivas desta amina.

A tirosina descarboxilase (TDC, EC 4.1.1.25) é a enzima responsável pela descarboxilação da tirosina a tiramina. A TDC pertence ao grupo das enzimas dependentes de fosfato de piridoxal (Moreno-Arribas e Lonvaud-Funel, 1999; Lucas e Lonvaud-Funel, 2002). Os genes codificantes para as tirosinas descarboxilases foram isolados e sequenciados em *Carnobacterium divergens* (Coton *et al.*, 2004), *Enterococcus faecalis* (Connil *et al.*, 2002), *Lactobacillus brevis* (Lucas e Lonvaud-Funel, 2002; Lucas *et al.*, 2003) e *Lactococcus lactis* IPLA655 recentemente reclassificada como *Enterococcus durans* IPLA655 (Fernández *et al.*, 2004 e 2007). Lucas *et al.* (2003), num estudo de caracterização do locus *tyrDC* em *Lactobacillus brevis*, identificaram quatro genes contíguos, transcritos na mesma direcção e que codificam para uma tirosil-tRNA sintetase (*tyrRS*), uma tirosina descarboxilase (*tyrDC*) e dois genes que codificam para transportadores secundários, um transportador de tirosina putativo (*tyrP*) e um transportador 'antiporter' Na⁺/H⁺ (*nhaC*).

De acordo com Wolken *et al.* (2006), a combinação dos genes da tirosina descarboxilase e do transporte da tirosina poderiam codificar para uma via secundária de produção de força protomotriz, por um mecanismo equivalente ao apresentado para a histidina descarboxilase. Aliás, este mecanismo de gerar energia metabólica por descarboxilação é comum a uma variedade de descarboxilases (Christensen *et al.*, 1999), podendo o gradiente electroquímico gerado ser usado pela célula para reacções que consomem energia tal como o transporte de nutrientes ou para gerar ATP via ATPase (Konings *et al.* 1997).

Há ainda a salientar a importância que a detecção da tirosina descarboxilase já teve como critério taxonómico na diferenciação de espécies de enterococos. Considerava-se que apenas as estirpes de *Enterococcus faecalis* e não as de *Enterococcus faecium* tinham capacidade de formação de tiramina a partir da tirosina (tdc+). Contudo, Marcobal *et al.* (2004) detectaram esta actividade em estirpes de *Enterococcus faecium* e propuseram a alteração do esquema vigente de identificação das espécies de enterococos do "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology".

A putrescina

A putrescina é conjuntamente com a histamina e com

a tiramina uma das aminas mais abundantes no vinho (Gloria *et al.*, 1998; Lonvaud-Funel, 2001; Leitão *et al.*, 2005; Mangani *et al.*, 2005) e com efeitos relevantes na saúde do consumidor, uma vez que potencia o efeito negativo da histamina (Marcobal *et al.*, 2004). Esta amina biogénica é produzida por estirpes de *Oenococcus oeni* a partir do metabolismo da ornitina e também a partir da arginina (Guerrini *et al.*, 2002; Mangani *et al.*, 2005).

A ornitina descarboxilase (ODC, EC 4.1.1.17) é a enzima responsável pela descarboxilação da ornitina a putrescina. Esta enzima requer fosfato de piridoxal como cofactor. Marcobal *et al.* (2004) identificaram o gene que codifica para esta enzima numa estirpe de *O. oeni*. A partir de arginina, a produção de putrescina pode ser realizada por duas vias: (i) via arginina desaminase e ornitina descarboxilase; ou (ii) via arginina descarboxilase e agmatina desaminase. De acordo com Mangani *et al.* (2005), a produção de putrescina surge em estirpes que possuem o sistema enzimático completo para converter a arginina a putrescina ou pode resultar de uma associação metabiótica, com troca de ornitina, entre estirpes capazes de catabolizar a arginina a ornitina mas incapazes de produzir putrescina e estirpes capazes de produzir putrescina a partir da ornitina mas incapazes de degradar a arginina. Estes autores verificaram ainda que a produção de putrescina por esta associação ocorre após a FML, enquanto que a conversão da ornitina a putrescina, por uma estirpe com ornitina descarboxilase, ocorre simultaneamente com a degradação do ácido málico. A produção de putrescina a partir de agmatina não envolve descarboxilação de aminoácidos ou formação de ureia (Arena e Manca de Nadra, 2001; Alberto *et al.*, 2006).

1.8.4 A selecção de 'starters'

As BAL têm sido usadas empiricamente na produção de alimentos desde há milhares de anos. Contudo, só recentemente foi reconhecido o papel destas bactérias na conservação e preservação de alimentos. De fermentações espontâneas não controladas, no passado, passou-se à utilização de culturas 'starter' com a finalidade de obter produtos de elevada qualidade. Uma cultura 'starter' pode ser definida como uma preparação constituída por um número elevado de células de pelo menos um microrganismo a ser adicionada a uma matéria prima, acelerando e dirigindo o seu processo fermentativo, com o intuito de produzir um alimento fermentado seguro e de elevada qualidade (Leroy e de Vuyst 2004). As culturas 'starter' apresentam-se em diversas formas, dependendo do tipo de produto e aplicação, estando disponíveis em líquido, congeladas ou em pó (liofilizadas), em diferentes concentrações, que permitem quer o uso directo no produto final ou após reactivação.

Actualmente, as culturas 'starter' são utilizadas de

uma forma regular em diversos alimentos, sendo a indústria dos lacticínios a maior utilizadora (Hansen, 2002). Nos vinhos, apesar da maior vulgarização das culturas 'starter' de leveduras, já existem disponíveis no mercado europeu e americano (Canadá e E.U.A.), desde 1980, culturas comerciais de 'starter' de BAL para promoverem/realizarem a FML (Henick-Kling, 1995). A espécie predominante é obviamente *O. oeni*, contudo existem algumas culturas 'starter' de *Pediococcus* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Lb. hilgardii* e *Lb. brevis*. As preparações são constituídas apenas por uma estirpe ou por diferentes estirpes (Davis *et al.*, 1985; Henick-Kling, 1995; Alegría *et al.*, 2004; Vaquero *et al.*, 2004).

Alguns dos critérios aplicados na selecção de

bactérias lácticas para inoculação de vinhos são apresentados no Quadro IV. Recentemente, outros critérios têm sido sugeridos por vários investigadores, dos quais se destacam, a não produção de precursores de carbamato de etilo (du Toit e Pretorius, 2000), a presença e actividade de algumas enzimas, como tanases (Vaquero *et al.*, 2004) e α -glucosidases (Grimaldi *et al.*, 2005a,b), para respectivamente reduzir a adstringência e aumentar a fracção aromática dos vinhos.

Culturas 'starter' universais versus regionalidade

A utilização de culturas 'starter' universais para produzir produtos diferentes tem sido questionada por vários autores, face à manutenção da tipicidade dos

QUADRO II

Critérios usados na selecção de BAL para induzir a FML no vinho (adaptado de: Davis *et al.*, 1985; Buckenhüskes, 1993; Henick-Kling, 1995)

Selection criteria for LAB for induction MLF in wine (adapted from Buckenhüskes, 1993)

Critérios de 1ª ordem

Resistência a pH baixo (capacidade em crescer a valores de pH entre 3,0 e 5,0)

Resistência ao etanol

Tolerância a baixas temperaturas (capacidade em crescer a temperaturas entre 10 e 15°C)

Metabolismo limitado das hexoses e pentoses

Critérios de 2ª ordem

Contagem de organismos vivos após propagação num meio padronizado

Tempo para propagação num meio padronizado

Rendimento por propagação num meio padronizado

Cinética de sobrevivência num vinho padronizado

Cinética da degradação do malato numa solução tampão de ácido tartárico (pH 4,5) e num vinho padronizado

Tolerância à liofilização

Critérios de 3ª ordem

Interações limitadas com as leveduras da fermentação alcoólica

Resistência aos fagos

Resistência ao SO₂ (concentrações de 50 mg/L)

Resistência aos pesticidas

Não produção de amins biogénicas

Metabolismo do citrato em condições aeróbias e anaeróbias

Potencial para formar diacetilo e acetoína

Potencial limitado para formar ácidos voláteis a partir das hexoses e pentoses

Reduzida ou não formação de ácido acético

Metabolismo limitado de ácidos orgânicos do vinho (*e.g.* succinato)

Não degradação do glicerol

Não produção de gostos desagradáveis

Não produção de mucilagens

Alterações sensoriais do vinho (produção de boas características organolépticas, por exemplo aumentando sabores frutados)

produtos obtidos. Por exemplo, o uso das mesmas culturas 'starter' comerciais para fabrico de diferentes tipos de queijo pode conduzir a produtos finais que são demasiado semelhantes (Gonzalez *et al.*, 2003; Topisirovic *et al.*, 2006). Neste contexto seria preferível o uso de culturas 'starter' autóctones seleccionadas, permitindo a melhoria da qualidade microbiológica sem alterar significativamente as características de tipicidade (Topisirovic *et al.*, 2006).

Também nos vinhos, alguns investigadores defendem a utilização de leveduras seleccionadas regionalmente. Estas desempenham um papel fundamental, enaltecendo as propriedades sensoriais dos vinhos regionais típicos, comparativamente às culturas 'starter' universais desenvolvidas essencialmente para produzirem elevados teores alcoólicos, sem produção de sabores desagradáveis e garantirem produtos estáveis (De Bortoli *et al.*, 2007). Estes autores salientam a preocupação de nos projectos mais recentes de selecção de leveduras para vinificação, se dar relevo às estirpes autóctones ecotípicas, tentando preservar a biodiversidade nas áreas de selecção e ao mesmo tempo garantir no vinho características ligadas à região de proveniência.

Algo semelhante se pode extrapolar para as BAL. Num estudo sobre a dinâmica de populações de bactérias maloláticas indígenas numa adega grega durante três vindimas consecutivas, Pramateftaki *et al.* (2006) observaram a prevalência de uma estirpe indígena com características desejáveis, indicando um elevado grau de adaptabilidade às condições de vinificação, o que de acordo com os autores deverá ser um critério a usar na selecção de estirpes para uso comercial. Zapparoli *et al.* (2004), baseados nos resultados obtidos em ensaios de microvinificação conduzidos por estirpes de *O. oeni* indígenas da região italiana de Valpolicella, defendem a utilização de 'starter' regionais em alternativa aos 'starter' comerciais universais menos eficientes.

Os métodos de 'fingerprinting' e a rastreabilidade

A rastreabilidade dos alimentos tornou-se um assunto de grande relevância em relação a condições de segurança, qualidade e tipicidade. Estas questões ganham ainda mais ênfase quando em causa estão produtos típicos de Denominação de Origem Protegida (DOP). Com o objectivo de assegurar a genuidade dos produtos, evitar adulterações e proteger produtores e consumidores de fraudes surge a necessidade de usar ferramentas analíticas capazes de caracterizar verdadeiramente os produtos típicos e traçar as suas áreas de produção (Bonizzi *et al.*, 2007).

A aplicação de métodos de 'fingerprinting', dirigidos quer para o fenótipo quer para o genótipo, na caracterização do microbiota autóctone poderá constituir uma alternativa aos métodos de química analítica (e.g. análise de razões isotópicas). A

abordagem clássica de isolamento e cultura, aliada a métodos de diferenciação de estirpes, permite uma caracterização dos produtos em função dos microrganismos cultiváveis associados e a exploração do potencial biotecnológico destes microrganismos. O 'fingerprinting' das comunidades microbianas que constituem o microbiota associado a cada produto, por uma abordagem molecular directa, poderá constituir uma forma alternativa de conseguir a sua rastreabilidade.

Lopes *et al.* (1999), recorrendo à aplicação de redes neuronais, propuseram a utilização dos perfis metabólicos de estirpes isoladas de dois produtos tradicionais (queijo de ovelha e chouriço) produzidos em diferentes regiões de Portugal, para discriminar a origem dos produtos, *i.e.* definir as regiões de origem protegida DOP. Bonizzi *et al.* (2007) propõem a técnica de ITS-PCR 'fingerprinting', aplicada às comunidades microbianas que constituem o microbiota dos queijos, como a ferramenta mais apropriada para traçar (delinear) a origem geográfica do queijo Mozzarella.

O estudo da expressão génica na selecção de 'starters'

Diversos investigadores têm estudado os mecanismos de tolerância aos factores de stress induzidos pelo vinho. Uma melhor compreensão dos mecanismos de tolerância a múltiplos factores de stress deverá permitir conhecer a base das respostas adaptativas e preparar as BAL para os processos industriais (Spano e Massa, 2006). São vários os exemplos de trabalhos que, através de RT-PCR, RT-qPCR e Western-blot, detectam a expressão de genes ou a presença de proteínas, produzidas nas condições de stress impostas pelo vinho, em estirpes de *Oenococcus oeni* (Jobin *et al.*, 1999; Guzzo *et al.*, 2000; Bourdineaud *et al.*, 2003; Fortier *et al.*, 2003; Beltramo *et al.*, 2004; Bourdineaud *et al.*, 2004; Coucheney *et al.*, 2005; Desroche *et al.*, 2005; Beltramo *et al.*, 2006) e *Lactobacillus plantarum* (Spano *et al.*, 2004).

Analogamente, foram realizados alguns estudos preliminares, para avaliar o efeito dos factores abióticos de stress do vinho (pH, temperatura, etanol, sulfuroso) sobre a regulação da expressão de genes que codificam para enzimas com interesse enológico, nomeadamente α -glucosidase (Spano *et al.*, 2005; Inês, 2007), histidina descarboxilase (Landete, 2005) e enzimas da via da arginina desaminase (Bourdineaud, 2006; Inês, 2007). Este tipo de abordagem será uma mais valia na selecção de estirpes a utilizar como culturas 'starter' em vinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberto M., Arena M., Manca de Nadra M., 2006. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds *Food Control* **18** (8), 898-893.
- Alegria E., Lopez I., Ruiz J., Saenz J., Fernandez E., Zarazaga M., Dizy M., Torres C., Ruiz-Larrea F., 2004. High tolerance of

- wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol *FEMS Microbiol Lett.* **230** (1), 53-61.
- Amerine M.A., Kunker R.E., 1968. Microbiology of winemaking. *Annu Rev Microbiol.* **22**, 323-358.
- Arena M., Manca de Nadra M., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J Appl Microbiol* **90** (2), 158-162.
- Arena M., Manca de Nadra M., 2005. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Res.Microbiol* **156** (8), 858-864.
- Arena M., Manca de Nadra M., Munoz R., 2002. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of the *arcABC* genes. *Gene* **301** (1-2), 61-66.
- Arena M., Saguir F., Manca de Nadra M., 1999. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Int.J Food Microbiol* **52** (3), 155-161.
- Arnink K., Henick-Kling T., 2005. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on successful malolactic conversion in wine. *Am.J.Enol.Vitic.* **56** (3), 228-237.
- Azevedo Z., Couto J., Hogg T., 2002. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Lett. Appl. Microbiol.* **34** (1), 32-36.
- Barbagallo R., Spagna G., Palmeri R., Torriani S., 2004. Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **34** (3-4), 292-296.
- Barcelona-Andres B., Marina A., Rubio V., 2002. Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanisms of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **184** (22), 6289-6300.
- Barthelmebs L., Divies C., Cavin J., 2001. Molecular characterization of the phenolic acid metabolism in the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*. *Lait* **81**, 161-171.
- Barthelmebs L., Lecomte B., Divies C., Cavin J., 2000. Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator. *J Bacteriol.* **182** (23), 6724-6731.
- Bartowsky E., 2005. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation - moving into the molecular arena. *Aust. J. Grape and Wine Res* **11** (2), 174-187.
- Bartowsky E., Henschke P., 1999. Use of a polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic bacterium *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) in grape juice and wine samples. *Aust. J. Grape and Wine Res.* **5**, 39-44.
- Bartowsky E., Henschke P., 2000. Management of malolactic fermentation for the 'buttery' diacetyl flavour in wine. *The Austrn. Grapegrower and Winemaker* (28th Technical Issue 438a), 58-67.
- Bartowsky E., Henschke P., 2004. The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* **96** (3), 235-252.
- Bartowsky E., Burvill T., Henschke P., 1997. Diacetyl in wine: Role of malolactic bacteria and citrate. *The Aust. Grapegrower and Winemaker* (25th Technical Issue 402a), 130-135.
- Bartowsky E., Henschke P., 1995. Malolactic fermentation and wine flavour. *Aust. Grapegrower and Winemaker Annual Technical Issue*, 83-94.
- Beltramo C., Desroche N., Tourdot-Marechal R., Grandvalet C., Guzzo J., 2006. Real-time PCR for characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. *Res.Microbiol* **157** (3), 267-274.
- Beltramo C., Grandvalet C., Pierre F., Guzzo J., 2004. Evidence for multiple levels of regulation of *Oenococcus oeni* *clpP-clpL* locus expression in response to stress. *J Bacteriol.* **186** (7), 2200-2205.
- Bhatia Y., Mishra S., Bisaria V.S., 2002. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22** (4), 375-407.
- Blasco L., Ferrer S., Pardo I., 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria *FEMS Microbiol.Lett.* **225**, 115-123.
- Bodmer S., Imark C., Kneubühl M., 1999. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Commentar. Inflamm. Res.* **48**, 296-300.
- Boido E., Lloret A., Medina K., Carrau F., Dellacassa E., 2002. Effect of β -glucosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *J Agric.Food Chem* **50** (8), 2344-2349.
- Bonizzi I., Feligini M., Aleandri R., Enne G., 2007. Genetic traceability of the geographical origin of typical Italian water buffalo Mozzarella cheese: a preliminary approach. *J Appl Microbiol.* **102**, 667-673.
- Bourdineaud J., 2006. Both arginine and fructose stimulate pH-independent resistance in the wine bacteria *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol.* **107** (3), 274-280.
- Bourdineaud J., Nehme B., Tesse S., Lonvaud-Funel A., 2003. The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2512-2520.
- Bourdineaud J., Nehme B., Tesse S., Lonvaud-Funel A., 2004. A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine. *Int J Food Microbiol.* **92** (1), 1-14.
- Bover-Cid S., Iquierdo-Pulido M., Mariné-Font A., Vidal-Carou M., 2006. Biogenic mono-, diand polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chem.* **96** (1), 43-47.
- Buckenhüskes H.J., 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 253-272.
- Cavin J., Andioc V., Etievant P., Divies C., 1993. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**, 76-80.
- Cavin J., Barthelmebs L., Divies C., 1997. Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Appl Environ Microbiol.* **63** (5), 1939-1944.
- Chambel L.M.M., 2001. *Análise taxonómica polifásica em Leuconostoc e Weissella*. 284 p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Chatonnet P., Viala C., Dubourdiou D., 1997. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 443-448.
- Christensen J., Dudley E., Pederson J., Steele J., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **76** (1-4), 217-246. 153
- Claisse O., Lonvaud-Funel A., 2001. Detection de bactéries lactiques produisant du 3-hydroxypropionaldehyde (precursur d'acroleine) à partir du glycerol par tests moléculaires. *Lait* **81**, 173-181.
- Clarridge J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17** (4), 840-62.
- Coenye T., Vandamme P., 2003. Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic

- acid bacteria as a test case. *Microbiol.* **149** (Pt 12), 3507-3517.
- Colagrande O., Silva A., Fumi M., 1994. Recent applications of biotechnology in wine production. *Biotechnol. Prog.* **10**, 2-18.
- Connil N., Le Breton Y., Dousset X., Auffray Y., Rince A., Prevost H., 2002. Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (7), 3537-3544.
- Copeland W.C., Domena J.D., Robertus J.D. 1989. The molecular cloning, sequence and expression of the *hdcB* gene from *Lactobacillus* 30A. *Gene.* **85**, 259-265.
- Costello P., Henschke P., 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 hildargii* DSM 20176. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7079-7087.
- Costello P.J., Lee T.H., Henschke P.A., 2001. Ability of lactic acid bacteria to produce N-heterocycles causing mousy off-flavour in wine. *Aust. J. Grape and Wine Res.* **7**, 160-167.
- Coton E., Rollan G., Lonvaud-Funel A., 1998b. Histidine carboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *J Appl Microbiol* **84** (2), 143-151.
- Coton E., Rollan G., Bertrand A., Lonvaud-Funel A., 1998a. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. *Am.J.Enol.Vitic.* **49** (2), 199-204.
- Cotton M., Coton E., Lucas P., Lonvaud A., 2004. Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.* **21**: 125-130.
- Cotter P., Hill, C. 2003. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol.Biol.Rev.* **67** (3): 429-453.
- Coucheney F., Desroche N., Bou M., Tourdot-Marechal R., Dumontier S., Guzzo J., 2005. A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int J Food Microbiol.* **105** (3): 463-470.
- Couto J.A., Hogg T.A., 1994. Diversity of ethanol-tolerant lactobacilli isolated from Douro fortified wine: Clustering and identification by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. *J Appl Bacteriol.* **76** (5): 487-491.
- Cox D.J., Henick-Kling T., 1989. Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J Bacteriol* **171** (10): 5750-5752.
- Cox D.J., Henick-Kling T., 1990. A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding, ATP, malolactic enzyme systems. *Am.J.Enol.Vitic.* **41** (3): 215-218.
- Cox D.J., Henick-Kling, T., 1995. Protonmotive force and ATP generation during malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 319-323.
- Crowell E.A., Guymon J.F., 1975. Wine Constituents Arising from Sorbic Acid Addition, and Identification of 2-Ethoxyhexa-3,5-Diene as Source of Geranium-Like Off-Odor. *Am. J. Enol. Vitic.* **26**: 97-102.
- Curk M.C., Boeufgras J.M., Decaris B., Gavini F., Kersters K., Larpent J.P., Le Bourgeois P., Renault P., de Roissart. H., Rouvier C., 1994. Méthodes d'identification des bactéries lactiques. In: *Bactéries Lactiques* 141-168. de Roissart H.e Luquet F.M. (Coordonnateurs), Vol. I. Lorica, Uriage, France.
- Davis C., Silveira N.F., Fleet G.H., 1985. Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl Environ Microbiol* **50** (4): 872-876.
- Davis C., Wibowo D., Fleet G., Lee T., 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**: 137-142.
- De Bortoli E., Bovo B., Giacomini A., Corich V., 2007. Evaluation of enological characteristics of autochthonous yeast strains selected for the production of Prosecco II.19 VQPRD wine. 8th International Symposium of Enology of Bordeaux
- De las Rivas B., Marcobal A., Munoz R., 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiol Lett* **244** (2): 367-372. 155
- De Revel G., Bertrand A., 1993. A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. *J. Sci Food Agric.* **61**: 267-272.
- Delaherche A., Bon E., Dupé A., Lucas M., Arvelier B., De Daruvar A., Lonvaud-Funel A., 2006. Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* strains determined by sequence analysis of target genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**: 394-403.
- Delaherche A., Claisse O., Lonvaud-Funel A., 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 910-915.
- Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M.C. e Janssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: *Bactéries Lactiques*. 25-116. de Roissart H.e Luquet F.M. (Coordonnateurs), Vol. I. Lorica, Uriage, France.
- Desroche N., Beltramo C. Guzzo J., 2005. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J Microbiol Methods* **60** (3): 325-333.
- Dicks L., van Vuuren H., 1988. Identification and physiological characteristics of heterofermentative strains of *Lactobacillus* from South African red wines. *J. Appl. Bacteriol.* **64**: 505-513.
- Dicks L., Dellaglio F., Collins M., 1995b. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **45**: 395-397. 156
- Dicks L., Loubser P., Augustyn O., 1995a. Identification of *Leuconostoc oenos* from South African fortified wines by numerical analysis of total soluble cell protein patterns and DNA-DNA hybridizations. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 43-48.
- Dicks L.M.T., Vuuren H.J.J., Dellaglio F., 1990. Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40** (1): 83-91.
- D'Incecco N., Bartowsky E., Kassara S., Lante A., Spettoli P., Henschke P., 2004. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiology* **21** (3): 257-265.
- Divol B., Tonon T., Morichon S., Gindreau E., Lonvaud-Funel A., 2003. Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *J Appl Microbiol.* **94** (4): 738-746.
- Du Plessis H., Dicks L., Lambrechts M., Pretorius I., Du Toit M., 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *Int. J. Food Microbio.* **91**: 19-29.
- Du Toit M., Pretorius I., 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons for nature's own arsenal *South African J. Enol. Vitic.* **21** (Special Issue): 74-96.
- Edinger W.D., Splittstoesser D.F., 1986. Sorbate tolerance by lactic acid bacteria associated with grapes and wine. *Journal of Food Science* **51**, 1077-1078.
- Edwards C.G., Collins M.D., Lawson P.A., Rodriguez A.V., 2000. *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *Int J Syst Evol Microbiol* **50** (Pt 2): 699-702.
- Edwards C.G., Haag K.M., Collins M.D., 1998a. Identification and characterization of two lactic acid bacteria associated with

- sluggish/stuck fermentations. *Am.J.Enol.Vitic.* **49** (4): 445-448.
- Edwards C.G., Haag K.M., Collins M.D., Hutson R.A., Huang Y.C., 1998b. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *J Appl Microbiol* **84** (5): 698-702.
- Endo A., Okada S., 2006. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2345-2348.
- Fernández M. e Zúñiga M., 2006. Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol.* **32** (3):155-83.
- Fernandez M., del Rio B., Linares D.M., Martin M.C., Alvarez M.A., 2006a. Real-Time polymerase chain for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *J. Dairy Sci.* **89**: 3763-3769.
- Fernandez M., Florez A.B., Linares D.M., Mayo B., Alvarez M.A., 2006b. Early PCR detection of tyramine-producing bacteria during cheese production. *J. Dairy Res.* **73**: 318-321.
- Fernandez M., Linares D.M., Alvarez M.A., 2004. Sequencing of the tyrosine decarboxylase gene cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating lactic acid bacteria. *J. Food Protec.* **67** (11): 2521-2529.
- Fernandez M., Linares D.M., Rodriguez A., Alvarez M.A., 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**: 1400-1406.
- Fleet G.H., 1993. The microorganisms of winemaking, isolation enumeration and identification. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. 1-25. Fleet G.H., (ed.), Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland,
- Fortier L., Tourdot-Marechal R., Divies C., Lee B., Guzzo J., 2003. Induction of *Oenococcus oeni* H⁺-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiol.Lett.* **222** (2): 165-169.
- Fugelsang K.C., 1997. *Wine Microbiology*. 245 p. Chapman & Hall. London.
- Galland D., Tourdot-Maréchal R., Abraham M., Chu K.S., Guzzo J., 2003. Absence of malolactic activity is a characteristic of H⁺-ATPase-deficient mutants of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* **69** (4), 1973-1979.
- Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M., Mastrocola D., Suzzi G., 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control* **16** (7), 609-616.
- Garvie E.I., 1986. Genus *Leuconostoc*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2 – section 12 – Gram – Positive cocci 1071-1075. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore.
- Gindreau E., Walling E., Lonvaud-Funel A., 2001. Direct polymerase chain reaction detection of *Pediococcus damnosus* strains in wine. *J Appl Microbiol* **90** (4), 535-542.
- Gloria M., Watson B., Simon-Sarkadi L., Daeschel M., 1998. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet sauvignon wines. *Am.J.Enol.Vitic.* **49** (3), 279-282.
- Gonzalez J., Mas M., Tabla R., Morige J., Roa I., Rebollo J.E., Cáceres P., 2003. Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Iborea goat's milk cheeses. *Lait* **83**: 193-202.
- González-Candelas L., Aristoy M.C., Polaina J., Flors A., 1989. Cloning and characterization of two genes from *Bacillus polymyxa* expressing β -glucosidase activity in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **55**: 3173-3177.
- González-Marco A., Ancín-Azpilicueta C., 2006. Influence of Lees Contact on Evolution of Amines in Chardonnay Wine. *Journal of Food Science* **71** (9), C544-C548.
- Grimaldi A., Bartowsky E., Jiranek V., 2005a. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* **105** (2): 233-244.
- Grimaldi A., Bartowsky E., Jiranek V., 2005b. Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology *J Appl Microbiol* **99** (5): 1061-1069.
- Grimaldi A., McLean H., Jiranek V., 2000. Identification and partial characterization of glycosidase activities of commercial strains of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Am.J.Enol.Vitic.* **51** (4): 362-369.
- Guarneri T., Rossetti L., Giraffa G., 2001. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, **33**:377-381.
- Guerrini S., Bastianini A., Blaiotta G., Granchi L., Moschetti G., Coppola S., Romano P., Vincenzini M., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int J Food Microbiol* **83** (1): 1-14.
- Guerrini S., Bastianini A., Granchi L., Vincenzini M., 2002. Effect of oleic acid on *Oenococcus oeni* strains and malolactic fermentation in wine. *Current Microbiol.* **44** (1): 5-9.
- Günata Y., Bayonove C., Cordonnier R., Arnaud A., Galzy P., 1990. Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases. *J.Sc.Food Agric.* **50**: 499-506.
- Günata Z., 1994. Étude de exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'amines du raisin de nature glycosidique. *Rev.Oenol.Tech.Vitivinic.Oenol.* **74**: 22-27.
- Guzzo J., Jobin M., Delmas F., Fortier L., Garmyn D., Tourdot-Marechal R., Lee B., Divies C., 2000. Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *Int.J Food Microbiol* **55** (1-3): 27-31.
- Hansen E.B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int J Food Microbiol* **78** (1-2): 119-131.
- Henick-Kling T., 1995. Control of malolactic fermentation in wine: Energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. *Journal of Applied Bacteriology* **9** (Suppl.): 29S-37S.
- Hirschhäuser S., Fröhlich J., Gneipel A., Schonig I., König H., 2005. Fast protocols for the 5S rDNA and ITS-2 based identification of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol Lett*, **244**: 165-171.
- Huynh Q., Snell E., 1985. Pyruvoyl-dependent histidine decarboxylases. Preparation and amino acid sequences of the beta chains of histidine decarboxylase from *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*. *J Biol.Chem* **260** (5): 2798-2803.
- Inês, A.F.H. 2007. *Abordagem polifásica na caracterização e seleção de bactérias do ácido láctico de vinhos da Região Demarcada do Douro*. 198 p. Tese de Doutorado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Inglede W.M., Kunke R.E., 1985. Factors Influencing Sluggish Fermentations of Grape Juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**: 65-76. 160
- Jackman P.J.H., 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: *Chemical methods in bacterial systematics*. 115-129. Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (Eds). Academic Press, London
- Jensen K., Edwards C., 1991. Modification of the API rapid CH system for characterization of *Leuconostoc oenos*. *Am.J.Enol.Vitic.* **42** (3): 274-277.
- Jobin M., Garmyn D., Divies C., Guzzo J., 1999. Expression of the *Oenococcus oeni trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. *Microbiology* **145** (Pt 5): 1245-1251.
- Kalac P., Krizec M., 2003. A Review of biogenic amines and polyamines in beer. *J. Inst. Brew.* **109** (2): 123-128.

- Kelly W., Asmundson R., Hopcroft D., 1989. Growth of *Leuconostoc oenos* under anaerobic conditions. *Am.J.Enol.Vitic.* **40**: 277-282.
- Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Turchini R., Peters S. A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Lankhorst R.M.K., Bron P.A., Hoffer S.M., Groot M.N.N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W.M., Siezen R.J. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (4): 1990-1995.
- Kodama S., Suzuki S., de la Teja P., Yotsuzuka F., 1994. Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wine during storage. *Am.J.Enol.Vitic.* **45**: 17-24.
- Konings W.N. 2006. Microbial transport: adaptations to natural environments. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **90**(4):325-42.
- Konnings W.N., Lolkema J.S., Bolhuis H., van Veen H.W., Poolman B., Driessen A.J.M., 1997. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 117-128.
- Koort J., 2006. *Polyphasic taxonomic studies of lactic acid bacteria associated with non-fermented meats*. 62p. Academic Dissertation Ph.D. thesis. Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki.
- Kroppenstedt R.M., 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. In: Bacterial Systematics 173-199. Goodfellow M., Minnikin D.E. (Eds.). Academic Press, London.
- Kunkee R.E., 1991. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microb. Rev.*, **88**: 55-72.
- Labarre C., Diviès C., Guzzo J., 1996. Genetic organization of the *mle* locus and identification of a *mleR*-like gene from *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol* **62** (12): 4493-4498.
- Lafon-Lafourcade S., Joyeux A., 1979. Techniques simplifiées pour le dénombrement et l'identification des microorganismes vivants dans les mouts et les vins. *Connaissance Vigne Vin* **13**(4): 295-310.
- Landete J.M., Ferrer S., Pardo I., 2005. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *J Appl Microbiol* **99** (3): 580-586.
- Landete J.M., 2005. *Estudio y caracterización molecular de la producción de aminas biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enológico*. 148 p. Tese de Doutoramento, Universitat de València.
- Le Jeune C.L., Lonvaud-Funel A., Ten Brink B., Hofstra H., van der Vossen J.M. 1995. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *J Appl Bacteriol* **78** (3): 316-326.
- Lechiancole T., Blaiotta G., Messina D., Fusco V., Villani F., Salzano G., 2006. Evaluation of intra-specific diversities in *Oenococcus oeni* through analysis of genomic and expressed DNA. *Syst Appl Microbiol* **29** (5): 375-381.
- Leitão M., Marques A., San Romão M., 2005. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control* **16** (3): 199-204.
- Leitão M., Teixeira H., Barreto Crespo M., San Romão M., 2000. Biogenic amines occurrence in wine. Amino acid decarboxylase and proteolytic activities expression by *Oenococcus oeni*. *J Agric.Food Chem.* **48** (7): 2780-2784.
- Leroy F., De Vuyst L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15** (2): 67-78.
- Li H., Zhang C., Liu Y., 2006. Species attribution and distinguishing strains of *Oenococcus oeni* isolated from Chinese wines *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 515-518.
- Liu S., 1993. Arginine metabolism in malolactic wine lactic acid bacteria and its oenological implications. PhD thesis. Massey University, New Zealand.
- Liu S., 2002. A review: malolactic fermentation in wine - beyond deacidification *J. Appl. Microbiol.* **92** (4): 589-601.
- Liu S., Pilone G., 1998. A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *J Appl Microbiol.* **84** (4): 315-327.
- Lonvaud-Funel A., 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **199**(1), 9—13.
- Lonvaud-Funel A., Joyeux A., 1994. Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J Appl Bacteriol.* **77** (4): 401-407.
- Lopes M., Pereira C., Rodrigues F., Martins M., Mimoso M., Barros T., Figueiredo Marques J., Tenreiro R., Almeida J., Barreto Crespo M., 1999. Registered designation of origin areas of fermented food products defined by microbial phenotypes and artificial neural networks. *Appl Environ.Microbiol* **65** (10): 4484-4489.
- Lopez I., Ruiz-Larrea F., Coccolin L., Orr E., Phister T., Marshall M., Van der Gheynst J., Mills. D.A., 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6801-6807.
- Lucas P., Lonvaud-Funel A., 2002. Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol Lett.* **211** (1): 85-89.
- Lucas P., Landete J., Coton M., Coton E., Lonvaud-Funel A., 2003. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria *FEMS Microbiol Lett.* **229** (1): 65-71.
- Lucas P., Wolken W., Claisse O., Lolkema J., Lonvaud-Funel A., 2005. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl Environ Microbiol* **71** (3): 1417-1424.
- Manca de Nadra M., Strasser de Saad A., 1995. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine, *Int. J. Food Microbiol.* **27**:101-106.
- Manca de Nadra M., Arena M., Saguir F., 2003. Nutritional requirements and amino acids utilization by lactic acid bacteria from wine - A short review. *Food, Agriculture & Environmental* **1** (34): 76-79.
- Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M., 2005. Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Curr.Microbiol* **51** (1) 6-10.
- Mansfield A., Zoecklein B., Whiton R., 2002. Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am.J.Enol.Vitic.* **53** (4): 303-307.
- Marcobal A., de las Rivas B., Moreno-Arribas M.V., Muñoz R., 2006b. Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM83. *Appl Environ Microbiol.* **72** (12): 7954-7958.
- Marcobal A., de las Rivas B., Moreno-Arribas M.V., Muñoz R., 2004. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiol Lett* **239** (2): 213-220.
- Marcobal A., Martín-Alvarez P., Polo M., Muñoz R., Moreno-Arribas M., 2006a. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *J. Food Prot.* **69**: 397-404.
- Marquis R., Bender G., Murray D., Wong A., 1987. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Appl.Environ.Microbiol.* **53** (1): 198-200.
- Martin M., Fernandez M., Linares D., Alvarez M., 2005. Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the

- histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology* **151** (4): 1219-1228.
- Martín-Álvarez P., Marcobal A., Polo C., Moreno-Arribas M.V., 2006. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *Eur. Food Res. Technol.* **222**: 420-424.
- Martineau B., Henick-Kling T., 1995. Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J. Appl. Bacteriol.* **78**: 526-536.
- Mascarenhas M.A., 1984. The Occurrence of Malolactic Fermentation and Diacetyl Content of Dry Table Wines from Northeastern Portugal. *Am. J. Enol. Vitic.* **35**:1:49-51.
- Masson F., Talon R., Montel M., 1996. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **32** (1-2): 199-207.
- Mateo J.J., Jiménez M., 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr A* **881** (1-2): 557-567.
- Matthews A., Grimaldi A., Walker M., Bartowsky E., Grbin P., Jiranek V., 2004. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl Environ. Microbiol.* **70** (10): 5715-5731.
- McMahon H., Zoecklein B., Fugelsang K., Jasinski Y., 1999. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **23** (3): 198-203.
- Mendes Ferreira A., Inês A., Mendes Faia A., 2001. Actividade glucosídica de leveduras isoladas de mostos e vinhos da região do Douro (1.as Jornadas do ICETA). UTAD. Vila Real de Trás-os-Montes.
- Mendes-Faia A. 1990. Caracterização química de vinhos inoculados com bactérias lácticas. *Ciência Tec. Vitic.* **9** (1-2): 43-52.
- Mendes-Faia M., 1991. *Tecnologia de vinhos: programa, conteúdo e métodos de ensino.*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Mills D.A., Rawsthorne H., Parker C., Tamir D., Makarova K., 2005. Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiol. Rev.* **29** (3) 465-475.
- Mira de Orduna R., Patchett M., Liu S., Pilone G., 2001. Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (4): 1657-1662.
- Molenaar D., Bosscher J.S., ten Brink B., Driessen A.J., Konings W.N., 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J. Bacteriol.* **175**: 2864-2870.
- Moreno-Arribas M., Polo M., Jorganes F., Munoz R., 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.* **84** (1): 117-123.
- Moreno-Arribas V., Lonvaud-Funel A., 1999. Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. *FEMS Microbiol. Lett.* **180** (1): 55-60.
- Moreno-Arribas V., Lonvaud-Funel A., 2001. Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine. *FEMS Microbiol. Lett.* **195** (1): 103-107.
- Moreno-Arribas V., Torlois S., Joyeux A., Bertrand A., Lonvaud-Funel A., 2000. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *J. Appl. Microbiol.* **88** (4): 584-593.
- Neeley E., Phister T., Mills D., 2005. Differential Real-Time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8954-8957.
- Nehmé B., Ganga M., Lonvaud-Funel A., 2006. The arginine deiminase locus of *Oenococcus oeni* includes a putative arginyl-tRNA synthetase ArgS2 at its 3'-end. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**: 590-597.
- Olive D., Bean P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37** (6): 1661-1669.
- Olsen E.B., Russell J.B., Henick-Kling T., 1991. Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis for energy derivation from malolactic fermentation. *J. Bacteriol.* **173** (19): 6199-6206.
- Osborne J.P., Dube Morneau A., Mira de Orduna R., 2006. Degradation of free and sulfur-dioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine. *J. Appl. Microbiol.* **101** (2): 474-479.
- Osborne J.P., Mira D.O., Pilone G., Liu S., 2000. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **191** (1): 51-55.
- Ough C.S., Crowell E.A., Gutlove B.R., 1988. Carbamyl compound reactions with ethanol. *American Journal of Enology and Viticulture*, **39** (3): 239-242.
- Palmeri R., Spagna G., 2007. β -glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enz. Microbiol. Technol.* **40** (3): 382-387.
- Pardo I., García M., Zúñiga M., Uruburu F., 1988. Evaluation of API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.* **39** (4): 347-350.
- Patarata L., Pimentel M., Pot B., Kersters K., Faia A.M. 1994. Identification of lactic acid bacteria isolated from Portuguese wines and musts by SDS-PAGE. *J. Appl. Bacteriol.* **76**: 288-293.
- Pinzani P., Bonciani L., Pazzagli M., Orlando C., Guerrini S., Granchi L., 2004. Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Let. Appl. Microbiol.* **38**: 118-124.
- Pramateftaki P., Metafa M., Kallithraka S., Lanaridis P., 2006. Evolution of malolactic bacteria and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentations in a Greek winery. *Let. Appl. Microbiol.* **43** (2): 155-160.
- Priest F., Austin B., 1993. *Modern Bacterial Taxonomy*. 2nd ed. Chapman & Hall. London. Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand, A. & Lonvaud-Funel, A. (2004) - Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* **96** (5): 1176-1184.
- Pripis-Nicolau L., De Revel G., Bertrand A., Lonvaud-Funel A., 2004. Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* **96** (5): 1176-1184.
- Quere F., Deschamps A., Urdaci M., 1997. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* **82** (6): 783-790.
- Radler F., Fath K., 1991. Histamine and other biogenic amines in wines. International Symposium on nitrogen in grapes and wine: 185-195.
- Reguant C., Bordons A., 2003. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **95** (2): 344-353.
- Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A., 2006. *rpoB* gene: A target for identification of LAB cocci by PCR-DGGE and melting curves analyses in real time PCR. *J. Microbiol.* **67**(1):162-70.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B., Lonvaud A., 2006. *Handbook of Enology - The Microbiology of Wine and Vinifications*. Vol. 1, 441 p. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.

- Rice S., Koehler P., 1976. Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus species* and the production of tyramine in fermented sausages. *J. Milk Food Technol.* **39** (3): 166-169.
- Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I., 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* **26** (3): 412-422.
- Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I., 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55** (Pt 1): 197-207.
- Rodríguez H., de las Rivas B., Muñoz R., 2007. Efficacy of *recA* gene sequence analysis in the identification and discrimination of *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from stuck wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **115**: 70-78.
- Rodríguez M., Lopes C., van Broock M., Valles S., Ramon D., Caballero A., 2004. Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J. Appl. Microbiol.* **96** (1) 84-95.
- Rollan G., Coton E., Lonvaud-Funel A., 1995. Histidine decarboxylase activity of *Leuconostoc oenos* 9204. *Food Microbiol.* **12**: 455-461.
- Rosi I., Domizio P., Vinella M., Salicone M., 1995. Hydrolysis of grape glycosides by enological yeast β -glucosidases. 1623-1635. In: *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*. Charalambous, G. (Ed.). Elsevier Science, Amsterdam.
- Rosi I., Vinella M., Domizio P. 1994. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* **77** (5): 519-527.
- Rosselló-Mora R., Amann R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 39-67.
- Salema M., Lolkema J.S., Romão M.V.S., Dias M.C.L., 1996. The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *J. Bacteriol.* **178** (11): 3127-3132.
- Sato H., Yanagida F., Shinohara T., Suzuki M., Suzuki K., Yokotsuka K., 2001. Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* **202** (1): 109-114.
- Semedo T.M.L., 2005. *Virulence traits in enterococci: phenotypic and molecular characterization in clinical and environmental isolates*. 113 p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Silla Santos M.H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**: 213-231.
- Slomkowska A., Ambroziak W., 2002. Biogenic amine profile of the most popular Polish beers. *European Food Research and Technology* **215** (5): 380-383.
- Sohier D., Lonvaud-Funel A., 1998. Rapid and sensitive *in situ* hybridization method for detecting and identifying lactic acid bacteria in wine. *Food Microbiol.* **15** (4): 391-397.
- Sohier D., Coulon J., Lonvaud-Funel A., 1999. Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1075-1081.
- Soufleros E., Barrios M., Bertrand A., 1998. Correlations between biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* **49** (3) 266-278.
- Spano G., Massa S., 2006. Environmental stress response in wine lactic acid bacteria: beyond *Bacillus subtilis*. *Crit. Rev. Microbiol.* **32** (2) 77-86.
- Spano G., Beneduce L., de Palma M.A., Vernile A., Massa S., 2006. Characterization of wine *Lactobacillus plantarum* by PCR-DGGE and RAPD-PCR analysis and identification of *Lactobacillus plantarum* strains able to degrade arginine. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 769-773.
- Spano G., Beneduce L., Tarantino D., Zapparoli G., Massa S., 2002. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species. *Let. Appl. Microbiol.* **35**: 370-374.
- Spano G., Capozzi V., Vernile A., Massa S., 2004. Cloning, molecular characterization and expression analysis of two small heat shock genes isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* **97** (4): 774-782.
- Spano G., Lonvaud-Funel A., Claisse O., Massa S., 2007. Analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. *Cur. Microbiol.* **54**: 9-13.
- Spano G., Rinaldi A., Ugliano M., Moio L., Beneduce L., Massa S., 2005. A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *J. Appl. Microbiol.* **98** (4): 855-861.
- Sponholz W.-R., 1993. Wine spoilage by microorganisms. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. 395-420. Fleet, G.H. (Ed.) Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Stackebrandt E., Goebel B.M., 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P. A., Kampf P., Maiden M.C., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B., 2002. Report of the Ad Hoc Committee for the Re-Evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1043-1047.
- Strauss M., Jolly N., Lambrechts M., van Rensburg P., 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **91** (1): 182-190.
- Swiegers J., Bartowsky E., Henschke P., Pretorius I., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11** (2): 139-173.
- Tenreiro R., 1995. *Análise taxonómica em Leuconostoc oenos - uma perspectiva polifásica*. 284 p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Tenreiro R., Santos M.A., Paveia H., Vieira G., 1994. Inter-strain relationships among wine leuconostocs and their divergence from other *Leuconostoc* species, as revealed by low frequency restriction fragment analysis of genomic DNA. *J. Appl. Bacteriol.* **77** (3) 271-280.
- Terrade N., Mira de Orduna R., 2006. Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **101** (2): 406-411.
- Teti D., Visalli M., McNair H., 2002. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions, *Journal of Chromatography B*, **781**, 107-149.
- Tonon T., Lonvaud-Funel A., 2000. Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* **89** (3): 526-531.
- Tonon T., Lonvaud-Funel A., 2002. Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Microbiology* **19** (5): 451-461.
- Tonon T., Bourdineaud J., Lonvaud-Funel A., 2001a. Catabolisme de l'arginine par *Oenococcus oeni* : aspects énergétiques et génétiques, *Lait* **81**: 139-150.
- Tonon T., Bourdineaud J., Lonvaud-Funel A., 2001b. The *arcABC* gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Res. Microbiol* **152** (7): 653-661.
- Topisirovic L., Kojic M., Fira D., Golic N., Strahinic I., Lozo J., 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **112**, 230-235.
- Torrea-Goni D., Ancín-Azpilicueta C., 2001. Influence of yeast strain on biogenic amine contents in wines: relationship with the

- utilization of amino acids during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **52** (3): 185–190.
- Torriani S., Felis G., Dellaglio F., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3450-3454.
- Tracey R.P., Britz T.J., 1987. A numerical taxonomic study of *Leuconostoc oenos* strains from wine. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 523-532
- Ugliano M., Genovese A., Moio L., 2003. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.* **51** (17): 5073-5078.
- Uthurry C.A., Suarez Lepe J.A., Lombardero J., Garcia Del Hierro J.R., 2006. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chem.* **94** (2): 262-270.
- Vaalder G., Brasch M., Snell E., 1986. Pyridoxal 5'-phosphate-dependent histidine decarboxylase. Nucleotide sequence of the *hdc* gene and the corresponding amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **261** (24): 1101.
- Van der Westhuizen L., Agenbach W., Loos M., Schoombee N., 1981. Comparison of procedures for isolation malolactic bacteria from wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **32** (2) 168-170.
- van Rensburg P., Pretorius I., 2000. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations - A review. *South African J. Enol. Vitic.* **21**, 52-73.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60** (2): 407-438.
- Vanderslice P., Copeland W., Robertus J., 1986. Cloning and nucleotide sequence of wild type and a mutant histidine decarboxylase from *Lactobacillus 30a*, *J. Biol. Chem.* **261** (32): 15186-15191.
- Vaquero I., Marcobal A., Munoz R., 2004. Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.* **96** (2): 199-204.
- Versari A., Parpinello G., Cattaneo M., 1999. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechn.* **23**, 447-455.
- Vidal-Carou M., Ambatlle-Espunyes A., Ulla-Ulla M., Marin-Font, A., 1990. Histamine and tyramine in spanish wines: their formation during the winemaking process. *Am. J. Enol. Vitic.* **41** (2): 160-167.
- Viti C., Giovannetti L., Granchi L., Ventura S., 1996. Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) with restriction endonuclease. *Res. Microbiol.* **147** (8): 651-660.
- Walling E., Gindreau E., Lonvaud-Funel A., 2001. La biosynthèse d'exopolysaccharide par des souches de *Pediococcus damnosus* isoées du vin : mise au point d'outils moléculaires de detection. *Lait* **81**, 289-300.
- Wibowo D., Eschenbruch R., Davis C., Fleet G., Lee T., 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **36** (4): 302-313.
- Wolken W., Lucas P., Lonvaud-Funel A., Lolkema J., 2006. The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **188** (6): 2198-2206.
- Yurdugul S., Bozoglu F., 2002. Studies on an inhibitor produced by lactic acid bacteria of wines on the control of malolactic fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* **215**, 38–41.
- Zapparoli G., Moser M., Dellaglio F., Tournet-Marechal R., Guzzo J. 2004. Typical metabolic traits of two *Oenococcus oeni* strains isolated from Valpolicella wines. *Lett. Appl. Microbiol.* **39** (1): 48-54.
- Zapparoli G., Reguant C., Bordons A., Torriani S., Dellaglio F., 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Curr. Microbiol.* **40**, 351-355.
- Zapparoli G., Torriani S., Pesente P., Dellaglio F., 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Lett. Appl. Microbiol.* **27** (5): 243-246.
- Zavaleta A., Martinez-Murcia A., Rodriguez-Valera F., 1997. Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl Environ Microbiol* **63** (4): 1261-1267.
- Zuniga M., Champomier-Verges M., Zagorec M., Perez-Martinez G., 1998. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sakei*. *J. Bacteriol.* **180** (16): 4154-4159.
- Zuniga M., Miralles Md M.C. Perez-Martinez G., 2002. The Product of *arcR*, the sixth gene of the *arc* operon of *Lactobacillus sakei*, is essential for expression of the arginine deiminase pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (12): 6051-6058.