

**EFEITO DE ALGUNS METABOLITOS
DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA NO CRESCIMENTO
E ACTIVIDADE DE UMA ESTIRPE DE *Leuconostoc oenos*.
PAPEL DO ÁCIDO MÁLICO**

**EFFECT DE QUELQUES METABOLITES DE LA FERMENTATION
ALCOOLIQUE SUR LA CROISSANCE ET L'ACTIVITÉ
D'UNE SOUCHE DE *Leuconostoc oenos*.
RÔLE DE L'ACIDE MALIQUE**

**INÁCIA CAPUCHO¹, M. CRISTINA LEITÃO¹,
M. P. FIRME² e M. VITÓRIA SAN ROMÃO^{1,3}**

¹ Instituto de Tecnologia Química e Biológica. 2780 OEIRAS. Portugal

² Estação Nacional de Tecnologia de Produtos Agrários. 2780 OEIRAS. Portuga

³ Estação Vitivinícola Nacional. Dois Portos, 2575 RUNA. Portugal

RESUMO

Neste trabalho, foi estudado o efeito do etanol e dos ácidos decanóico, e dodecanóico no crescimento e na actividade maloláctica de uma estirpe de *Leuconostoc oenos*. O etanol, nas concentrações normalmente presentes no vinho, inibe o crescimento celular, mas parece não exercer qualquer efeito sobre a actividade da enzima maloláctica. Contudo, os efeitos que exerce sobre a permeabilidade da membrana celular, destruindo a barreira de protecção da célula, conduzem a uma inibição da enzima pelo pH do meio.

Os ácidos gordos exercem efeitos diferentes conforme as concentrações em que estão presentes no meio. Em concentrações baixas, parecem funcionar como factores de crescimento induzindo uma estimulação tanto do crescimento como da actividade enzimática. Concentrações mais elevadas (dependendo da extensão da cadeia carbonada do ácido) tornam-se inibidoras. A forma tóxica é a forma molecular, o que indica que os ácidos entram na célula sob a forma não dissociada.

Por outro lado, é demonstrado o efeito estimulante do ácido málico no metabolismo de *L. oenos* em condições adversas. Em meios carenciados nutricionalmente e de pH baixo, como é o caso do vinho, o ácido málico parece estar na origem de uma produção adicional de energia pelas bactérias.

Palavras chave: Fermentação maloláctica, *Leuconostoc oenos*, ácido málico.

Mots clés: Fermentation malolactique, *Leuconostoc oenos*, acide malique.

INTRODUÇÃO

Tem sido considerado que a fermentação dos açúcares fornece a energia para a formação da biomassa necessária à degradação do ácido málico aquando da fermentação maloláctica dos vinhos (Radler, 1976), enquanto que a degradação do ácido málico conduziria apenas a um aumento de pH do meio tornado-o mais favorável ao crescimento bacteriano (Radler, 1975). Entretanto vários trabalhos vêm sugerindo um papel diferente para a fermentação maloláctica. Assim, Henick-Kling *et al.* (1991) referem uma reduzida taxa de utilização da glucose por *Lactobacillus plantarum* que parece preferir o malato como fonte de energia, especialmente a pH baixo. Salou *et al.* (1991) e Loubiere *et al.* (1992) sugeriram que a fermentação maloláctica por *Leuconostoc oenos* pode desempenhar um papel como fornecedora adicional de energia. Aqueles autores observaram um ganho energético no metabolismo da glucose o que explicaria o efeito estimulante do ácido málico no crescimento.

Em trabalho anterior por nós realizado (Firme *et al.* 1922) é demonstrada de forma clara, a estimulação do crescimento e da degradação dos açúcares por *L. oenos* em presença de ácido málico. Estes fenómenos estão na origem de um apreciável aumento nos rendimentos molares de degradação da glucose.

Neste trabalho fomos estudar o efeito da constituição do meio e das condições de arejamento no metabolismo dos açúcares e o papel desempenhado pelo ácido málico nessas condições, no sentido de tentar compreender as observações anteriores e verificar o que se passa em condições próximas das do vinho, portanto a pH baixo e em condições de carências nutricionais.

Por outro lado, tem sido demonstrada a existência de antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas, tanto em mostos e vinhos como em meios sintéticos (Lonvaud-Funel e Desens, 1988). A inibição das bactérias lácticas pela acção das leveduras é considerada como o resultado do esgotamento de nutrientes ou produção de compostos inibidores por estes microrganismos. Os ácidos gordos de cadeia média, são tóxicos tanto para as leveduras como para as bactérias lácticas. São sobretudo ácidos carboxílicos de cadeia média (C₈ a C₁₂) e respectivos ésteres etílicos, aldeídos e cetonas. São responsáveis pela diminuição tanto da taxa de crescimento como da velocidade de degradação

do ácido málico. O seu efeito depende da presença de compostos macromoleculares no meio, tal como «yeast goasts» que parecem adsorver os ácidos gordos (Edwards e Beelman, 1987).

Um dos objectivos deste estudo é clarificar o efeito do etanol e dos ácidos decanóico e dodecanóico, os ácidos gordos mais frequentemente encontrados no vinho, na taxa de crescimento e na actividade maloláctica de suspensões celulares de uma estirpe de *Leuconostoc oenos* isolada de vinhos portugueses.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo do efeito do ácido málico

Bactérias e condições de cultura — Foi usada uma estirpe comercial de *Leuconostoc oenos*, GM (Microlife Technis, Sarasota, Florida) que foi cultivada em meio de Carr modificado contendo em g l⁻¹ de água destilada: extracto de levedura, 4; casaminoacids, 5; KH₂PO₄, 0.6; KCl, 0.45; CaCl₂, 0.13; MnSO₄, 0.003 e MgSO₄, 0.131. Numa das experiências para eliminar a interferência do extracto de levedura, este foi substituído por «yeast nitrogen base». Nos casos em que se pretendia estudar o metabolismo do ácido málico foram adicionados 5 g l⁻¹ de ácido málico. O pH do meio foi ajustado a 3.5 ou 4.8. O meio foi distribuído por balões de Erlenmeyer de 250 ml, contendo 150 ml de meio, ou garrafas de 500 ml, contendo 450 ml de meio. Após esterilização durante 15 minutos a 121° C, o meio foi adicionado de 2 g l⁻¹ de glucose, frutose ou arabinose, a partir de soluções previamente esterilizadas. As concentrações de açúcar foram escolhidas de acordo com os teores normais do vinho. As condições de aerobiose foram conseguidas pela agitação constante dos balões contendo esferas de vidro e fechados com rolhas de algodão cardado. As atmosferas de N₂ foram conseguidas fazendo borbulhar o gás, durante um espaço de tempo previamente determinado para atingir a saturação. As experiências foram efectuadas a 25° C.

Preparação do inóculo e controlo do crescimento — O inóculo foi preparado por multiplicação no meio referido acima a 25° C, por 2 dias, de uma cultura stock mantida a -20° C. As células

foram centrifugadas a 2000 g por 10 min, lavadas e resuspen-
didas num pequeno volume de meio de cultura. A concentração
do inóculo foi de 0.08, 0.10 ou 0.15 mg ml⁻¹ em peso seco, depen-
dendo das experiências.

O controlo do crescimento foi efectuado por leituras regu-
lares da absorvância a 600 nm sendo usada uma curva de cali-
bração de peso seco de células versus absorvância.

Métodos analíticos — As concentrações de glucose, frutose,
ácidos L-málico, D- e L-láctico e acético foram determinadas
enzimaticamente (Bergmeyer, 1971) usando análise em fluxo
contínuo segmentado (Skalar Analytical B. V., Breda, Holanda).
As concentrações iniciais e finais foram sempre comparadas.
O glicerol foi determinado enzimaticamente usando o «Test
Combination Kit» de Boeheringer Mannheim. O etanol foi deter-
minado por cromatografia de gas em «head space» usando um
detector de ionização de chama e uma coluna de vidro Perma-
bond (FFAP-DF 0.25, de 25 m de comprimento × 0.32 mm i. d.).

Estudo do efeito do etanol e ácidos gordos

Os ensaios de crescimento foram realizados a 30° C, a
pH 4.5 em meio FT80 modificado (Cavin *et al.* 1988). O cres-
cimento foi seguido pela avaliação da transmitância a 600 nm
num espectrofotómetro de visível. Foi utilizada uma estirpe de
L. oenos CTQB M3 isolada de vinhos portugueses.

As suspensões celulares, em tampão fosfato pH 6, 0.2 M,
foram obtidas a partir de culturas crescidas em CSTR (reactor
continuamente agitado), estabilizado perto do final da fase
exponencial de crescimento ($D = 0.11 \text{ h}^{-1}$).

A actividade maloláctica foi determinada por medição mano-
métrica do CO₂ libertado pela descarboxilação do ácido L-málico
num aparelho de Warburg (Umbreit *et al.*, 1964). A mistura
de reacção é composta por uma solução fosfato a pH 3 e ácido
L-málico 50 mM.

Em ambos os casos os ácidos gordos foram dissolvidos em
etanol a 99% e diluídos de modo a que a concentração final
em etanol fosse de 4%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 — Efeito do etanol e dos ácidos gordos no crescimento e actividade maloláctica

O etanol parece não afectar significativamente a actividade maloláctica de suspensões celulares para concentrações inferiores a 12% a pH 3. Concentrações superiores inibem progressivamente essa actividade até que esta se anula a 18% de etanol. Outro ensaio revelou que o efeito do etanol, nas mesmas concentrações, é negligenciável a pH 5 (Fig. 1).

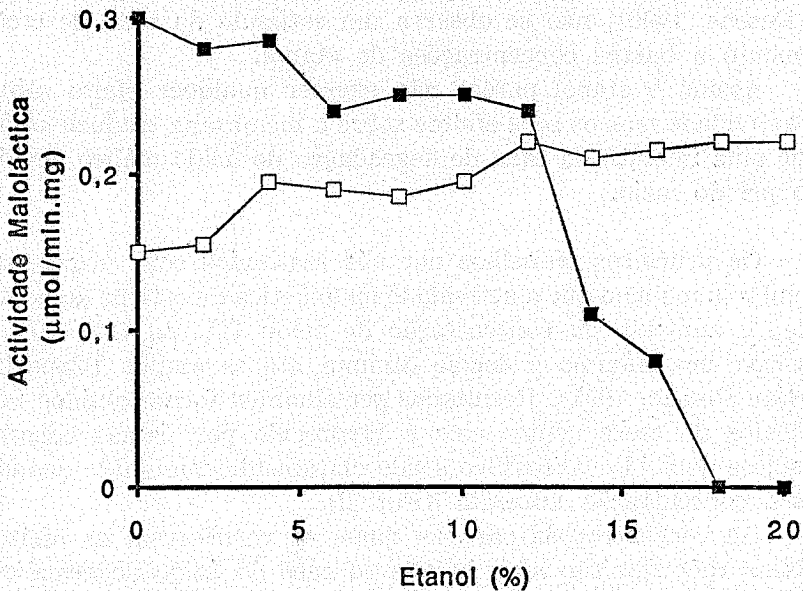


Fig. 1 — Efeito do etanol na actividade maloláctica de suspensões celulares de *Leuconostoc oenos*.

Effect de l'éthanol sur l'activité malolactique de suspensions cellulaires de Leuconostoc oenos.

—■— pH 3 —□— pH 5

A pH 3 (o pH óptimo de actividade para células inteiras) o etanol parece não afectar significativamente a actividade maloláctica de suspensões celulares. O etanol estará na origem de uma permeabilização progressiva da membrana citoplasmática

da célula a qual facilitará o transporte do ácido málico, o que se traduz pelo aumento da actividade observado. Para concentrações mais elevadas parece verificar-se uma desagregação da membrana e a enzima é inibida pelo pH do meio. A pH 5 (o pH óptimo da enzima), não se verifica este efeito de pH e a actividade maloláctica não parece afectada pelo etanol.

Verificou-se por outro lado, que a taxa de crescimento é fortemente dependente da concentração de etanol no meio: embora o efeito de 2% de etanol seja desprezável, com etanol a 4% a inibição do crescimento é já mensurável (Capucho e San Romão, 1993). Resultados posteriores confirmam que, contrariamente ao encontrado por outros autores (Lonvaud-Funel e Desens, 1990), não se observa um estímulo da taxa de crescimento a baixas concentrações de etanol.

Assim, o etanol parece não exercer qualquer efeito sobre a actividade mas os seus efeitos sobre a membrana traduzir-se-ão por uma inibição da taxa de degradação do ácido málico devida ao pH do meio.

Os primeiros trabalhos por nós realizados com suspensões celulares indicam que a actividade maloláctica da estirpe aumenta com o aumento da concentração de ácido (C_{10} ou C_{12}) até se atingir um máximo e depois diminui até se anular (Capucho e San Romão, 1991). Resultados semelhantes foram obtidos nos ensaios de crescimento: este é favorecido por baixas concentrações de ácido carboxílico sendo claramente diminuído quando essa concentração aumenta (Fig. 2).

As concentrações para as quais se verificaram os efeitos acima referidos são mais baixas no caso do ácido dodecanóico, o que está directamente relacionado com a toxicidade relativa dos dois ácidos a qual aumenta com o tamanho da respectiva cadeia alifática (Freese *et al.* 1973).

A estimulação observada inicialmente pode ser atribuída a alterações da permeabilidade da membrana, devido à inserção dos ácidos gordos, com um conseqüente aumento do transporte do ácido málico para o interior da célula.

Trabalho posterior (Capucho *et al.* 1992) sobre o efeito destes ácidos permitiu propor um mecanismo explicativo dos efeitos descritos acima. Foi observada uma clara dependência do efeito do ácido decanóico na actividade maloláctica do pH

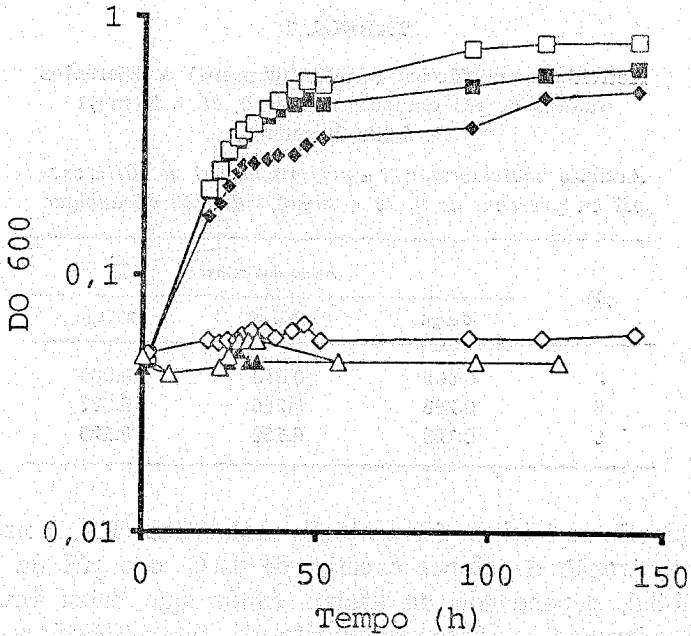


Fig. 2 — Efeito do ácido dodecanóico no crescimento de *Leuconostoc oenos*.

Effect of l'acide dodecanoique sur la croissance de Leuconostoc oenos.

—■— 0 mg/l —□— 1 mg/l —◇— 1.5 mg/l
—◇— 2 mg/l —▲— 5 mg/l —△— 10 mg/l

do meio. Quando o pH decresce o efeito do ácido aumenta (Tabela 1). Estes resultados indicam que a forma activa do ácido é a espécie molecular. Assim, os ácidos gordos entram na célula devido à sua solubilidade nos fosfolípidos da membrana, como moléculas não dissociadas, que se desprotonam no interior acidificando o citoplasma da célula, com a consequente diminuição do pH intracelular. Esta alteração de pH poderá afectar a actividade da enzima maloláctica. As experiências realizadas com extractos brutos mostram que os ácidos gordos não alteram a actividade enzimática, o que está de acordo com a hipótese anterior (resultados não apresentados). A determinação do pH interno da célula bacteriana na presença dos ácidos gordos, poderá permitir a confirmação do mecanismo proposto.

TABELA 1

Actividade maloláctica ($\mu\text{mol}/\text{min.mgps}$) a diferentes valores de pH em presença de 0, 10 e 20 mg/l de ácido decanóico

Activité malolactique ($\mu\text{mol}/\text{min.mgps}$) a différents pH en présence de 0, 10 e 20 mg/l d'acide décanoïque

pH	Ácido decanóico		
	0 mg/l	10 mg/l	20 mg/l
3	0.402	0.533	0.060
5	0.298	0.286	0.397
6	0.128	0.130	0.123

Quando se inicia a fermentação maloláctica (FML) no vinho a concentração de etanol é cerca de 12% e o pH da ordem de 3.4-3.5, dependendo do vinho. Ainda que estas condições sejam adversas ao desenvolvimento da flora microbiana, nas nossas condições, a degradação do ácido L-málico não é significativamente afectada. Assim a utilização de inóculos comerciais com elevada concentração celular e suficiente actividade deverá permitir o desencadear da FML.

II — O papel do ácido málico — Energética da FML

O extracto de levedura, a frutose e as condições de anaerobiose favorecem o crescimento celular, o que confirma resultados anteriores (Firme *et al.* 1992). A taxa de degradação do ácido málico não foi neste caso influenciada pela atmosfera, parecendo assim que em condições favoráveis de crescimento, os açúcares são consumidos e a velocidade de degradação do ácido málico é dependente da biomassa formada (Fig. 3a). Com «yeast nitrogen base», e a pH 3.5, apenas se verificou um ligeiro crescimento e o ácido málico foi mais intensamente consumido em anaerobiose (Fig. 3b). Os produtos formados no metabolismo dos açúcares estiveram de acordo com os esperados numa heterofermentação (Tabela 2).

Para explicar os fenómenos de estimulação observados, foram calculadas as taxas de energia produzida. Assim, tendo

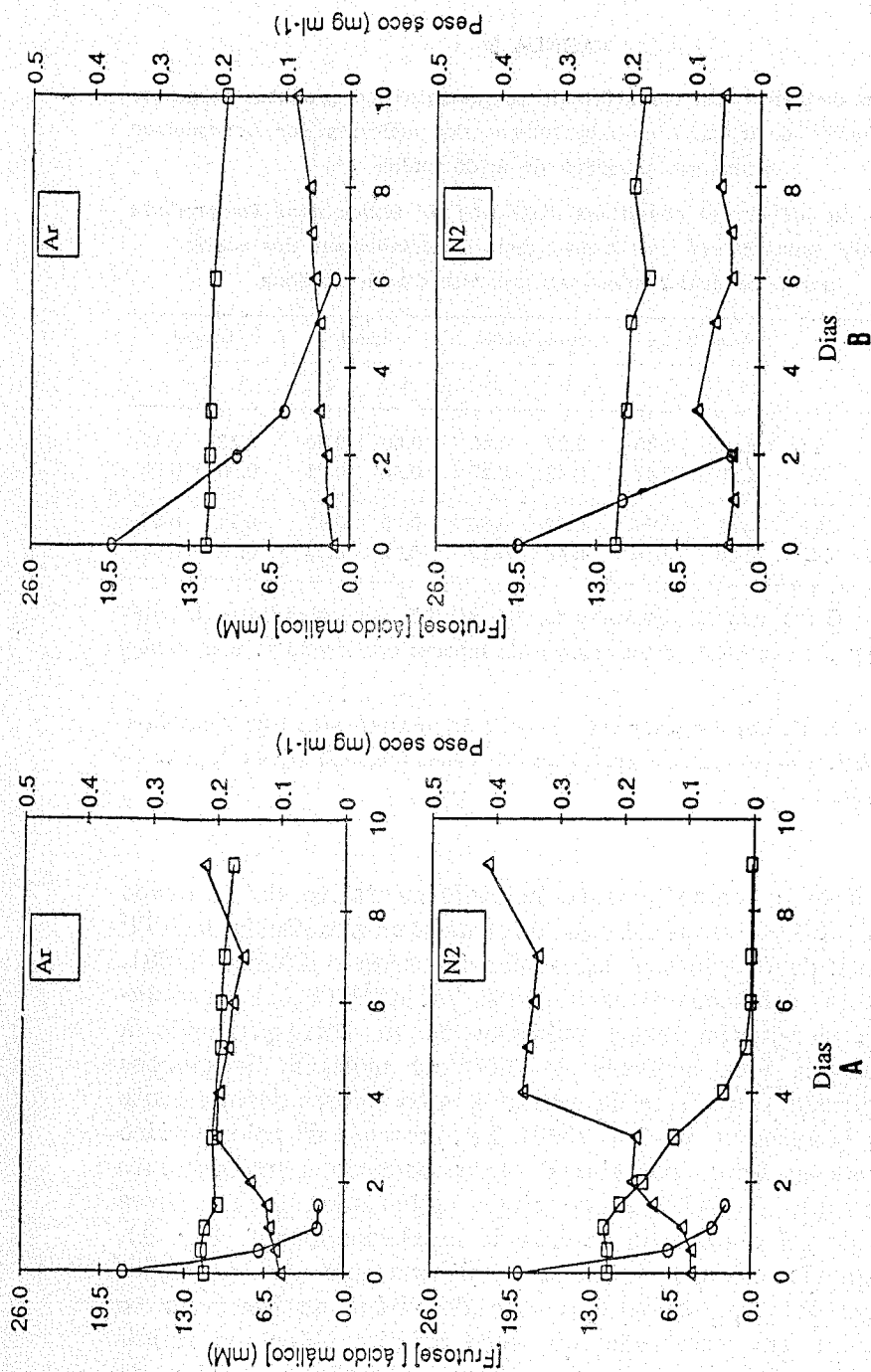


Fig. 3—Efeito das condições de meio na velocidade de degradação do ácido málico. A—meio contendo «yeast nitrogen base». B—meio contendo extracto de levedura. pH do meio—3.5. Concentração de inóculo—0.10 mg ml⁻¹ de peso seco. Effect des conditions de milieu sur la vitesse de dégradation de l'acide malique. A—milieu contenant du «yeast nitrogen base». B—milieu contenant de l'extract de levure. pH du milieu—3.5. Concentration de l'inoculum—0.10 mg ml⁻¹ de poids sec.

Peso seco. Pois sec \blacktriangle ; Consumo de açúcar. Dégradation du sucre \square ; Consumo de ácido málico. Dégradation de l'acide malique \circ .

TABELA 2

Influência do pH e das condições de arejamento nos produtos formados (mmol.mmol⁻¹ de açúcar) no metabolismo dos açúcares por *Leuconostoc oenos*, em presença de ácido málico (*)

*Influence du pH et des conditions d'aération du milieu dans les produits formés (mmol.mmol⁻¹ de sucre) dans le métabolisme des sucres par *Leuconostoc oenos*, en présence d'acide malique*

		Ácido láctico		Ácido acético		Etanol		Glicerol	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Glucose	Ar	n. d.	0.85	0.92	0.42	0.50	0.30	0.13	0.10
	N ₂	1.15	0.87	0.69	0.27	0.36	0.71	0.05	0.02
Frutose	Ar	n. d.	0.74	0.52	0.80	0.29	0.12	0.11	0.07
	N ₂	0.68	0.45	0.46	0.73	0.12	0.12	0.02	0.08

(*) O CO₂ não foi determinado. 1 — pH 3.5; concentração de inóculo 0.1 mg ml⁻¹. 2 — pH 4.8; concentração de inóculo 0.15 mg ml⁻¹. n. d. — não detectado.

Le CO₂ n'a pas été déterminé. 1 — pH 3.5; concentration de Vinoculum 0.1 mg ml⁻¹. 2 — pH 4.8; concentration de Vinoculum 0.15 mg ml⁻¹. n. d. — non détecté.

em atenção o comportamento heterofermentativo de *L. oenos* (Gavie, 1986) foi assumido que é formada uma molécula de ATP por molécula de glucose degradada (Mostafa e Collins, 1968). Nas nossas condições os rendimentos em ATP (Y_{ATP}) no metabolismo da glucose foram próximos de 10, correspondendo à formação de uma molécula de ATP por molécula de glucose metabolizada, o que está de acordo com os valores normalmente aceites (Bauchop e Elsdén, 1960). Em presença de ácido málico esses valores foram superiores, correspondendo a um aumento na formação de ATP, sendo ainda estimulados para valores baixos de pH e em meio carenciado nutricionalmente (Fig. 4).

Segundo estes resultados, admitimos que em condições adversas de meio, como é o caso do vinho, as bactérias se adaptam a um mecanismo que lhes permite obter um rendimento em ATP por mole de açúcar metabolizado, maior do

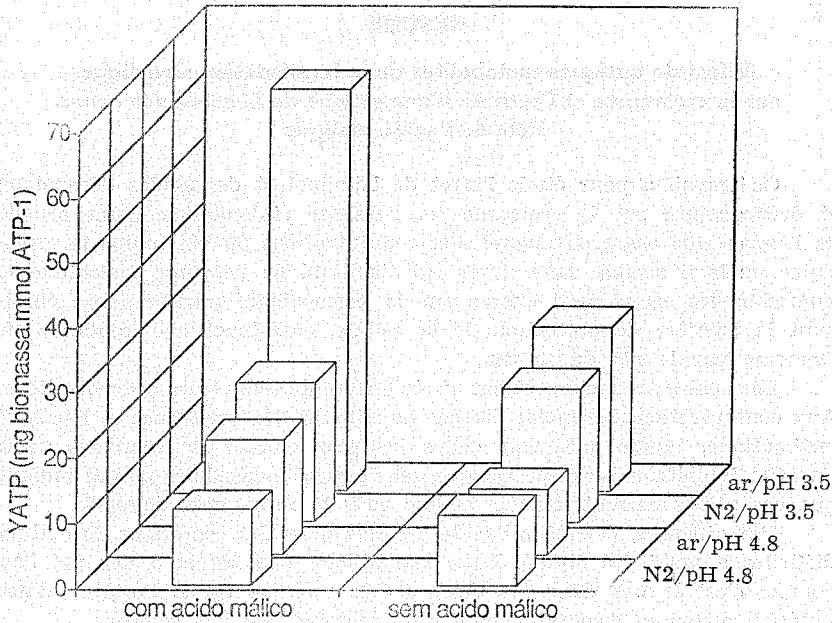


Fig. 4 — Efeito do ácido málico e das condições de pH e arejamento do meio na produção de ATP por *Leuconostoc oenos*.

Effect of l'acide malique et des conditions de pH et aeration du milieu sur la production d'ATP par Leuconostoc oenos.

que aquele que é obtido em condições favoráveis de crescimento. A frutose e o oxigênio, actuando como aceitadores adicionais de electrões, permitem um maior ganho energético. Em anaerobiose, contudo, será o ácido málico que estará na origem do aumento de energia observado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Sr. Prof. L. Vilas Boas pelo apoio nas determinações por HPLC e à S.^{ra} Doutora Teresa Barreto Crespo pelo seu apoio nas fermentações em CSTR.

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica e pelo Programa Biotechnology (BRIDGE), contrato BIOT-CT91-0263, da Comunidade Europeia.

RÉSUMÉ

Effect de quelques metabolites de la fermentation alcoolique sur la croissance et l'activité d'une souche de *Leuconostoc oenos*. Rôle de l'acide malique

Ce travail a pour étude l'effet de l'éthanol et des acides décanoïque et dodécanoïque sur la croissance et l'activité malolactique d'une souche de *Leuconostoc oenos*. L'éthanol aux concentrations du vin inhibe la croissance, mais il semble sans effets sur l'activité de l'enzyme malolactique. Toutefois, les effets qu'il exerce sur la perméabilité membranaire, éliminant la barrière de protection de la cellule, entraînent une inhibition de l'enzyme par le pH du milieu.

Les acides gras exercent des effets différents selon leurs concentrations. Aux concentrations les moins élevées ils stimulent la croissance et l'activité enzymatique, tandis que pour celles les plus élevées ils semblent avoir un effet inhibiteur. L'espèce toxique est l'espèce moléculaire ce qui indique que ces acides entrent dans la cellule sous la forme non dissociée.

Par ailleurs, l'effet de l'acide malique dans des conditions de culture difficiles a aussi été étudié. Dans les milieux pauvres et à des pH bas, comme c'est le cas dans les vins, l'acide malique est à l'origine d'une production accrue d'énergie pendant le métabolisme des sucres.

SUMMARY

Effect of some metabolites of alcoholic fermentation on growth and activity of *Leuconostoc oenos*. The malic acid role

The purpose of this work is to study the effect of both ethanol and decanoic and dodecanoic acids on the growth and on the malolactic activity of a *Leuconostoc oenos* strain isolated from red wine of Portugal. Our results point out that ethanol in concentrations near of those present in wine, has a non significant effect on malolactic activity. However, its effects on the membrane permeability leads to a decrease of the efficiency of the cell protection, and an inhibition of the enzyme activity by the low pH of the wines is observed.

The fatty acids effect depends on its concentration; at low concentration they seem to act as growth factors stimulating also malolactic activity; at higher concentrations they exert an inhibitory effect. The undissociated molecule is the active form suggesting that fatty acids enter the cell as undissociated molecules.

Furthermore the malic acid influence on the growth and metabolism of *L. oenos* was also studied. Malic acid clearly stimulates bacterial growth, allowing an increase in the yields of ATP production. Results suggest that under adverse conditions cells are not able to grow and malic acid degradation supplies additional energy production during sugars metabolism.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bergmeyer, U., 1971. Methods of enzymatic analysis. Ed. Verlag Chemie. Wheinheim. Academic Press. New York.
- Bauchop, T.; Elsdén, S. R., 1960. The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.*, **23**: 457-469.
- Capucho, I.; San Romão, M. V., 1991. Fatty acids influence on malolactic activity. IV Congresso Luso-Espanhol de Bioquímica. Póvoa do Varzim.
- 1993. Efeito dos ácidos decanoico e dodecanoico no crescimento e actividade maloláctica de uma estirpe de *Leuconostoc oenos*. Simpósio Nacional de Microbiologia Aplicada. 1.^{as} Jornadas de Biologia de leveduras Prof. Nicolau van Uden. Luso. Portugal.
- Capucho, I.; Sobreiro, A.; Barreto-Crespo, M. T.; San Romão, M. V., 1992. Fatty acids effect on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. IV Congresso Nacional y Hispano-Luso de Biotecnología. Santiago de Compostela.
- Cavin, J. F.; Schmitt, P.; Arias, A.; Lin, J.; Davies, C., 1988. Plasmid profiles in *Leuconostoc* species. *Microbiol. Alim. Nutr.* **6**: 55-62.
- Edwards, C. G.; Beelman, R. B., 1987. Inhibition of the malolactic bacterium, *Leuconostoc oenos* (PSU-1), by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition by yeast ghosts. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**(3): 239-242.
- Firme, M. P.; Leitão, M. C.; San Romão, M. V., 1992. Efeito do ácido málico e das condições de anareobiose no metabolismo dos açúcares por *Leuconostoc oenos*. IV Congresso Nacional e I Congresso Hispano-Luso de Biotecnología. Universidade de Santiago de Compostela.
- Freese, E.; Sheu, C.; Galliers, E., 1973. Functional of lipophilic acids as antimicrobials food additives. *Nature (London)* **241**: 321-325.
- Garvie, E. I., 1986. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. II. Ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Henick-Kling, T.; Cox, D. J.; Ilsen, E. B., 1991. Production de l'énergie durant la fermentation malolactique. *R. F. Oen.*, **132**: 63-66.
- Lonvaud-Funel, A.; Desens, C., 1988. Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **44**: 183-191.
- Lonvaud-Funel, A.; Desens, C., 1990. Constitution en acides gras des membranes des bactéries lactiques du vin. Incidences des conditions de culture. *Sci Aliments* **10**(4): 817-829.
- Loubiere, P.; Salou, P.; Leroy, M. J.; Lindleyand, N. D.; Pareilleux, A., 1992. Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *J. Bacteriol.*, **174**, 16: 5302-5308.
- Moustafa, H. H.; Collins, E. B., 1968. Molar growth yields of certain lactic acid bacteria as influenced by autolysis. *J. Bacteriol.*, **96**, 1: 117-125.
- Radler, F., 1975. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria in beverages and food. J. G. Carr, C. V. Cutting & G. C. Witting eds., p. 17-27. Academic Press London.

Salou, P.; Leroy, M. J.; Goma, G.; Pareilleux, A., 1991. Influence of pH and malate-glucose ratio on the growth kinetics of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**: 87-91.

Umbreit, W. W.; Burris, R. H.; Stauffer, J. F., 1964. In: *Manometric Technics*. Ed. Burgess Publishing Company. USA.