

**EFEITO DO ETANOL NO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS
LÁCTICAS**

por: Maria Leticia Miranda Fernandes

com orientação de: Maria Arlete Mendes Faia

Tese submetida ao I.S.T. para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

1989

**EFEITO DO ETANOL NO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS
LÁCTICAS**

Maria Leticia Miranda Fernandes

MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA
(Eng^a Bioquímica)

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO

1989

AGRADECIMENTOS

Ao finalizarmos este trabalho, queremos expressar o nosso reconhecimento às pessoas e Instituições que contribuíram para a sua concretização, nomeadamente:

Em primeiro lugar, à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, que nos proporcionou as condições indispensáveis à realização deste trabalho, na pessoa do seu Presidente da Comissão Instaladora, Prof.^o. Doutor Dionísio Gonçalves.

À Prof.^a. Doutora M.^a Arlete Mendes Faia, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro de Vila Real, por ter aceite orientar este trabalho, pela dedicação, sugestões, ensinamentos e facilidades sem limites concedidas.

Ao Prof.^o. Virgílio Loureiro do Instituto Superior de Agronomia de Lisboa, por ter aceite co-orientar este trabalho e pelo apoio que nos dispensou ao longo da sua realização.

Ao Departamento de Indústrias Alimentares da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, por nos proporcionar as condições indispensáveis à realização das análises no seu Laboratório.

Ao Prof.^o. Doutor Francisco Rego, pela disponibilidade manifestada e apoio no tratamento estatísticos dos dados.

Ao Prof.^o Doutor J. Lima Pereira, pelo incentivo que nos deu para a realização do trabalho.

Ao Prof.^o Doutor Francisco Cepeda e Eng.^o. José Luis Baltasar, pelo interesse e amizade que nos manifestaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos nossos pais e família pela amizade e compreensão que nos dispensaram durante a realização do trabalho.

À Doutora Conceição Martins, pelo apoio amigo e desinteressado que nos manifestou.

Ao pessoal técnico do Departamento de Indústrias Alimentares Sr. Armando Lage, Sr. Felisberto Borges e Sr.^a. Ana Santos pela dedicação demonstrada nas determinações analíticas.

Á D^{na} Inês Maldonado e particularmente à D^{na} Maria da Conceição P. Ferreira, pela dedicação e competente colaboração no processamento do texto.

Ao Sr. Atilano, pelo trabalho desenvolvido na elaboração dos desenhos.

Finalmente, a todos aqueles que por qualquer forma ajudaram na elaboração do trabalho, o nosso profundo agradecer.

RESUMO

Na primeira parte deste trabalho estudámos o efeito do etanol no crescimento das bactérias lácticas isoladas dos vinhos pertencentes aos géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* inoculados em meio complexo (TGB), com diferentes doses de etanol para vários níveis de pH. Verificámos que o pH e a concentração em etanol do meio de cultura afectavam significativamente a taxa específica de crescimento, o teor de glicose consumido, a absorvância final, a duração da fase *lag* e o coeficiente de rendimento em biomassa. No género *Leuconostoc* a contribuição do etanol na variação de todos os parâmetros referidos foi superior à do pH, ao contrário do que aconteceu nos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*.

Observou-se um aumento significativo na taxa específica de crescimento na presença de 2 a 4% de etanol em todas as estirpes. Em *Leuconostoc oenos*, 8A e ML₃₄, quanto mais baixo foi o pH maior foi o efeito estimulante do etanol. Além disso, à medida que decresceu o valor de pH foi mais elevada a dose de álcool estimulante do crescimento. Para valores superiores a 8% verificou-se uma inibição no crescimento. Em *Leuconostoc oenos*, o efeito positivo do etanol nas taxas de crescimento foi significativamente mais elevado a pH 3,5. Porém não foi observado nenhum acréscimo assinalável na absorvância final nem no consumo de glicose. Pelo contrário, a pH 4,0 e 4,5 detectaram-se maiores consumos de açúcares sem aumento na biomassa.

Em *Pediococcus damnosus* 12A e em *Lactobacillus spp* 48, não foram observadas diferenças significativas nos teores de glicose metabolizados, havendo contudo um decréscimo significativo na biomassa à medida que se aumentou o teor de etanol.

Em todas as estirpes, a fase *lag* foi significativamente mais prolongada particularmente para valores de etanol iguais ou superiores a 6%. A produção de metabolitos nas diferentes estirpes, determinados por HPLC, não foi afectada pela adição de etanol.

Finalmente, avaliou-se o efeito do estado fisiológico de duas estirpes de *Leuconostoc oenos* em função da presença e ausência de etanol e o seu efeito na velocidade de degradação do ácido L-málico. Neste ensaio utilizaram-se diferentes concentrações de ácido málico (0,1; 0,5 e 0,75%) e de etanol (0; 5; 10 e 15%), para dois níveis de pH (3,5 e 4,0).

Observamos que o pH 4,0 a velocidade de descarboxilação do ácido não foi afectada pelo etanol. Para valores de pH 3,5 o ácido málico foi completamente metabolizado quando a sua concentração foi de (0,1 e 0,5%), não sendo afectada a velocidade de degradação até 15% de etanol. Para concentrações de ácido málico de 0,75% verificámos um decréscimo na sua velocidade de degradação à medida que se aumentou o teor em etanol: a descarboxilação foi parcial ou completamente inibida quando a concentração de etanol foi de 10 e 15% respectivamente.

SUMMARY

In this study effect of ethanol on the growth of lactic acid bacteria isolated from wine was studied in four strains classified under the genera *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus*. A factorial analysis was used to test eight ethanol concentrations (0; 2; 4; 8; 10; 12 and 14%) under three different pH values (3,5; 4,0 and 4,5). All strains were grown in a complex medium (TGB).

Specific growth rate, lag phase, glucose consumption, biomass produced and growth yields were significantly affected by the pH value and the ethanol concentration in the cultures media. The effect of ethanol was higher than the pH on both strains of *Leuconostoc oenos*. On the other hand, effectiveness of pH was higher in *Lactobacillus* and *Pediococcus*. These strains of *Leuconostoc oenos* were more tolerant to acidity conditions than *Lactobacillus* and *Pediococcus*. The results agree with findings previously reported by other authors.

Ethanol greatly depressed growth (specific growth rate and lag phase) for the initial concentrations of 6 to 8%. In most strains an unexpected significant increase on growth rates was detected when 2 to 4% of ethanol were added to the culture media. Its effectiveness was related to pH: in *Leuconostoc oenos* the lower was the pH (3,5) the higher was the stimulant effect of ethanol. However, an increase in biomass or a higher glucose consumption could not be observed.

Increasing the initial concentration of ethanol significantly reduced biomass production by *Pediococcus* and *Lactobacillus* without any effect on the amount of glucose metabolized.

In addition, the metabolites produced by different strains, analysed by HPLC, were not affected by ethanol.

Finally, was studied the influence of ethanol (0; 5; 10; and 15%) on the physiology of *Leuconostoc oenos* (8A and ML₃₄) and on "malic activity" of these strains, at two pH values (3,5 and 4,0). The amount of malic acid degraded was unaffected by ethanol concentration, at pH 4,0. At pH 3,5, malate was completely metabolized (0,1 and 0,5%) even in presence of 15% of ethanol. However, when 0,75% of malic acid was added decarboxylation was partial or completely repressed respectively for 10 and 15% of ethanol.

LISTA DOS QUADROS

pág.

1. Substratos utilizados e metabolitos produzidos por bactérias lácticas	12
2. Fermentação dos glícidos em meio de cultura complexo (MRS), pH 6,0 pelas espécies <i>Leuconostoc oenos</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> e <i>Lactobacillus spp.</i>	13
3. Modificações da composição azotada dos vinhos provocada pela fermentação maloláctica.	23
4. Necessidades das bactérias lácticas em factores de crescimento.....	24
5. Valores médios das taxas de crescimento (h^{-1}) das várias estirpes, para vários níveis de pH.	26
6. Tempo necessário (dias) à ocorrência da fermentação maloláctica num vinho com vários valores de pH.....	27
7. Quantidade de ácido L-málico metabolizado em (meq/l) por <i>Lc gracile</i> em função do tempo e do teor em etanol do meio.	34
I – 1. Valores médios da taxa específica de crescimento (h^{-1}) das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.	44
II – 1. Valores médios do teor de glicose ($\mu g/\mu l$) das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.	48
III – 1. Valores médios da fase <i>lag</i> (h) das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.	53
IV – 1. Valores médios da absorvância final (D.O) das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.....	57

V – 1.	Valores médios do pH final das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.	61
VI – 1.	Valores do coeficiente de rendimento (%), das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.....	65
VII – 1.	Concentração dos produtos finais obtidos na estirpe ML ₃₄ (μ moles/μl ⁻¹).....	68
VIII – 1.	Concentração dos produtos finais obtidos na estirpe 8A (μ moles/μl ⁻¹).....	69
IX – 1.	Concentração dos produtos finais obtidos na estirpe 12A (μ moles/μl ⁻¹).....	70
X.	Tempo necessário para a degradação do ácido L-málico (h) pela estirpe ML ₃₄ , para níveis de etanol e pH.	72
XI.	Tempo necessário para a degradação do ácido L-málico (h) pela estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.....	73
ANEXO 1.....		95
1 A.	Análise da variância das taxas específicas de crescimento das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.....	96
2 A.	Análise da variância da taxa específica de crescimento da estirpe ML ₃₄ , para vários níveis de etanol e pH.	97
3 A.	Análise da variância da taxa específica de crescimento da estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH	97
4 A.	Análise da variância da taxa específica de crescimento da estirpe 12A, para vários níveis de etanol e pH.	98

5 A.	Análise da variância da taxa específica de crescimento da estirpe 48, para vários níveis de etanol e pH	98
6 A.	Análise da variância do teor de glicose residual das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH	99
7 A.	Análise da variância do teor de glicose residual na estirpe ML ₃₄ , para vários níveis de etanol e pH.	100
8 A.	Análise da variância do teor de glicose residual na estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.....	100
9 A.	Análise da variância do teor de glicose residual na estirpe 12A, para vários níveis de etanol e pH.....	101
10 A.	Análise da variância do teor de glicose residual na estirpe 48, para vários níveis de etanol e pH.....	101
11 A.	Análise da variância dos valores médios da fase <i>lag</i> das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH	102
12 A.	Análise da variância dos valores médios da fase <i>lag</i> da estirpe ML ₃₄ , para vários níveis de etanol e pH	103
13 A.	Análise da variância dos valores médios da fase <i>lag</i> da estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH	103
14 A.	Análise da variância dos valores médios da fase <i>lag</i> da estirpe 12A, para vários níveis de etanol e pH.....	104
15 A.	Análise da variância dos valores da fase <i>lag</i> da estirpe 48, para vários níveis de etanol e pH.....	104
16 A.	Análise da variância dos valores médios da absorvância final, das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.....	105

17 A.	Análise da variância dos valores médios da absorvância final, da estirpe ML ₃₄ , para vários níveis de etanol e pH.	106
18 A.	Análise da variância dos valores médios da absorvância final, da estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.....	106
19 A.	Análise da variância dos valores médios da absorvância final da estirpe 12A, para vários níveis de etanol e pH.	107
20 A.	Análise da variância dos valores médios da absorvância final, da estirpe 48, para vários níveis de etanol e pH.	107
21 A.	Análise da variância dos valores médios do pH do meio de cultura das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.	108
22 A.	Análise da variância dos valores médios do pH final do meio de cultura da estirpe ML ₃₄ , para vários níveis de etanol e pH.....	109
23 A.	Análise da variância dos valores médios do pH final do meio de cultura da estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.	109
24 A.	Análise da variância dos valores médios do pH final do meio de cultura da estirpe 12A, para vários níveis de etanol e pH.....	110
25 A.	Análise da variância dos valores médios do pH final dos meios de cultura da estirpe 48, para vários níveis de etanol e pH.....	110
26 A.	Variâncias esperadas da taxa específica de crescimento, do teor de glicose, da fase <i>lag</i> , da densidade optima e do pH final, para várias estirpes e níveis de pH.....	111
27 A.	Variâncias esperadas da taxa específica de crescimento, do teor de glicose, da fase <i>lag</i> , da absorvância final e do pH final, para várias estirpes e níveis de pH.....	111

LISTA DAS FIGURAS

	pág.
1. Ciclo de crescimento da bactérias lácticas durante a vinificação de um vinho tinto	5
2. Principais vias metabólicas da fermentação dos hexoses pelas bactérias lácticas.....	7
3. Formação de manitol a partir da frutose pelas bactérias lácticas heterofermentativas	9
4. Mecanismo de degradação do ácido tartárico pelas bactérias lácticas homofermentativas.....	16
5. Degradação do ácido tartárico pelas bactérias heterofermentativas.....	16
6. Desassimilação do glicerol por <i>Lactobacillus brevis</i>	20
7. Influência do pH no crescimento de diversas bactérias lácticas em meio de cultura com sumo de tomate	26
8. Percentagem de distribuição de sulfito, bissulfito e SO ₂ moléculas em solução aquosa, em função do pH.....	28
9. Efeito do SO ₂ no crescimento das bactérias do ácido láctico durante a vinificação de vinhos Chancellor a pH 3,5; 3,5 e 3,7	30
10. Evolução do número de bactérias lácticas durante a vinificação de vinhos tintos.....	32
11. Locais de actuação do etanol nas células das leveduras	35

I – 1.	Efeito da concentração de etanol e do pH na taxa específica de crescimento das várias estirpes.	45
I – 2.	Relação entre a taxa específica de crescimento na presença da concentração x de etanol e a taxa específica de crescimento na ausência de etanol (%) para as várias estirpes, a vários níveis de pH...	46
II – 1.	Efeito da concentração de etanol e do pH no teor de glicose das várias estirpes.....	49
II – 2.	Relação entre o teor de glicose final na presença da concentração x de etanol e o teor de glicose na ausência de etanol (%) para as várias estirpes, a vários níveis de pH.....	50
III – 1.	Efeito da concentração de etanol e do pH na duração da fase <i>lag</i> (h) das várias estirpes.....	54
III – 2.	Relação entre a fase <i>lag</i> na presença da concentração x de etanol e a fase <i>lag</i> na ausência de etanol (%) para as várias estirpes, a vários níveis de pH	55
IV – 1.	Efeito da concentração de etanol e do pH na absorvância final (D.O) das várias estirpes.....	58
IV – 2.	Relação entre a absorvância final na presença da concentração x de etanol e a absorvância final na ausência de etanol (%) para as várias estirpes, a vários níveis de pH.....	59
V – 1.	Efeito da concentração de etanol e do pH no pH final do meio de cultura das várias estirpes.....	62

V – 2.	Relação entre o pH final do meio de cultura na presença da concentração de etanol e o pH final do meio de cultura na ausência de etanol (%) para as várias estirpes, a vários níveis de pH.....	63
VI – 1.	Efeito da concentração de etanol e do pH no coeficiente de rendimento (%) das estirpes ML ₃₄ e 8A.....	66
VII – 1.	Velocidade de degradação do ácido L-málico (h) pela estirpe ML ₃₄ , para vários níveis de etanol e pH.....	74
VIII – 1.	Velocidade de degradação do ácido L-málico (h) pela estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.....	75

1. Introdução.....	1
1.1. Ocorrência das bactérias lácticas dos vinhos	2
1.2. Ecologia das bactérias lácticas dos vinhos.....	4
1.3. Aspectos metabólicos das bactérias lácticas dos vinhos.....	6
1.4. Alterações do vinho provocadas por bactérias lácticas.	10
1.4.1. Fermentação maloláctica.....	10
1.4.2. Doenças dos vinhos.....	11
1.4.2.1. Degradação dos açúcares	13
1.4.2.2. Degradação dos ácidos.....	14
a) Ácido tartárico	15
b) Ácidos cítrico e pirúvico	17
c) Outros ácidos	18
d) Ácido sórbico.....	18
1.4.2.3. Degradação do glicerol.....	19
1.4.2.4. Formação de polissacáridos	20
1.5. Factores que afectam o crescimento	21
1.5.1. Factores nutricionais	21
1.5.2. Factores físico-químicos	25
1.5.2.1. pH.....	25

1.5.2.2. Dióxido de enxofre	28
1.5.2.3. Temperatura	31
1.5.2.4. Arejamento	33
1.5.2.5. Etanol	33
<hr/>	
2. Material e métodos	37
2.1. Microorganismos.....	37
2.2. Composição dos meios de cultura	37
2.3. Condições de crescimento	38
2.4. Avaliação de alguns parâmetros de crescimento	39
2.4.1. Cálculo das taxas específicas de crescimento	39
2.4.2. Determinação da concentração de glicose residual	40
2.4.3. Determinação da fase lag	40
2.4.4. Determinação do coeficiente de rendimento em biomassa.....	40
2.5. Análise de metabolitos	41
2.6. Velocidade de degradação do ácido L-málico	41
2.7. Análise estatística	41
3. Resultados	43
3.1. Resultados.....	43
3.1.1. Efeito do etanol no crescimento	43

a) Taxa específica de crescimento	43
b) Consumo de glicose	47
c) Fase lag.....	52
d) Absorvância final a 600nm.....	56
e) pH final.....	60
f) Coeficiente de rendimento em biomassa	64
g) Produtos resultantes do metabolismo.....	67
3.1.2. Efeito do etanol e do estado fisiológico das células na velocidade de degradação do ácido L-málico.....	71
4. Discussão	76
5. Conclusões.....	80
6. Bibliografia	82
Anexo 1	95

1 – INTRODUÇÃO

As bactérias lácticas assumem uma grande relevância em Enologia, não só pelo carácter benéfico que podem ter na melhoria das características organolépticas de alguns tipos de vinhos, mas também pela acção que podem ter como agentes de alteração. No primeiro caso, a sua acção traduz-se pela descarboxilação directa do ácido L(-) málico, a ácido L(+) lactico. Este fenómeno é vulgarmente designado por “fermentação maloláctica”, conduz a uma desacidificação tornando os vinhos excessivamente ácidos – como grande parte dos vinhos verdes – e os vinhos tintos mais harmoniosos do ponto de vista organoléptico e mais estáveis química e microbiologicamente (KUNKEE, 1974; WIBOWO *et al.*, 1985).

No segundo caso, a sua acção faz-se sentir através da degradação de vários componentes dos vinhos – mono e oligossacarídeos, ácidos orgânicos, álcoois, aminoácidos e até compostos fenólicos (DAVIS *et al.*, 1986), que conduzem a alterações mais ou menos profundas das suas características químicas e organolépticas, muitas vezes irreparáveis.

A actividade metabólica das bactérias lácticas nos vinhos é fortemente dependente dos factores ambientais, razão pela qual grande parte da investigação desenvolvida neste domínio se relaciona com o estudo do efeito dos diferentes factores ambientais sobre as bactérias lácticas. O vinho constitui um ambiente pouco favorável ao crescimento microbiano devido aos elevados teores de etanol e de dióxido de enxofre, aos valores reduzidos de pH e de nutrientes (LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1983; PEYNAUD e DOMERCQ, 1968; WEBB e INGRAHAN, 1960 e WEILLER e RADLER, 1972). Por isso, numerosos têm sido os estudos efectuados sobre o efeito de vários factores no crescimento bacteriano nomeadamente sobre o efeito do pH, sabendo-se que o valor deste parâmetro afecta a duração da fase *lag*, a taxa de crescimento, a produção de biomassa final e, concomitantemente, a produção de ácido láctico (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975; 1977). O pH condiciona ainda o tipo de microflora que se desenvolve no vinho (MENDES FAIA, 1987). Ao contrário, o efeito do etanol no crescimento bacteriano tem sido um assunto menos estudado, nomeadamente do ponto de vista quantitativo, sabendo-se, porém, que a sensibilidade ao etanol é variável com o género (KUNKEE, 1967), com a espécie e com as condições do meio (LAFON-LAFOURCADE, 1975; LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1983). PILONE (1975) refere que a fermentação maloláctica dificilmente ocorre em vinhos cujo teor em

etanol seja superior a 13% (1). LAFON-LAFOURCADE (1975) verificou que a enzima maloláctica de *Leuconostoc oenos* era tanto mais inibida quanto mais elevado era o teor de etanol do vinho. Existem algumas referências na literatura (KUNKEE, 1967; LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1983; PEYNAUD e DOMERCQ, 1968; PILONE 1975; RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975; 1977) sobre a inibição do etanol no crescimento de certas espécies de bactérias lácticas. Há, porém, espécies isoladas de vinhos alcoolizados, com percentagens de etanol da ordem dos 20%, cujo crescimento é não só estimulado pelo etanol como também por outros álcoois nomeadamente o metanol, o propanol, o butanol, vários poliálcoois e ainda a acetona (RADLER e HARTEL, 1984).

Este trabalho teve por objectivo, quantificar o efeito do etanol e do pH, na actividade de várias estirpes de bactérias lácticas isoladas de vinhos, pertencentes aos géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*. Para tal, foi estudado o efeito da concentração do etanol, para três níveis de pH (3,5; 4,0 e 4,5), na variação da taxa específica de crescimento, no consumo de glicose, no tempo de duração da fase *lag*, na absorvância final a 600nm, no coeficiente de rendimento em biomassa e na natureza e concentração final de produtos resultantes do metabolismo.

Posteriormente, estudou-se o efeito do estado fisiológico de duas estirpes de *Leuconostoc oenos*, em função da presença e ausência de etanol e o seu efeito na velocidade de degradação do ácido L-málico. Neste ensaio utilizaram-se quatro concentrações de etanol (0; 5; 10 e 15%), dois níveis de pH (3,5 e 4,0) e três concentrações de ácido málico (0,1; 0,5 e 0,75% (p/v)).

1.1 – Ocorrência de Bactérias Lácticas nos Vinhos.

As vulgarmente designadas “bactérias do ácido láctico” compreendem os cocos pertencentes aos géneros *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* e os bacilos dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (KANDLER, 1983) que, de acordo com o BERGEY'S MANUAL of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1974), pertencem às famílias *Streptococaceae* e *Lactobacillaceae* respectivamente.

São microrganismos Gram positivo não formadores de endósporos e, geralmente desprovidos de mobilidade; não possuem citocromos, pelo que produzem ATP, por via fermentativa, através de fosforilação a nível do substrato; caracterizam-se por não terem catalase e serem sensíveis a concentrações elevadas de oxigénio, embora haja espécies

aerotolerantes. Algumas estirpes destroem o peróxido de hidrogénio na presença de substâncias com estrutura heme e outras, ainda possuem peroxidase.

As bactérias deste grupo devem a sua designação à capacidade que têm para formar ácido lático como único ou principal produto da fermentação dos açúcares. Tal característica permite-lhes suportarem valores muito baixos de pH, embora a tolerância à acidez seja variável com os géneros, as espécies e até as estirpes. A sua elevada exigência nutricional não constitui obstáculo à sua elevada ubiquidade, podendo ser isoladas dos mais diversos substratos de origem vegetal e animal.

As bactérias lácticas que ocorrem nos vinho pertencem aos géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* (VAUGHN, 1955; KUNKEE, 1974; RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975). Entre as espécies capazes de levarem a cabo a fermentação maloláctica, *Leuconostoc oenos* é a mais frequente sendo, de acordo com WIBOWO, *et al* (1985), a única pertencente ao género *Leuconostoc* capaz de se desenvolver nos vinhos. Alguns autores franceses (LAFON-LAFOURCADE, 1983; RIBEREAU-GAYON, *et al.*, 1975) referem que a espécie *Leuconostoc gracile* pode ser isolada dos vinhos. No entanto, de acordo com as recentes classificações, esta espécie é considerada dentro das estirpes de *Leuconostoc oenos* incapazes de fermentar xilose e arabinose (WIBOWO *et al.*, 1985).

Dentro do género *Pediococcus*, somente as espécies *Pediococcus damnosus* (*P. cerevisiae*), *Pediococcus parvulus* e *Pediococcus pentosaceus* ocorrem nos vinhos (WIBOWO *et al.*, 1985), distinguindo-se das outras espécies deste género por crescerem a valores baixos de temperatura e de pH (RIBEREAU-GAYON, *et al.*, 1975). São homofermentativas e produzem ácido DL-Láctico a partir da glicose, o que permite distingui-las do género *Streptococcus* que produzem exclusivamente o isómero L(+). As espécies referidas aparecem, geralmente em vinhos alterados (PEYNAUD e DOMERCQ, 1967; FLEET *et al.*, 1984), embora haja referências à sua acção como agentes da desacidificação biológica de certos vinhos australianos (DAVIS, 1986), suíços (MARET e SOZZI, *et al.*, 1977), alemães (BENDA, 1982) e franceses (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975). O facto das espécies de *Pediococcus* serem menos tolerantes a valores baixos de pH do que *Leuconostoc oenos*, faz com que sejam mais frequentes em vinhos de pH elevado e possam surgir após a subida de pH resultante da actividade maloláctica de *Leuconostoc oenos* (DAVIS *et al.*, 1986).

Dentro do género *Lactobacillus* numerosas espécies têm sido isoladas dos vinhos (BARRE, 1978) embora sejam as heterofermentativas as que predominam, nomeadamente *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus brevis* (RADLER, 1976; RIBEREAU-GAYON *et al.*,

1975). Todas as espécies pertencentes ao género *Lactobacillus* estão associadas a processos de alteração de vinhos com pH elevado.

1.2 – Ecologia das Bactérias Lácticas dos Vinhos.

Muitos estudos que têm sido realizados (ver revisão de WIBOWO *et al.*, 1985) indicam que as bactérias lácticas presentes nos vinhos são provenientes das uvas, das folhas das videiras e do equipamento utilizado nas adegas. Geralmente o número de bactérias presente nas uvas e nas folhas das videiras é reduzido, não excedendo as 100 células/gr, dependendo do grau de maturação das uvas e das condições ambientais (LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1983; PEYNAUD e DOMERCQ, 1968). O equipamento das adegas normalmente, cubas, bombas, válvulas, barris de madeira, é, contudo, considerado a principal fonte das bactérias lácticas presentes nos vinhos (WEBB e INGRAHAM, 1960; PEYNAUD e DOMERCQ, 1968).

De todas as bactérias lácticas provenientes das uvas só um pequeno número se desenvolve no mosto e vinho, porque estes meios limitam o crescimento bacteriano, devido aos elevados teores em etanol, em dióxido de enxofre e aos valores reduzidos de pH e de nutrientes (PEYNAUD e DOMERCQ 1968; FORNACHON, 1965; CASTILHO *et al.*, 1975; RANKINE, 1977; WIBOWO *et al.*, 1985).

A multiplicação bacteriana no decurso da vinificação apresenta geralmente dois ciclos sucessivos, separados por uma fase de adaptação que apresentamos na Fig. 1.

Logo a seguir ao esmagamento o mosto contém bactérias lácticas numa concentração de 10^3 - 10^4 células ml^{-1} , diminuindo este número ao longo da fermentação alcoólica (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975; WIBOWO *et al.*, 1985) devido à sensibilidade das bactérias ao etanol e ao SO_2 utilizado na desinfecção dos mostos e produzido pelas leveduras (FORNACHON, 1963). A utilização de alguns nutrientes essenciais ao crescimento bacteriano pelas leveduras é outra das causas de inibição bacteriana (WEILLER e RADLER, 1972).

Após o estado de latência, cuja duração depende das características químicas do meio, das condições de vinificação e da interacção entre as bactérias e os outros microrganismos presentes no vinho (WIBOWO *et al.*, 1985), multiplicam-se e, quando se atinge uma população da ordem das 10^6 - 10^8 células ml^{-1} (RICE e MATICH, 1970; LIU e GALLANDER, 1983; WIBOWO *et al.*, 1985) ocorre a descarboxilação do ácido málico a ácido láctico.

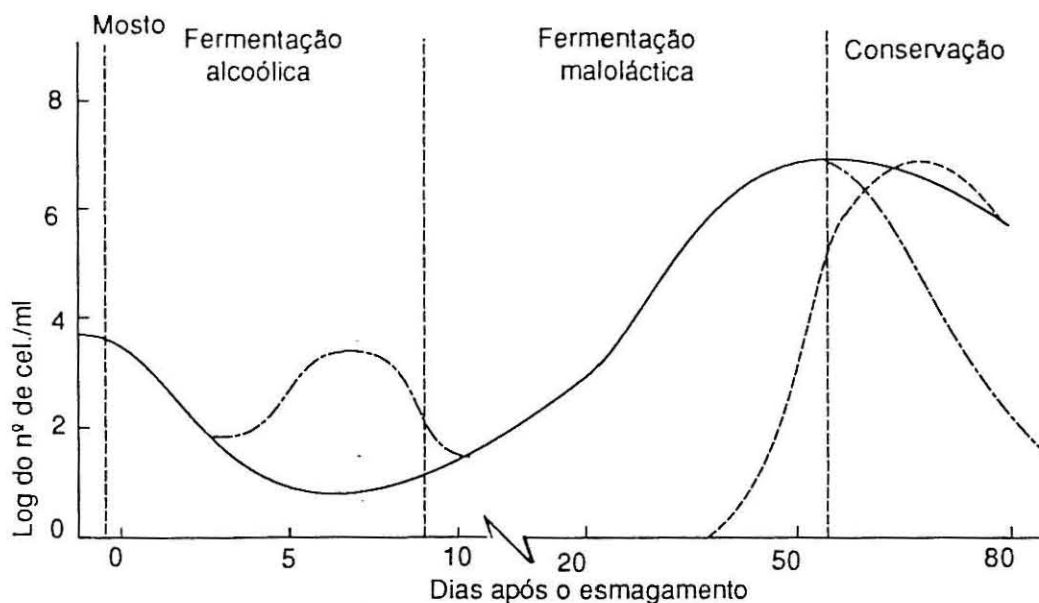


Fig. 1. Ciclo de crescimento das bactérias lácticas durante a vinificação em vinhos tintos
(WIBOWO *et al.*, 1985)

- Crescimento do *Leuconostoc oenos* a pH 3,5.
- Crescimento de outras espécies de bactérias lácticas.
- Declínio da viabilidade de *Leuconostoc oenos*.

A ocorrência da fermentação maloláctica, que, como foi referido, depende da concentração de células presentes no vinho, pode, no entanto, vir a ser mais ou menos diferida no tempo, em resultado das condições ambientais e presença de inibidores presentes no vinho.

Do ponto de vista ecológico existem, ainda, determinados factores que podem determinar a presença de bactérias lácticas de alteração e comprometer a estabilidade microbiológica e qualidade futura dos vinhos. Ainda que não existam muitas referências na literatura sobre estes factores, é do conhecimento empírico dos técnicos de vinhos que nos anos em que há grande percentagem de uvas podres (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975) e em que as temperaturas de fermentação são elevadas (BARRE, 1978), os problemas causados por bactérias lácticas de alteração (nomeadamente do género *Lactobacillus*) são ainda maiores. Esta situação é particularmente sentida no nosso país e tem ocorrido, frequentemente nos últimos anos. LOUREIRO (1986), refere paragens da fermentação em grande parte da produção de uma adega cooperativa do Ribatejo, motivadas pelas elevadas temperaturas, que conduziram ao domínio total da população de leveduras por bactérias lácticas do género *Lactobacillus* e causaram graves prejuízos na qualidade dos vinhos.

1.3 – Aspectos Metabólicos das Bactérias Lácticas dos Vinhos.

Como já foi referido, a actividade metabólica das bactérias lácticas dos vinhos pode alterar, mais ou menos profundamente, a sua composição química e as suas características organolépticas. Nem sempre é fácil, contudo, avaliar, do ponto de vista bioquímico as alterações verificadas. O grande número de compostos presentes no vinho, susceptíveis de serem utilizados como substratos das bactérias lácticas, e a variedades de estirpes que podem coexistir no mesmo vinho, dificultam por vezes, o esclarecimento das vias que conduzem ao aparecimento de determinados metabolitos nos vinhos. Por tal motivo apresenta-se, de seguida, uma breve síntese do metabolismo das bactérias lácticas dos vinhos.

Todas as bactérias lácticas fermentam a glicose produzindo como principal produto final ácido láctico (D, L e DL). No entanto, há que distinguir entre as homofermentativas e as heterofermentativas. A nível enzimático, os dois grupos diferem no que respeita à presença ou ausência da frutose 1,6 difosfato aldolase (FDP) ou fosfocetolase. As heterofermentativas não possuem FDP aldolase possuindo fosfocetolase, ao contrário do que se verifica nas homofermentativas. Porém, as espécies homofermentativas capazes de utilizar pentoses, e quando na presença destes substratos, manifestam a presença de fosfocetolase (KANDLER e WEISS, citado por SAN ROMÃO, 1987).

No processo homofermentativo, a glicose é quase exclusivamente convertida (95 a 100%) em ácido láctico, pela via de EMBDEN-MEYERHOFF. As heterofermentativas, produzem, além de ácido láctico, CO₂ e outros produtos (etanol e/ou ácido acético), via hexose monofosfato ou via das pentoses (INGRAM, 1975). Assim, nas homofermentativas a hexose difosfato é cindida em duas moléculas (gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato) através da FDP aldolase, as quais são oxidadas a ácido pirúvico que em seguida é reduzido a ácido láctico. O balanço energético deste processo é de duas moléculas de ATP por cada molécula de glicose fermentada (BROCH, 1974).

Nas heterofermentativas que não possuem aldolase, há uma oxidação da hexose monofosfato a 6-fosfogliconato que é descarboxilado oxidativamente originando uma pentose fosfato. Esta por sua vez, através da fosfocetolase dá origem a uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato, a qual é convertida em ácido láctico pelo processo descrito para as homofermentativas com a produção de um ATP, e uma molécula de Acetil-fosfato. Esta última aceita os electrões do coenzima NADH + H⁺, gerados durante a produção da pentose fosfato, dando origem a acetaldeído que é reduzido a etanol sem produção de

ATP (BROCK, 1974; CARPENTER, 1977). As principais e vias metabólicas da fermentação das hexoses pelas bactérias lácticas estão sumarizadas na Fig. 2.

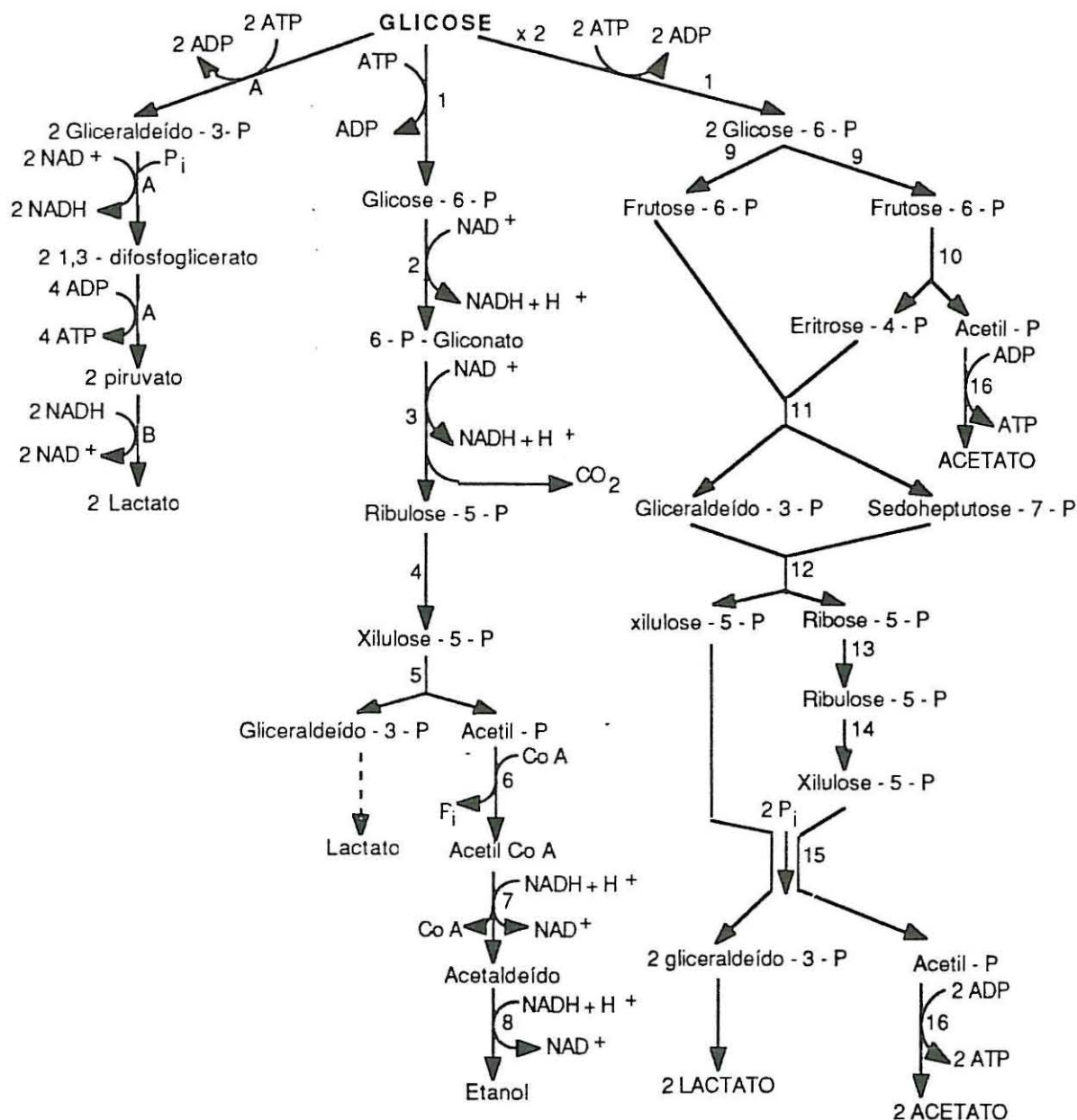


Fig. 2. Principais vias metabólicas da fermentação das hexoses pelas bactérias lácticas (adaptado de KANDLER, 1983 e GOTTSCHALK, 1986)

A. Enzimas da via de Emdden – Meyerhoff-Parmas; B. Lactato desidrogenase; 1. Hexocinase; 2. Glicose-6-P desidrogenase; 3. 6Fosfogliconato desidrogenase; 4. Ribulose-5-fostato 3-epimerase; 5. Fosfoctolase; 6. Fosfotransacetilase; 7. Acetaldeído desidrogenase; 8. Álcool desidrogenase; 9. Glicose--

6-P isomerase; 10. Frutose-6-P fosfocetolase; 11. Transaldolase; 12. Transcetolase; 13. Ribose-5-P isomerase; 14. Ribulose-5-P 3-epimerase; 15. Xilulose-5-fosfato fosfocetolase; 16. Acetato cinase

Em aerobiose, algumas bactérias heterofermentativas reoxidam o coenzima NADH + H⁺ utilizando o O₂ como aceitador final de electões, através de uma flavoproteína. Neste caso, o Acetil-CoA não é completamente reduzido a etanol, formando-se CO₂, ácido láctico, acético e duas moléculas de ATP por molécula de glicose fermentada (BROCK, 1974).

Nos vinhos, as características homo e heterofermentativas das bactérias lácticas nem sempre são fáceis de evidenciar, devido à presença de vários substratos utilizáveis. Assim, por exemplo uma bactéria láctica homofermentativa pode produzir quantidades apreciáveis de ácido acético quando fermenta pentoses (BENDA, 1982), aparentando um comportamento heterofermentativo. RIBEREAU-GAYON *et al.*, (1975) propuseram vários critérios de distinção entre as bactérias homo e heterofermentativas nos vinhos, entre os quais se salientam: os quocientes entre CO₂/lactato; lactato/acetato e acidez fixa/acidez volátil. O isómero do ácido láctico produzido também permite fazer a distinção entre alguns géneros. Os cocos heterofermentativos produzem essencialmente ácido D (-) láctico e 2-5% de ácido L (+) láctico. Porém, *Lactobacillus* heterofermentativos (*L. brevis* e *L. fructivorans*) produzem ácido DL láctico. Outra característica que permite fazer a distinção entre os cocos e os bacilos heterofermentativos é a produção de acetoina. A formação de acetoina nas bactérias lácticas provém do piruvato, podendo ocorrer por duas vias metabólicas diferentes: por descarboxilação do α -acetolactato ou pela redução do diacetilo proveniente da condensação do acetaldeído TPP (tiamina pirofosfato) com Acetil-CoA (KANDLER, 1983).

Em presença de glicose, as bactérias lácticas heterofermentativas reduzem a frutose a manitol, formando-se acetato em vez de etanol. Este processo tem manifestas vantagens para as bactérias na medida em que há uma produção adicional de ATP (Fig. 3).

As bactérias lácticas isoladas dos vinhos, utilizam ainda, como fonte de carbono e/ou energia, ácidos orgânicos tais como: ácido cítrico, tartárico e málico. Estes ácidos são metabolizados via ácido oxaloacético e pirúvico a CO₂ e ácido láctico ou acético (RADLER, 1975).

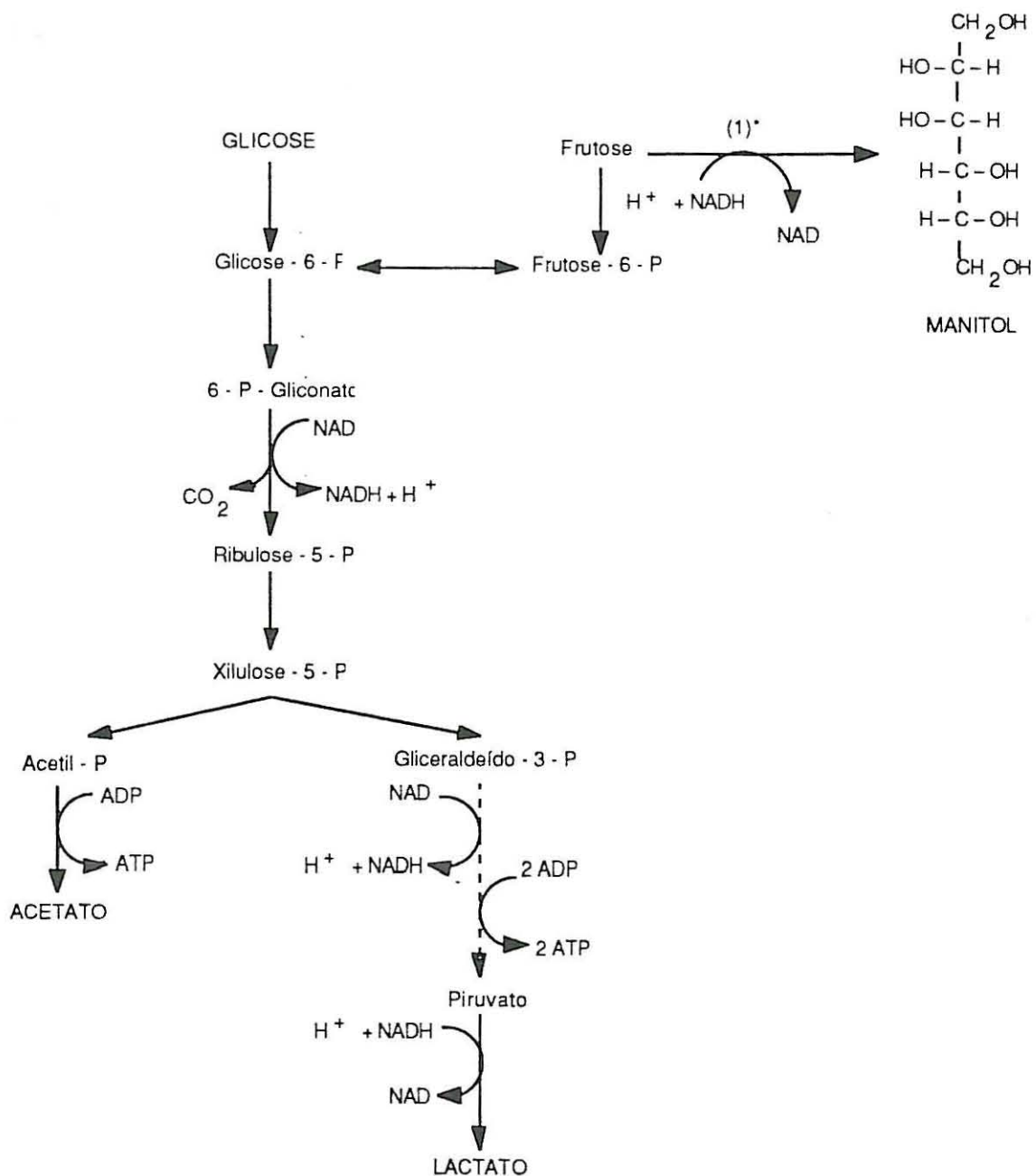


Fig. 3. Formação de manitol a partir da frutose pelas bactérias lácticas heterofermentativas (adaptado de SHÜTZ e RADLER, 1984).

Reacção global: 3 Frutose \rightarrow 1 ácido láctico + 1 ácido acético + 1CO₂ + 2 manitol.

* (1) L-idiol: NAD⁺ 5- Oxireductase

1.4 – Alterações do Vinho Provocadas por Bactérias Lácticas.

1.4.1. – Fermentação Maloláctica.

PASTEUR terá sido o primeiro cientista a verificar a redução da acidez fixa de alguns vinhos em 1858, tendo admitido que tal fenómeno deveria resultar da degradação microbiana do ácido tartárico (KUNKEE, 1967; 1982) mais tarde, em 1889, KULISCH verificou um fenómeno idêntico em cidras, tendo-o atribuído à actividade metabólica de leveduras. A origem bacteriana desta desacidificação só mais tarde, em 1891, foi reconhecida por MULLER-THURGAU. Dez anos depois KOCH demonstrou a hipótese de MULLER-THURGAU ao conseguir a desacidificação de vinhos através da sua inoculação com estirpes de bactérias lácticas (KUNKEE, 1967). Foi ainda KOCH que sugeriu, mais tarde, ser este o fenómeno resultante do desaparecimento do ácido málico.

SEIFERT, em 1901, apresentou a equação global de transformação do ácido málico em ácido láctico e dióxido de carbono, designando as bactérias responsáveis pelo processo por *micrococcus malolacticus*.

Só muito recentemente foi mostrado, contudo, que a fermentação do ácido L(-) málico a L(+) láctico e dióxido de carbono é causada por uma única enzima que foi designada enzima maloláctica (KUNKEE, 1975; CASPRITZ e RADLLER, 1983) e que só foi detectada em bactérias lácticas (RADLER, 1986). De acordo com SHÜTZ e RADLER (1974) esta enzima é induzida pela presença de ácido L-málico e de glicose. Segundo, LAFON-LAFOURCADE (1970 b) a enzima maloláctica é constitutiva em 70% das estirpes estudadas pela autora.

No passado, houve autores que julgaram ser a fermentação maloláctica um processo produtor de energia para as células (PEYNAUD, 1956). Porém, KUNKEE (1967) estimou que a quantidade de energia libertada pela conversão de ácido málico em láctico é de apenas 6kcal (a 18,6°C, pH 3,4 e numa atmosfera de CO₂).sendo, portanto, insuficiente para a síntese de ATP. Presentemente aceita-se que a “reacção” maloláctica é um mecanismo que as bactérias lácticas dispõem para a remoção de protões que inibem o crescimento (RADLER, 1986).

MENDES FAIA 1987 propõe uma hipótese explicativa para o efeito estimulante da fermentação maloláctica sobre as bactérias lácticas.De acordo com esta autora, quanto mais baixo é o pH maior é a quantidade de ácido láctico sob a forma diprotonada o que facilitaria a entrada do ácido para o interior da célula. À primeira vista, e atendendo a que

o pH intracelular está próximo da neutralidade, o ácido málico iria funcionar como desacoplador, o que é desfavorável à manutenção do gradiente protónico e electroquímico na célula. No entanto pela actividade da enzima maloláctica, o malato é descarboxilado formando-se L-lactato e bicarbonato. Segundo a autora a descarboxilação do malato a lactato elimina o efeito desacoplador do ácido pelos efluxos do lactato e do bicarbonato. O efluxo do lactato é electrogénico, pelo menos nalgumas bactérias lácticas, dado que são excretados dois prótons por mole de lactato (OTTO *et al.*, 1980) e a variação de pH no interior e exterior da célula (Δ pH) pode ser utilizado para a síntese de ATP. Estes mecanismos poderiam explicar o efeito estimulante do ácido málico na utilização dos açúcares e no crescimento das bactérias para valores reduzidos de pH (MENDES FAIA, 1987).

1.4.2 – Doenças dos Vinhos.

Exceptuando a degradação do ácido málico, mais nenhuma actividade metabólica das bactérias lácticas nos vinhos é desejável. Porém, a versatilidade metabólica destas bactérias é elevada, sendo mesmo superior á das leveduras (Quadro 1), podendo conduzir ao aparecimento de alterações, mais ou menos profundas vulgarmente designadas por doenças dos vinhos.

Na classificação das alterações dos vinhos provocados por bactérias lácticas, a maioria dos autores (AMERINE *et al.*, 1972; AMERINE e JOSELYN, 1970; RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975) baseia-se na natureza dos substratos utilizados. Assim, as alterações com mais significado são as seguintes:

- a) A degradação do ácido tartárico que se designa vulgarmente como “volta”;
- b) A fermentação láctica da frutose com formação de manitol;
- c) A degradação do glicerol e formação de acroleína “amargor”;
- d) A fermentação láctica dos açúcares “pico láctico”;
- e) A formação de polissacáridos “gordura”.

Quadro 1 – Substratos utilizados e metabolitos produzidos por bactérias lácticas (RADLER, 1986).

	Substratos	Metabolitos
Ácidos	L-malato	L-mactato, CO ₂ (succinato, acetato)
	Citrato, piruvato	Lactato, acetato, CO ₂ , acetofina
	Gluconato	Lactato, acetato, CO ₂
	α-cetoglutarato	4-hidroxi:butirato, succinato, CO ₂
	Tartarato	Lactato, acetato, CO ₂ , succinato
	Sorbato	2,4-hexanodiol
	Clorogenato	Etilcatecol, dihidroxisiquimato
Açúcares	Glicose	Lactato, acetato, etanol, CO ₂
	Frutose	Lactato, etanol, acetato, CO ₂ , manitol
	Arabinose, xilose, ribose	Lactato e acetato
Poliálcoois	Manitol	(provavelmente semelhante à glicose)
	2,3-butanodiol	2-butanol
	Glicerol	1,3-propanodiol
Aminoácidos	Arginina	Ornitina, CO ₂ , NH ₃
	Histidina	Histamina, CO ₂
	Fenilalanina	2-feniletilamina, CO ₂
	Tirosina	Tiramina, CO ₂
	Ornitina	Putrescina, CO ₂
	Lisina	Cadaverina, CO ₂
	Serina	Etanolamina
	Glutamato	γ-aminobutirato, CO ₂
Substratos desconhecidos (provavelmente açúcares)		Propanol, isopropanol, isobutanol, metil-2-butanol-1, metil-3-butanol-1, acetato de etilo, acetaldeído, n-hexanol, octanol, glicerol, 2,3-butanodiol, eritrol, arabitol, dextranas, diacetilo

1.4.2.1 – Degradação dos Açúcares.

As bactérias do ácido láctico fermentam uma vasta gama de glícidos (Quadro 2) incluindo, várias hexoses, pentoses, dissacáridos, trissacáridos, glicosídeos e glicerol (DAVIS *et al*, 1988). São vários os mecanismos de degradação seguidos, conduzindo à formação de diferentes produtos finais.

Quadro 2. Fermentação dos glícidos em meio de cultura complexo (MRS), pH 6,0, pelas espécies *Leuconostoc oenos*, *Pediococcus parvulus* e *Lactobacillus spp* (DAVIS *et al.*, 1988)

Glícido	Percentagem de estirpes que utilizam os vários glícidos			Glícido	Percentagem de estirpes que utilizam os vários glícidos		
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>		<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
	<i>oenos</i> (71) ^b	<i>parvulus</i> (17)	<i>spp</i> (13)		<i>oenos</i> (71) ^b	<i>parvulus</i> (17)	<i>spp</i> (13)
glicerol	1,4	11,8	30,8	Salicina	91,5	100,0	76,9
D-Arabinose	26,8	0	23,1	D- Celobiose	85,9	94,1	69,2
L-Arabinose	35,2	29,4	53,8	D- Maltose	5,6	23,5	92,3
D-Ribose	54,9	23,5	76,9	Lactose	4,2	11,8	76,9
D-Xilose	8,5	5,9	23,1	Melibiose	42,3	11,8	69,2
L-Xilose	36,6	0	7,7	Sacarose	45,1	70,6	92,3
D-Galactose	49,3	26,7	84,6	Trealose	97,2	94,1	84,6
D-Glicose	100,0	100,0	92,3	Inulina	1,4	5,9	7,7
D-Frutose	100,0	100,0	100,0	D-Melezitose	2,8	11,8	53,8
D-Manose	91,5	100,0	76,9	Rafinose	5,6	5,9	46,1
L-Sorbose	0	0	0	Glicogénio	0	0	0
L-Ramnose	70,4	11,8	15,4	Gentiobiose	70,4	94,1	69,2
Mesoinositol	0	0	0	D- Furanose	14,1	46,2	53,8
D-Manitol	26,8	11,8	76,9	D-Lixose	11,3	0	0
D-Glucitol	5,6	11,8	38,50	D-Fucose	0	0	0
α metil-D-manosídeo	1,4	17,6	38,50	L-Fucose	0	0	0
α metil-D- glicosídeo	95,80	100	76,9	Arabitol	0	0	7,7
N acetil-glicosamina	97,2	100,0	69,2	Gluconato	54,9	11,8	76,8
Amidgalina	76,1	100,0	69,2	2 - Ceto gliconato	2,8	0	7,7
Arbutina	93,0	100,0	76,9	5-Ceto gliconato	85,9	11,8	30,8

b – Número de estirpes estudadas.

Como já foi referido, segundo os produtos de degradação das hexoses, as bactérias lácticas são classificadas em homofermentativas (formação quase exclusiva de lactato) e heterofermentativas (formação de lactato, acetato e etanol...). A degradação da frutose pelas bactérias homofermentativas é efectuada pela via de EMBDEN-MEYERHOFF-PARNAS, formando-se quase exclusivamente ácido láctico. As bactérias heterofermentativas utilizam a frutose como fonte de energia, originando os produtos mencionados anteriormente e, também, como aceitador de electrões formando-se manitol (Fig.3). A acumulação de manitol altera o vinho, dando origem a um sabor agridoce desagradável. Porém, a formação de ácido acético concomitantemente com a do manitol é considerada a principal causa de alteração do vinho (MENDES FAIA, 1987 b).

Assume alguma importância o metabolismo das pentoses, presentes no vinho em teores não desprezáveis, e frequentemente responsáveis pela elevação da acidez total e volátil de vinhos aparentemente estáveis.

A degradação das pentoses nas bactérias homo e heterofermentativas efectua-se geralmente pela via das pentoses monofosfato havendo formação de ácido láctico, acético e/ou etanol e CO₂ (GOTTSCHALK, 1986; KANDLER, 1983). No entanto, BARRE (1978) refere que algumas bactérias lácticas podem fermentar as pentoses por um mecanismo homofermentativo, uma vez que o produto final dominante é o ácido láctico, concluindo assim que deverá existir uma via de degradação das pentoses não necessitando da fosfocetolase.

Nos vinhos secos a fermentação alcohólica não deve ser interrompida de modo, a que, a utilização dos açúcares seja efectuada completamente pelas leveduras. Nos vinhos com açúcar residual, deve evitar-se a proliferação das bactérias lácticas, para que os glícidos não sejam degradados por estes microrganismos com produção de ácido acético e láctico. Estes metabolitos afectam negativamente a qualidade do vinho, provocando a alteração bacteriana denominada pico láctico (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975).

1.4.2.2 – Degradação dos Ácidos.

As bactérias do ácido láctico também metabolizam vários ácidos orgânicos: tartárico, cítrico, píruvico, málico e outros. A utilização destes compostos conduz a modificações da cor e do aroma do vinho, sendo particularmente sensíveis a estas alterações aqueles que apresentam pH elevado (DAVIS *et al.*, 1985; BENDA, 1982).

a) Ácido tartárico.

O ácido tartárico é o ácido fixo mais importante presente no vinho, sendo o principal responsável pela sua acidez. É igualmente o mais resistente aos ataques bacterianos, contudo pode acidentalmente ser degradado por algumas bactérias do ácido láctico – é a “doença da volta”. Esta alteração graças aos actuais processos tecnológicos, ocorre hoje bastante raramente.

As condições que favorecem a sua ocorrência são, além da falta de higiene durante os processos de manipulação dos vinhos, o pH elevado (superior a 3,5) e os baixos teores em SO₂ (RANKINE e BRIDSON, 1971).

A degradação do ácido tartárico pelas bactérias lácticas não é característica da espécie. RADLER e YANNISSIS (1972), observaram que das 78 espécies estudadas pertencentes aos géneros *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, somente 4 estirpes de *Lactobacillus plantarum* e uma de *L. brevis* utilizaram este ácido, sendo, em ambos os casos, induzida a enzima responsável pela degradação .

Segundo RIBEREAU-GAYON *et al.* (1975) estirpes susceptíveis de degradarem o ácido tartárico podem ser isoladas de vinhos alterados, de vinhos sãos ou cidras, não dependendo a capacidade da bactéria de degradar aquele substrato do meio de onde foi isolada. Bactérias isoladas de vinhos sãos podem induzir a alteração e bactérias isoladas de vinhos alterados podem não o fazer. De acordo com estes autores, a fermentação do ácido tartárico aparece como uma adaptação podendo ocorrer em bactérias muito diversas “como uma função nova adquirida ou como uma potencialidade que se exprime num meio favorável”. A degradação do ácido tartárico por estas bactérias pode ser total, contudo os ataques mais frequentes correspondem apenas à degradação de um terço do seu teor nos vinhos ou por vezes a um meio (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975). Nas (Figs. 4 e 5) e de acordo com RADLER (1975) apresentamos os processos de degradação do tartarato por *Lactobacillus* homo e heterofermentativos. Nos primeiros o ácido tartárico pela acção da enzima tartarato desidrogenase perde uma molécula de água sendo convertido em oxaloacetato. Em seguida, o oxaloacetato é descarboxilado a piruvato através da oxaloacetato descarboxilase. Metade do piruvato é depois descarboxilado oxidativamente, possivelmente por um sistema da piruvato desidrogenase, originando CO₂ e acetato; a outra metade é reduzida a lactato pela acção da lactato desidrogenase (RADLER e YANNISSIS, 1972).

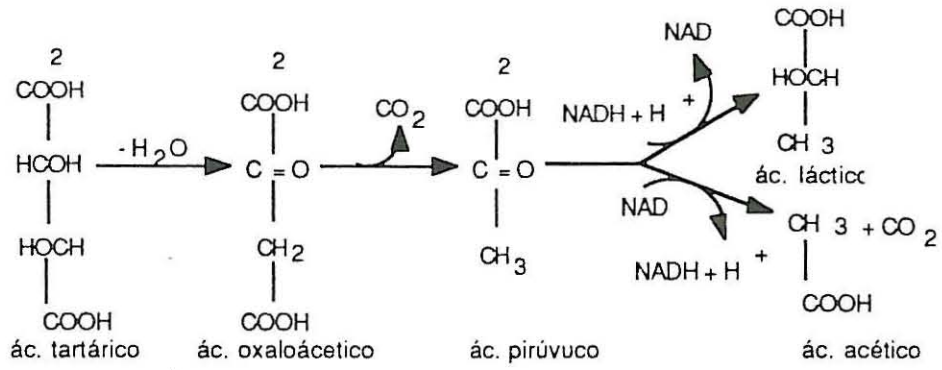


Fig. 4. Mecanismo de degradação do ácido tartárico nas bactérias lácticas homofermentativas (RADLER, 1975).

Nas bactérias heterofermentativas (Fig.5) o ácido tartárico é convertido em oxaloacetato havendo igualmente perda de uma molécula de água. No entanto neste processo metabólico apenas dois terços de oxaloacetato são descarboxilados a piruvato que é completamente convertido em acetato. Um terço deste ácido, pela ação da malato

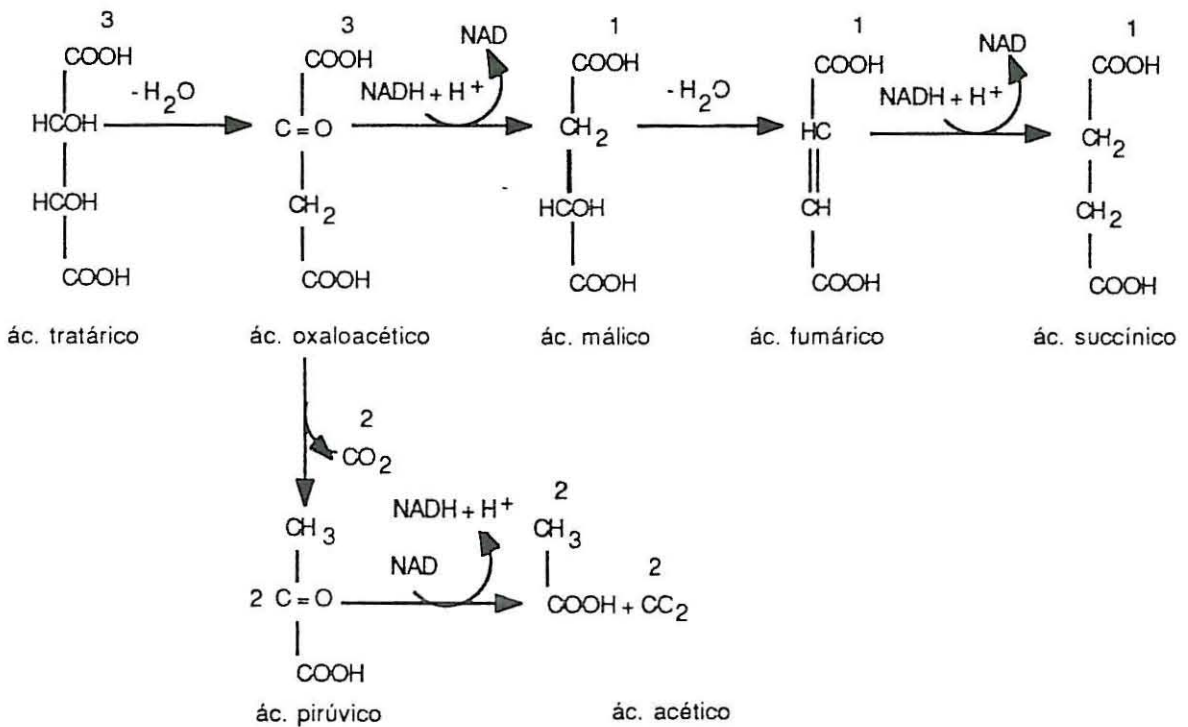


Fig. 5. Degradação do ácido tartárico pelas bactérias heterofermentativas (RADLER, 1975).

desidrogenase, é reduzido a malato. Em seguida, o malato perde uma mole de água e através da fumarase, origina fumarato que é depois reduzido a succinato pela enzima

fumarato redutase. Segundo observações de RADLER e YANNISSIS (1972) esta última reacção é dependente do coenzima FAD no ciclo de Krebs, porém, na decomposição do ácido tartárico os coenzimas NAD e NADH são essenciais.

b) Ácidos cítrico e pirúvico.

A quantidade de ácido cítrico presente no vinho proveniente das uvas é relativamente pequena, situa-se entre 0-0,5 gr/l (RADLER, 1982), sendo metabolizado apenas por algumas bactérias lácticas, principalmente por *Leuconostoc oenos* e algumas espécies do género *Lactobacillus* (BERGEY'S SISTEMATIC BACTERIOLOGY, 1986). Através da citrato liase o ácido cítrico é convertido em acetato e oxaloacetato, o qual é depois descarboxilado a piruvato. Esta enzima é induzida em todas as bactérias à excepção da espécie *Streptococcus diacetilactis* (WHITING, 1975). Todavia, o metabolismo deste ácido está estreitamente dependente das condições do meio e da natureza das bactérias implicadas. Segundo SAN ROMÃO (1987) a degradação do citrato não se traduz normalmente por alterações profundas com repercursões negativas, particularmente pelos reduzidos teores em que se encontra presente no vinho, uma vez que este composto é sempre efectivamente degradado pelas bactérias lácticas juntamente com o ácido málico. Porém, segundo os trabalhos de MENDES FAIA (1987) algumas estirpes não utilizam o ácido cítrico, outras são estimuladas pela presença deste ácido formando-se acetato como produto final. Daí que a autora alerte para os problemas que podem advir da adição de ácido cítrico, adicionado por vezes aos vinhos para evitar a casse férrica ou para os tornar mais frutados.

O ácido pirúvico existente nos vinhos provém, essencialmente, do metabolismo fermentivo das leveduras. Segundo (RADLER, 1975) o piruvato é um intermediário chave da fermentação maloláctica. RANKINE (1966) aconselha mesmo a adição de pequenas quantidades de piruvato para estimular a desacidificação biológica. No entanto, de acordo com os resultados obtidos por (MENDES FAIA, 1987), a adição de ácido pirúvico ao meio de cultura teve um efeito estimulante ou repressivo do crescimento em função do género: em *Leuconostoc oenos* e em *Lactobacillus delbruekii* provocou um acréscimo altamente significativo nas taxas de crescimento, excepto na estirpe ML₃₄, embora tenha prolongado significativamente a duração da fase *lag* de todas as espécies estudadas. Ao contrário, em *Pediococcus*, a autora detectou um efeito altamente repressivo na biomassa e nas taxas de crescimento. Dependendo da espécie, os produtos resultantes da degradação deste ácido são: ácido D e L-láctico, CO₂, 2,3-butanodiol, acetoína, ácido

acético e/ou etanol. FURNACHON e LLOYD (1965) e WHITING (1975) salientam a formação de diacetilo a partir do ácido pirúvico presente no vinho durante a fermentação maloláctica. O diacetilo e a acetoína condicionam o aroma do vinho (DAVIS *et al.*, 1988). Concentrações em diacetilo de 1 a 4mg/l têm efeito positivo na qualidade do vinho, teores superiores a 5mg/l afectam negativamente o aroma, dando ao vinho, um aspecto gorduroso indesejável (RANKINE 1966; DAVIS *et al.*, 1985) A produção deste composto é variável com a estirpe. As espécies do género *Pediococcus* são mais eficientes na produção do diacetilo que as do género *Leuconostoc* (BENDA, 1982). Todavia, MENDES FAIA (1987) não observou maior produção de diacetilo nas estirpes de *Pediococcus damnosus*, quando comparadas com as estirpes de *Leuconostoc oenos*.

c) Outros ácidos.

O ácido glucónico, galacturónico e glucorónico aparecem em vinho provenientes de uvas infectadas com *Botrytis cineria*. RADLER e SCHÖNIG (1978) estudaram a capacidade de degradação do ácido glucónico em 116 estirpes dos géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Todas as espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc oenos* metabolizaram este ácido com a formação de ácido láctico, acético, etanol e CO₂.

O ácido α -cetoglutárico presente no vinho é produzido quase na sua totalidade durante a fermentação alcohólica pela actividade metabólica das leveduras (RANKINE e POCOCK, 1969). Segundo RADLER e BRÖHL (1984) várias estirpes de *Leuconostoc oenos* descarboxilam o ácido α -cetoglutárico a semi-aldeído succínico que pode ser reduzido a 4-hidroxibutirato ou oxidado a succinato.

d) Ácido sórbico.

O ácido sórbico é utilizado como antiséptico em vários produtos alimentares, incluindo vinhos adamados, por inibir o crescimento das leveduras (RADLER, 1976). As doses legais deste composto utilizadas nos vinhos são $\leq 200\text{mg/l}$. Estes teores não inibem o crescimento das bactérias lácticas, uma vez que, e segundo este autor, o ácido sórbico é particularmente eficaz contra microrganismos que possuem metabolismo oxidativo. O crescimento das bactérias lácticas só é reprimido para valores da ordem dos 500 e 1000mg/l, por isso deve ser utilizado nos vinhos ($\leq 200\text{mg/l}$) concomitantemente com o dióxido de enxofre. É reduzido por estas bactérias a 2-4 hexadienol; para os valores de pH

do vinho esterifica quimicamente com o etanol formando 2-etoxihexa-3,5-dieno, composto responsável pelo odor a gerânio (EDINGER e SPLITTSTOESSER, 1986; RADLER, 1986).

1.4.2.3 – Degradação do Glicerol.

O glicerol é um constituinte importante do vinho, contribuindo para a sua viscosidade e macieza, cujo teor é dependente de vários factores – estirpe de levedura responsável pela fermentação alcoólica, temperatura, pH, níveis de SO₂, estado sanitário das uvas (OUGH *et al.*, 1972; RADLER e SCHÜTZ, 1982; RANKINE e BRIDSON, 1971; RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975 e 1982). Também algumas bactérias lácticas homo e heterofermentativas, formam teores apreciáveis de glicerol a partir das hexoses e pentoses e particularmente em vinhos de mostos de cultura de *Botritis cinerea* (SAN ROMÃO e LAFON-LAFOURCADE, 1979).

O glicerol é decomposto por certas espécies heterofermentativas do género *Lactobacillus* (SHOPFER, 1973). Estas espécies não utilizam o glicerol como fonte de energia, portanto só o metabolizam na presença de glicose e/ou frutose e são estimuladas pelo etanol (SCHÜTZ e RADLER, 1984). Na (Fig. 6) apresentamos a degradação bacteriana do glicerol. O amargor que se detecta nos vinhos devido à degradação do glicerol tem sido atribuído às reacções da acroleína com as catequinas e as antocianinas (AMERINE *et al.*, 1972). Convém no entanto salientar, que a acroleína não resulta da actividade metabólica das bactérias lácticas mas sim da desidratação do 3-hidroxiopropanal em condições de acidez, e elevação da temperatura (SCHÜTZ e RADLER, 1984; WHITING, 1975). A acroleína é altamente tóxica, provoca irritações nas mucosas nasais e nos olhos e tem um cheiro desagradável a rábano picante (AMERINE *et al.*, 1972). Os vinhos tintos são mais susceptíveis a esta alteração por possuírem maior teor em polifenóis (BENDA, 1982).

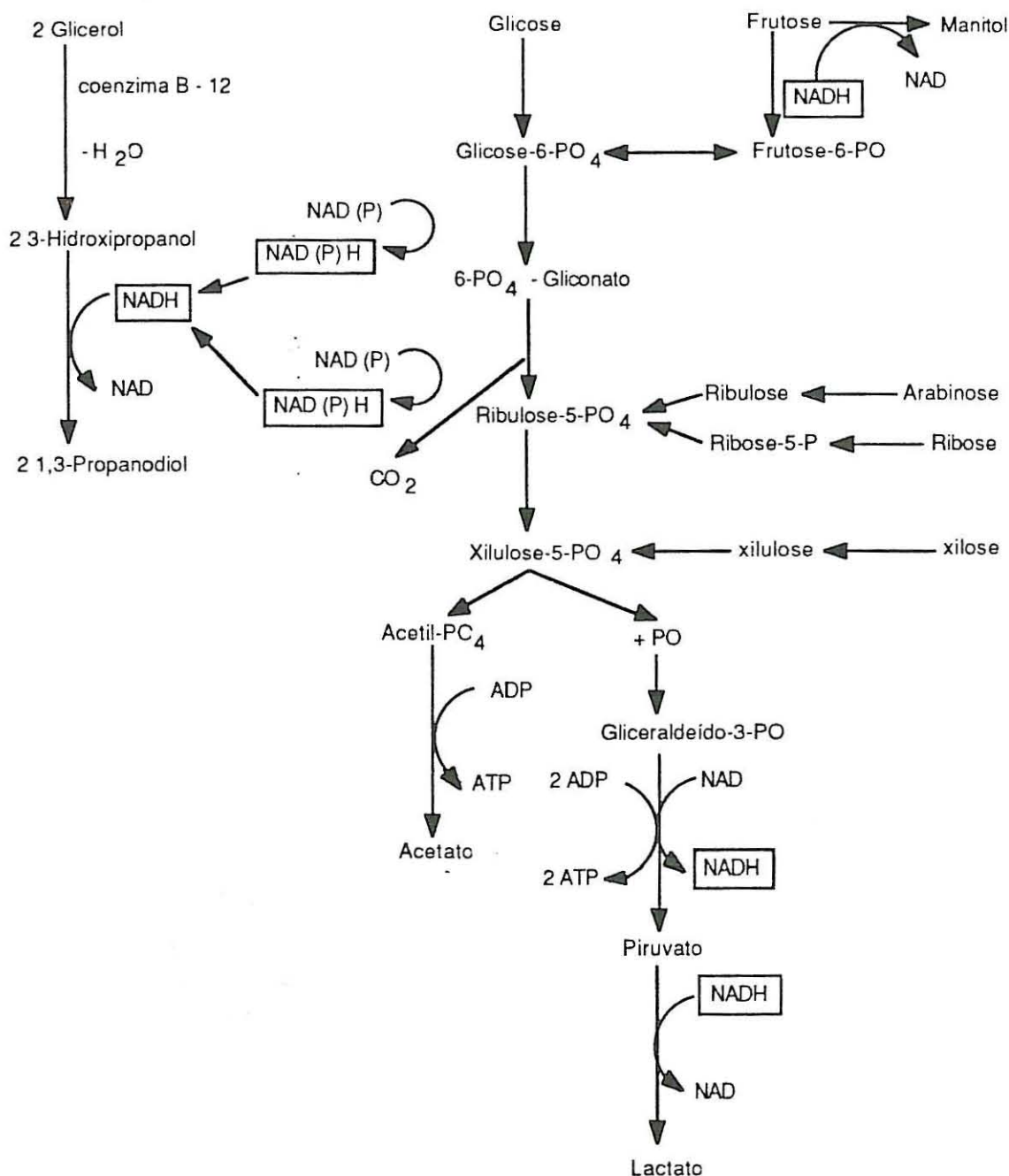


Fig. 6. Desassimilação do glicerol por *L.brevis* (SCHÜTZ e RADLER, 1984)

1.4.2.4 – Formação de Polissacáridos.

Algumas espécies de bactérias do ácido láctico formam dextranas, substâncias que afectam a qualidade e a filtrabilidade do vinho (WIBOWO *et al.*, 1985) provocando a alteração vulgarmente designada por gordura. Pode aparecer em vinhos tintos e brancos como uma manifestação particular da fermentação maloláctica. Nos vinhos, julga-se serem estirpes do género *Leuconostoc* os responsáveis por esta alteração (RIBEREAU-

-GAYON *et al.*, 1975), enquanto que na cerveja e cidra são referidas outras estirpes de *Lactobacillus* e *Pediococcus* como agentes causais desta transformação no vinho.

1.5 – Factores que Afectam o Crescimento.

São numerosos os factores que afectam o crescimento e sobrevivência das bactérias lácticas do vinho. LAFON-LAFOURCADE (1975) divide os factores condicionantes do crescimento das bactérias em duas categorias: nutricionais e físico-químicos, que de seguida iremos apresentar mais detalhadamente.

1.5.1 – Factores Nutricionais

É conhecida a limitada capacidade biosintética das bactérias lácticas em geral e das do vinho em particular, dado que exigem factores específicos de crescimento, nomeadamente aminoácidos e vitaminas.

As exigências em aminoácidos e vitaminas variam com o género e espécie bacteriana e com a composição do meio (PEYNAUD, 1956). Os cocos são muito mais exigentes que os bacilos o que explica a dificuldade de os cultivar (PEYNAUD e DOMERCQ, 1968). O ácido glutâmico, isoleucina, leucina e valina são indispensáveis ao crescimento dos bacilos. Os cocos requerem, para além destes aminoácidos, arginina, histidina, metionina, fenilalanina, serina, triptofano e tirosina (PEYNAUD e DOMERCQ, 1968, RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975). As bases puricas e pirimidicas funcionam, também, como estimulantes do crescimento (PEYNAUD e DOMERCQ, 1968).

Estudos efectuados sobre as exigências nutricionais das bactérias lácticas demonstram que o extracto de carne, os extractos de fígado e de levedura, a peptona e a caseína favorecem o crescimento bacteriano. O extracto de carne é utilizado nos meios de cultura como suplemento em aminoácidos, o extracto de levedura como suplemento vitamínico (BERG *et al.*, 1981).

Certas bactérias da fermentação maloláctica são ainda estimuladas por factores de crescimento (TJF) 4'-0-(β -D-glicopiranosil) D-ácido-pantoténico presentes no sumo de tomate (AMACHI, 1975; IMAMOTO *et al.*, 1973), de uva (STAMER STOYLA, 1970) e de couve (TIWARI *et al.*, 1980). O TJF é constituído, segundo (YOSHIZUMI, 1975) por glicosídeo de ácido pantoténico, porém, COGAN *et al.*, (1968) identificaram o agente estimulante como constituído por adenosina e adenina.

Segundo KUNKEE (1967), verifica-se um estímulo na fermentação maloláctica nos vinhos inoculados com *Leuconostoc oenos* quando a fermentação alcoólica dos mostos decorre na presença das películas. Idênticos resultados obtiveram BEELMAN e GALLANDER (1970 b), tendo observado que a velocidade de degradação do ácido L-málico em *Leuconostoc citrovorum* é proporcional ao tempo de contacto das películas com o mosto. Estas observações levaram à conclusão que as películas continham substâncias estimulantes do crescimento.

Pode pensar-se ainda que o aumento do teor em certos aminoácidos e factores de crescimento observados por LAFON-LAFOURCADE e PEYNAUD (1961), em vinhos nas condições de adega no fim da fermentação alcohólica seja devido à autólise das leveduras e possível degradação das proteínas das leveduras pelas proteases (KING e BEELMAN, 1986 e MENDES FAIA, 1987).

Durante a fermentação maloláctica ocorrem ainda mudanças significativas na concentração de aminoácidos do vinho, devidas ao crescimento bacteriano (KUENSCH *et al.*, 1974). A concentração de uns aumenta a de outros diminui (Quadro 3).

Os aminoácidos não são apenas assimilados mas também, ocasionalmente, decompostos. WEILLER e RADLER (1976), referem que certas estirpes conseguem metabolizar completamente a arginina, ácido glutâmico, histidina e tirosina. Outros aminoácidos, tais como triptofano, ácido aspártico, trionina e fenilalanina, são apenas parcialmente metabolizados. Estudos de RADLER (1975) evidenciam que das 100 estirpes de bactérias lácticas estudadas, várias estirpes de *Lactobacillus brevis* metabolizam a arginina, ácido glutâmico e isoleucina. Em *Streptococcus lactis* a arginina pode ser utilizada como fonte de energia, em determinadas condições, quando a glicose funciona como substrato limitante, havendo a formação de uma mole de ATP por mole de arginina.

Recentemente têm merecido considerável interesse a presença de aminas no vinho, e o papel das bactérias lácticas na sua produção (LAFON-LAFOURCADE, 1975; RIBAS GONZALO, 1983). A amina mais importante é a histamina resultante da descarboxilação da histidina por *Lactobacillus spp* e por uma estirpe de *Pediococcus cerevisiae* pela acção da enzima histidina descarboxilase (RADLER, 1975). Esta enzima tem um óptimo de actividade a pH ácido, necessitando de piridoxal fosfato (MEISTER, 1965). A histidina é um vaso dilatador libertado em certos tecidos animais como resultado de uma hipersensibilidade alérgica e, portanto, indesejável no vinho (MENDES FAIA, 1987).

A capacidade de descarboxilação depende da estirpe e das condições de crescimento, principalmente da quantidade de nutrientes e do pH do meio (IENESTEA,

1971). As estirpes do género *Pediococcus* produzem maiores quantidades que as dos géneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (WIBOWO *et al.*, 1985).

As bactérias do ácido láctico, para além dos aminoácidos, necessitam de factores de crescimento tais como a tiamina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, piridoxina, biotina e mesoinositol e principalmente riboflavina, como estimulantes da fermentação maloláctica (PEYNAUD e S. DOMERCQ 1968). Porém as vitaminas presentes no vinho e mosto geralmente satisfazem quantitativamente as necessidades das bactérias lácticas. Comparando o teor em vitaminas do mosto com o do vinho, observa-se que o primeiro é pobre em tiamina e rico em riboflavina, em ácido para-aminobenzoico e cianocobalamina (PEYNAUD e LAFON-LAFOURCADE, citado por BENDA, 1982).

Quadro 3. Modificações da composição azotada dos vinhos provocada pela fermentação maloláctica. (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975)

	<u>vinho tinto</u>		<u>vinho branco</u>	
	antes da fermentação maloláctica	depois da fermentação maloláctica	antes da fermentação maloláctica	depois da fermentação maloláctica
Alanina	9	0	–	–
Arginina	24	14	58	14
Cisteína	24	14	58	14
A. Glútamico	34	71	34	47
Isoleucina	12	27	16	18
Leucina	6.6	37	18	21
Trionina	19	100	258	200
Triptofano	3.7	24	5.2	18
Valina	26	38	30	38
N amoniacal	7	28	3	17

As necessidades nestes elementos variam com a espécie, a composição do meio, as condições de cultura e a fase de crescimento (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975). No Quadro (4) observam-se algumas diferenças entre as necessidades vitamínicas dos cocos e dos bacilos. Os bacilos exigem geralmente a tiamina e, sobretudo, a riboflavina, enquanto que o ácido fólico tem um efeito estimulante muito importante e quase específico nos

cocos – o ácido fólico activou 75% dos cocos e apenas 5% dos bacilos (PEYNAUD e DOMERCQ, 1968).

WEILLER e RADLER (1972) verificaram que o ácido pantoténico e nicotínico são indispensáveis ao crescimento de todas as estirpes por eles estudadas.

As necessidades em certas vitaminas foram utilizadas por estes autores como base de diferenciação taxonómica. *Leuconostoc oenos* distingue-se de *Leuconostoc mesenteroides* por manifestar uma necessidade adicional em ácido fólico. O ácido fólico e a riboflavina foram essenciais para todas as estirpes de *Lactobacillus casei*, ao contrário do que se verificou em *Lactobacillus plantarum*. A tiamina foi necessária para *Leuconostoc* e não para *Pediococcus*.

Quadro 4. Necessidades das bactérias lácticas em factores de crescimento.

Percentagem das espécies para as quais um factor de crescimento é independente (-), estimulante (s) e essencial (+) (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975).

	<u>Bacillus</u>			<u>Coccus</u>		
	-	S	+	-	S	+
Tiamina	31	43	26	31	43	26
Riboflavina	22	13	65	22	13	65
Nicotinamida	69	18	13	75	22	3
Ac.pantoténico	0	9	91	0	7	93
Ac.nicotínico	4	9	87	0	15	85
Ac. p.a. benzoico	83	13	4	75	20	5
Mesoinositol	83	13	4	72	23	5
Ac.fólico	95	5	0	25	45	30
Biotina	87	13	0	83	12	5
Cobalamida	83	13	4	85	15	0

Estes microrganismos têm igualmente necessidade de elementos minerais. O magnésio, o sódio, o potássio e o manganês são indispensáveis ao crescimento bacteriano, enquanto que a descarboxilação do ácido L-málico depende do teor em potássio (KUNKEE, 1967).

Segundo KUNKEE, *Leuconostoc gracile* não se desenvolve numa solução nutritiva desmineralizada, porém, a adição de K^+ , Na e Mg^{2+} permite um crescimento e desacidificação biológica normais (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975).

1.5.2 – Factores Físico-químicos

1.5.2.1 – pH

O pH é considerado como um dos factores ambientais, que afecta mais significativamente o desenvolvimento das bactérias do ácido láctico. O pH óptimo de crescimento que se situa entre 4,3 e 4,8 é característico da espécie e depende da composição do meio de cultura (LAFON-LAFOURCADE, 1975). Estes valores são muito superiores ao pH normal dos vinhos (INGRAHAN *et al.*, 1960) embora algumas estirpes bacterianas cresçam a valores de pH da ordem de 2,9 a 3,0 (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975; BENDA, 1982; KUNKEE, 1974 e LAFON-LAFOURCADE, 1975).

O efeito do pH manifesta-se ao nível da seleção das bactérias que se desenvolvem no vinho (WIBOWO *et al.*, 1985; COSTELLO, *et al.*, 1983; RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975). Geralmente *Leuconostoc oenos* é a única espécie isolada de vinhos com pH inferior a 3,5. Os géneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* predominam em vinhos com valores de pH superiores (DAVIS *et al.*, 1985), principalmente depois da fermentação maloláctica estar terminada. O pH exerce, ainda, um efeito selectivo sobre os substratos metabolizáveis por cada uma das estirpes bacterianas que crescem no vinho (WIBOWO *et al.*, 1985). A velocidade de degradação dos açúcares é maior à medida que aumenta o pH, conduzindo a um acréscimo na acidez volátil, no teor em ácido acético (PEYNAUD e S. DOMERCQ, 1968) e a uma diminuição na produção de diacetilo (RANKINE *et al.*, 1969).

A taxa de crescimento (Quadro 5) e concomitantemente a velocidade de descarboxilação do malato (Quadro 6) são função do pH inicial do vinho, ocorrendo tanto mais rapidamente quanto mais elevado for esse valor (BOUBOURAS e KUNKEE, 1971; LIU e GALLANDER, 1983; CASTINO *et al.*, 1975; DAVIS *et al.*, 1985; RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975). Porém, a sensibilidade à acidez do meio é variável com a estirpe (Fig. 4): *Leuconostoc oenos* são menos sensíveis aos valores baixos de pH que as estirpes dos géneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975; MENDES FAIA, 1987). A elevada tolerância à acidez do género *Leuconostoc* explica a razão pela qual é a única estirpe isolada de vinhos com pH inferior a 3,5 (DAVIS *et al.*, 1985; COSTELLO *et al.*, 1983).

Quadro 5. Valores médios das taxas de crescimento (h^{-1}) das várias estirpes, para vários níveis de pH (MENDES FAIA, 1987)

pH	Estirpes				
	8A	ML34	12A	27	CuC ₁
3,5	0,0352	0,0319	0,0310	0,0000	0,0088
4,0	0,0697	0,0769	0,1512	0,0663	0,1155
4,5	0,0862	0,0820	0,1663	0,1077	0,1410

8A e ML34 – Pertencem ao género *Leuconostoc*

12A e 27 – Pertencem ao género *Pediococcus*

CuC₁ – Pertence ao género *Lactobacillus*

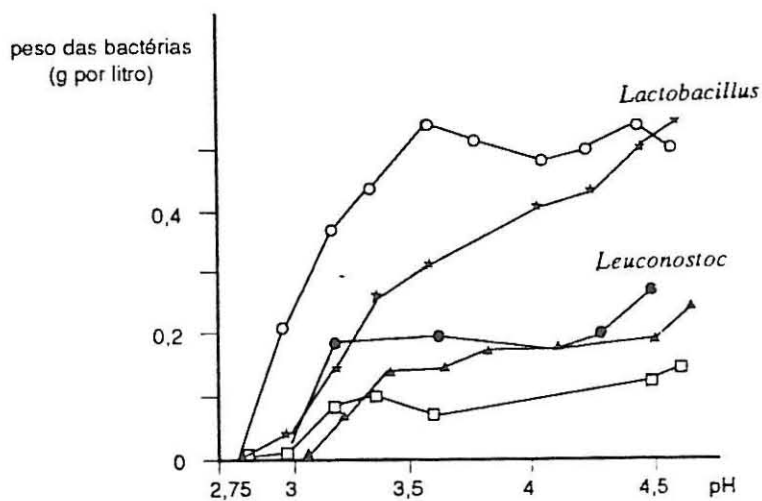


Fig. 7. Influência do pH no crescimento de diversas bactérias lácticas em meio de cultura com sumo de tomate. (RADLER, citado por RIBEREAU GAYON *et al.*, 1975.)

Quadro 6. Tempo necessário (dias) à ocorrência da fermentação maloláctica num vinho com vários valores de pH. (BOUBOURAS e KUNKEE, 1971)

pH inicial	Tempo
3,15	164
3,30	59
3,40	37
3,50	27
3,63	25
3,73	19
3,83	14

KUNKEE (1967) refere a existência de uma relação linear directa entre o pH natural do mosto e a taxa da fermentação maloláctica, para valores de pH compreendidos entre 3,35 e 3,50. A actividade da enzima maloláctica parece ser função do pH tendo sido estudada por LAFON-LAFOURCADE (1970 b). Para os bacilos o óptimo da actividade enzimática situa-se entre 3,5 e 4,0, havendo uma certa inibição para valores de pH 3,0 e superiores a 4,5. A sensibilidade é variável, em *Lactobacillus brevis*, a actividade enzimática decresce 60% quando o pH é 3,0 ou 4,5. Pelo contrário, em algumas espécies de *Lactobacillus hilgardii*, a quantidade de ácido L-málico degradado por gr de células/litro de meio à temperatura de 30°C, durante 24 horas, é independente do pH. Nos cocos a degradação do ácido málico, ocorre geralmente a pH mais baixo, com pH óptimo entre 3,0 e 4,0. O complexo enzimático é fortemente inibido para valores superiores a 4,5. LAFON-LAFOURCADE (1970 b) conclui que as bactérias lácticas não proliferantes têm um óptimo de degradação do ácido málico a pH 3,5 e 4,0 e que a fermentação maloláctica é possível a valores de pH reduzidos para os quais todo o crescimento é inibido.

O efeito inibidor do pH resulta da sua acção directa na multiplicação bacteriana, mas sobretudo, do seu efeito sinérgico na actividade do dióxido de enxofre (KUNKEE, 1967). A fermentação maloláctica é parcialmente inibida por estes factores quando actuam individualmente e, se usados em simultâneo, reprimem completamente o processo (CASTINO *et al.*, 1975; LIU e GALLANDER, 1983).

O sinérgismo do pH na actividade do SO₂ pode ser atribuído ao efeito do pH no grau de ionização do dióxido de enxofre (MENDES FAIA, 1987).

1.5.2.2 – Dióxido de enxofre.

O dióxido de enxofre tem vindo a ser utilizado em vinificação como antioxidante, antioxidásico e para evitar o crescimento das bactérias e leveduras não interessantes do ponto de vista fermentativo. Durante a conservação de vinhos é utilizado como agente estabilizante (HAMOND e CARR, 1976).

No vinho o SO_2 apresenta-se sob as formas de H_2SO_3 ou SO_2 molecular dissolvido, de ião bissulfito (HSO_3^-) e de ião sulfito (SO_3^-) (WIBOWO *et al.*, 1985). A quantidade de cada uma destas formas é variável com o pH (Fig. 8). A pH neutro existe praticamente a mesma quantidade de HSO_3^- e SO_3^- . A pH 5,0 predomina o ião bissulfito e a pH 3,0 aparecem o ião bissulfito e o SO_2 molecular (HAMOND e CARR, 1976). Estas formas são designadas em Enologia por dióxido de enxofre “livre”.

Parte do dióxido de enxofre adicionado aos vinhos combina-se com os compostos orgânicos nele existentes. Os compostos carbonilo, principalmente o acetaldeído, são os agentes mais importantes de combinação do SO_2 (FORNACHON, 1963; WIBOWO *et al.*, 1985). Pode, de igual modo, combinar-se com a arabinose e a glicose,

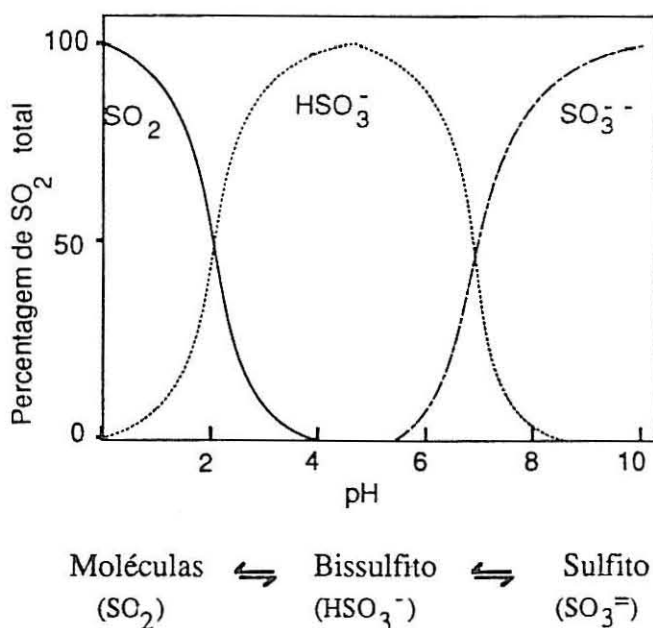


Fig. 8. Percentagem de distribuição de sulfito, bissulfito e SO_2 moléculas em solução aquosa, em função do pH (HAMOND e CARR, 1976).

não reagindo praticamente com a frutose e a sacarose (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975). Para além destes compostos, os taninos e as antocianinas também formam compostos de adição com o SO_2 (KUNKEE, 1967), ocorrendo uma redução de intensidade da cor do

vinho. No entanto, a reacção é reversível e a descoloração só é significativa em vinhos com pH elevados, uma vez que o SO₂ combinado com as antocianinas é libertado quando se acidifica o meio (DAVIS *et al.*, 1985).

O efeito do SO₂ faz-se sentir a nível da duração da fase de adaptação (Fig. 9), da taxa de crescimento, no metabolismo do ácido málico e dos açúcares e das características sensoriais do vinho (LAFON-LAFOURCADE, 1975; LUI e GALLANDER, 1983). A fermentação maloláctica ocorre mais facilmente em vinhos sem SO₂, todavia, também tem lugar, mas com menor velocidade, em vinhos com 100-200 ppm de SO₂, desde que se aumente a população bacteriana (KUNKEE *et al.*, 1964). Este autor em 1967, refere que em vinhos com pH 3,7 a fermentação maloláctica é possível mesmo quando os teores em SO₂ são superiores a 150 ppm.

LAFON-LAFOURCADE (1970 b) avaliou o comportamento da enzima maloláctica em *Leuconostoc gracile* cf34 e *Lactobacillus plantarum* em vinhos com doses crescentes de SO₂. A sensibilidade foi dependente do número de células presentes. A autora salienta que 50 mg de acetaldeído sulfuroso diminuem ligeiramente a actividade da enzima maloláctica quando a concentração celular é de 5 gr/l. Utilizando 2 gr/l a redução é de 25%, com 1 gr/l diminui 50%, sendo totalmente inibida para doses de inóculo baixas. Portanto, nos vinhos em que se pretenda a fermentação maloláctica, a adição de dióxido de enxofre deverá ser efectuada no final desta fermentação (RANKINE e BRIDSON, 1971).

A tolerância ao dióxido de enxofre depende, no entanto, de vários factores, entre os quais se salientam: forma química do SO₂, espécie, pH e composição química do meio de cultura (LAFON-LAFOURCADE e PEYNAUD, 1974; HOOD, 1983).

A acção antimicrobiana do SO₂ livre é reconhecida por todos os autores estudados, o mesmo não acontecendo no que diz respeito à eficácia antibacteriana do dióxido de enxofre combinado (MENDES FAIA, 1987). Segundo WIBOWO *et al.* (1985), de todas as formas de SO₂ presentes no vinho a forma molecular é a mais activa isto porque segundo BEECH e THOMAS (1984), as moléculas não ionizadas penetram através da parede e membrana citoplasmática mais rapidamente que as moléculas não ionizadas.

Apesar da acção do dióxido de enxofre livre ser superior à do combinado, para concentrações elevadas o segundo também tem algum efeito (FORNACHON, 1963). Este

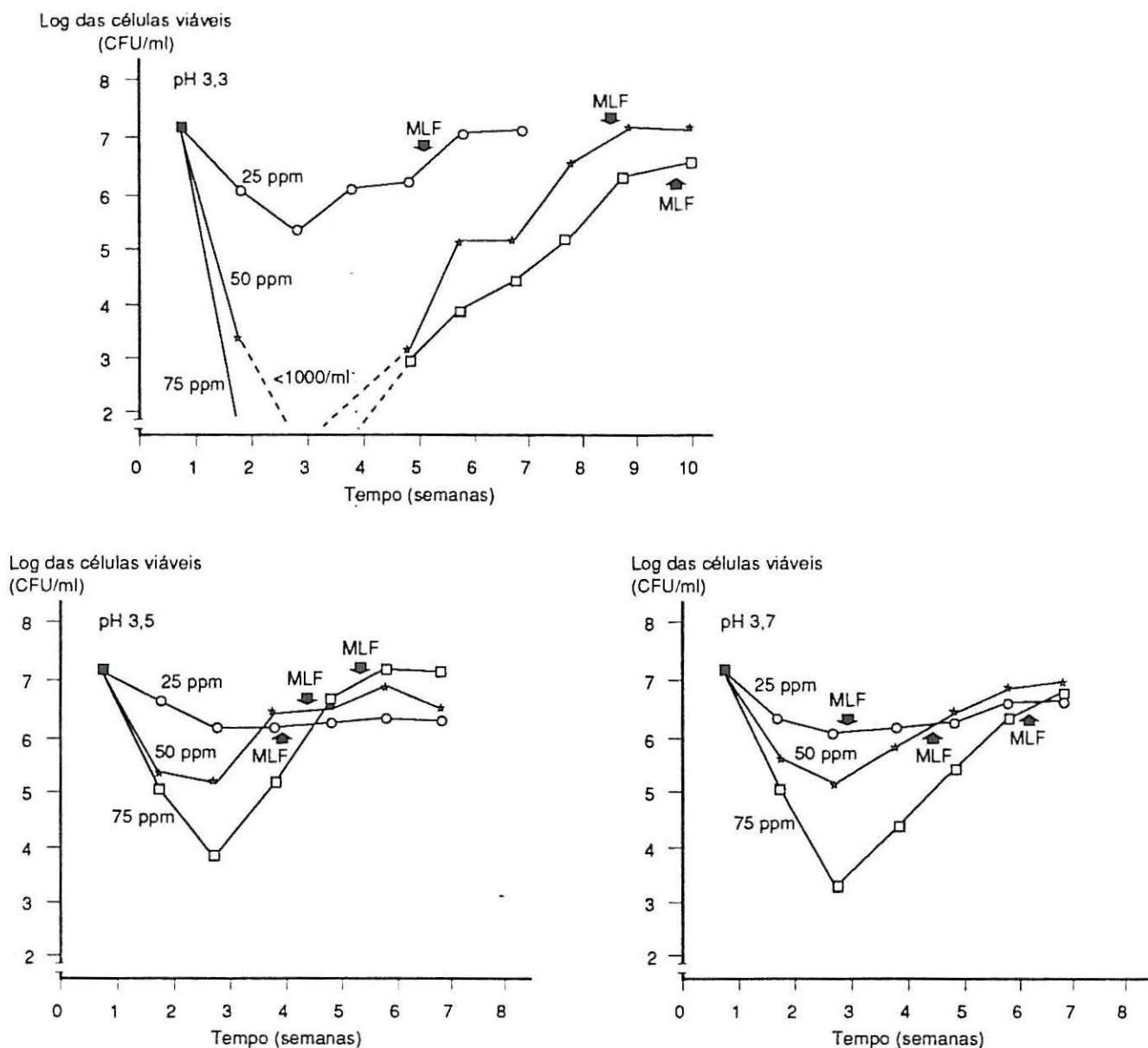


Fig. 9 Efeito do SO_2 no crescimento das bactérias do ácido láctico durante a vinificação de vinhos Chancellor a pH 3,3; 3,5 e 3,7. A seta indica o início da fermentação maloláctica (LIU e GALLANDER, 1983)

autor refere a inibição de algumas espécies heterofermentativas, *Lactobacillus hilgardii* e *Leuconostoc mesenteroides* em meios ricos em açúcar, contendo acetaldeído sulfuroso. Estes microrganismos durante o crescimento metabolizam o acetaldeído, libertando o bisulfito que estava combinado, impedindo assim o crescimento bacteriano. WIBOWO *et al.* (1985) referem, também, que a multiplicação microbiana é afectada de igual modo no vinho com 100 a 150 mg/l de SO_2 total, ou 50-100 mg/l de SO_2 combinado, ou na presença de 1 a 10 mg/l de SO_2 livre. O dióxido de enxofre molecular tem uma acção bactericida, enquanto que a forma combinada é bacteriostático (LAFON-LAFOURCADE, 1974;

MAYER *et al.*, citado por HOOD, 1983). A sensibilidade ao SO₂ é também variável com o género: as bactérias são mais sensíveis que as leveduras e os cocos são menos resistentes que os bacilos. As espécies do género *Leuconostoc* são mais susceptíveis que as dos géneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975; BEECH e THOMAS, 1984; DAVIS *et al.*, 1985 e MENDES FAIA, 1987). DAVIS *et al.* (1985) referem que a espécie *Pediococcus parvulus* conduziu a fermentação maloláctica num vinho comercial com 72 mg/l de SO₂ livre, não referindo todavia o pH do vinho.

O efeito inibidor do SO₂ aumenta quando decresce o pH. Porém, num vinho com pH 3,5, ao qual foi adicionada uma concentração relativamente alta de dióxido de enxofre molecular, a viabilidade celular de *Lactobacillus spp* e as características sensoriais do vinho não foram significativamente afectadas quando foi utilizado no controlo da fermentação maloláctica um reactor de fluxo contínuo e células imobilizadas numa matriz com 2% de Kcarragénio (CRAPISI *et al.*, 1987).

1.5.2.3 – Temperatura

As bactérias do ácido láctico isoladas do vinho são segundo (RIBEREAU-GAYON *et al.*, LAFON-LAFOURCADE, 1983) mesófilas, variando a sua temperatura óptima de crescimento entre 25 e 30°C. No entanto, BARRE (1978) isolou 8 estirpes pertencentes ao grupo *Thermobacterium* com características muito semelhantes a *L. acidophilus*, de mostos fermentados a temperaturas elevadas (40 a 43°C) Temperaturas diferentes dos valores óptimos condicionam a taxa específica de crescimento, a “actividade maloláctica”, e a duração do período de latência (PEYNAUD e DOMERQ, 1967 A) e os substratos utilizados (PIRT, 1975). LAFON-LAFOURCADE (1983) verificou que um decréscimo de 5°C na temperatura é suficiente para impedir o crescimento de grande parte da população bacteriana e prolongar a duração da fermentação maloláctica (Fig. 10). Porém, o efeito deste factor é variável com a estirpe, com o pH e com a percentagem de etanol. SILVER e LEIGHTON (1981) avaliaram o crescimento de três estirpes de *Leuconostoc oenos* a várias temperaturas e observaram que a descarboxilação do ácido málico se completava a 10°C ao fim de 10 dias, 58 e 64 dias respectivamente nas estirpes B44.40 ML₃₄, e PSU1.

A desacidificação biológica é máxima para temperaturas situadas entre 30 e 35°C, é mais lenta a 15 e a 35°C.

Depois de ter avaliado laboratorialmente a degradação do ácido málico a 25°, a 30° e a 35°C, LAFON-LAFOURCADE (1975) concluiu que a temperatura óptima de crescimento bacteriano era inferior à temperatura óptima de degradação do ácido málico.

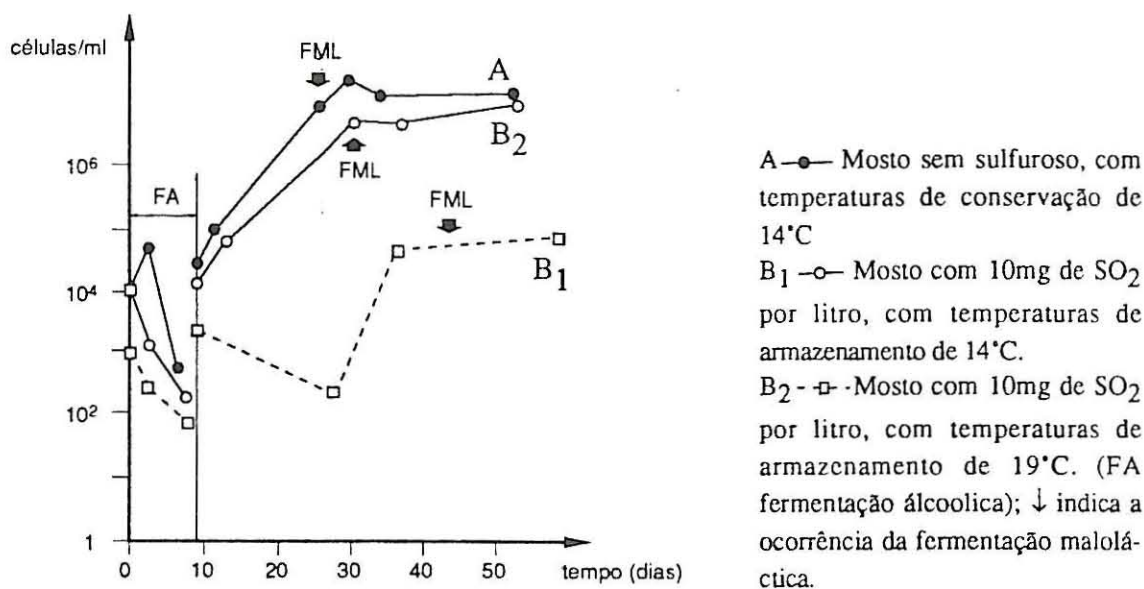


Fig. 10. Efeito da concentração de SO₂ e da temperatura na evolução do número de bactérias lácticas durante a vinificação de vinhos tintos (LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1983).

De acordo com RIBEREAU-GAYON *et al.* (1975), a fermentação maloláctica é tanto mais lenta quanto mais baixa for a temperatura, podendo efectuar-se em alguns dias a 25°C, algumas semanas a 15°C e alguns meses a temperaturas inferiores. Ocorre, no entanto, a temperaturas de 10-15°C (KUNKEE, 1967) ou inferiores, desde que a população bacteriana inicial seja elevada (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975).

O frio de Inverno constitui em algumas regiões, como Trás-os-Montes, o principal obstáculo para a ocorrência desta fermentação. Quando se pretende a desacidificação biológica antes da Primavera, aconselha-se o aquecimento das adegas. Porém, a temperatura nunca deverá ultrapassar os 18°C, uma vez que o aumento da temperatura conduz a um acréscimo da acidez volátil, devido à degradação de outros componentes que não o ácido málico (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1976). Dado o grande interesse em que a degradação do ácido málico se processe a temperaturas relativamente baixas, DAVIS *et al.* (1988) aconselham a selecção de estirpes bacterianas que cresçam a

temperaturas inferiores a 20°C. Com efeito OUGH (1985) refere que o aumento da temperatura afecta negativamente a côr, o aroma e o sabor do vinho tinto.

1.5.2.4 – Arejamento

A multiplicação das bactérias malolácticas e a descarboxilação do ácido málico são favorecidas por condições de anaerobiose e microaerofilia (KUNKEE, 1967). Todavia, PEYNAUD (1956), refere que a saturação de vinho novo com o ar, antecipou a fermentação maloláctica em 24 horas, enquanto que a saturação com oxigénio a atrasou sem a impedir completamente. A influência do arejamento depende segundo RIBEREAU-GAYON *et al.* (1976) da espécie bacteriana. MAYER, refere que o CO₂ estimula o crescimento e a fermentação maloláctica de *Leuconostoc oenos* (BENDA, 1982), reduzindo a fase lag (STAMER e STOYLA, 1970). Esta espécie não cresce em ambientes com oxigénio, CO₂ e azoto. No entanto, desenvolve-se rapidamente numa atmosfera contendo azoto e 10% de CO₂. Pelo contrário, BENDA (1982) refere que *Leuconostoc gracile* cresce melhor na presença de pequenas quantidades de ar. Estes resultados são algo contraditórios na medida em que *Leuconostoc gracile* é a designação francesa da espécie *Leuconostoc oenos*. Porém BENDA (1982) não especifica quais os gases que estimulam o crescimento da referida espécie.

1.5.2.5 – Etanol

As bactérias do ácido láctico isoladas do vinho são particularmente resistentes ao etanol, no entanto, segundo RIBEREAU-GAYON *et al.* (1975) este factor químico é um importante inibidor do crescimento bacteriano. Porém, a resistência ao etanol é variável com o género (KUNKEE, 1967), com a espécie, com as condições do meio de cultura (LAFON-LAFOURCADE, 1975; 1983), com o teor de substâncias azotadas disponíveis, com o pH (PEYNAUD, 1967) e ainda com a temperatura e com a concentração de SO₂ (BENDA, 1982). Isto é, a tolerância ao etanol decresce com o aumento da temperatura, do teor de SO₂ e com a diminuição do pH (CASTINO *et al.*, 1975). FLESCHE e JERCEL salientam que os efeitos do pH para valores compreendidos entre 3,0 e 5,5 em meio de cultura complexo com concentrações de etanol entre 5 e 11% são cumulativos (BENDA, 1982). O estímulo do crescimento bacteriano com adição de 1,5% de etanol anula-se pela adição de SO₂ ao meio de cultura (KING e BEELMAN, 1986).

A "actividade maloláctica" é reduzida também com o aumento do teor de etanol (LAFON-LAFOURCADE, 1975; PILONE, 1975) devido à inibição das enzimas envolvidas no processo (WIBOWO *et al.*, 1985). LAFON-LAFOURCADE, 1975 refere que a capacidade de degradação do ácido málico pelas células não proliferantes de *Leuconostoc gracile* cf34, em meio sintético, não era afectada por concentrações em etanol de 11%. Porém, sofreu uma redução de 16% e 56% na presença de percentagens em álcool de 12 e 13% respectivamente (Quadro 7). Além disso, o etanol prolonga a fase de latência, a duração da fermentação maloláctica e conduz a menor produção de ácido láctico (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1975).

Embora existam referências na literatura, sobre o efeito inibidor do etanol no crescimento de algumas espécies de bactérias lácticas não existem estudos sistemáticos sobre esta matéria. Segundo vários autores (MARET e SOZZI, 1977; DAVIS *et al.*, 1985; 1986; 1988) as espécies dos géneros *Leuconostoc* e *Pediococcus* têm uma tolerância máxima de 12 a 14% enquanto as espécies do género *Lactobacillus* suportam valores de etanol de 15%. *Lactobacillus trichodes* por exemplo, é ainda mais tolerante na medida em

Quadro 7. Quantidade de ácido L-málico metabolizado em (meq/l) por *Lc gracile* em função do tempo e do teor em etanol do meio (LAFON -LAFOURCADE 1970 b)

Quantidade de células em (gr/l)	Teor em álcool (%; v/v)											
	0			11			12			13		
	5h	24h		5h	24h		5h	24h	48h	5h	24h	48h
1	19	50		19	50		16	28	30	3	8	8
2	23	50		23	50		26	48	48	3	8	8
3	33	50		40	50		46	50	50	33	33	50

que foi isolado de vinhos alcoolizados com percentagens em etanol da ordem dos 20%. O crescimento destes microrganismos é não só estimulado pelo etanol, como também pelo 2-metil propanol, vários poliálcoois e ainda a acetona. Porém, a espécie *Lactobacillus trichodes* não metaboliza o etanol nem o ácido málico (RADLER e HARTEL, 1984). Também de acordo com D'AMORE e STEWART, 1987 *Lactobacillus heterohiochii*, microrganismo de

alteração do saké, suporta valores de etanol da ordem dos 20% sendo estimulado por doses baixas de etanol.

Ainda que a maioria das espécies seja inibida por teores elevados de etanol são, pelo contrário estimuladas por doses reduzidas deste álcool. KING e BEELMAN (1986) confirmaram resultados obtidos anteriormente por MORENZONI em que o crescimento bacteriano era estimulado quando adicionaram 1,5-3% de etanol ao meio e drasticamente inibido para teores superiores a 6%. HAYMON e MONK (citado por KING e BEELMAN, 1986) referem, também, que o crescimento destes organismos em meios de cultura com sumo de uva é estimulado pela adição de vinho, tendo-se verificado um crescimento máximo em meios de cultura constituídos por 20% de vinho e 80% de mosto.

O efeito inibidor do etanol no crescimento bacteriano não está suficientemente elucidado. RADLER e HARTEL (1984) referem que, possivelmente actua ao nível da membrana citoplasmática não elucidando contudo, o modo de actuação. Todavia, de acordo com D'AMORE e STEWART, 1987, nas células das leveduras o etanol actua provavelmente nos locais ilustrados na Fig. 11.

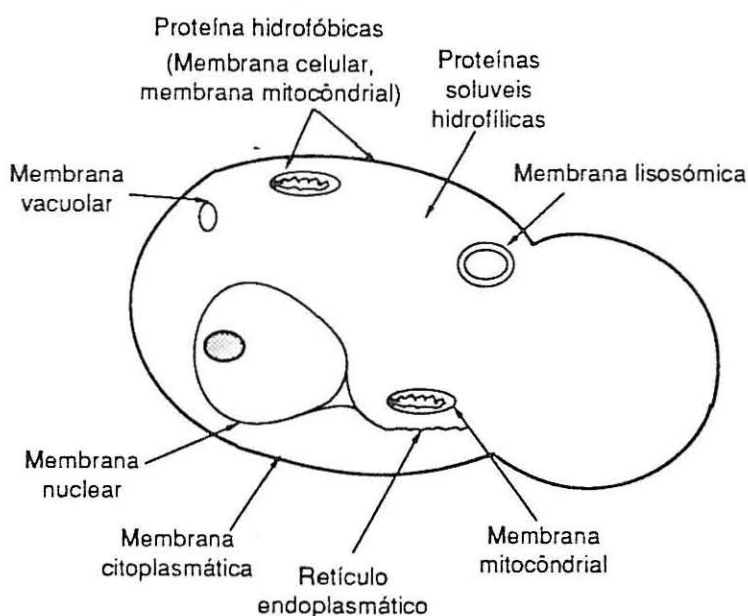


Fig. 11. Locais de actuação do etanol nas células das leveduras (D'AMORE e STEWART, 1987).

O etanol desnatura e inibe as enzimas glicolíticas, inibe não competitivamente o transporte da glicose, da maltose, da amónia e dos aminoácidos, diminui as temperaturas óptima e máxima de crescimento e aumenta a temperatura mínima. Adicionalmente, altera a organização e permeabilidade celular, acelera a reentrada passiva de prótons e aumenta a morte térmica (van UDEN, 1985; D'AMORE e STEWART, 1987). Os fosfolípidos e os esteróis da membrana citoplasmática desempenham um importante papel no mecanismo de

tolerância ao etanol (van UDEN, 1985). Em *Lactobacillus homohiochii* e *Lactobacillus heterohiochii*, segundo D'AMORE e STEWART (1987), o etanol induz alterações ao nível dos ácidos gordos da membrana citoplasmática. Aumenta o teor em ácidos gordos insaturados e em esteróis e o comprimento das cadeias acil dos ácidos gordos, conduzindo a um acréscimo na fluidez da membrana. O grau de inibição é dependente da solubilidade dos lipídios, do peso molecular do ácido e da concentração em glicose. Isto é, aumenta à medida que decresce o teor em ácidos gordos insaturados, aumenta o peso molecular do álcool e para concentrações em glicose superiores a 10% (INGRAM e BUTTKE, 1984). Porém, em *Saccharomyces cerevisiae*, segundo (JUROSEK *et al.*, 1987), o etanol diminui o efluxo de prótons em células activas e reduz o gradiente de prótons transmembranário no passo de troca zero. Isto significa que existe uma igualdade entre o influxo e o efluxo de prótons transmembranário. A concentração em etanol que reduziu o gradiente de prótons foi idêntica à que inibiu o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Microrganismos:

Foram utilizadas nos ensaios as estirpes ML₃₄ e 8A de *Leuconostoc oenos*, a estirpe 12A de *Pediococcus damnosus* e a estirpe 48 de *Lactobacillus spp.* *Leuconostoc oenos* ML₃₄ foi proveniente da colecção do Departamento de Enologia da Universidade da Califórnia – Davis. *Leuconostoc oenos* 8A; *Pediococcus* 12A e *Lactobacillus spp* 48 foram provenientes da colecção do Departamento das Indústrias Alimentares da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro – Vila Real. Todas as estirpes foram isoladas a partir de vinhos de mesa, à excepção da estirpe *Lactobacillus spp* 48 que foi isolada de um vinho licoroso (vinho do Porto). A manutenção das culturas foi feita em tubos de ensaio contendo um meio de repicagem sólido (TGB agar).

No nosso trabalho fomos estudar *Leuconostoc oenos* ML₃₄ por ser uma estirpe de referência, largamente estudada e utilizada nos Estados Unidos da América e Europa na indução da fermentação maloláctica. Esta estirpe é comercializada nos Estados Unidos na forma liofilizada. *Leuconostoc oenos* 8A foi utilizada por ter sido isolada de vinhos da região de Vila Real e apresentar taxas específicas de crescimento elevadas (MENDES FAIA, 1987). As estirpes 12A e 48 foram utilizadas tendo como principal objectivo, comparar o seu comportamento na presença de etanol com o das estirpes 8A e ML₃₄. Uma vez que, estes microrganismos pertencem a géneros susceptíveis de aparecerem nos vinhos e poderem em muitos casos, ser responsáveis por alterações (agentes de doenças dos vinhos).

2.2 – Composição dos Meios de Cultura

Os meios de crescimento usados na determinação da taxa específica de crescimento, na presença de concentrações crescentes de etanol foram compostos por:

- Um meio base TGB, constituído por caldo de sumo de tomate com extracto de fígado e glicose. Este meio de cultura contém: 2% Bactotripton, 0,5% Bactopepton, 0,5% extracto de levedura, 0,5% glicose, 0,1% extracto de fígado, 0,005% Tween 80. A dissolução dos vários componentes foi feita em sumo de tomate diluído (1:5).

Um meio GB, este meio de cultura tem a mesma composição do meio TGB, sem adição de sumo de tomate o pH final foi acertado a 4,5.

– Para determinar o efeito do álcool na taxa de crescimento utilizou-se:

O meio base TGB tendo sido adicionado, após esterilização, doses crescentes de etanol (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12%).

O pH foi avaliado antes da esterilização num potenciômetro Orion 601A previamente calibrado com solução tampão a pH 4,0 e 7,0.

Os valores de pH do meio de cultura foram ajustados antes da esterilização a 121°C durante 15 minutos de modo a que, após a adição de etanol o pH final fosse 3,5; 4,0 e 4,5 .

2.3 – Condições de Crescimento.

O efeito do etanol na taxa de crescimento foi estudado em tubos de ensaio rolhados, com 5ml de TGB e concentrações crescentes de etanol e incubados a 25°C.

Foram preparados inoculos em caldo de TGB a partir da repicagem de culturas de bactérias, mantidas no frigorífico (2-8°C) em agar TGB. Após 7 dias a 25°C procedeu-se à sua repicagem para GB caldo, tendo sido posteriormente centrifugado a 10 000g durante 15 minutos, numa centrifuga refrigerada Sorvall 33. O líquido sobrenadante foi eliminado e ao sedimento adicionou-se um volume de água estéril igual ao volume inicial do meio de cultura.

O meio TGB adicionado de álcool foi inoculado 1% (v/v) de cada uma das estirpes em fase exponencial de crescimento. Todos os ensaios foram efectuados em triplicados.

O crescimento foi avaliado pelo método turbidimétrico. A densidade óptica foi medida a 600nm em intervalos de tempo regulares, com um espectofotometro Bausch Lomb, Spectronic 21, até à obtenção do crescimento máximo. O espectofotometro foi acertado a 100% de transmitância com água destilada. Foi utilizado, como padrão, um meio não inoculado.

Em seguida, foi medido o pH final dos meios de cultura e foram filtrados por membranas 0,22µm de diâmetro de poro. O filtrado foi refrigerado para análises posteriores.

2.4 – Avaliação de Alguns Parâmetros de Crescimento.

2.4.1 – Cálculo da Taxa Específica de Crescimento.

As taxas específicas de crescimento foram calculadas de acordo com PIRT (1975), para cada, concentração de etanol adicionada.

O crescimento de uma população homogênea de microrganismos, num meio de cultura líquido, bem agitado, arejado, se necessário, a temperatura e pH constantes e bem tolerados, apresenta diferente fases (período de latência, fase de crescimento exponencial, fase estacionária e fase de morte), reflectindo modificações no estado fisiológico do microrganismo e do seu meio ambiente.

A taxa de crescimento da população, em cada instante é expressa por $\frac{dx}{dt}$ em que x é a concentração de microrganismos.

Dividindo essa taxa pela concentração correspondente de microrganismos, obtém-se a taxa específica de crescimento

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (1.1)$$

ou
$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1.2)$$

Se a taxa específica de crescimento se mantiver constante e o meio ambiente mantiver as suas propriedades físico-químicas pode aplicar-se ao crescimento da população a equação integrada (1.3)

$$\mu_t = x e^{\mu t} \quad (1.3)$$

Esta equação traduz o crescimento exponencial da população microbiana no tempo. Aplicando logaritmos:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad (1.4)$$

A equação (1.4) permite calcular experimentalmente a taxa específica de crescimento a partir do declive da recta, que relaciona para a fase de crescimento exponencial, o logaritmo natural da concentração da biomassa com o tempo de incubação.

2.4.2 – Determinação da Concentração de Glicose Residual.

A determinação de glicose residual foi efectuada no sobrenadante refrigerado segundo o método de SOMOGY descrito por NEUFELD e GINSBURG (1966)

2.4.3 – Determinação da Fase *lag* .

Quando as células bacterianas são transferidas para um novo meio de cultura, não iniciam imediatamente o crescimento, elas necessitam de um período de adaptação designado por fase *lag*. Durante este período, de duração variável, as células sintetizam enzimas e protoplasma necessários ao metabolismo e divisão celular.

Após a inoculação, a densidade óptica mantém-se praticamente inalterável durante algum tempo. A partir de um determinado momento observou-se um aumento significativo na densidade óptica. Consideramos o tempo imediatamente anterior como correspondente à fase *lag*

Em certos casos, principalmente para concentrações em etanol elevadas e valores de pH baixos, esta variação não foi tão nitida, pelo que consideramos como fase de latência, o tempo em horas correspondente à intercepção entre o prolongamento da recta correspondente à fase exponencial de crescimento e uma paralela ao eixo das abcissas, correspondentes à fase *lag*.

2.4.4 – Coeficiente de Rendimento em Biomassa.

O coeficiente de rendimento em biomassa, foi determinado de acordo com PIRT (1975), para cada uma das concentrações em etanol adicionadas, sendo a biomassa final avaliada em termos de peso seco.

Existe uma relação linear entre a biomassa produzida (x) e o decréscimo da concentração do substrato (S), donde:

$$\frac{dx}{dt} = -y \frac{dS}{dt} \quad (1.5)$$

Da multiplicação de ambos os membros por $\frac{1}{x}$ resulta:

$$\frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = -y \frac{1}{x} \frac{dS}{dt} \quad (1.6)$$

$$\mu = y k \quad (1.7)$$

y – Rendimento

k – Taxa específica de transferência do substrato.

Se as condições ambientais se mantiverem invariáveis, y é uma constante, então:

$$x - x_0 = y (S_0 - S)$$

Na fase estacionária como a concentração do substrato limitante é zero, o rendimento é dado pela equação

$$y = \frac{x_m - x_0}{S_0}$$

x_0 – Biomassa inicial

S_0 – Concentração inicial de substrato

2.5 – Análise de Metabolitos.

A análise quantitativa dos produtos resultantes do metabolismo bacteriano foi efectuada por HPLC, segundo o método descrito por MENDES FAIA (1987).

2.6 – Velocidade de Degradação do Ácido L-málico.

Para determinar a velocidade de degradação do ácido L-málico utilizamos o meio base TGB tendo sido adicionados teores de etanol de 0 e 5% e inoculados com 1% das estirpes 8A e ML₃₄. Quando a população bacteriana atingiu a máxima densidade óptica juntamos a um dos tubos mais 5% e ao outro mais 10% de etanol, de modo a termos concentrações finais de etanol de 0,5; 10 e 15%. Cada ensaio foi feito em triplicado. Em seguida, a cada um dos ensaios adicionamos concentrações em ácido L-málico de 0,1; 0,5 e 0,75%, respectivamente. O desaparecimento do ácido málico foi verificado diariamente por cromatografia em papel de acordo com o método de RIBEREAU-GAYON *et al.*(1971).

2.7 – Análise Estatística.

Os efeitos da concentração de etanol e do valor inicial de pH no crescimento das várias estirpes estudadas foram avaliados por análise de variância de acordo com

SNEDECOR e COCHRAN (1967) e STEEL e TORRIE (1981). A significancia das diferenças entre as médias foi avaliada pela MDS (Menor diferença significativa) e teste de TUKEY (SNEDECOR e COCHRAN, 1967; e STEEL e TORRIE, 1981) para 95% de probabilidade.

3 - RESULTADOS.

3.1 - Resultados.

3.1.1 - Efeito do Etanol no Crescimento.

a) Taxa de específica de crescimento.

O efeito do etanol foi estudado em várias estirpes pertencentes aos géneros *Leuconostoc* (A,B), *Pediococcus* (C) e *Lactobacillus* (D) inoculados em meio complexo (TGB), com vários níveis de pH (3, 5; 4,0 e 4,5) e ao qual foram adicionadas diversas doses de etanol.

Os resultados obtidos são apresentados no Quadro I-1 e nas Fig. I-1 e I-2 e as respectivas análises da variância (ANOVA) nos Quadros 1A, 2A, 3A, 4A, 5A (Anexo 1). A análise dos resultados demonstra que o pH, a concentração de etanol e as estirpes tiveram um efeito altamente significativo ($P < 0,001$) na variação da taxa de crescimento. Nas estirpes *Leuconostoc oenos* ML₃₄ e 8A a contribuição do etanol para a variação da taxa específica de crescimento foi superior à do pH, ao contrário do que aconteceu nas espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Quadros 26A e 27A). Em todas as estirpes se observou um aumento significativo da taxa específica de crescimento quando as concentrações de etanol foram de 2-4%, sobretudo na estirpe ML₃₄ quando o pH inicial do meio foi 3,5. A taxa de crescimento da ML₃₄, a pH 3,5 e com adição de 2% de etanol foi aproximadamente dupla da observada no controlo. Em *Leuconostoc oenos*, quanto mais baixo foi o pH maior foi o efeito estimulante do etanol. Além disso, à medida que decresceu o valor de pH a dose de etanol estimulante do crescimento foi mais elevada. Para valores de etanol de 8-10% observou-se uma inibição no crescimento para todos os valores de pH. Concentrações de etanol de 12% impediram completamente o crescimento bacteriano.

O efeito do etanol variou com o pH inicial no meio de cultura, o que se traduziu por uma interacção altamente significativa ($P < 0,001$). Na realidade o efeito repressivo do etanol foi tanto mais acentuado quanto mais baixo o pH no meio de cultura. Contudo, nas estirpes ML₃₄ e 8A o efeito inibidor de etanol para percentagens de 10% foi praticamente independente do pH inicial.

A interacção estirpe \times pH foi altamente significativa ($P < 0,001$), ou seja, as estirpes tiveram respostas diferentes à variação do pH. Verificou-se um aumento na taxa

Quadro 1-1. Valores médios da taxa específica de crescimento (h-1) dos várias estirpes para vários níveis de etanol e pH.

Estirpe	pH	concentração em etanol (%)								valores médios
		0	2	4	6	8	10	12	14	
ML34 (A)	3,5	0,050	0,100	0,106	0,054	0,046	0	0	-	0,45
8A (B)		0,046	0,067	0,061	0,058	0,036	0,020	0	-	0,36
12A (C)		0,029	0,040	0,030	0	0	0	0	-	0,012
Lact(D)		0	0	0	0	0	0	0	-	0
ML34 (A)	4,0	0,100	0,104	0,109	0,094	0,053	0,035	0	-	0,062
8A (B)		0,074	0,099	0,101	0,100	0,054	0,023	0	-	0,056
12A (C)		0,074	0,097	0,107	0,088	0,081	0,037	0	-	0,061
Lact (D)		0,054	0,045	0,056	0,038	0,037	0	0	-	0,029
ML34 (A)	4,5	0,114	0,128	0,119	0,103	0,076	0,032	0	-	0,072
8A (B)		0,111	0,120	0,130	0,111	0,077	0,055	0	-	0,076
12A (C)		0,101	0,126	0,124	0,111	0,099	0,059	0,032	-	0,082
Lact (D)		0,065	0,086	0,088	0,081	0,076	0,063	0,047	-	0,063
Valores médios		0,069	0,084	0,086	0,070	0,053	0,027	0,007	0	0,11

Os valores apresentados são a média de 3 repetições

As médias da mesma coluna a linha assinalados com a mesma letra não são significativamente diferentes para $P < 0,05$

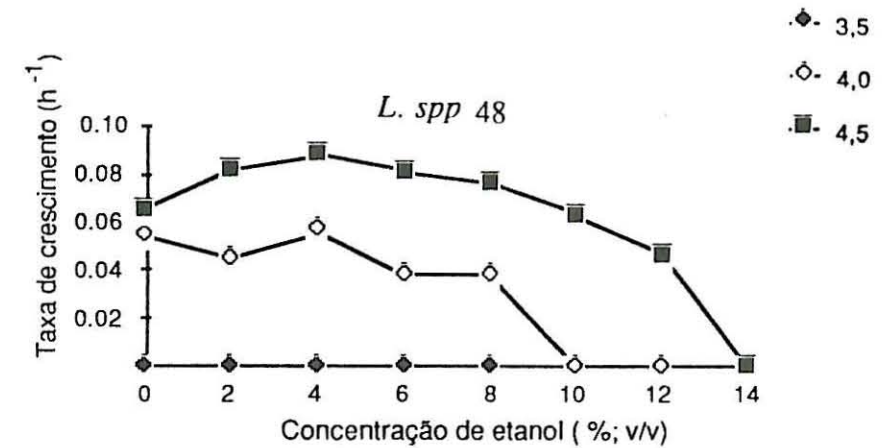
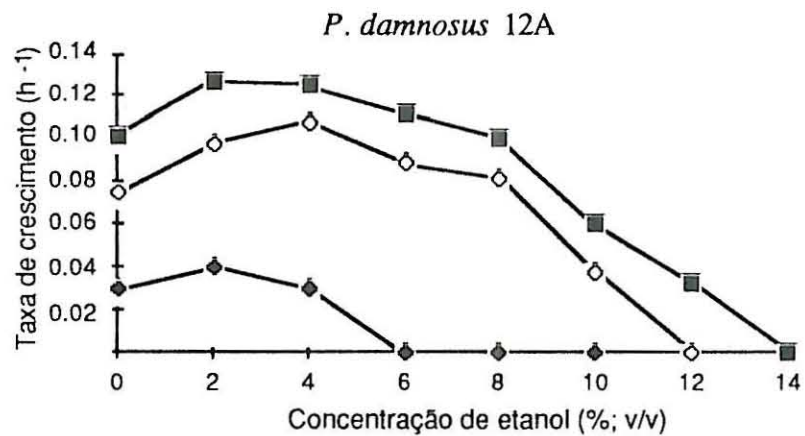
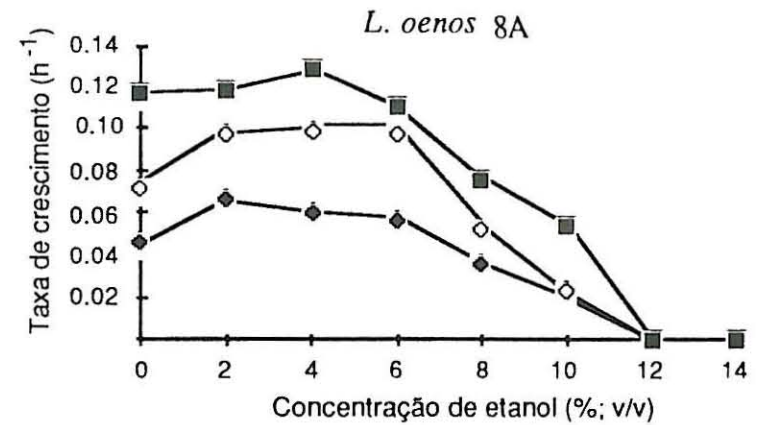
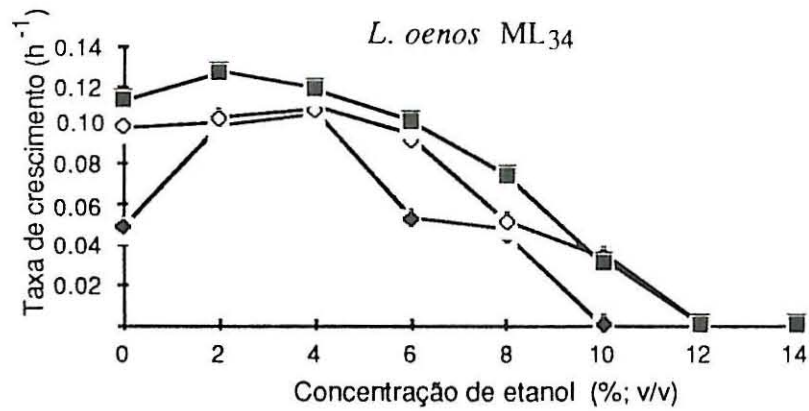


Fig. I - 1. Efeito da concentração de etanol e do pH na taxa específica de crescimento (h^{-1}) das várias estirpes.

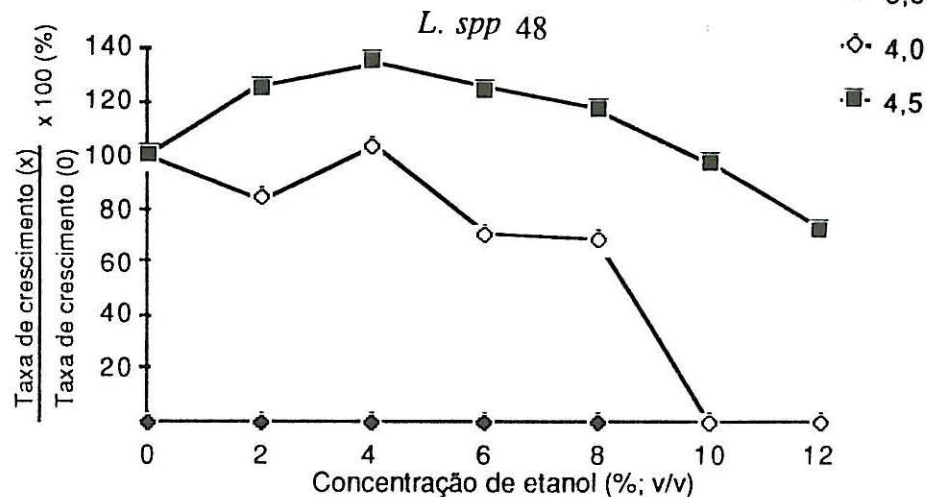
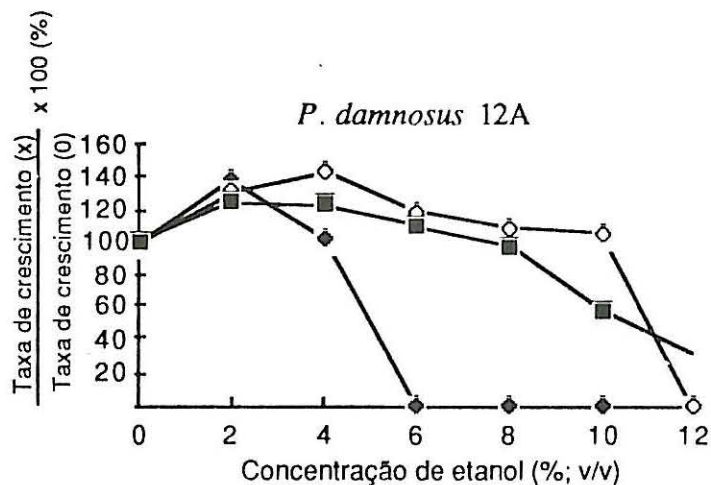
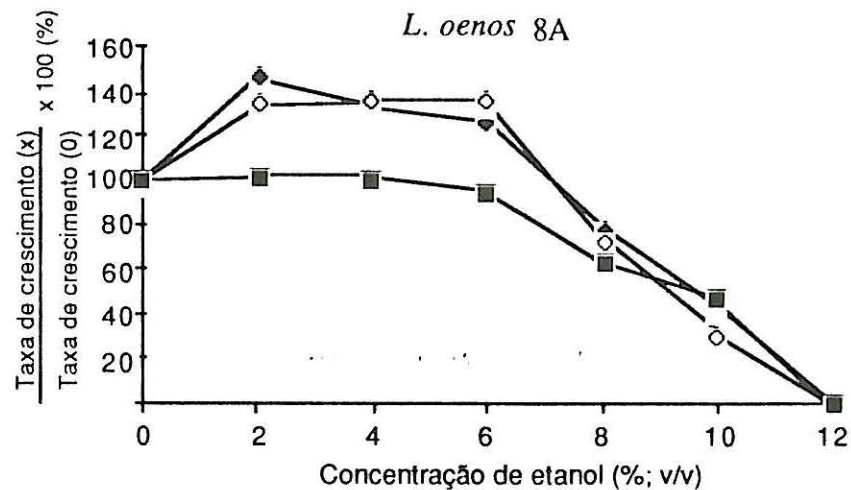
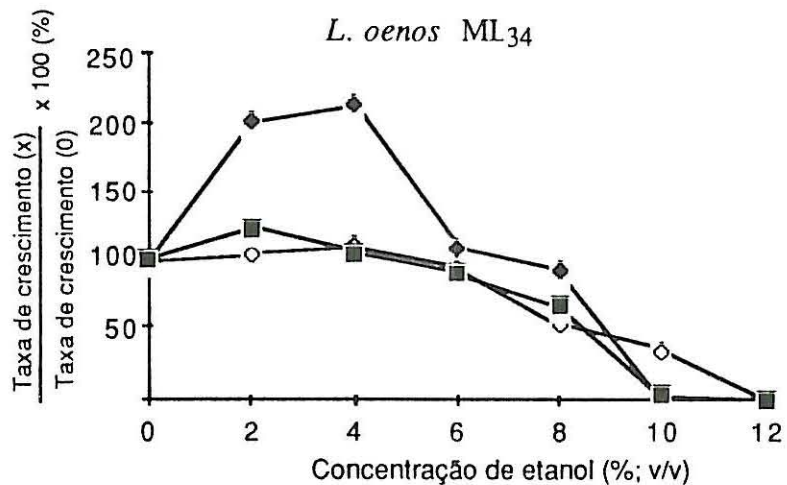


Fig. I - 2. Relação entre a taxa específica de crescimento na presença da concentração x de etanol e a taxa específica de crescimento na ausência de etanol (%) para as várias estirpes, a vários níveis de pH.

específica de crescimento das várias estirpes com o aumento do pH de 3,5 para 4,0. Este aumento foi mais significativo nas estirpes *Pediococcus*12A e *Lactobacillus* 48 do que nas restantes. O acréscimo observado no crescimento com o aumento de pH de 4,0 para 4,5 foi semelhante em todas as estirpes mas muito menos acentuado do que o verificado na passagem de pH de 3,5 para 4,0.

O comportamento das estirpes foi variável em função da presença ou ausência de etanol, traduzindo-se numa interacção altamente significativa ($P < 0,001$) entre estes dois factores. O estímulo e a repressão da taxa de crescimento foram mais expressivos em *Leuconostoc oenos* ML₃₄ e menores em *Lactobacillus* spp.

A interacção entre o pH, as estirpes e a concentração em etanol foi altamente significativa ($P < 0,001$). A pH 3,5, não se observou crescimento de *Lactobacillus* mesmo sem adição de etanol. As estirpes de *Leuconostoc oenos* ML₃₄ e 8A, foram inibidas para valores de álcool de 8 e 10% respectivamente, enquanto as espécies do género *Pediococcus* o foram para 6%. A pH 4,0 as taxas específicas de crescimento da estirpes 12A, 8A e ML₃₄ foram reprimidas para valores de etanol de 12% e a estirpe 48 somente a 10%. Finalmente, a pH 4,5 o crescimento da estirpe 48 não foi inibido para concentrações de etanol de 12%. Nas restantes estirpes não foi detectado crescimento nesta concentração de etanol, para todos os níveis pH, excepto em *Pediococcus* 12A a pH 4,5.

Pela análise dos resultados do Quadro 1A podemos ainda dizer que o pH teve um efeito mais significativo ($P < 0,001$) na variação da taxa de crescimento do que a concentração em etanol e as estirpes. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,001$) entre as médias das taxas de crescimento da estirpes 8A, 12A e ML₃₄ a pH 3,5 e 4,0. Todavia, a taxa específica de crescimento de *Lactobacillus* foi expressivamente diferente.

b) Consumo de glicose

Os resultados obtidos são apresentados no Quadro II-1 e Fig(s) II-1 e II-2 as respectivas análises da variância (ANOVA) nos Quadros 6A, 7A, 8A, 9A e 10A (Anexo 1). Os factores pH inicial do meio de cultura, o etanol e as estirpes tiveram um efeito altamente significativo ($P < 0,001$) sobre a variação no consumo em glicose. O pH inicial teve um efeito mais significativo na variação observada, tendo contribuído com 85

Quadro 11-1. Valores médios do consumo da glicose ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Estirpe	pH	concentração em etanol (%)								valores médios
		0	2	4	6	8	10	12	14	
ML34 (A)	3,5	22,88	21,63	25,88	32,88	58,05	84,13	-	-	40,93
8A (B)		22,33	24,16	26,25	26,58	30,25	40,16	-	-	28,23
12A(C)		71,42	69,16	80,42	81,76	82,75	83,76	-	-	78,18
Lact(D)		0	0	0	0	0	0	0	0	130,5
ML34 (A)	4,0	23,91	6,72	10,71	15,59	46,46	51,05	-	-	25,74
8A(B)		34,83	4,08	12,16	17,50	41,33	55,00	-	-	25,96
12A (C)		34,58	45,75	45,75	43,83	43,83	79,66	-	-	48,85
Lact (D)		64,33	64,00	56,00	78,41	90,50	90,58	91,66	-	73,97
ML34 (A)	4,5	12,02	4,62	6,58	6,63	22,63	23,88	-	-	12,67
8A (B)		15,66	6,16	8,00	8,75	27,33	43,16	-	-	18,15
12A (C)		10,75	21,33	23,58	23,83	24,08	32,42	-	-	24,41
Lact (D)		64,92	57,50	26,25	28,75	29,91	48,16	55,83	-	42,58
Valores médios		42,31	37,94	37,62	41,22	52,24	62,75	12,29		45,68

Os valores apresentados são a média de 3 repetições

As médias da mesma coluna a linha assinalados com a mesma letra não são significativamente diferentes para $P < 0,05$

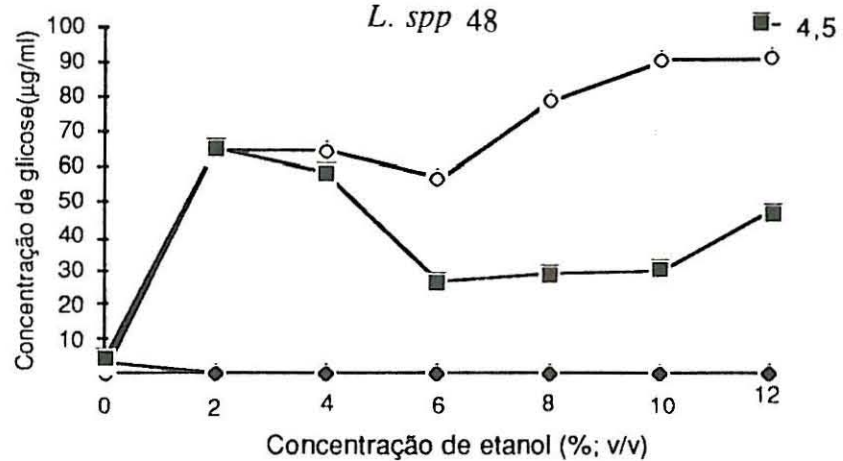
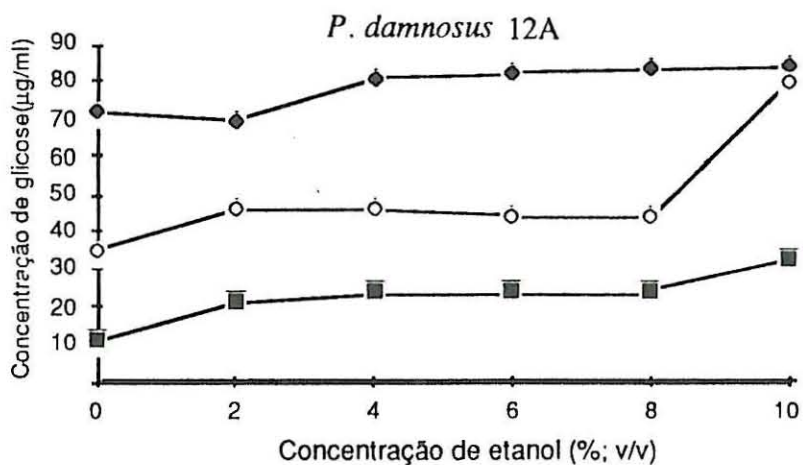
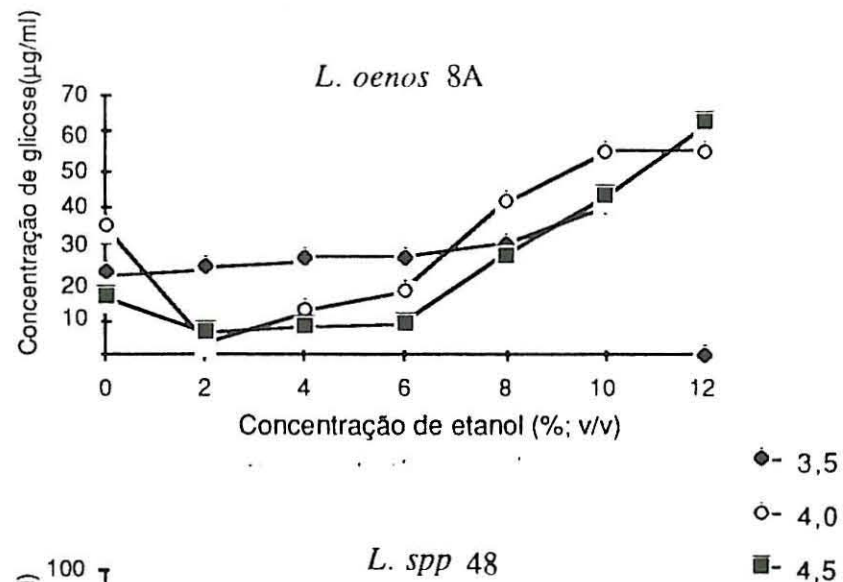
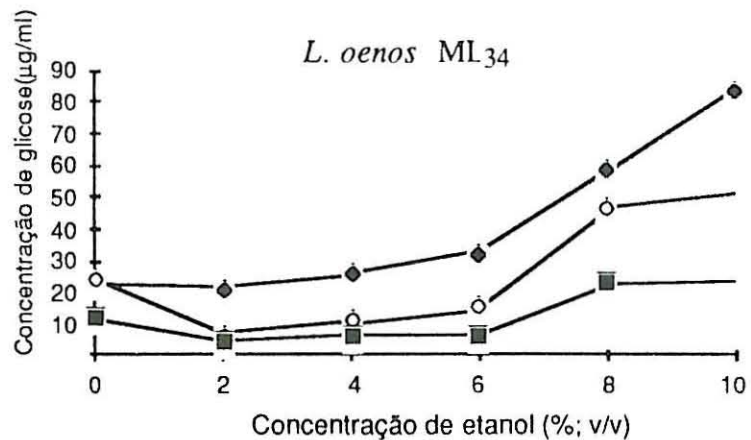


Fig. II - 1. Efeito da concentração do etanol e do pH na concentração de glicose (µg/ml) do meio de cultura das várias estirpes.

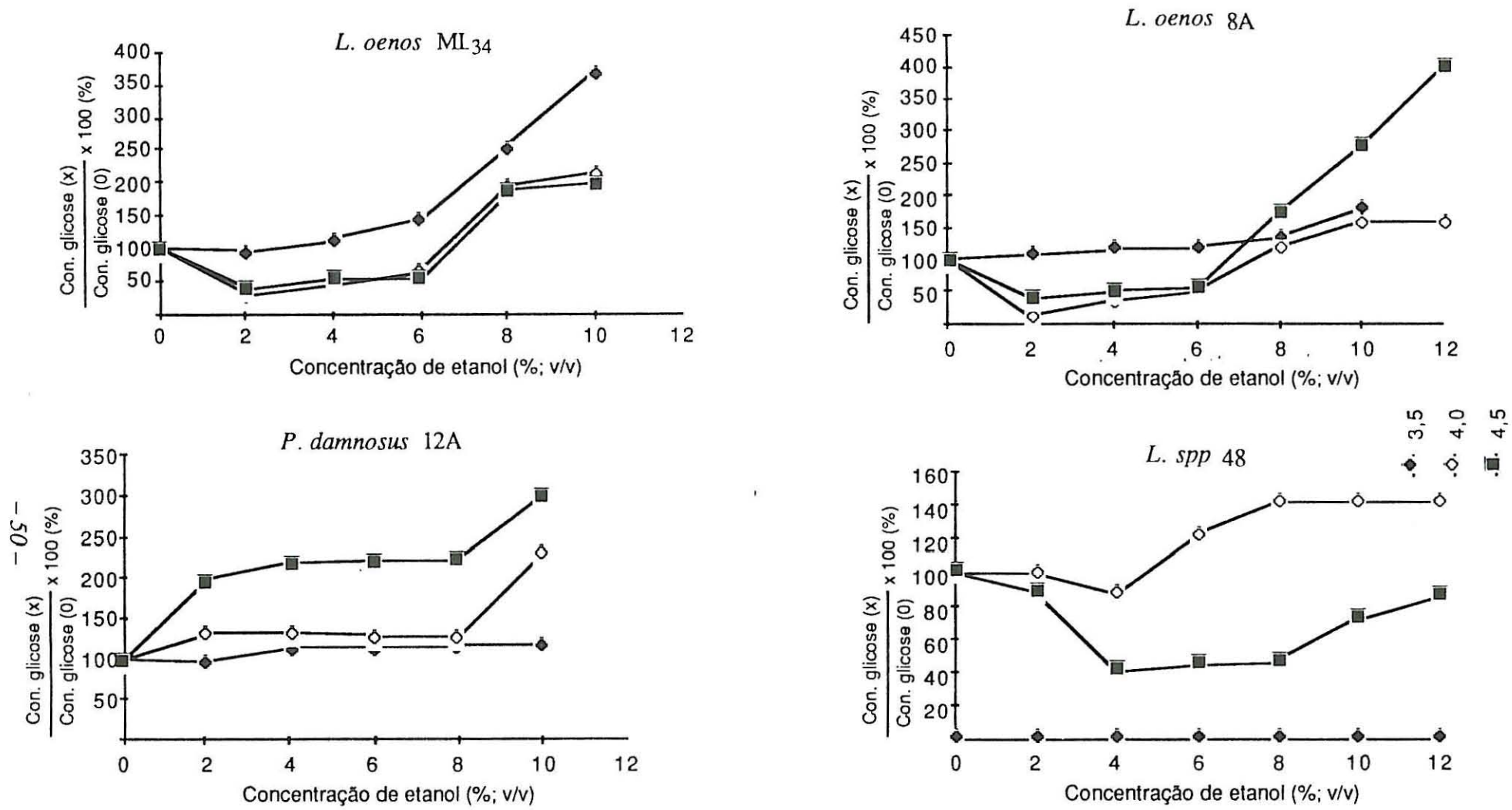


Fig. II - 2. Relação entre a glicose final na presença da concentração x de etanol e glicose final na ausência de etanol para as várias estirpes, a vários níveis de pH.

e 90% para a variação, respectivamente em *Pediococcus* e *Lactobacillus*. Ao contrário, o etanol foi o principal responsável pela variação em *Leuconostoc*, a sua contribuição foi de 60% na estirpe 8A e 49% na estirpe ML₃₄ (Quadros 26A e 27A). *Leuconostoc* apresentou o maior consumo de glicose, enquanto que em *Pediococcus* observámos valores intermédios e em *Lactobacillus* os valores mais baixos.

A interacção estirpe × etanol foi altamente significativa ($P < 0,001$). À semelhança do que aconteceu com a taxa de crescimento o efeito estimulante do etanol no consumo da glicose foi significativamente menos assinalável nas espécies do género *Lactobacillus* e *Pediococcus* do que no género *Leuconostoc*. Não foram detectadas diferenças significativas no consumo de glicose entre as estirpes 8A e ML₃₄.

O pH inicial do meio de cultura condicionou de modo altamente significativo ($P < 0,001$) o consumo de glicose das várias estirpes estudadas. A pH 3,5 todas as estirpes apresentaram o menor consumo de glicose. Com o aumento do pH de 3,5 para 4,0 houve um acréscimo na sua utilização em *Leuconostoc oenos*. Porém, de pH 4,0 para 4,5 o efeito foi mais reduzido, não sendo significativa a variação. Nas estirpes 48 e 12A à medida que se aumentou o pH verificou-se um acréscimo altamente significativo ($P < 0,001$) no consumo da glicose, principalmente em *Lactobacillus*. Estes resultados são mais notórios de pH 3,5 para 4,0, uma vez que não houve consumo de açúcar por esta estirpe a pH 3,5.

O efeito do etanol foi dependente do pH inicial de modo altamente significativo ($P < 0,001$). A pH 3,5, teores de etanol até 6% não afectaram significativamente a utilização de glicose. Para os restantes valores de pH houve um acréscimo gradual no consumo de açúcar para concentrações de etanol de 2 a 6% com o aumento do pH.

A interacção estirpe × etanol × pH foi altamente significativa ($P < 0,001$). Nas estirpes 12A e 48 a pH 4,0 e 4,5 e nas estirpes ML₃₄ e 8A a pH 3,5, o consumo de açúcar não foi significativamente diferente nos meios aos quais foram adicionadas percentagens em etanol de 0 a 8% e 0 a 6% respectivamente em *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Para valores de pH 4,0 e 4,5 o teor em glicose final foi mais reduzido para concentrações de etanol de 2 e 6%, quando comparados com o controlo. Nas estirpes ML₃₄ e 8A o maior consumo de açúcares foi observado para concentrações de etanol de 2% e 6%. Como seria de prever, ao consumo máximo de glicose correspondeu a taxa de crescimento máxima. Para concentrações de etanol de 2, 4 e 6% não foram observadas diferenças significativas

no teor da glicose final para valores de pH de 4,0 e 4,5. Observou-se consumo superior de açúcar nas estirpes 12A e 48 para valores de etanol de 2 e 4% respectivamente.

Pela análise dos resultados, verificámos ainda a existência de diferenças significativas ($P < 0,001$) entre as médias da concentração em glicose final para vários níveis de pH. O consumo em açúcar pelas várias estirpes com pH 3,5 foi cerca de metade do consumo a pH 4,5

c) Fase *lag*

Os resultados obtidos estão apresentados no Quadro III - 1 e Fig(s) III-1 e III-2 e as respectivas análises da variância (ANOVA) nos Quadros 11A, 12A, 13A, 14A e 15A. O pH inicial do meio de cultura, o etanol e as estirpes tiveram um efeito altamente significativo na variação da duração da fase *lag*. *Lactobacillus spp* 48 foi a estirpe que apresentou uma fase *lag* mais prolongada, sendo significativamente diferentes das observadas nas espécies *Leuconostoc oenos* e *Pediococcus damnosus*. Porém, não foram detectadas diferenças significativas na fase de latência das estirpes 8A e ML₃₄ e 12A.

O efeito do etanol variou em função do pH inicial do meio de cultura o que se traduziu numa interacção altamente significativa entre os dois factores. Quando o pH inicial do meio de cultura foi 3,5 houve um aumento altamente significativo na duração da fase *lag* para concentrações em etanol superiores a 6%, enquanto que a pH 4,0 e 4,5 só foram observadas diferenças significativas na fase de latência para valores de etanol iguais ou superiores a 8%.

As estirpes reagiram de modo significativamente diferente à presença de etanol ($P < 0,001$). Nas estirpes 8A, 12A e ML₃₄ a fase *lag* foi significativamente prolongada para valores em etanol superiores a 6%. Em *Lactobacillus*, a pH 4,0 houve um acréscimo da duração da fase de latência para as várias concentrações de etanol à excepção de 2%. A pH 4,5, valores em etanol até 8% provocaram uma redução da fase *lag*, ao contrário do que aconteceu para as concentrações superiores.

O pH inicial do meio de cultura condicionou igualmente, a duração da fase *lag*, em todas as estirpes, mas de modo diverso, o que resultou numa interacção altamente significativa ($P < 0,001$) entre estes dois factores. À medida que aumentamos o pH, sobretudo de 3,5 para 4,0 verificamos um decréscimo na duração na fase de latência em todas as estirpes estudadas. O decréscimo foi mais significativo no género *Lactobacillus* do que nos géneros *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Como era de esperar uma vez que, a

Quadro III - 1. Valores médios da fase lag (h) das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Estirpe	pH	concentração em etanol (%)								valores médios	
		0	2	4	6	8	10	12	14		
ML34 (A)	3,5	33	33	33	39	219	600	-	-	159,50	
8A (B)		27	27	27	45	78	249	-	-		75,50
12A(C)		27	27	27	600	600	600	-	-		318,50
Lact(D)		600	600	600	600	600	600	-	-		600,00
ML34 (A)	4,0	21	21	21	27	99	387	-	-	92,83	
8A(B)		18	18	18	27	45	147	-	-		45,50
12A (C)		18	18	18	18	33	78	-	-		30,50
Lact (D)		198	198	270	336	450	600	-	-		343,00
ML34 (A)	4,5	18	18	18	27	45	126	-	-	41,83	
8A (B)		18	18	18	21	27	57	-	-		26,67
12A (C)		18	18	18	18	27	27	-	-		20,33
Lact (D)		147	120	120	120	156	210	-	-		149,33
Valores médios		97	93	98,33	156,67	198,50	304,75	-	-	158,125	

Os valores apresentados são a média de 3 repetições

As médias da mesma coluna a linha assinaladas com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si para $P < 0,05$

a) o ensaio terminou ao fim de 600 horas

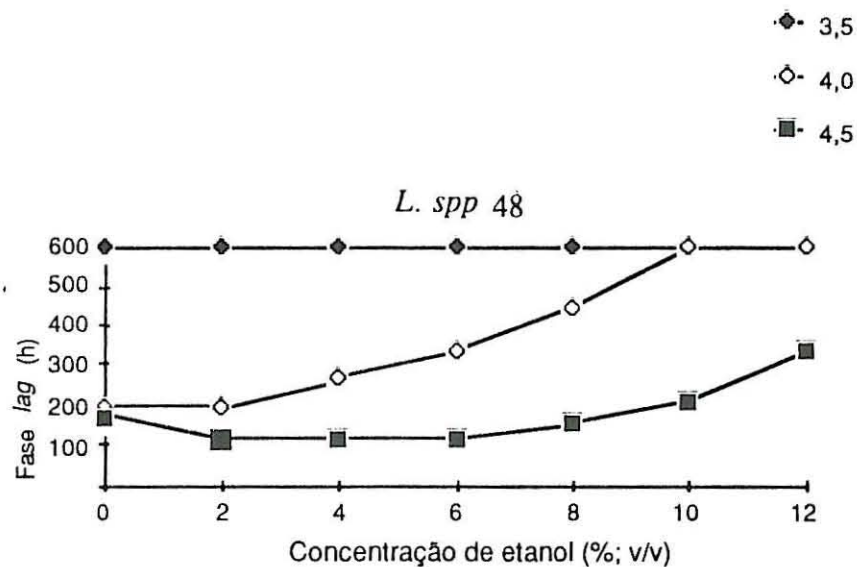
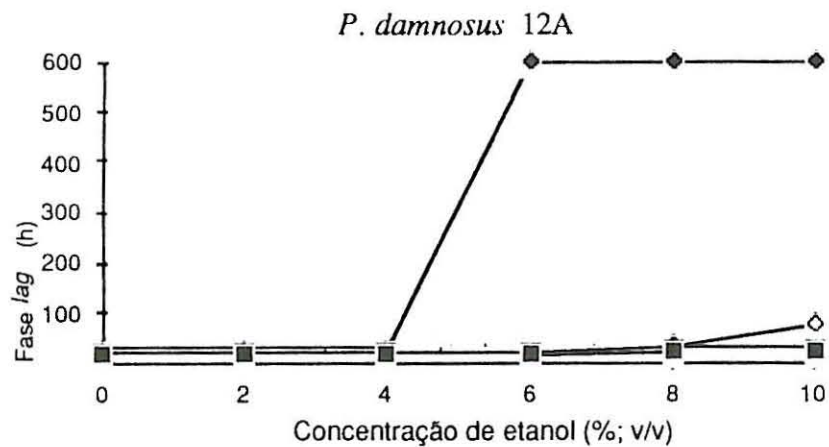
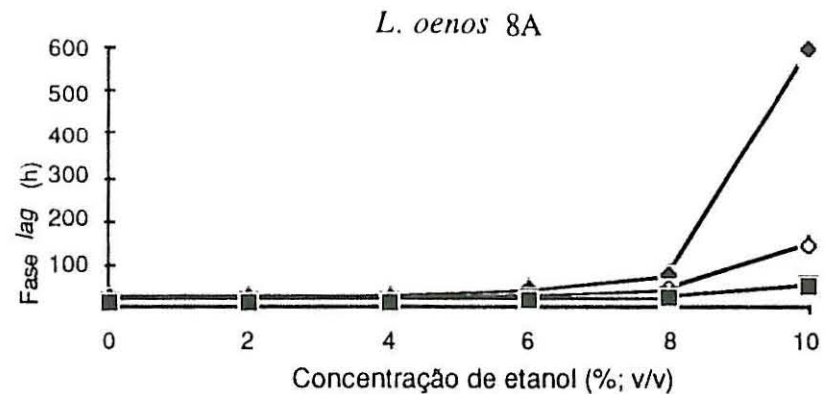
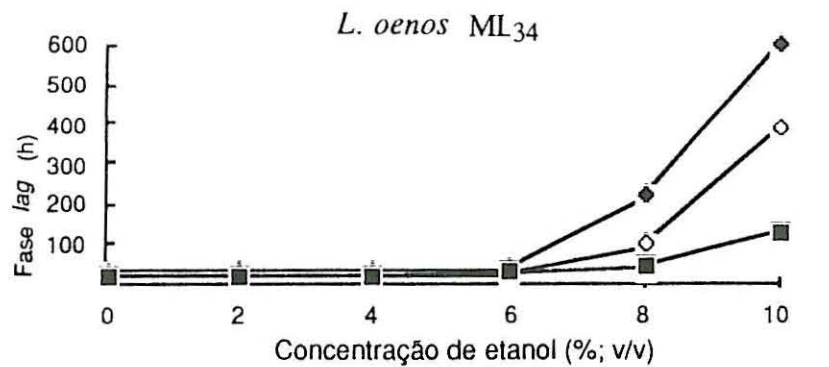


Fig. III - 1. Efeito da concentração de etanol e do pH na duração da fase lag (h) das várias estirpes.

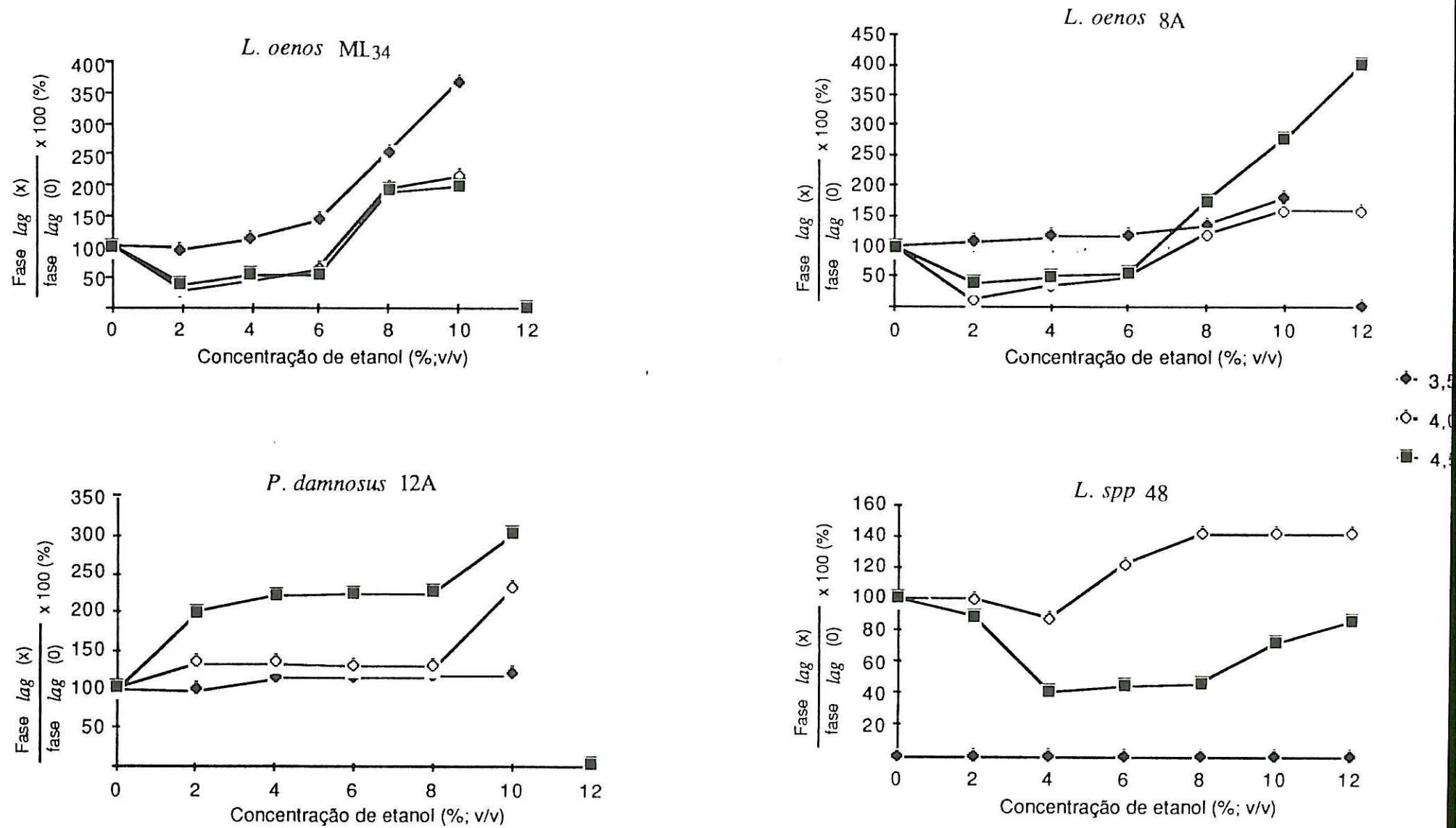


Fig. III - 2. Relação entre a fase lag na presença da concentração x de etanol e a fase lag na ausência de etanol (%) para as várias estirpes, a vários níveis de pH.

estirpe 48 não cresceu a pH 3,5, teve a pH 4,0 uma fase *lag* 3,03 vezes menor que a pH 3,5. As restantes estirpes tiveram um valor *lag* apenas 1,6 e 1,5 vezes menor, embora de igual modo significativamente diferente do registado a pH 3,5.

A resistência das várias estirpes ao etanol foi dependente do pH o que se traduziu numa interacção altamente significativa ($P < 0,001$) entre os três factores. A adição de 6, 8 e 10% aos meios de cultura com pH 3,5 foram suficientes para inibir o crescimento das estirpes 12A, ML₃₄ e 8A, respectivamente. A estirpe 48 não cresceu a este nível de pH. A pH 4,0, a adição de 10% de etanol inibiu o crescimento da estirpe *Lactobacillus spp* 48, enquanto que as estirpes dos géneros *Leuconostoc oenos* e *Pediococcus damnosus* foram inibidas somente por percentagens de 12%. A pH 4,5, só foi detectado crescimento da estirpe 48 na presença de 12% de etanol.

À semelhança do que se verificou nas taxas específicas de crescimento, o pH teve um efeito mais significativo na variação da fase *lag* que a concentração de etanol nas estirpes de *Pediococcus damnosus* 12A e *Lactobacillus spp* 48, ao contrário do que se verificou nas estirpes de *Leuconostoc oenos* (Quadros 26A e 27A).

Observaram-se ainda diferenças significativas na duração média da fase *lag* entre as várias estirpes. A diferença máxima verificou-se entre as médias das estirpes ML₃₄ e 48 e a mínima entre as médias das estirpes ML₃₄ e 12A.

d) Absorvância final a 600nm.

Os resultados obtidos estão apresentados no Quadro IV-1 e Fig(s) IV-1 e IV-2 e as respectivas ANOVA nos Quadros 16A, 17A, 18A, 19A e 20A (Anexo 1). Os factores pH inicial do meio de cultura, as estirpes e o etanol tiveram um efeito altamente significativo ($P < 0,001$) na variação da densidade óptica final. Nas estirpes 8A, ML₃₄ o etanol foi o principal responsável pela variação. Em *Lactobacillus* foi o pH o factor que mais contribuiu para a variação observada. No género *Pediococcus*, o pH e o etanol tiveram um papel semelhante na variação absorvância final a 600nm (Quadros 26A e 27A). A estirpe 48 foi a que apresentou a densidade óptica mais reduzida, *Pediococcus* apresentou valores intermédios e as estirpes ML₃₄ e 8A os valores mais elevados e semelhantes entre si.

As estirpes reagiram de modo significativamente diferente ($P < 0,001$) à presença de etanol. Em *Leuconostoc oenos* (ML₃₄ e 8A) não houve diferenças

Quadro IV - 1. Valores médios da absorvância final a 600nm (D.O), das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Estirpe	pH	concentração em etanol (%)								valores médios
		0	2	4	6	8	10	12	14	
ML34 (A) 8A (B) 12A(C) Lact(D)	3,5	0,619 0,617 0,312 0	0,633 0,651 0,277 0	0,649 0,642 0,157 0	0,638 0,598 0,042 0	0,449 0,499 0,038 0	0,015 0,233 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0,375 0,405 0,101 0
ML34 (A) 8A(B) 12A (C) Lact (D)	4,0	0,787 0,811 0,530 0,242	0,824 0,802 0,444 0,365	0,827 0,755 0,433 0,332	0,826 0,750 0,390 0,414	0,602 0,454 0,335 0,359	0,438 0,464 0,170 0,012	0 0,007 0 0,010	0 0 0 0	0,538 0,506 0,289 0,217
ML34 (A) 8A (B) 12A (C) Lact (D)	4,5	0,787 0,854 0,735 0,275	0,824 0,854 0,687 0,447	0,827 0,854 0,621 0,460	0,826 0,818 0,619 0,456	0,640 0,555 0,486 0,415	0,506 0,396 0,438 0,362	0 0 0,345 0,300	0 0 0 0	0,551 0,541 0,491 0,337
Valores médios		0,547	0,565	0,546	0,531	0,403	0,253	0,056	0	0,363

Os valores apresentados são a média de 3 repetições

As médias da mesma linha e coluna assinaladas com a mesma letra não são significativamente diferentes para $P < 0,05$

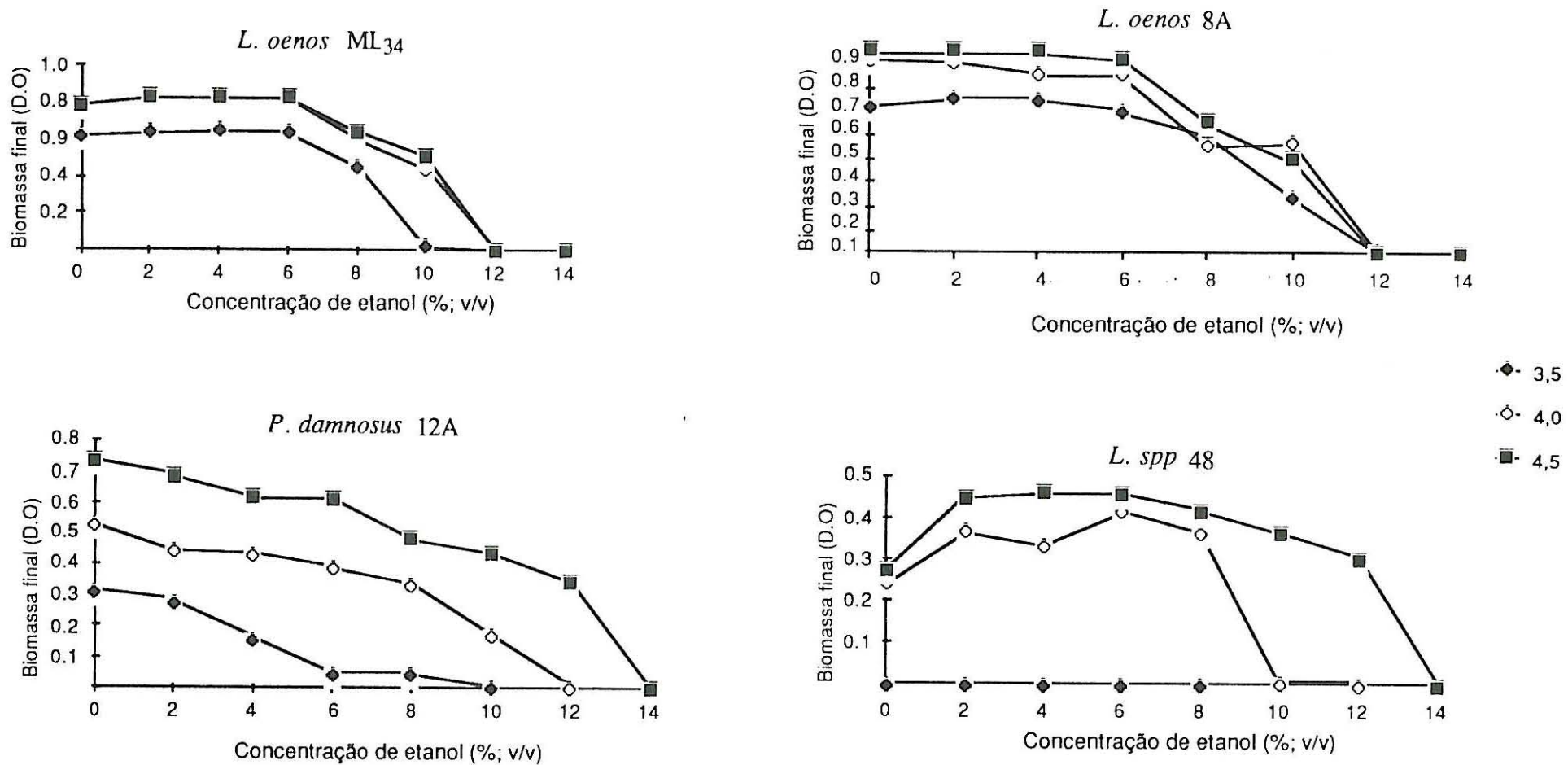


Fig. IV - 1. Efeito da concentração de etanol e do pH na absorvância final a 600nm (D.O) das várias estirpes.

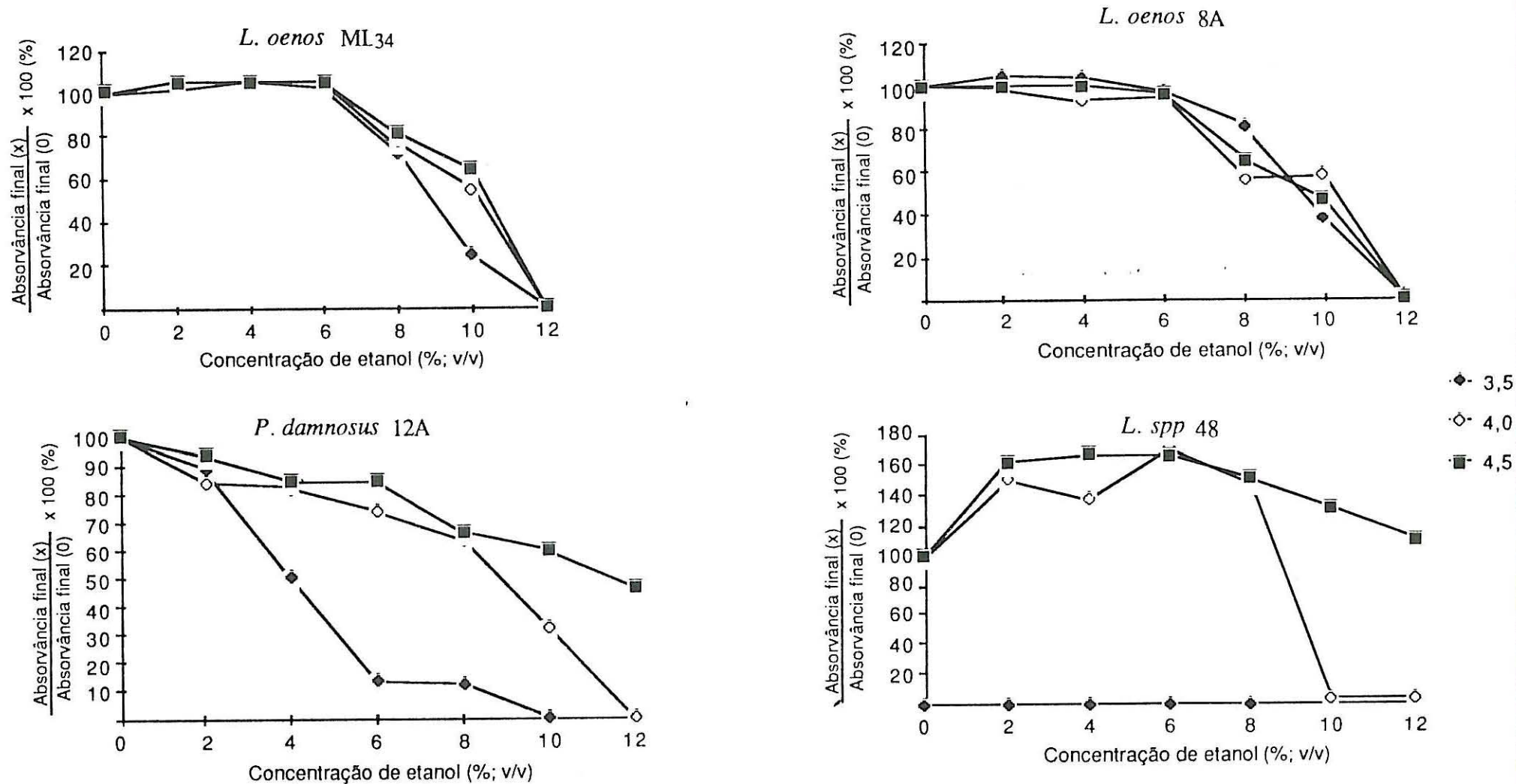


Fig. IV - 2. Relação entre absorvância final a 600nm na presença da concentração x de etanol e a absorvância final na ausência de etanol (%) para as várias estirpes, a vários níveis de pH.

significativas na absorvância final a 600nm para percentagens em etanol até 6%. Para valores superiores observámos um decréscimo progressivo na densidade óptica à medida que aumentamos a concentração em etanol. A produção de biomassa na estirpe 48 foi similar ao da taxa específica de crescimento, foi máxima para concentrações em etanol entre 2 e 8% ou 2 e 12% respectivamente a pH 4,0 e 4,5. Para teores em etanol superiores houve um decréscimo altamente significativo na absorvância final a 600nm. Na estirpe 12A, à medida que aumentámos a quantidade de etanol foi observada uma diminuição na densidade óptica porém, o decréscimo foi mais acentuado para valores de etanol iguais ou superiores a 6%.

O efeito do etanol foi dependente do pH inicial do meio de cultura, o que conduziu a uma interacção altamente significativa ($P < 0,001$) entre estes dois factores. Verificou-se um acréscimo na absorvância final a 600nm com a subida do pH, sendo o acréscimo variável com o género. Em *Pediococcus* e em *Leuconostoc* o acréscimo foi mais acentuado do que em *Lactobacillus*. Nas estirpes ML₃₄ e 8A não houve diferenças assinaláveis na absorvância final a 600nm para valores de pH 4,0 e 4,5, no entanto a densidade óptica a pH 3,5 foi significativamente diferente da observada para os restantes valores de pH. Os decréscimos observados nas várias estirpes com a diminuição do pH de 4,0 para 3,5 foram altamente significativos, sobretudo na estirpe 48.

A resposta das estirpes variou ainda de modo altamente significativo ($P < 0,001$) em função do etanol adicionado ao meio de cultura, para os vários níveis de pH. Esta interacção ficou a dever-se principalmente à estirpe 48, pois como já foi referido, o seu crescimento foi totalmente inibido a pH 3,5 na presença e ausência de etanol.

Não houve diferenças significativas entre as médias da densidade óptica nas estirpes 12A e 48. Porém, as médias da absorvância final a 600nm a pH 4,0 e 4,5 das várias estirpes foram significativamente diferentes.

e) pH final

No Quadro V- 1 e Fig(s) V-1, V-2 apresentamos os resultados dos valores do pH final do meio de cultura, as análises da variância são apresentadas nos Quadros 21A, 22A, 23A, 24A e 25A. Da análise dos resultados obtidos, observamos que, à semelhança do que aconteceu com os outros parâmetros estudados, os factores pH inicial do meio de

Quadro V -1. Valores médios do pH final das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Estirpe	pH	concentração em etanol (%)								valores médios	
		0	2	4	6	8	10	12	14		
ML34 (A)	3,5	3,46	3,47	3,50	3,53	3,61	3,70	-	-	3,54	
8A (B)		3,53	3,54	3,58	3,62	3,68	3,76	-	-		3,62
12A(C)		3,59	3,58	3,72	3,77	3,80	3,80	-	-		3,73
Lact(D)		3,51	3,52	3,55	3,56	3,57	3,61	-	-		3,55
ML34 (A)	4,0	3,68	3,69	3,74	3,75	3,85	3,89	-	-	3,77	
8A(B)		3,69	3,70	3,73	3,76	3,82	3,86	-	-		3,77
12A (C)		3,60	3,60	3,65	3,70	3,79	3,95	-	-		3,71
Lact (D)		3,83	3,86	3,91	3,96	4,03	4,05	-	-		3,94
ML34 (A)	4,5	3,88	3,90	3,91	3,93	4,03	4,14	-	-	3,97	
8A (B)		3,79	3,77	3,83	3,82	3,84	3,92	-	-		3,83
12A (C)		3,62	3,64	3,65	3,70	3,78	3,87	-	-		3,71
Lact (D)		4,03	4,05	4,05	4,06	4,14	4,16	-	-		4,08
Valores médios		3,68	3,69	3,73	3,76	3,83	3,90	-	-	3,770	

Os valores apresentados são a média de 3 repetições

As médias da mesma linha e coluna assinaladas com a mesma letra não são significativamente diferentes para $P < 0,05$

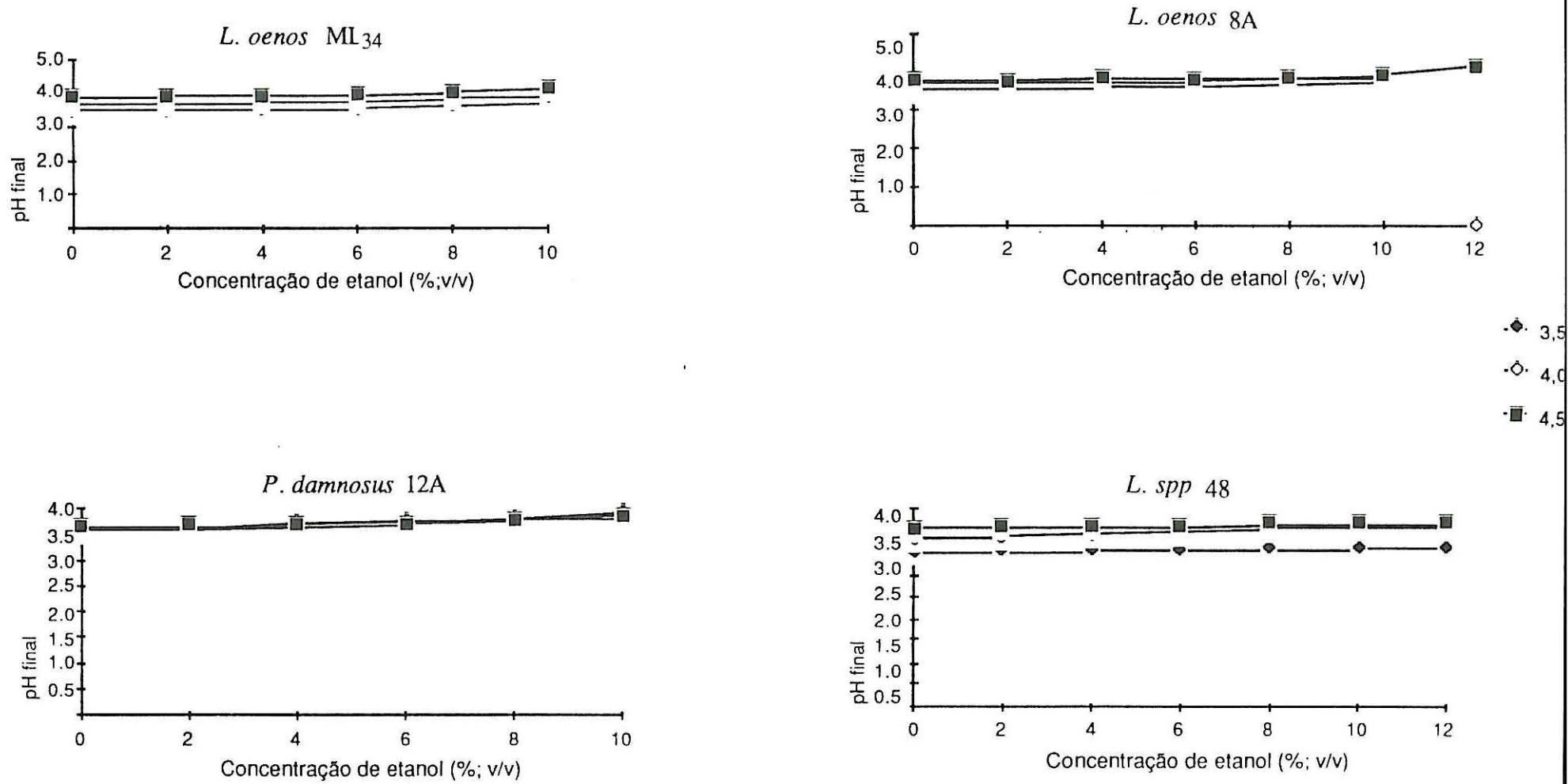
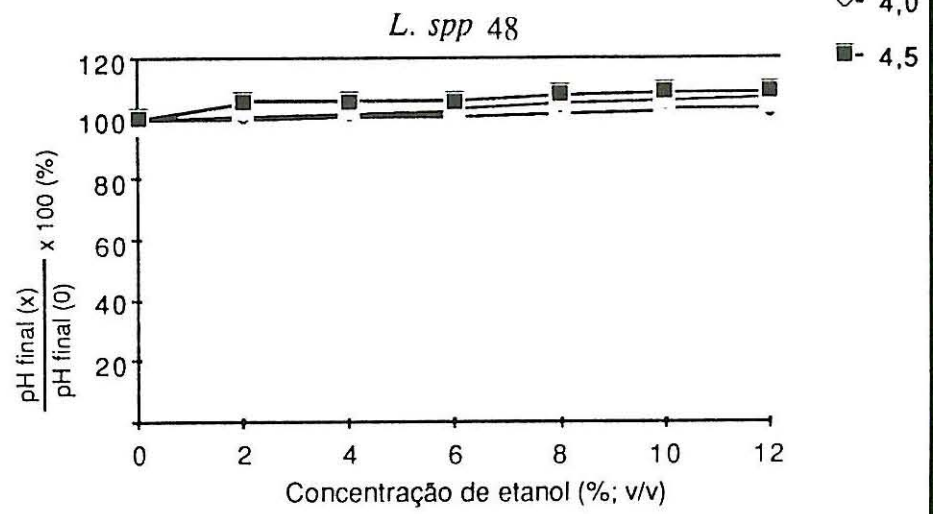
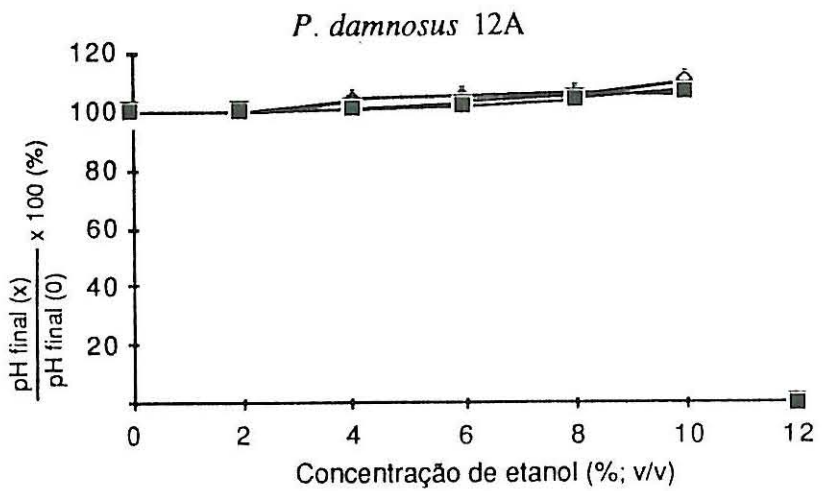
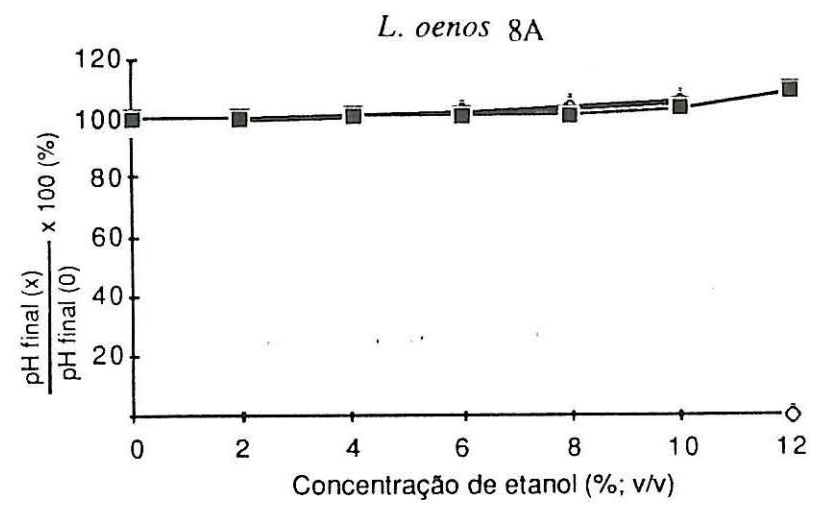
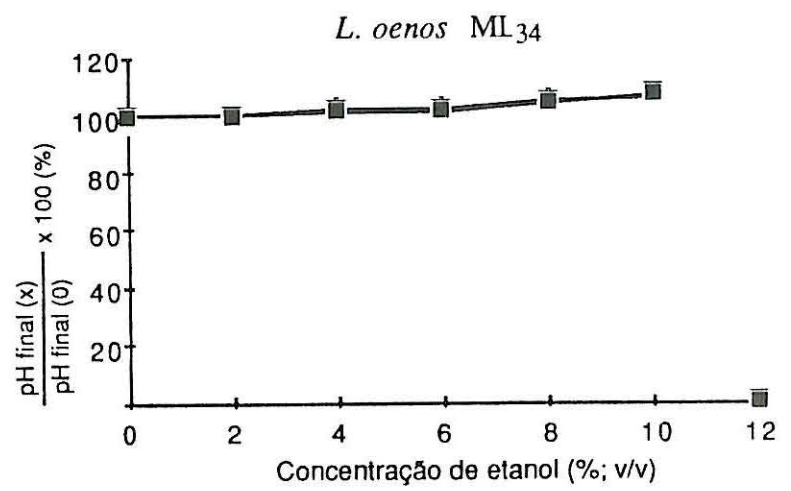


Fig. V - 1. Efeito da concentração de etanol e do pH no pH final do meio de cultura das várias estirpes.



- ◆ - 3,5
- - 4,0
- - 4,5

Fig. V - 2. Relação entre o pH final do meio de cultura na presença da concentração x de etanol e o pH final na ausência de etanol (%) para as várias estirpes, a vários níveis de pH.

cultura, as estirpes e o etanol tiveram um efeito altamente significativo ($P < 0,001$) na variação do pH final, que, de algum modo, está relacionado com a produção de ácido láctico pelas bactérias. Em todas as estirpes analisadas, o pH inicial do meio de cultura teve um efeito mais significativo na variação observada do que teve o etanol. A contribuição foi variável com a estirpe. A variação do pH final dos meios de cultura inoculados com as estirpes 12A e 48 foi significativamente mais afectada pelo pH inicial do que com as estirpes ML₃₄ e 8A (Quadros 26A e 27A).

O efeito do etanol foi dependente do pH inicial do meio de cultura o que se traduziu numa interacção altamente significativa ($P < 0,001$). Nas estirpes 8A e ML₃₄, quando o pH inicial do meio de cultura foi 3,5 verificou-se um acréscimo no pH final. Para valores de pH superiores à medida que aumentou o pH inicial houve uma redução no pH final. Em *Lactobacillus* e *Pediococcus* observou-se um decréscimo gradual no pH com o aumento do pH inicial. Esta interacção contribuiu mais significativamente para a variação do pH do que as outras interacções estudadas.

A interacção estirpe \times álcool foi altamente significativa ($P < 0,001$), o que quer dizer que as estirpes se comportaram de maneira diferente na presença do etanol. Na realidade, a redução do pH inicial foi mais significativa na estirpe 12A, na qual, como homofermentativa, se observou uma diminuição mais acentuada do que nas estirpes heterofermentativas 8A, ML₃₄ e 48.

O efeito do etanol sobre o pH final do meio de cultura foi não só dependente da estirpe mas também do pH inicial, o que conduziu a uma interacção altamente significativa ($P < 0,001$) entre os três factores. Quando o pH inicial do meio de cultura foi 3,5 nas estirpes do género *Leuconostoc* só houve alteração no pH para concentrações em etanol superiores a 6%, nos géneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* houve um acréscimo do pH nos meios de cultura com e sem adição de etanol. Além disso, o etanol provocou uma subida do pH dos meios de cultura, em todas as estirpes, quando o pH inicial foi de 4,0 e 4,5 .

f) Coeficiente de rendimento em biomassa

Os resultados obtidos são apresentados no Quadro VI-1 e Fig. VI-1. Da análise dos resultados observamos que, as duas estirpes de *Leuconostoc oenos* estudadas apresentam os mais baixos rendimentos a pH 3,5. À medida que se aumentou o pH de 3,5

Quadro VI -1. Valores do coeficiente de rendimento em biomassa (%), das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Etanol(%) Estirpe	pH 3,5							pH 4,0							pH 4,5						
	0	2	4	6	8	10	12	0	2	4	6	8	10	12	0	2	4	6	8	10	12
8A	41,00	47,00	49,00	38,00	8,00	8,00	-	62,20	65,00	50,00	31,00	25,00	11,00	-	69,00	67,00	52,00	35,00	34,00	9,00	-
ML34	39,50	51,00	65,20	54,00	30,00	10,00	-	70,00	72,00	62,00	58,00	24,00	10,00	-	70,00	74,00	66,00	58,00	27,00	10,10	-

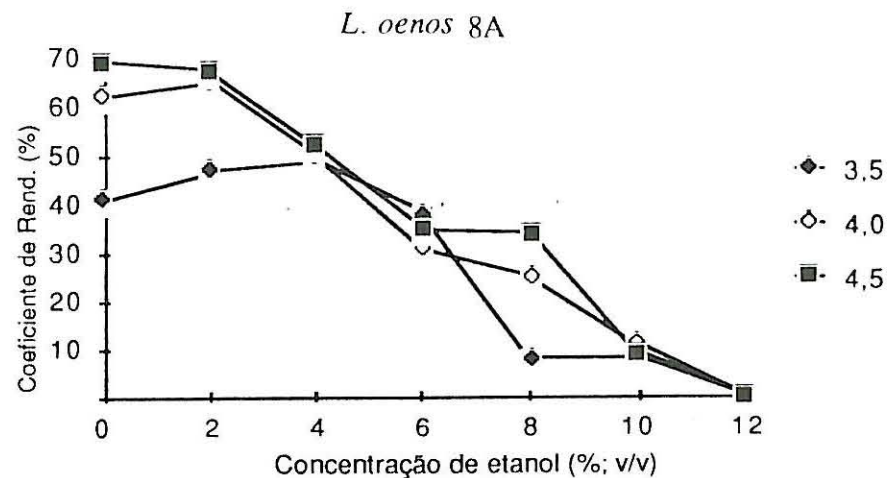
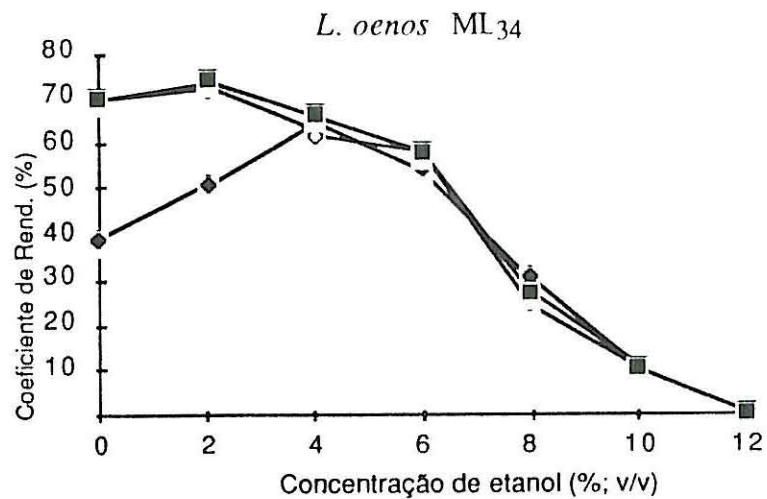


Fig. VI – 1. Efeito da concentração de etanol e do pH no coeficiente de rendimento em biomassa (%) das estirpes ML₃₄ e 8A.

para 4,0 houve um acréscimo muito significativo para depois diminuir de intensidade quando o pH passou de 4,0 para 4,5. Isto é, a pH 4,0 o rendimento foi 1,79 e 1,52 vezes maior que a pH 3,5, respectivamente na estirpe ML₃₄ e 8A. A variação dos rendimentos a pH 4,0 e 4,5 não foi significativa em ambas as estirpes.

g) Produtos resultantes do metabolismo

Nos Quadros VII-1, VIII-1 e IX-1 apresentamos os valores médios de açúcar e de ácidos presentes nos meios de cultura inoculados com as várias estirpes. As estirpes foram inoculadas (1%) nos vários meios de cultura tendo sido o seu crescimento avaliado por turbidimetria a 600nm. Após 45 dias de incubação a 25°C, as células foram removidas por filtração e o filtrado foi congelado até à altura em que se procedeu à sua análise por HPLC.

De acordo com os resultados obtidos em todas as estirpes estudadas houve um acréscimo na utilização dos açúcares e concomitantemente na produção de ácido láctico, com o incremento de 0,5 unidades de pH. Porém, este aumento foi mais significativo na passagem de pH 3,5 para 4,0.

Na estirpe 12A o consumo máximo de açúcar foi observado no controlo (0% de etanol), não tendo sido detectadas porém diferenças significativas na produção de ácido láctico. Para teores de etanol de 10% houve um decréscimo acentuado no consumo de açúcares e na formação de ácido láctico. Nas estirpes 8A e ML₃₄ a pH 3,5, não houve diferenças assinaláveis na utilização dos açúcares nem na produção de lactato nos meios de cultura sem ou com 2% de etanol. A pH 4,0 e 4,5 observamos, o maior consumo de açúcares e a produção máxima de lactato, para valores de 2% de etanol. Todavia, à medida que se aumentou a concentração em etanol observou-se um decréscimo na utilização dos açúcares e na formação do lactato. Verificámos ainda que, as estirpes do género *Leuconostoc oenos* metabolizaram totalmente o ácido cítrico adicionado ao meio de cultura, para todos os níveis de pH e na presença ou ausência de etanol. A produção de ácido acético não foi significativamente diferente para os vários níveis de pH e teores de etanol estudados. Todavia, um ligeiro acréscimo para percentagens 2-4%, principalmente a pH 3,5. Ao contrário, o género *Pediococcus* não utilizou o citrato.

Quadro VII-1. Concentração dos produtos finais obtidos na estirpe ML34 ($\mu\text{moles}/\mu\text{l-1}$)

Etanol (%)	pH 3,5			pH 4,0			pH 4,5		
	0	2	6	0	2	10	0	2	10
Metabolitos									
Cítrico	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
Açúcares (Glu+Fru)	0,744	0,712	0,819	0,710	0,614	0,871	0,706	0,532	0,860
Málico	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
Sucínico	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
Lactico	0,603	0,581	0,344	0,605	0,634	0,350	0,635	0,684	0,382
Acético	0,130	0,140	0,142	0,153	0,123	0,130	0,141	0,150	0,141
Etanol	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)

a) não detectado

b) não analisado

Quadro VIII-1. Concentração dos produtos finais obtidos na estirpe 8A ($\mu\text{moles}/\mu\text{l-1}$)

Etanol (%)	pH 3,5			pH 4,0			pH 4,5		
	0	2	6	0	2	10	0	2	10
Metabolitos									
Cítrico	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
Açúcares (Glu+Fru)	0,745	0,725	0,800	0,820	0,655	0,882	0,715	0,600	0,872
Málico	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
Sucínico	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
Lactico	0,600	0,592	0,321	0,600	0,630	0,325	0,620	0,642	0,371
Acético	0,140	0,142	0,132	0,152	0,133	0,126	0,150	0,142	0,139
Etanol	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)

a) não detectado

b) não analisado

Quadro IX-1. Concentração dos produtos finais obtidos na estirpe12A ($\mu\text{moles}/\mu\text{l-1}$)

Etanol (%)	pH 3,5			pH 4,0			pH 4,5		
	0	2	6	0	2	10	0	2	10
Metabolitos									
Cítrico	0,070	0,070	0,077	0,070	0,075	0,076	0,075	0,076	0,074
Açúcares (Glu+Fru)	0,702	0,701	0,884	0,676	0,538	0,862	0,604	0,506	0,945
Málico	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
Sucínico	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)
Lactico	0,440	0,446	a)	0,595	0,598	a)	0,687	0,688	0,300
Acético	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	a)	0,139
Etanol	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)	b)

a) não detectado
b) não analisado

Adicionalmente observámos que, a quantidade de ácido láctico produzido pela estirpe 12A foi expressivamente superior à das restantes estirpes, o que parece lógico na medida em que os *Pediococcus* são homofermentativos.

3.1.2 – Efeito do Etanol e do Estado Fisiológico das Células na Velocidade de Degradação do Ácido L-málico.

Resultados obtidos estão apresentados nos Quadros X-1 e XI-1 e nas Fig(s) VI-1 e VII-1. Da análise dos resultados, parece-nos importante salientar, que quando adicionámos concentrações em ácido L-málico de 0,1 e 0,5% aos meios de cultura com pH 3,5 depois da população bacteriana ter atingido o crescimento máximo, o ácido L-málico foi completamente metabolizado e a velocidade de degradação não foi afectada a não ser para teores em etanol iguais a 15%. Porém, quando a percentagem de malato foi de 0,75% verificámos que, à medida que se aumentou o teor em etanol houve um descréscimo significativo na velocidade de degradação. Nos meios de cultura com 15% não foi detectada a descarboxilação do ácido L-málico e nos meios com 10% de etanol a degradação foi parcial para valores de pH 3,5. A pH 4,0 a velocidade de descarboxilação do ácido L-málico (0,1; 0,5 e 0,75) não foi afectada pelo etanol.

Quadro X. Tempo necessário para a degradação do ácido L-málico (h) pela estirpe ML34, para vários níveis de etanol e pH.

Concentração em ácido málico (%)	pH	Concentração de etanol (%)			
		0	5	10	15
0,10	3,5 4,0	312 72	312 72	312 72	a) 72
0,50	3,5 4,0	312 72	312 72	312 72	a) 72
0,75	3,5 4,0	312 96	336 96	b) 96	a) 96

a) Não foi degradado ao fim de 880 horas (45 dias).

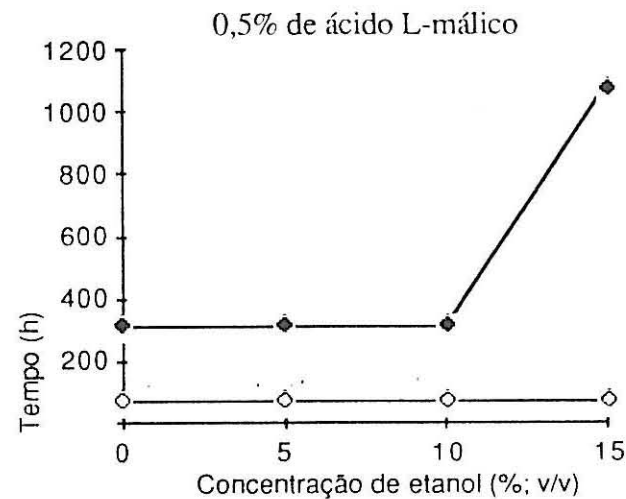
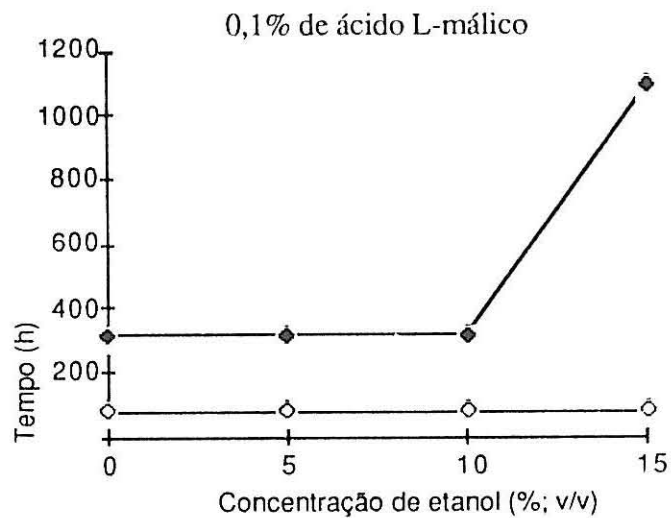
b) Degradado parcialmente ao fim de 880 horas (45 dias).

Quadro XI. Tempo necessário para a degradação do ácido L-málico (h) pela estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.

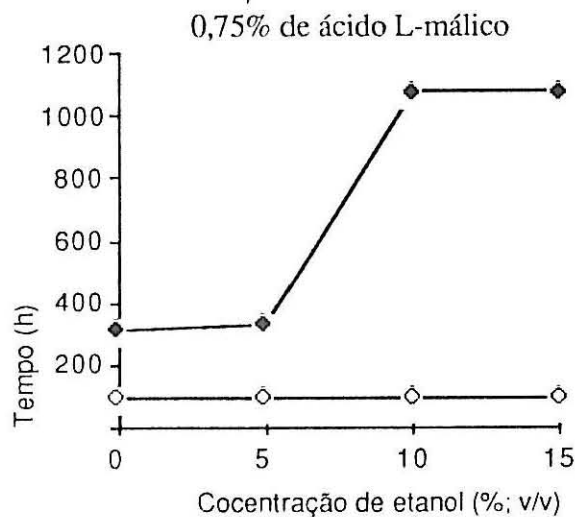
Concentração em ácido málico (%)	pH	Concentração de etanol (%)			
		0	5	10	15
0,75	3,5	168	312	b)	a)
	4,0	96	96	96	96

a) Não foi degradado ao fim de 880 horas (45 dias).

b) Degradado parcialmente ao fim de 880 horas (45 dias).



L. spp 48



◆ 3,5
◇ 4,0

Fig. VII - 1. Efeito da concentração de etanol e do pH na velocidade de degradação do ácido L-málico (h) da estirpe ML₃₄.

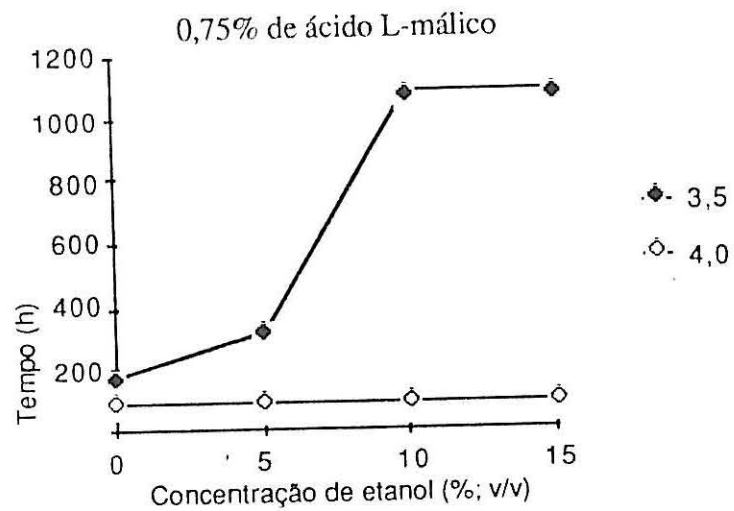


Fig.VIII – 1. Efeito da concentração de etanol e do pH na velocidade de degradação do ácido L-málico (h) da estirpe 8A.

4 - DISCUSSÃO

Ao estudar-se o efeito do etanol na cinética de crescimento de estirpes de bactérias lácticas dos vinhos, pretendeu-se avaliar até que ponto a concentração de etanol poderia condicionar, para vários níveis de pH do meio de cultura, a acção destas bactérias nos vinhos, quer do ponto de vista positivo, como agentes da fermentação maloláctica, quer do ponto de vista negativo, como agentes de doença.

Os resultados obtidos demonstraram que o pH inicial e a concentração de etanol do meio de cultura são factores decisivos no controlo da actividade microbiana, afectando de modo altamente significativo a taxa específica de crescimento, o consumo de glicose, a absorvância final, a duração da fase lag e o pH final do meio de cultura, ainda que tenham tido pouca influência na natureza e teor dos produtos secundários da fermentação maloláctica.

De acordo com o que é geralmente referido na literatura (BOUBOURAS e KUNKEE, 1971; LIU e GALLANDER, 1983; DAVIS *et al.*, 1985; MENDES FAIA, 1987), o efeito do pH afectou profundamente a actividade das estirpes estudadas, confirmando-se que *Leuconostoc oenos* é mais acidotolerante que *Pediococcus damnosus* e este, por sua vez, mais acidotolerante que *Lactocillus spp.* Este facto justifica que *Leuconostoc oenos* seja identificado como o principal agente da fermentação maloláctica e *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus spp.* como agentes de alteração dos vinhos particularmente os de pH elevado.

O facto de *Leuconostoc oenos* ser mais tolerante a valores baixos de pH do que as restantes espécies estudadas, justifica que a acção do etanol na variação dos parâmetros estudados tenha sido superior à acção do pH, ao contrário do verificado em *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus spp.*

Os mecanismos de resistência das bactérias lácticas dos vinhos ao pH tem sido muito pouco estudados, não tendo nós conhecimento de nenhuma referência, para além de MENDES FAIA (1987) onde seja adiantada qualquer hipótese explicativa. Tal assunto tem sido no entanto estudado em bactérias lácticas dos leites e da boca (KASHKET, 1987) dada a importância que assumem nos processos fermentativos e na cariogénese, respectivamente. Entre as bactérias lácticas responsáveis pela acidificação dos produtos lácticos, sabe-se que o género *Streptococcus* é menos acidotolerante que o género *Lactobacillus*, embora tanto num caso como noutro o efeito do pH permita a actividade fermentativa para valores

inferiores áqueles a que cessa o crescimento (KASHKET, 1987). Os nossos resultados também mostraram um comportamento análogo das bactérias dos vinhos, pois verificou-se um abaixamento do pH final do meio de cultura (devido provavelmente, à produção de ácido láctico) a valores de pH em que já não houve crescimento (c.f. Figs. I-1 e V-1).

CROW e THOMAS (1982) verificaram que algumas estirpes de *Streptococcus* podem adaptar-se a valores baixos de pH através da fermentação da arginina, pois a amónia resultante dessa fermentação, ao fazer subir ligeiramente o pH extracelular, prolonga por mais tempo a sua actividade metabólica. KUENSCH *et al.* (1974) verificaram este fenómeno em vinhos com *Leuconostoc oenos*, pelo que será de admitir que tal facto contribua para a sua acidoterância.

É geralmente aceite, contudo, que a resistência das bactérias ao pH do meio se deve, fundamentalmente, à sua capacidade para manterem constante o pH intracelular, o qual se deve à regulação dos sistemas de transporte de iões (BOOTH, 1985) e, conseqüentemente, ao "steady-state" que se estabelece entre a geração e a dissipação de um gradiente de protões. A actividade dissipadora desse gradiente de protões através de agentes protonóforos e caotróficos (KASHKET, 1987), poderá explicar a maior sensibilidade das estirpes por nós estudadas na presença de elevadas concentrações de etanol.

No nosso trabalho ao contrário do observado por outros autores (BOUBOURAS e KUNKEE, 1971; LIU e GALLANDER, 1983; DAVIS *et al.*, 1985; MENDES FAIA, 1987) verificamos ainda, que a estirpe *Lactobacillus spp* 48 teve taxas específicas de crescimento relativamente reduzidas e a duração da fase *lag* foi significativamente prolongada. Pelo que podemos dizer que nem todas as espécies de *Lactobacillus* têm um crescimento mais rápido que *Leuconostoc* e *Pediococcus* como foi referido por RIBEREAU-GAYON *et al.* (1975). Será contudo necessário realçar, que esta estirpe, ao contrário de todas as outras referidas na literatura citada, não foi isolada de vinhos de mesa mas sim de um vinho licoroso.

Dos resultados obtidos o mais significativo diz respeito à acção estimulante que o etanol exerceu, a baixas e médias concentrações (2-8%), sobre todos os parâmetros das estirpes estudadas. Ao contrário do que seria de esperar, a acção do etanol sobre as bactérias lácticas é um assunto muito pouco estudado e, tanto quanto sabemos, nunca abordado em termos de efeitos sobre a cinética de crescimento. KING e BEELMAN (1986) referem que teores de etanol de 1,5 a 3% estimulam o crescimento das bactérias lácticas dos vinhos, conduzindo a biomassas finais superiores às encontradas em meios sem

etanol. Consideram, todavia, que o etanol tem um efeito fortemente repressivo para concentrações superiores a 6%, facto que nós só verificamos, apenas para as estirpes de *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus spp* a pH 3,5. A grande exigência das bactérias lácticas em termos nutricionais poderá explicar, em parte, tal discrepância, pois os meios de cultura utilizados nos estudos de crescimento terão concerteza grande importância.

Se o efeito estimulante do etanol já de si foi inesperado, atendendo às concentrações a que se verificou, mais surpreendente se torna se considerarmos a sua acção sobre a absorvância final produzida e sobre o coeficiente de rendimento. Com efeito, RADLER e HARTEL (1984) afirmaram que o etanol não é metabolizável pelas bactérias lácticas, embora possa ser produzido, ainda que em baixas concentrações, por bactérias heterofermentativas (KANDLER, 1983). Ainda que seja meramente especulativa qualquer explicação para os resultados obtidos, é de considerar a hipótese do etanol poder a exemplo do que aconteceu com as leveduras (van UDEN, 1985) e outros microrganismos (INGRAM e BUTTKE, 1984), actuar a nível da membrana, estimulando o influxo de glicose (não verificado em leveduras) ou o efluxo de metabolitos capazes de acidificar o pH intracelular.

O facto de se ter, usado por força das exigências nutricionais das bactérias lácticas, um meio de cultura complexo, torna possível a hipótese de ter havido consumo de outro nutrientes como fonte de energia e por conseguinte, uma avaliação por defeito do coeficiente de rendimento em biomassa. Contudo, a análise cromatográfica dos produtos de fermentação não faz supor tal facto pois sómente a estirpe de *Pediococcus damnosus* utilizou o citrato, presente no meio em concentração muito baixa.

Do ponto de vista prático, o efeito estimulante do etanol poderá ter grande significado, não só por poder vir a ser utilizado na formulação de meios de cultura para isolamento e crescimento rápido de bactérias lácticas, mas também por poder ser importante na multiplicação de fermentos. No caso concreto das estirpes de *Leuconostoc oenos*, o grande efeito estimulante do etanol, associado à elevada resistência ao pH poderá, vir a ser aproveitado para a formulação de meios de cultura selectivos para o isolamento desta espécie apartir de vinhos, particularmente moroso com os meios vulgarmente utilizados.

Por outro lado, tal como já foi referido, o efeito do pH em *Lactobacillus* foi significativamente maior que o do etanol o que nos leva a concluir que a estabilização dos vinhos licorosos exige a redução do pH para valores iguais e inferiores a 3,5.

Ao estudar-se a velocidade de degradação do ácido L-málico por células de *Leuconostoc oenos* na presença e ausência de 5% de etanol, pretendeu-se avaliar até que ponto o álcool poderia influenciar o estado de adaptação das células ao meio, e deste modo, ser determinante na preparação de fermentos para a realização da fermentação maloláctica. Assim, num meio de cultura TGB com 5% de etanol inoculou-se uma população microbiana em fase exponencial de crescimento. Quando os microrganismos atingiram o crescimento máximo, adicionamos várias doses de etanol e de ácido L-málico de modo a que a concentração final nos vários tubos fosse de 0; 5; 10 e 15% de etanol e 0; 1; 0,5 e 0,75% de ácido L-málico. Neste ensaio, verificámos que a velocidade de degradação do ácido málico foi dependente do pH, da concentração de ácido adicionado e do teor em etanol. A pH 4,0 o ácido málico foi totalmente descarboxilado, mesmo quando a sua concentração foi de 0,75% e o teor em etanol de 15%. No meio de cultura com pH 3,5 e 15% de etanol, a degradação do ácido málico (0,75%) não foi observada até 45 dias. Até mesmo com 10% de etanol a utilização do ácido (0,5%) não foi completa. Observámos também uma redução substancial no número de células viáveis com adição de etanol, particularmente quando a concentração final de álcool foi de 15%, para os dois níveis de pH estudados. Porém, o decréscimo da população bacteriana foi bastante mais elevado a pH 3,5. Estes resultados estão de acordo, com as observações de RICE e MATTICK (1970) nos vinhos. Segundo os autores, a descarboxilação do ácido málico só se inicia quando a população é da ordem de 10^6 células ml^{-1} . A pH 3,5, foi detectado um acréscimo assinalável no tempo necessário à degradação do ácido à medida que se aumentou a sua concentração e o teor de etanol do meio de cultura. Estes resultados levam-nos a concluir, em primeiro lugar, que a actividade da enzima maloláctica é inibida pelo etanol conforme já foi observado por LAFON-LAFOURCADE (1975). Além disso, podem confirmar de algum modo a hipótese formulada por MENDES FAIA (1987): isto é quanto mais baixo é o pH do meio, maior é a quantidade de ácido sob a forma diprotonada, o que facilita a sua entrada para o interior da célula. O efeito desacoplador do ácido é, segundo a autora, diminuído pela ocorrência da fermentação maloláctica. No entanto, uma vez que a enzima maloláctica é inibida pelo etanol, a sua actividade não é suficiente para eliminar o efeito desacoplador do ácido málico. Como se sabe, os microrganismos que vivem em ambientes ácidos tem de manter de igual modo o pH intracelular próximo da neutralidade o que é atingido pelo efluxo de metabolitos ou pela utilização de ATP, o que explica o crescimento lento destas espécies em meios com valores reduzidos de pH.

5 – CONCLUSÕES

- a) O pH e a concentração em etanol do meio de cultura afectaram de modo altamente significativo as taxas de crescimento (h^{-1}), a biomassa final, a duração da fase de latência e o pH final do meio de cultura das várias estirpes bacterianas. Todavia, o efeito global do etanol foi significativamente repressivo do crescimento em todas as estirpes.
- b) O etanol teve com efeito estimulante ou repressivo, dependendo da sua concentração, do pH do meio de cultura e da estirpe.
- c) A acção estimulante do etanol (2-4%) nas taxas de crescimento fez-se sentir com maior intensidade em *Leuconostoc oenos*, principalmente na estirpe ML₃₄, para valores de pH 3,5. Não foi, no entanto, observado aumento no consumo em glicose, na densidade óptica nem na produção de ácido láctico.
- d) Na estirpe do género *Pediococcus* na ausência de etanol e no género *Lactobacillus* na presença de percentagens de 2-4%, verificou-se um aumento na densidade óptica, resultante provavelmente do maior consumo de açúcares.
- e) A duração da fase lag não foi afectada pelo etanol a não ser para valores iguais ou superiores a 6%.
- f) Em todas as estirpes estudadas, mas de modo diverso, o aumento do pH, sobretudo de 3,5 para 4,0, conduziu a maior utilização dos açúcares e a um acréscimo na biomassa final.
- g) O ácido cítrico não foi metabolizado pela estirpe do género *Pediococcus*, não tendo sido afectado, contudo, o crescimento bacteriano.
- h) *Leuconostoc oenos* metabolizaram totalmente o ácido cítrico com produção de ácido láctico e acético.
- i) A presença de etanol não afectou qualitativamente os metabolitos produzidos pelas várias estirpes.

- j) A descarboxilação do ácido L-málico não foi afetada pela presença de etanol no meio de cultura a pH 4,0. Tendo sido fortemente inibida a pH 3,5 para valores de etanol superiores ou iguais a 10%.
- l) Os resultados obtidos sugerem que a adição de etanol (2 - 4%) e a redução de pH do meio de cultura podem ser condições selectivas para o crescimento do *Leuconostoc oenos*.
- m) Podemos ainda dizer que a estabilização microbiológica dos vinhos licorosos se consegue reduzindo o pH para valores iguais ou inferiores a 3,5.

6 – BIBLIOGRAFIA

- AMACHI T. 1975 – Chemical structure of a growth factor (TJF) and its physiological significance for malo-lactic bacteria. Em: Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr, C. V. Cutting e G. C. Whiting (eds.): 103-118.
- AMERINE M. A. e M. JOSELYN 1970 – Table wines. 2nd ed. University of California Press, Berkeley.
- AMERINE M., H. BERG e W. CRUESS, 1972 – Technology of wine making, 3rd. edition. The Avi Publishing Company Inc.
- ARCHIBALD F. e I. FRIDOVICH, 1981 – Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. J. Bact. 145 (1): 442-451
- BARRE P., 1978 – Identification of thermobacteria and homofermentative, thermophilic, pentose utilizing *Lactobacilli* from temperature high fermenting grape must. J. Appl. Bact. 44: 125-129.
- BEECH F. W. e J. G. CARR, 1977 – Cider and perry. Em “Economic Microbiology – Alcoholic beverages”. (1). A. H. Rose (eds.) Academic Press: 139-315.
- BEECH F. W. e S. THOMAS, 1984 – Action antimicrobienne du SO₂. 64^{ème} Assemblée Général de l’O.I.V. Porto – Portugal.
- BEELMAN R. e J. GALLANDER, 1970 b – Stimulation of malo-lactic fermentation in eastern grape musts. Appl. Microb. 20 (6): 993-994.
- BEELMAN R., A. GAVIN e R. KEEN, 1977. A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malo-lactic fermentation in eastern wines. Am. J. Enol. Vitic. 28 (3): 159-165.
- BENDA I, 1982 – Wine and Brandy. Em: Prescott and Dunus Industrial Microbiology (4th eds.). G. Red (ed.). West Port. LT (3): 401.

- BERG R. W., W. E. SANDINE e A. W. ANDERSON, 1981 – Identification of a growth stimulant for *Lactobacillus sanfrancisco*. Appl. Environ. Microbiol. 42 (5): 786-788.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Buchanan, R. E. e N. E. Gibbons (eds.) 1974: 8th edition Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland.
- BOOTH I. R., 1985 – Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. Microbiol. Rev. 49:359-378.
- BOUSBOURAS G. e R.E. KUNKEE, 1971 – Effect of pH on malo-lactic fermentation in wine. Am. J. Enol. Vitic. 22: 121-126.
- BREED R. S., E. G. D. MUNAY e N.R. SMITH, 1957 – Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th edition. Williams and wilkings. Baltimore, Maryland.
- BROCK T., 1974 – Biology of microorganisms 2nd edition. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- CASPRITZ G. e RADLER. F, 1983 – Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. J.biol. Chem. 258:4907-4910.
- CASTINO M., L. USSEGLIO-TOMASSET e A. GANDINI, 1975 – Factors which affect the spontaneous initiation of the malo-lactic fermentation in wines. The possibility of transmission of inoculation and its effects on organoleptic properties. Em: "Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr, C. V. Cutting e G.C. Withing (eds.): 139-148.
- CARPENTER P., 1977 – Microbiology. 4th edition. W. B. Saunders company. 180. pp.
- CARR J., 1975 – Lactics of the world unite. Em: "Lactic acid bacteria in beverages and food." J. G. Carr, C. Y. Cutting e G. C. Whiting (eds.): 369-380.

- COGAN T. M., S. E. GILLILAND e M.L. SPECK, 1968 – Identification of stimulants for *Lactobacillus bulgaricus* in tomato juice. *Appl. Microb.* 16 (8): 1215-1219.
- COGAN T.M., M. O'DOWD e D. MELLERICK, 1981 – Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(1): 1-8.
- COLLINS E. B., 1977 – Influence of medium and temperature on end products and growth. *J. Dairy Sci.* 60(5): 799-804.
- COSTELO P. J., G.H. MORRISSON, T. H., LEE e G. H. FLEET, 1983 – Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Thn.* 35 (1): 14-18.
- CRAPISI A., M. P. NUTI., A. ZAMORANI e P. SPETTOLI, 1987 – Improved stability of Immobilized *Lactobacillus sp.* cells for the control of malolactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic* 38 (4): 310-312.
- CROW V. L. e T.D. THOMAS, 1982 – Arginina metabolism in lactic *Streptococci*.. *J. Bacteriol.* 150: 1024-1032.
- D'AMORE T. e STEWART G. G., 1987 – Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Techol.* 9: 322-330.
- DAVIS C. R., D.WIBOWO, R. ESCHENBRUCH, T. H. LEE e G. H. FLEET, 1985 – Practical implication of malolactic fermentation: a Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36 (4): 290-301.
- DAVIS C. R., D.WIBOWO, T. H. LEE e G. H. FLEET, 1986 – Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 38 (1): 35-40.
- DAVIS C. R., D.WIBOWO, T. H. LEE, e H. FLEET 1986 – Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Appli and Environ Microbiol.* 51(3): 539-545.

- DAVIS C. R., D.WIBOWO, G. H. FLEET e T. H. LEE 1988 – Properties of wine lactic acid bacteria: Their potêncial Enogical significance. *Am J. Enol. Vitic*, 39 (2): 137-142.
- EDINGER W. D. e D. F. SPRLITTSOESSER, 1986 – Production by lactic acid bacteria of sorbic alcohol, the precursor of the geranium odor compound. *Am. J.Enol. Vitic*. 37 (1): 34-38.
- FORNACHON J. C. M., 1963 – Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. *J. Sci. Food. Agric.* 14: 857-862.
- FORNACHON J. C. M., 1965 – A *Leuconostoc* causing malo-lactic fermentation in Australian wines. *Am. J. Enol. Vitic*. 15: 184-186.
- FORNACHON J. C. M. e B. LLOYD, 1965 – Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. *J. Sci. Food. Agric.* 16: 710-716.
- FLEET G. H., S. LAFON-LAFOURCADE e P. RIBEREAU-GAYON, 1984 – Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (5): 1034-1038.
- GOTTSCHALK G., 1986 – Bacterial metabolism. 2nd ed. Spring Verlag. New York.
- GUILLOUX-BENATIER M., H. FEUILLAT e B. CIOLFI, 1985 – Contribution à l'étude de la degradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques isolées du vin: Effect stimulat des antolysates de levures. *Vitis* 24: 59-74.
- GUILLOUX-BENATIER M. 1987 – Malolactiques: finie la loterie? *Viti*. 114.
- HAMMOND S. e J. CARR, 1976 – The antimicrobial activity of SO₂ with particular reference to fermented and non fermented fruit juices. *Soc for Appl. Bact. Symposium Series* 5: 83-110.
- HOOD. A., 1983 – Inibition of growth of wine lactic acid bacteria by acetaldehyde-bound sulphur dioxide. *Wine -Science*: 34-43.

- IMAMOTO S., T. AMACHI e H. YOSHIKUNI, 1973 – Syntheses of some derivatives of glycosyl pantothenic acids, analogies of growth factor for MLF bacteria. *J. Agric. Biol. Chem.* 37 (3): 545-551.
- INGRAM M., 1975 – The lactic acid bacteria. A broad view. Em: Lactic acid bacteria in beverage and food. J. G. Carr, C. V. Cutting and G. C. Whiting, (eds.): 1-13.
- INGRAHAM J.L., R. V. VAUGHN e G. M. COOKE, 1960 – Studies on malolactic organisms isolated from California wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 11: 1-4.
- INGRAM L. O. e BUTTKE T. M., 1984 – Effects of alcohols on Micro-organisms. *Adv. in Microb. Phys.* 25: 254-300.
- INESTEA C., 1971 – Bacterial production and destruhicion of histamine in foods and food poisoning caused by histamine. *Nabrung* 15: 109-113.
- JUROSZEK J. R., O RAIMBAULT, M. FEUIELAT e C. CHARPENTIER, 1987 – A new method for determination of etanol tolerance in vinification yeast. Measurement of glucose. Induced proton movements *Am. J. Vitis*, 38 (4): 336-341.
- KANDLER O., 1983 – Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 209-224.
- KASHKET E. R., 1987 – Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS. Microbiology Reviews.* 233-244.
- KING S. W. e R. B. BEELMAN, 1986 – Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Am. J. Enol. Vitic.* 37 (1): 53-60.
- KUENSCH V., A. TEMPERLI e K. MAYER, 1974 – Conversio of arginine to ornithine during malo-lactic fermentation in red Swiss wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 25 (4): 191-193.

- KUNKEE R. E., 1967 – Malo-lactic fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* **9**: 235-279.
- KUNKEE R. E., 1967 b – Control of malo-lactic fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. *Am. J. Enol.* **18**: 71-77.
- KUNKEE R. E., 1974 – Malo-lactic fermentation and wine-making. Em: Chemistry of wine making. A. D. webb (ed.). *Advances in Chemistry series* **137**: 151-170.
- KUNKEE R. E., 1975 – A second enzymatic activity for decomposition of malic acid by malo-lactic bacteria. Em: Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr, C. V. Cutting e G. C. Whiting (eds.): 29-42.
- KUNKEE R. E., 1982 – Four thousand years of wine microbiology with an emphasis on the last hundred years. *Grape and wine Centennial Symposium Proceedings, 1980*, U. C. Davis: 76-78.
- KUNKEE R. E., C. OUGH e M. AMERINE, 1964 – Induction of malo-lactic fermentation by inoculation of musts and wine with bacteria. *Am J. Enol. Vitic.* **15** (4):178-183.
- KUNKEE R. E., G. PILONE e R. COMBS, 1965 – The occurrence of malolactic fermentation in Southern California wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**: 219-223.
- LAFON-LAFOURCADE S., 1970 b – Étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférants isolées des vins. *Ann. Technol. Agric.* **19** (2): 141-154.
- LAFON-LAFOURCADE S., 1975 – Factors of the malo-lactic fermentation of wines. Em: Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr. C. V. Cutting and G.C. Whiting (eds.): 43-53.
- LAFON-LAFOURCADE S., 1983 – Em: wine and brandy. *Biotechnology* **5**: 81-163.

- LAFON-LAFOURCADE S. e E. PEYNAUD, 1961 – Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. Ann. Technol. Agric. 10 (2): 143-160.
- LAFON-LAFOURCADE S. e E. PEYNAUD, 1974 – Sur l'action antibacterienne de l'anhydride sulphureux sous forme libre et sous forme combinée. Conn Vigne Vin 8: 187-203.
- LAFON-LAFOURCADE S., E. CARRE e P. RIBEREAU-GAYON, 1983 – Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. Appl. Environ. Microbiol. 46 (4): 874-880
- LAFON-LAFOURCADE S., V. LUCMARET e A. JOYEUX, 1980 – Quelques observations sur la formation d'acide acétique par les bactéries lactiques. Conn. de la vigne et du vin 14(3):183-193.
- LIU J. R. e J. F. GALLANDER, 1983 – Effect of pH and sulfur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wines. Am. J. Enol. Vitic. 34 (1): 44-46.
- LOUREIRO A. V., 1986 – Vinhos: Os microbios atacaram a colheita de 85 de uma forma intensa e original. Boletim da Sociedade Portuguesa de Microbiologia. 2: 9-12.
- MALONEY P., 1983 – Relationship between phosphorylation potential and electrochemical gradient during glycolysis in *Streptococcus lactis*. J. Bact. 153 (3): 1461-70.
- MARET R. e T. SOZZI, 1977 – Flore malolactique de mouts et de vins du Canton du Valais (Suisse). I- *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Ann. Technol. Agric. 21(3): 255-273
- MEISTER, 1965 – Biochemistry of the amino acids. 2nd ed. vol. 1 e 2. Academic Press.
- MENDES FAIA MASCARENHAS FERREIRA M.A., 1982 – A fermentação maloláctica. Instituto Universitario de Trás-os-Montes e Alto Douro - Vila Real. 43 pp

- MENDES FAIA MASCARENHAS FERREIRA M.A., 1987 b – Prova complementar - Estabilização microbiológica dos vinhos. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - Vila Real. 59 pp.
- MENDES FAIA MASCARENHAS FERREIRA M.A., 1987 – Tese de Doutoramento – Crescimento e metabolismo de bactérias lácticas provenientes de vinhos da Região de Trás-os-Montes, sua intervenção na fermentação Maloláctica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - Vila Real. 163 pp.
- NAKAGAWA A. e K. KITAHARA, 1959 – Taxonomic studies on genus *Pediococcus*. J.Gen. Appl. Microbiol. 5: 95-126.
- NEUFELD E. F. e V. GINSBURG, 1966 – Methods in enzymology (Vol III) – Complex carbohydrates. E.F. Neufeld e V. Ginsburg (eds.). Academic Press: 7-8.
- OTTO R. e N. WEISS, 1986 – Bergey's sistematic Bacteriology.
- OTTO R., A SONNENBERG, H. VELDKAMP e W. KONINGS, 1980 – Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux. Proc. Natl. Acad. Sci. 77 (9): 5502-5506.
- OUGH C. S., 1985 – Some effects of temperature and SO₂ on wine during simulated transport or storage. Am. J. Enol. 36 (1): 18-22.
- PEYNAUD E. 1956 – New information concerning biological degradation of acids. Am. J. Enol. Vitic. 7: 150-156.
- PEYNAUD E., 1967 – 2^{eme} Symposium Internacional Enologie. Inra (eds.) Paris. 219 pp.
- PEYNAUD E., 1981 – Connaisance e travail du vin. Bordas (eds.). 347 pp.
- PEYNAUD E. e G. GUIMBERTEAU, 1964 – Sur les polyols formés dans la fermentation lactiques des glucides. C. R. Hebd. S. Acad. Sci., Paris.
- PEYNAUD E. e S. DOMERCQ, 1967 – Study of some homofermentative lactic rods isolated from wines. Arch. Mikrobiol. 57: 255-270.

- PEYNAUD E. e S. DOMERCQ, 1968 – Etude de 400 souches de coques heterolatiques isolées de vins. Ann. Inst. Pasteur, XIX: 1-7.
- PILONE G., 1975 – Control of malo-lactic fermentation in table wines by addition of fumaric acid. Em: Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr., C.V. Cutting e G.C. Whiting (eds.): 121-138.
- PILONE G., R. E. KUNKEE e D.WEBB, 1966 – Chemical characterization of wines fermented with various malo-lactic bacteria. Appl. Microbiol. 14(4): 608-615.
- PILONE G. e R. E. KUNKEE, 1972 – Characterization and energetics of *Leuconostoc oenos* ML₃₄. Am. J. Enol. Vitic. 23 (2): 61-67.
- PILONE G. e R. E. KUNKEE, 1976 – Stimulatory effect of malo-lactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. Appl. Environ. Microb. 32 (3): 405-408.
- PIRT J. S., 1975 – Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- RADLER F., 1966 – Die mikrobiologischen grundlagen des säureabbaus im wein. Zentralbl. Bakt. II Abt. 120: 237-287. Citado por RADLER F., (1975) e McFEETERS *et al* (1982).
- RADLER F., 1972 – Problematik des bakteriellen säureabbaus. Weinberg und Keller, Band 19: 357-370.
- RADLER F., 1975 – The metabolism of organic acid by lactic acid bacteria. Em: Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr, C. V. Cutting e G. C. Whiting (eds.): 17-27.
- RADLER F., 1976 – Degradation de l'acide sorbique par les bacteries. Bull de l'O.I.V. 1976 545-546: 629-635.

- RADLER F., 1982 – The metabolism of organic acids by *Saccharomyces*. Grape and wine Centennial Symposium Proceedings, UC Davis, 1980. Webb, D (ed.): 103-108.
- RADLER F., 1986 – Microbial biochemistry. *Experientia* 42, Birkhäuser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland: 884-893.
- RADLER F. e C. YANNISSIS, 1972 – Weisäurevergärung durch milchräurebakterien des weines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167: 165-170.
- RADLER F. e I. SCHÖNIG, 1978 – Gluconsäurevergärung durch milchsäurebakterien des weines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167: 165-170.
- RADLER F. e H. SCHÜTZ, 1982 – Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. *Am. J. Enol, Vitic.* 179 : 225-231.
- RADLER F. e K. BRÖHL, 1984 – The metabolism of several carboxylic acids by lactic acid bacteria. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167: 165-170
- RADLER F. e S. HARTEL, 1984 – *Lactobacillus trichodes*, ein alkoholabhängiges Milchsäurebakterium. *wein - wiss*: 106-112.
- RANKINE B. C., 1966.– Decomposition of L-malic acid by wine yeast. *J. Sci. Food Agric.* 17: 312-316
- RANKINE B. C., 1977 – Developements in malo-lactic fermentation of Australian red tables wines. *Am. J. Enol. Vitis.* 28(1): 27-33.
- RANKINE B. C. e POCOCK, 1969 – Influence of yeast strain on binding of SO₂ in wines, and on its formation during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 20: 104-109.
- RANKINE B. C., J. C. M. FORNACHON e A. BRIDSON, 1969 – Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis* 8: 129-134.
- RANKINE B. C. e A. BRIDSON, 1971 – Bacterial spoilage in dry red wine and its relationship to malo-lactic fermentation. *Aust. wine, Brew. & Spirit. Rev.* 90 (3): 44-50.

- RIBEREAU-GAYON J., E. PEYNAUD, P. RIBEREAU-GAYON e P. SUDRAUD, 1971, 1975, 1977 – Traité d'oenologie – Sciences et techniques du vin. Vol. 1 e 2, Dunod, Paris.
- RICE A. e C. MATTICK, 1970 – Natural malo-lactic fermentation in New Your State wines. Am. J. Enol. Vitic. 21: 145-152.
- RIVAS-GONZALO J. C., J. F. SANTOS-HERNANDEZ e A. MARINE FORTE, 1983 – Study of tyramine content during de vinification process. J. Food. Sci. 48 (29): 417-418.
- SAN ROMÃO M. V., 1987 – Alterações microbiológicas dos vinhos. Instituto Nacional de Investigação Agrária. Estação Vitivinícola Nacional.
- SAN ROMÃO M. V. e S. LAFON-LAFOURCADE 1979 – Primiers observation sur l'action de *Botrytis cinerea* cultivi sur moût de raisins, à l'egard du metabolismo de bactéries lactiques dans le moûts et dans le vin. Vitis, 18: 155-160.
- SHARPE M. E., 1979 – Identificação of lactic of lactic acid bacteria. Em: Identification methods for Microbiologists. 2nd. ed. Soc. Appe. Bact. Techn. Series 14: SKINNER e LOVELOCK (eds.): 233-259.
- SHÖPHER J. F., 1973 – Bacteries láctiques et alteracion. Colloque Internacional D' Oenologie, 150^e Anniversaire de Pasteur, Paris. Am. J. Enol. Vitic. 28 (3): 137-144.
- SHÖPHER J. F. e J. AERNY, 1984 – Le role l'anhydride sulfureux en vinification. 64^{ème} Assemblée Générale de l'O.I.V., Porto-Portugal, 1984.
- SCHÜTZ M. e F. RADLER, 1974 – Das vorkommen vou Malatenzym und Malo-lactic-enzym bei Verschiedenen Milchsäurebakterien. Arch. Mikrobiol. 96: 329-339.
- SCHÜTZ H. e F. RADLER, 1984 – Anaerobic reduction of glycerol to propanediol-1,3 by *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus bruchneri*.. Syst. Appl. Microbiol. 5: 169-178.

- SILVER J. e T. LEIGHTON, 1981 – Control of malolactic fermentation in wine. Isolation and characterization of a new malo-lactic organism. *Am. J. Enol. Vitic.* 32(1): 64-72.
- SNEDECOR G. W. e W. G. COCHRAN, 1967 – Statistical methods. 6th ed. The IOWA State University Press.
- STANER J. R., 1979 – The lactic acid bacteria. *Microbes of diversity*. Food Technol: 60-65.
- STAMER J. R. e B. O. STOYLA, 1970 – Growth stimulants in plant extracts for *Leuconostoc citrorrum* *Appl. Microbiol.* 20 (5) :672-676.
- STEEL R. G. D. e J. H. TORRIE, 1981 – Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2nd ed. MacCraw-Hill Int. Book Co.
- TRACEY R. P. e T. J. BRITZ, 1987 – A numerical taxonomic study of *Leuconostoc oenos* strain from wine. *Jof Appl. Bacteriology.* 63: 523-532.
- TIWARI K. P., N. MISHRA e A. PANDEY, 1980 – Effect of some natural material on lactic acid fermentation *Zbl. Bakt. II Abt.* 135: 721-723.
- Van UDEN N., 1985 – Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Annual Reports on fermentation Processes* 8: 11-58.
- VAUGH R. H., 1955 – Bacterial spoilage of wines with special reference to California conditions. *Adv. Food Res.* 6: 67-108.
- WEBB R. B. e INGRAHAN, 1980 – Induced malolactic fermentations. *Am. J. Enol. Vitic* 11: 59-63.
- WEILLER H e F. RADLER, 1972 – Vitamin-und Aminosäurebedarf von Milchäurebakterien aus Wein un von Rebenblättern. *Mitt. Klosterneuburg.* 21: 4-18
- WEILLER H. e F. RADLER, 1976 – Über den Aminosäurestoffwechsel von Milchäurebakterien aus wrin. *Z. Lebens. Unters. Forsch.* 161: 259-266.

WHITING G., 1975 – Some biochemical and flavour aspects of lactic acid bacteria in ciders and other alcoholic beverages. Em: Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr, C. V. Cutting e G. C. Whiting (eds.): 69-85.

WIBOWO D., R. ESCHENBRUCH, C. R. DAVIS, G. H. FLEET e T. H. LEE, 1985 – Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Review. Am. J. Enol. Vitic. 36 (4): 302-313.

YOSHIKUNI H., 1975 – A malolactic bacterium and its growth factor: Em: Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr, C. V. Cutting e G. C. Whiting (eds.): 87-102.

ANEXO 1

Análise da variância das taxas de crescimento, do teor em glicose residual, da fase *lag*, da densidade óptica, em função da adição de etanol e do pH.

Quadro 1 A. Análise da variância das taxas específicas de crescimento das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Estirpe	3	0,037	0,012	416,109 * * *
Álcool	7	0,293	0,042	1425,577 * * *
Estirpe × álcool	21	0,058	1,807E-3	61,632 * * *
pH	2	0,120	0,06	2042,707 * * *
Estirpe × pH	6	0,016	2,720E-3	92,791 * * *
Álcool × pH	14	0,033	2,358E-3	80,447 * * *
Estirpe × álcool × pH	42	0,015	3,6483E-4	12,446 * * *
Erro	192	5,628E-3	2,9312E-5	

Quadro 2 A. Análise da variância da taxa específica de crescimento da estirpe ML₃₄, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	7	0,137	0,020	605,685 * * *
pH	2	8,934E-3	4,467E-3	138,636 * * *
Álcool × pH	14	7,225E-3	5161E-4	16,017 * * *
Erro	48	2,347E-3	3,2222E-4	

Quadro 3 A. Análise da variância da taxa específica de crescimento da estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	7	0,106	0,015	309,079 * * *
pH	2	0,019	0,010	199,243 * * *
Álcool × pH	14	9,272E-3	6,623E-4	13,546 * * *
Erro	48	2,347E-3	4,8889E-5	

Quadro 4 A. Análise da variância da taxa específica de crescimento da estirpe 12A, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	7	0,071	0,010	614,191 * * *
pH	2	0,060	0,030	1831,173 * * *
Álcool x pH	14	0,19	1,359E-3	82,343 * * *
Erro	48	7,920E-4	1,6500E-5	

Quadro 5 A. Análise da variância da taxa específica de crescimento da estirpe 48, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	7	0,071	2,446E-3	124,537 * * *
pH	2	0,047	0,024	1202,428 * * *
Álcool x pH	14	0,013	9,156E-3	46,621 * * *
Erro	48	9,427E-4	1,9639E-3	

Quadro 6 A. Análise da variância do teor de glicose residual das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Estirpe	3	1184630,151	39543,384	5208,845 * * *
Álcool	5	17660,328	3532,066	465,261 * * *
Estirpe x álcool	15	7204,47	480,298	63,267 * * *
pH	2	75008,115	37504,058	4940,215 * * *
Estirpe x pH	6	32678,98	5446,497	717,439 * * *
Álcool x pH	10	3314,805	331,48	43,664 * * *
Estirpe x álcool x pH	30	8112,926	270,431	35,622 * * *
Erro	144	1093,188	7,592	

Quadro 7 A. Análise da variância dos teores de glicose residual da estirpe ML₃₄, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	5	1804,392	2608,278	429,191 * * *
pH	2	7199,712	3599,856	592,354 * * *
Álcool × pH	10	2751,039	275,104	45,268 * * *
Erro	36	218,779	6,077	

Quadro 8 A. Análise da variância do teore de glicose residual da estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	5	6430,737	1286,147	129,451 * * *
pH	2	1006,768	503,384	50,666 * * *
Álcool × pH	10	1682,345	168,234	16,933 * * *
Erro	36	357,673	9,935	

Quadro 9 A. Análise da variância do teore de glicose residual da estirpe 12A, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	5	3434,785	686,957	124,24 * * *
pH	2	28017,982	14009,991	2583,594 * * *
Álcool × pH	10	1584,528	158,453	28,657 * * *
Erro	36	199,055	5,529	

Quadro 10 A. Análise da variância do teore de glicose residual da estirpe 48, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	5	1958,009	391,602	44,279 * * *
pH	2	71461,084	35730,542	4040,116 * * *
Álcool × pH	10	5408,419	540,842	61,154 * * *
Erro	36	318,382	8,844	

Quadro 11 A. Análise da variância dos valores médios da fase *lag* das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Estirpe	3	320096,792	1066832,264	23533,065 * * *
Álcool	5	1246470,875	249294,175	5499,136 * * *
Estirpe × álcool	15	432401,958	28826,797	635,885 * * *
pH	2	1958,779	979389,5	21604,18 * * *
Estirpe × pH	6	1018272,333	169712,056	3734,648 * * *
Álcool × pH	10	469830,033	46983	1036,39 * * *
Estirpe × álcool × pH	30	1000046,667	33334,889	735,328 * * *
Erro	144	6528	45,333	

Quadro 12 A. Análise da variância dos valores médios da fase *lag* da estirpe ML₃₄, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	5	839198,833	167839,767	1117,69 * * *
pH	2	125345,333	62672,667	417,354 * * *
Álcool × pH	10	262308,667	26230,867	174,678 * * *
Erro	36	5406	150,167	

Quadro 13 A. Análise da variância dos valores médios da fase *lag* da estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	5	117851,333	23570,267	2828,32 * * *
pH	2	21836,333	10918,167	13101,8 * * *
Álcool × pH	10	38761,667	3876,167	4651,4 * * *
Erro	36	30	0,833	

Quadro 14 A. Análise da variância dos valores médios da fase *lag* da estirpe 12A, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q	Q.M	F
Álcool	5	550115,333	110023,067	4926,406 * * *
pH	2	989932,333	494966,167	22162,664 * * *
Álcool × pH	10	944647,667	94464,767	4229,766* * *
Erro	36	804	22,333	

Quadro 15 A. Análise da variância dos valores médios da fase *lag* da estirpe 48, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q	Q.M	F
Álcool	5	171707,333	34341,467	4292,683 * * *
pH	2	1839937,333	919968,667	114996,083 * * *
Álcool × pH	10	224158,667	22415,867	2801,983* * *
Erro	36	288	8	

Quadro 16 A. Análise da variância dos valores médios da absorvância final, das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q	Q.M	F
Estirpe	3	4,822	1,607	2080,264 ***
Álcool	7	13,561	1,937	2507,116 ***
Estirpe × álcool	21	3,197	0,152	197,018 ***
Estirpe × pH	2	3,328	1,664	2153,645 ***
Estirpe × álcool	6	0,601	0,100	129,53 ***
Álcool × pH	14	0,796	0,057	73,559 ***
Estirpe × álcool × pH	42	0,563	0,130	17,345 ***
Erro	192	0,148	7,727E-4	

Quadro 17 A. Análise da variância dos valores médios da absorvância final da estirpe, ML₃₄ para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	7	7,178	1,025	1264,423 * * *
pH	2	0,461	0,230	283,9 * * *
Álcool × pH	14	0,289	0,021	25,467* * *
Erro	48	0,039	8,110E-4	

Quadro 18 A. Análise da variância dos valores médios da absorvância final, da estirpe 8A, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q.	Q.M	F
Álcool	7	6,886	0,984	1450,284 * * *
pH	2	0,240	0,120	174,947 * * *
Álcool × pH	14	0,166	0,012	17,513* * *
Erro	48	0,033	6,784E-4	

Quadro 21 A. Análise da variância dos valores médios do pH final do meio de cultura das várias estirpes, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q	Q.M	F
Estirpe	3	0,616	0,205	397,029 * * *
Álcool	5	0,297	0,259	501,351 * * *
Estirpe × álcool	15	0,108	7,199E-3	13,909 * * *
pH	2	3,057	1,528	2952,687 * * *
Estirpe × pH	6	1,693	0,282	545,094 * * *
Álcool × pH	10	0,028	2,788E-3	5,386 * * *
Estirpe × álcool × pH	30	0,061	2,040E-3	3,942 * * *
Erro	144	0,075	5,176E-4	

Quadro 22 A. Análise da variância dos valores médios do pH final do meio de cultura da estirpe ML34, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q	Q.M	F
Álcool	7	0,071	0,10	614,191 * * *
pH	2	0,060	0,030	183,173 * * *
Álcool × pH	14	0,019	1,359E-3	82,343 * * *
Erro	48	7,920E-4	1,6500E-5	

Quadro 23 A. Análise da variância dos valores médios do pH final do meio de cultura da estirpe 8A, para vários níveis de pH e etanol.

Fonte de variação	g. l	S.Q	Q.M	F
Álcool	5	0,233	0,047	127,011 * * *
pH	2	0,416	0,208	567,157 * * *
Álcool × pH	10	0,019	1,862E-3	5,087 * * *
Erro	36	0,013	3,6667E-4	

Quadro 24 A. Análise da variância dos valores médios do pH final do meio de cultura da estirpe 12A, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q	Q.M	F
Álcool	5	0,526	0,105	122,151 * * *
pH	2	1,3704E-4	6,8519E-5	0,08 * * *
Álcool × pH	10	0,0630	6,286E-3	7,3 * * *
Erro	36	0,031	8,611E-4	

Quadro 25 A. Análise da variância dos valores médios do pH final do meio de cultura da estirpe 48, para vários níveis de etanol e pH.

Fonte de variação	g. l	S.Q	Q.M	F
Álcool	5	0,152	0,03	64,949 * * *
pH	2	2,70	1,35	2881,47 * * *
Álcool × pH	10	0,029	2,882E-3	6,152 * * *
Erro	36	0,017	4,6852E-4	

Quadro 26 A. Variâncias esperadas da taxa específica de crescimento, do teor de glicose residual, da fase *lag*, da absorvância final e do pH final, para várias estirpes e níveis de pH.

Estirpe	σ^2 esperada (%) taxa de crescimento	σ^2 esperada consumo glicose	σ^2 esperada(%) fase lag	σ^2 esperada(%) absorvância final	σ^2 esperada(%) pH final
ML ₃₄	26,32	34,16	11,20	7,25	83,20
8A	19,58	11,82	13,42	4,22	65,47
12A	45,10	85,47	38,61	47,50	-0,31
Lact	97,38	89,60	81,90	58,99	94,61

Quadro 27 A. Variâncias esperadas da taxa específica de crescimento, do teor de glicose, da fase *lag*, da absorvância final e do pH final, para várias estirpes e níveis de pH.

Estirpe	σ^2 esperada (%) taxa de crescimento	σ^2 esperada consumo glicose	σ^2 esperada(%) fase lag	σ^2 esperada(%) absorvância final	σ^2 esperada(%) pH final
ML ₃₄	94,63	49,46	60,48	87,01	15,90
8A	79,24	61,14	57,00	91,99	29,60
12A	37,59	8,32	17,16	40,00	81,56
Lact	2,62	1,92	6,11	19,27	3,78