

ESTUDO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS COM VISTA À REPARAÇÃO DE INÓCULOS

M. V. SAN ROMÃO e M. F. SILVA ALEMÃO

Estação Vitivinícola Nacional. Dois Portes. 2575 RUNA

RESUMO

Foram isoladas bactérias lácticas de vinhos das regiões do Oeste e Dão. Após identificação por recurso às técnicas clássicas baseadas na morfologia e fisiologia das bactérias foram seleccionadas 7 estirpes de *Leuconostoc oenos* e 1 de *Lactobacillus plantarum* que têm vindo a ser estudadas no respeitante ao efeito que alguns factores do meio (ácido málico, pH e etanol) podem exercer sobre o crescimento e metabolismo do ácido málico. Foi avaliada a actividade maloláctica das estirpes em estudo.

INTRODUÇÃO

A fermentação maloláctica de um vinho (FML) é conseguida pela acção de bactérias lácticas (BL) que se desenvolvem após a fermentação alcoólica.

Quando as condições de meio são favoráveis, a população atinge níveis da ordem de 10^6 cel/ml, a partir dos quais o ácido málico é degradado. Contudo o crescimento bacteriano é muitas vezes insuficiente, dependendo das condições do meio (pH, temperatura, álcool, anidrido sulfuroso, condições sanitárias das uvas, ...) e a FML não se dá ou dá-se apenas muito tardiamente.

A fermentação do ácido málico é essencial à estabilização biológica e qualidade dos vinhos tintos, e as exigências crescentes da produção e do consumo obrigam a um domínio efectivo dos processos de finalização e conservação dos vinhos.

Pelo recurso à inoculação dos vinhos com bactérias lácticas isoladas de vinhos e multiplicadas em meios óptimos não tem sido possível controlar o processo de forma eficaz (Peynaud e Domercq, 1959, Kunkee *et al.*, 1964, Lafon-Lafourcade *et al.*, 1968). De facto, o vinho é um meio pouco favorável ao cres-

cimento bacteriano não sendo fácil impor uma população capaz de se multiplicar e fazer a degradação do ácido málico.

Mais recentemente foram desenvolvidas formas de aplicação de biomassas concentradas de bactérias lácticas, sob a forma de preparações congeladas ou liofilizadas.

Contudo a rápida perda de viabilidade destas preparações não permite que também este processo possa ser usado como prática corrente.

Foram entretanto ensaiados processos de as tornar mais eficazes por recurso a uma prévia reactivação das bactérias lácticas (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983, Joyeux e Lonvaud-Funel, 1985) ou recurso a tratamentos adicionais do vinho (Guilloux-Benatier *et al.*, 1985, Lonvaud-Funel *et al.*, 1985). Estas práticas tornam o processo mais oneroso apresentando portanto um interesse relativo.

O recurso a microorganismos imobilizados tem vindo a adquirir interesse crescente sendo já numerosos os ensaios respeitantes a utilização de enzimas fixadas ou leveduras imobilizadas na preparação de vinhos espumantes ou na fermentação da cerveja (Bidan *et al.*, 1978, Kolot, 1980, Loureiro e Novais, 1986).

A aplicação deste processo ao controlo da FML dos vinhos tem também vindo a ser ensaiada.

De acordo com Cuenat e Villettaz, 1984, a imobilização de células inteiras é mais simples que a da enzima maloláctica (EML), conservando as actividades enzimáticas secundárias das bactérias desde que não tenham sido destruídas durante o processo de imobilização.

Segundo aqueles autores este processo apresenta várias vantagens potenciais de ordem tecnológica e económica:

- as bactérias imobilizadas podem ser reutilizadas;
- o vinho tratado contém poucas BL o que diminui o risco de alterações posteriores por ataque de outros substratos presentes no vinho e facilita os processos de acabamento;
- o momento e extensão da FML podem ser devidamente controlados.

O perigo de contaminações e a perda de actividade das biomassas são aspectos a não descurar no processo.

Entretanto, o estudo de suportes de imobilização, preparação dos inóculos, estudo do tipo de reactor e condições de meio e trabalho, têm vindo a ser objecto de vários ensaios (Spettoli *et al.*, 1982, Cuenat e Villettaz, 1984, McCord e Ryu, 1985, Crapisi *et al.*, 1987, Rossi e Clementi, 1984).

Neste trabalho propusemo-nos isolar e seleccionar bactérias lácticas com vista a posterior imobilização, com o objectivo de estabelecer um processo de controlo da FML aplicável à prática enológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento das bactérias lácticas — a partir de vinhos, das regiões do Oeste e do Dão, em que se deu ou está em curso a FML, são isoladas bactérias por riscado em meio de Carr com incubação em anaerobiose. As bactérias isoladas são conservadas em meio de Carr líquido, a 10° C, e repicadas periodicamente.

Identificação das bactérias lácticas — baseámo-nos essencialmente na observação da morfologia e determinação de algumas propriedades fisiológicas — pesquisa de catalase e da oxidação do etanol, forma isomérica do ácido láctico formado a partir da glucose, caracter homo ou heterofermentativo dos açúcares, fermentação das pentoses (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975, Carre, 1982, Joyeux, 1983).

Para a execução de alguns testes recorreremos a galerias API 50 CH e 10E, processo normalizado que facilita grandemente a determinação dos critérios clássicos de identificação — fermentação de vários substratos entre os quais as pentoses e confirmação do carácter homo ou heterofermentativo — degradação da arginina (bacilos heterofermentativos), formação de acetoina a partir do ácido pirúvico (cocos heterofermentativos).

O etanol e os ácidos L(+) e D(-) láctico foram determinados por via enzimática, segundo o protocolo indicado por Boheringer-Manheim.

Seleção das estirpes — de entre as bactérias identificadas foram seleccionadas 1 estirpe de *Lactobacillus plantarum* e 7 estirpes de *Leuconostoc oenos*, tendo como base a sua facilidade de crescimento, e têm vindo a ser estudadas por forma

a avaliar a acção que alguns dos factores do meio exercem sobre elas.

Neste trabalho apresentam-se resultados da acção do pH, do ácido málico e do etanol no crescimento e actividade das estirpes em estudo.

Foram efectuadas culturas em meio de Carr a 3 valores de pH (3.40, 3.75 e 4.00) contendo ou não ácido málico (2 e 5 g/l) e adicionado ou não de etanol (8 e 11 %).

O crescimento foi seguido pela determinação da absorvência a 640 nm e a evolução do ácido málico foi seguida por cromatografia em papel.

A actividade enzimática das bactérias é determinada avaliando a percentagem de ácido málico degradado num dado intervalo de tempo (4 h) por um peso conhecido de biomassa (5 mg de peso seco), recolhida em fase exponencial de crescimento a partir de uma cultura em meio de Carr contendo ou não ácido málico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

I — *Bactérias isoladas e identificadas*

No Quadro I indica-se o total de bactérias isoladas e identificadas até ao momento.

Verificamos que a maior percentagem de bactérias que perderam a viabilidade, se apresentavam sob a forma de cocos, normalmente as bactérias mais sensíveis às condições de meio e exigentes do ponto de vista nutricional.

QUADRO I
Bactérias isoladas e identificadas
Bactéries isolées et identifiées

	BL isoladas		BL que perderam viabilidade		Cocos que perderam viabilidade	
	Oeste	Dão	Oeste	Dão	Oeste	Dão
1987	113	44	76	37	49	34
1988	102	—	42	—	33	—
Total	215	44	118	37	82	34
			(55 %)	(84 %)	(70 %)	(92 %)

Verifica-se também uma diferente distribuição das bactérias nos dois anos de estudo:

Foram as seguintes bactérias identificadas:

Ano de 1987

<i>Lactobacillus brevis</i>	12
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	3
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	5
<i>Leuconostoc oenos</i>	1

Ano de 1988

<i>Lactobacillus brevis</i>	1
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	6
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	2
<i>Leuconostoc oenos</i>	12

Assim, em 1988 a maioria das bactérias identificadas pertencem à espécie *Leuconostoc oenos* (50%) enquanto em 1987 apenas se identificou uma bactéria pertencendo a esta espécie.

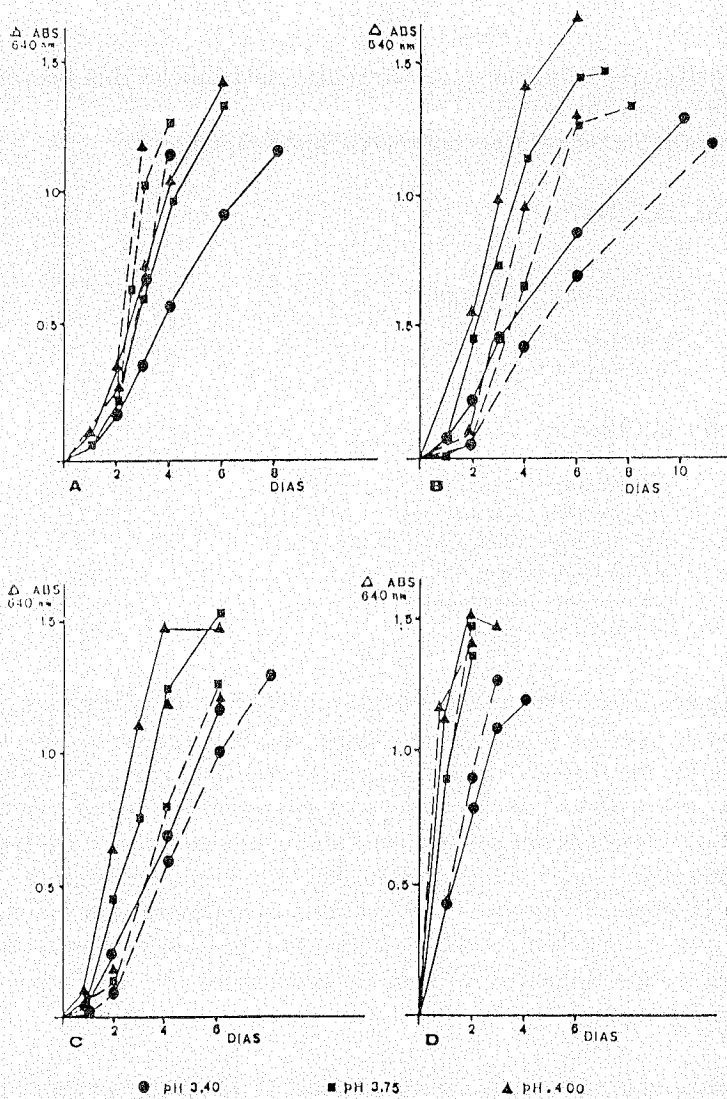
A este facto não deverá ser estranha a elevada mortalidade que se verificou nos cocos e também as condições diferentes de maturação das uvas e composição do vinho resultante, não sendo também de ignorar a diferente proveniência das amostras pelo que a diferente distribuição das estirpes identificadas poderá estar relacionada com as condições de trabalho nas diferentes adegas.

II — *Crescimento em presença de ácido málico — Influência do pH do meio*

O comportamento das várias estirpes em função do pH do meio é variável, sendo diferente de estirpe para estirpe a acção exercida pelo ácido málico.

De um modo geral o pH 3.4 é o mais desfavorável ao crescimento (Fig. 1).

Forma-se mais biomassa a pH 3.75 que a pH 4.0 não sendo salientes diferenças nos meios a estes 2 valores de pH no respeitante ao momento em que se atinge o máximo de formação de biomassa.



A — *Leuconostoc oenos* 5-8/88
 B — *Leuconostoc oenos* 6-4/88
 C — *Leuconostoc oenos* 7-3/88
 D — *Lactobacillus plantarum* 20-9/88

Fig. 1 — Crescimento de bactérias lácticas em função do pH do meio (— M. Carre sem ácido málico; — — M. Carre com 2,5 g/l de ácido málico).

Croissance de bactéries lactiques en fonction du pH du milieu (— M. Carre sans acide malique; — — M. Carre avec 2,5 g/l d'acide malique).

Verifica-se que de um modo geral o meio contendo ácido málico é, neste ensaio, mais adverso ao crescimento sendo nestes meios que a biomassa formada é menos importante.

As estirpes menos afectadas pelo pH do meio são a 5-8/88, 7-3/88, 7-4/88 e 20-9/88 sendo a 6-4/88 a que apresenta mais dificuldades de crescimento especialmente a pH 3.4.

A evolução do ácido málico está de acordo com o crescimento das bactérias sendo variável de estirpe para estirpe (Quadro II). A acção do pH é pouco evidente em algumas estirpes (20-9/88 e 6-4/88) sendo marcada noutras (7-7/88, 5-8/88).

QUADRO II

Evolução do ácido málico
Evolution de l'acide malique

BL	% de ác. málico degradado	Dia de cultura da observação	Varição em função do pH do meio
5-7/88	60	10	3.4 \cong 3.75 < 4.0
5-8/88	50	10	3.4 \cong 3.75
	75	10	4.0
6-4/88	50	8	3.4 \cong 3.75 \cong 4.0
7-3/88	75	6	3.4 < 3.75 \cong 4.0
7-4/88	75	6	3.4 \cong 3.75 < 4.0
7-6/88	75	6	3.4 \cong 3.75 \cong 4.0
7-7/88	75	6	3.4 < 3.75 < 4.0
20-9/88	50	4	3.4 \cong 3.75 \cong 4.0

A variação do pH do meio de cultura determinado quando se atingiu o máximo de biomassa, está expressa na Fig. 2.

Verifica-se que de um modo geral o pH do meio baixa, sendo esse abaixamento mais marcado nos meios que não contém ácido málico. O ácido láctico decorrente da transformação dos açúcares do meio de cultura será o responsável por este abaixamento.

Nos meios contendo ácido málico o pH é regulado pelo ácido láctico formado dos açúcares e pelo ácido do meio o qual ao ser desdobrado originando um ácido fraco está na origem de uma elevação do valor de pH, sendo o balanço destes dois

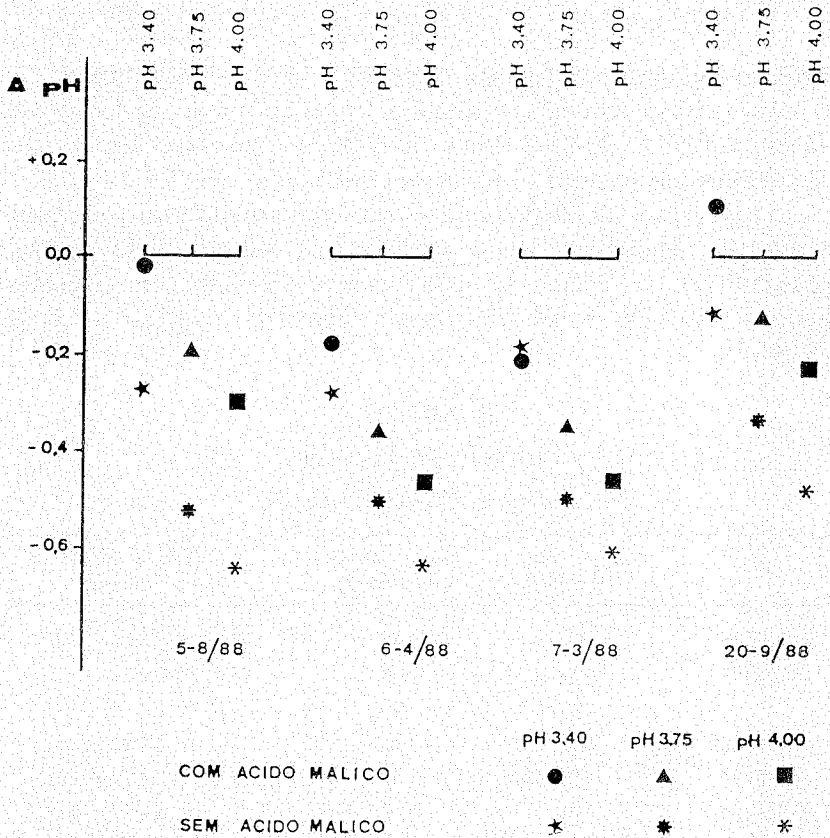


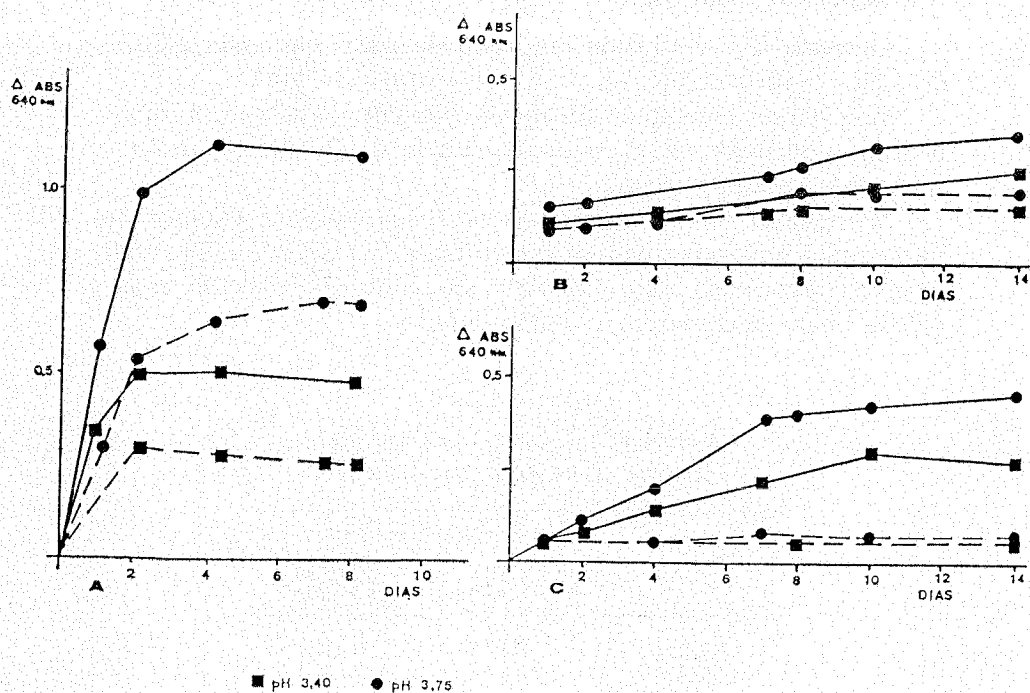
Fig. 2 — Variação do pH do meio pelo metabolismo de bactérias lácticas.
Variation du pH du milieu par le métabolisme de bactéries lactiques.

fenómenos que se traduz nos resultados observados. A estirpe 20-9/88, aquela em que a degradação do ácido málico é mais acentuada é aquela em que o pH desce menos, havendo mesmo um caso em que se verifica uma subida de cerca de 0,2.

III — Acção do etanol

É nítida a inibição exercida pelo etanol particularmente para níveis de pH mais baixos.

A sensibilidade das diferentes estirpes ao etanol é variável (Fig. 3). A estirpe 6-4/88 não apresenta qualquer crescimento



A — *Lactobacillus plantarum* 20-9/88
 B — *Leuconostoc oenos* 7-4/88
 C — *Leuconostoc oenos* 7-7/88

Fig. 3 — Crescimento de bactérias lácticas em função do etanol e do pH do meio (— tit. alc. vol. 8% V/V; - - - tit. alc. vol. 11% V/V).

Croissance de bactéries lactiques en fonction de l'éthanol et du pH du milieu (— tit. alc. vol. 8% V/V; - - - alc. vol. 11% V/V).

a 11° de etanol enquanto a 20-9/88 apresenta ainda um crescimento interessante, particularmente ao pH mais elevado.

A pH 3.40 as estirpes mais afectadas são as 5-7/88, 5-8/88 e 6-4/88. A 8° de etanol e pH 3.40 apresentam crescimento as estirpes 7-3/88, 7-4/88, 7-6/88, 7-7/88 e 20-9/88. A 11° de etanol e também a pH 3.40 crescem apenas as estirpes 7-4/88 e 20-9/88.

Aos valores de pH mais elevados o efeito do etanol é menos marcado.

IV — *Actividade maloláctica*

O ensaio foi conduzido em meio de Carr, contendo 2,6 g/l de ácido málico, a pH 4.5 e à temperatura de 20° C.

As estirpes em estudo foram previamente sujeitas a 4 repiscagens sucessivas em meio de Carr sem ácido málico ou contendo 5 g/l daquele ácido.

No Quadro III apresentamos os resultados encontrados os quais mais uma vez apontam as estirpes 7-3/88 e 7-4/88 como as mais favoráveis, agora também do ponto de vista da capacidade para degradarem o ácido málico.

QUADRO III

Actividade maloláctica das estirpes
Activité maloactique des souches

Estirpe	% de ácido málico degradado	
	Précultura sem ác. málico	Précultura com ác. málico
5-7/88	3.4	4.2
5-8/88	19.7	11.4
6-4/88	0	0
7-3/88	13.6	34.8
7-4/88	17.8	16.7
7-6/88	17.4	7.6
7-7/88	11.4	34.1
20-9/88	21.9	—

A acção do ácido málico varia com a estirpe, parecendo que a enzima será em todos os casos constitutiva.

O estudo do comportamento das BL em presença de SO₂ e ácidos gordos bem como o metabolismo dos açúcares e do ácido cítrico, são os factores a estudar de imediato.

Seguidamente terá que ser avaliada a adaptabilidade das estirpes ao vinho e possível acção na composição organoléptica destes.

CONCLUSÕES

A estabilização biológica de um vinho por recurso a bactérias lácticas immobilizadas supõe a selecção de estirpes bem caracterizadas e adaptadas ao meio.

O conhecimento da acção exercida sobre as bactérias por alguns factores do meio é essencial.

Dos ensaios efectuados verifica-se que o efeito do pH do meio e dos teores em etanol varia com a estirpe. O etanol, associado aos baixos níveis de pH, aparece mesmo como factor limitante de algumas estirpes isoladas.

As estirpes de *Leuconostoc oenos* aparecem mais sensíveis às condições do meio que a estirpe de *Lactobacillus plantarum* em ensaio.

A actividade enzimática das diferentes bactérias isoladas varia igualmente com a estirpe, não sendo claro o efeito do ácido málico na pré-cultura. Parece contudo que a actividade enzimática será em todos os casos constitutiva, restando esclarecer o que se passa com a estirpe 6-4/88 que às 4 h não apresentava degradação do ácido málico mas que em outros ensaios mostrou possuir potencial para a efectuar. Esta estirpe aparece aliás como pouco interessante de acordo com os vários resultados obtidos.

São manifestas as dificuldades de isolamento e cultura de bactérias lácticas, particularmente dos cocos, o que à partida deixa supor a dificuldade de implantação destas culturas num meio como o vinho e incentiva à procura de técnicas que permitam proteger as células das condições ambientais, no caso ao recurso a imobilização.

AGRADECIMENTOS

Agradece-se a colaboração do Serviço de Análises do Departamento de Enologia na realização dos cromatogramas para avaliação da evolução do ácido málico.

RÉSUMÉ

Etude de bacteries lactiques pour la préparations de inocula

Des bactéries lactiques isolées de vins portugais ont été identifiées en faisant appel aux techniques traditionnelles qui déterminent certaines propriétés morphologiques et physiologiques. 7 souches de *Leuconostoc oenos* et 1 souche de *Lactobacillus plantarum* ont été sélectionnées et étudiées vis à vis l'action de l'acide malique, du pH et de l'éthanol du milieu. L'activité malolactique a été évaluée.

SUMMARY

Study of lactic acid bacteria to prepare starter cultures

Lactic acid bacteria isolated from portuguese wines are identified by the traditional techniques considering their morphological and physiological properties. 7 *Leuconostoc oenos* strains and 1 *Lactobacillus plantarum* were selected and the malic acid content, pH and ethanol effect on their growth and malic acid metabolism were studied. Malolactic activity of the strains are evaluated.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bidan, P.; Ch. Divies; P. Dupuy
1978 Procédé perfectionné de préparation de vins mousseux. Cit. Cuenat e Villettaz, 1984.
- Carre, E.
1982 Recherches sur la croissance des bactéries lactiques en vinification. Désacidification biologique des vins. Thèse 3ème cycle. Bordeaux II.
- 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.
- Cuenat, Ph; J.-Cl. Villettaz
1984 Essais de fermentation malolactique de vins par bactéries lactiques immobilisées du genre *Leuconostoc*. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **16**, 3: 145-151.
- Guilloux-Benatier, M.; M. Feullat e B. Ciolfi
1985 Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide malique par les bactéries lactiques isolées du vin: effet stimulant des autolysats de levure. *Vitis*, **24**: 59-74.
- Joyeux, A.
1983 Analyse microbiologique des raisins, des moûts et des vins. Application à l'étude des bactéries acétiques. Thèse d'Université. Université de Bordeaux II.
- Joyeux, A. e A. Lonvaud-Funel
1985 Comparaison de diverses préparations industrielles de bactéries lactiques réactivées pour stimuler la fermentation malolactique. *Conn. Vigne Vin*, **19**: 149-159.
- Kolot, F. B.
1980 New trends in yeast technology immobilized cells. *Proccs. Biochem.*, **15**: 2-8.
- Kunkee, R. E.; C. S. Ough e M. A. Amerine
1964 Induction of malolactic fermentation by inoculation of must and wine with lactic acid bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.*, **15**: 178-183.

- Lafon-Lafourcade, S.; E. Carre; A. Lonvaud-Funel e P. Ribéreau-Gayon
1983 Induction de la fermentation malolactique par inoculation d'une biomasse industrielle congelée de *Leuconostoc oenos* après reactivation. *Conn. Vigne Vin*, **17**: 55-71.
- Lafon-Lafourcade, S.; S. Domercq e E. Peynaud
1968 Étude de l'ensemencement des vins par les bacteries de la fermentation malolactique. *Conn. Vigne Vin*, **10**: 187-203.
- Lonvaud-Funel, A.; C. Desens e A. Joyeux
1985 Stimulation de la fermentation malolactique par addition d'envelopes cellulaires de levure et différents adjuvants de nature polysaccharidique et azotée. *Conn. Vigne Vin*, **19**: 229-240.
- Loureiro, V. e J. M. Novais
1986 Utilização de leveduras imobilizadas na produção de espumantes pelo método champanhês. 3.º Encontro Nacional de Biotecnologia.
- McCord, J. D. e D. D. Y. Ryn
1985 Development of malolactic fermentation process using immobilized whole cells and enzymes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 2: 214-218.
- Peynaud, E. e S. Domercq
1959 Possibilité de provoquer la fermentation malolactique en vinification a l'aide de bactéries cultivées. *C. R. Acad. Agric.*, **45**: 355-358.
- Ribéreau-Gayon, J.; E. Peynaud; P. Ribéreau-Gayon e P. Sudraud
1975 Sciences et Techniques du vin. Tomo 2. Donod éd. Paris.
- Rossi, J. e F. Clementi
1984 L-malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc oenos*. *Am. Enol. Vitic.*, **35**, 2: 100-102.
- Spettoli, P.; A. Botiacin; M. P. Nuti; A. Zamorani
1982 Immobilization of *Leuconostoc oenos* ML—34 in calcium alginate gels and its application to wine technology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **33**, 1: 1-5.

