

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

REVIEW: WINE LACTIC ACID BACTERIA - Part I

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

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

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

(Manuscrito recebido em 28.11.08. Aceite para publicação em 03.12.08)

RESUMO

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

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

SUMMARY

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

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

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

1.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO (BAL)

O termo “bactérias do ácido láctico” (BAL) descreve um grupo de microrganismos procariotas capazes de produzir ácido láctico como produto final da fermentação de hidratos de carbono. Foi Hueppe, em 1884, que introduziu o termo “Milchsauerbacillus” para descrever, em parte, a flora microbiana responsável pela acidificação do leite e produtos lácteos (Stamer, 1979). Mais tarde, em 1919, Orla-Jensen definiu com razoável precisão este grupo de bactérias, usando as suas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas como critérios para estabelecer a sua diferenciação taxonómica (Stamer, 1979; Kandler, 1983; Axelsson, 1993).

A formação de ácido láctico como produto final do metabolismo dos açúcares é uma característica partilhada com outros grupos de microrganismos, distinguindo-se as “verdadeiras” BAL por apresentarem um teor molar de guanina e citosina

inferior a 50% no seu DNA (Holzapfel e Wood, 1995; Holzapfel *et al.*, 2001).

As bactérias incluídas neste grupo são bacilos ou cocos gram positivos não móveis (ou raramente móveis) e que não formam endósporos. São microrganismos quimioorganotróficos com metabolismo estritamente fermentativo (Stamer, 1979; Kandler, 1983; Holzapfel e Wood, 1995). A característica chave deste grupo é a incapacidade de sintetizar grupos porfirínicos (*e.g.* heme), o que explica o facto de nas condições de cultura utilizadas em laboratório as BAL serem desprovidas de citocromos e a ausência de “verdadeira” catalase. Contudo, podem ocorrer excepções a esta descrição geral, já que algumas estirpes de BAL produzem peroxidases ou uma “pseudocatalase” (Axelsson, 1993; Holzapfel e Wood, 1995). Em meios contendo hematina ou compostos similares, algumas estirpes podem produzir catalase ou mesmo citocromos, e em alguns casos constituir uma cadeia de transporte electrónico funcional (Axelsson, 1993).

Apesar de serem aerotolerantes, são um grupo de bactérias característico de habitats não aeróbios, muito exigentes do ponto de vista nutritivo e que suportam valores de pH muito baixos, sendo a tolerância à acidez uma característica variável entre estirpes. As BAL estão presentes em ambientes muito diversos (*e.g.* alimentos e bebidas fermentados, plantas, frutos, solo, águas residuais) e também fazem parte da microbiota dos tractos respiratório, intestinal e genital do homem e de animais (Holzapfel e Wood, 1995; Chambel, 2001).

Numa perspectiva biotecnológica, as BAL têm um potencial de aplicação diversificado, desde o controlo do processo fermentativo na produção de alimentos fermentados até à sua utilização como probióticos na saúde humana e animal (Chambel, 2001). No vinho, este grupo de microrganismos é responsável por um processo fermentativo secundário e está envolvido na libertação de compostos aromáticos. Ocasionalmente, a produção de metabolitos indesejáveis por parte destes microrganismos pode provocar alterações das propriedades organolépticas e das características toxicológicas/higiénicas do produto final (Lonvaud-Funel, 1999).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS BAL

A primeira classificação das BAL foi efectuada por Orla-Jensen em 1919. Este investigador classificou as BAL nos géneros *Betabacterium*,

Thermobacterium, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus* e *Microbacterium*. As alterações consideráveis ocorridas na taxonomia das BAL, com a criação de novos géneros, espécies e sua reclassificação e reorganização, conduziram a que destes géneros apenas persista actualmente *Streptococcus*, embora não incluindo as espécies transferidas para os novos géneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus*.

A abordagem tradicional na classificação das BAL em diferentes géneros baseava-se fundamentalmente em caracteres fenotípicos, nomeadamente: (i) morfológicos, das células (forma, endósporos, flagelos, reacção de Gram) e das colónias (cor, dimensões, forma); (ii) bioquímicos (modo de fermentação da glucose, configuração do ácido láctico produzido); e (iii) fisiológicos (crescimento a diferentes temperaturas, capacidade de crescer em elevadas concentrações de sal, e tolerância a pH ácido e alcalino) (Curck *et al.*, 1994; Dellaglio *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1996; Axelsson, 2004).

Ainda que estas características continuem a ser usadas como diferenciais a nível de alguns géneros de BAL, tal como se exemplifica no Quadro I, outros métodos fenotípicos foram introduzidos na classificação das BAL tais como os perfis metabólicos e enzimáticos, a tipagem fágica e bacteriocínica e a serotipagem.

Com o desenvolvimento dos métodos quimiotaxonómicos surgiu também a análise de perfis

QUADRO I

Características diferenciais de alguns géneros de BAL (adaptado de Axelsson, 1993)
Differential characteristics for some LAB genera (adapted from Axelsson, 1993)

Características ^a	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Weissella</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
Morfologia celular ^b	B	B	B, C	C	C	C	C	C	C	C
Formação de tétradas	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
CO ₂ a partir da glucose ^c	-	±	+	-	-	-	+	-	-	-
Crescimento a 10°C	+	±	+	+	+	+	+	±	-	+
Crescimento a 45°C	-	±	-	-	+	-	-	±	±	-
Cresc. em 6,5% de NaCl	ND ^d	±	±	+	+	-	±	±	-	+
Cresc. em 18,0% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Crescimento em pH 4,4	ND	±	±	-	+	±	±	+	-	-
Crescimento em pH 9,6	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Ácido láctico ^e	L	D, L, DL	D, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L

a. +, positivo; -, negativo; ±, resposta varia entre espécies; ND, não determinado.

b. B, bacilos; C, cocos.

c. Teste para tipo fermentação da glucose: negativo e positivo representam homofermentativo e heterofermentativo, respectivamente.

d. Não foi observado crescimento em 8% de NaCl.

e. Configuração do ácido láctico produzido a partir da glucose.

de ácidos gordos ou de perfis de proteínas celulares totais, a análise de constituintes da parede celular (tipos de peptidoglicano e ácidos teicóicos), ou a análise do espectro infravermelho de pirólise pela transformada de Fourier (Curck *et al.*, 1994; Dellaglio *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1996).

A aplicação de técnicas moleculares na classificação e identificação das BAL permitiu substituir e/ou complementar as metodologias clássicas baseadas no fenótipo. Dos métodos moleculares destacam-se, entre outros, a sequenciação do rDNA 16S e outros genes, a determinação do teor molar de guanina e citosina, as hibridações DNA-DNA e DNA-RNA, a análise de polimorfismos de dimensão de fragmentos de restrição (RFLP), a macrorestrição (PFGE) e diversas técnicas baseadas em PCR (RAPD, ARDRA, AFLP). Os métodos fenotípicos e genotípicos usados na identificação, diferenciação e tipificação das BAL, em particular das BAL isoladas de vinhos, serão abordados com mais pormenor no ponto 1.7.

Trabalhos exaustivos e extensos de determinação de sequências de RNA e DNA ribossómico, particularmente do rRNA 16S, têm permitido estabelecer as relações filogenéticas que servem de base à taxonomia actual das BAL. Por apresentarem um teor molar de G+C inferior a 50%, as BAL típicas pertencem ao ramo “Clostridium” das bactérias gram positivas (Figura 1), enquanto que o ramo “Actinomycetes” cujo teor em (G+C)% é superior a 50% inclui espécies do género *Bifidobacterium* e outros géneros também importantes nas indústrias dos

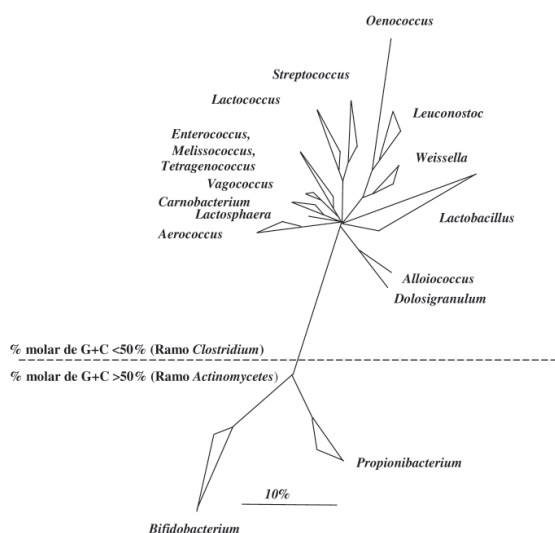


Fig. 1 - Árvore consenso, baseada na análise comparativa de sequências de rRNA 16S, mostrando os principais grupos filogenéticos das bactérias do ácido láctico (BAL) com baixo teor molar de G+C e os géneros gram positivos não directamente relacionados *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* (adaptado de Stiles e Holzapfel 1997).

Consensus tree, based on comparative analysis of rRNA 16S sequences, showing the major phylogenetic groups of lactic acid bacteria (LAB) with low G+C content and non related gram-positive genera *Bifidobacterium* and *Propionibacterium* (adapted from Stiles and Holzapfel 1997).

alimentos e das bebidas (Coenye e Vandamme, 2003).

De uma maneira geral, a maioria dos géneros das BAL forma grupos filogeneticamente distintos mas, para alguns, em particular *Lactobacillus* e *Pediococcus*, os ‘clusters’ filogenéticos não se correlacionam com as classificações baseadas em caracteres fenotípicos (Axelsson, 2004). No caso do género *Lactobacillus* e numa tentativa de conciliar os dados de caracterização fenotípica com os dados filogenéticos obtidos da sequenciação do rRNA, Hammes e Vogel (1995) propuseram a seguinte classificação: homofermentativos obrigatórios (grupo A), heterofermentativos facultativos (grupo B) e heterofermentativos obrigatórios (grupo C). Dentro de cada grupo fermentativo as espécies são organizadas de acordo com as suas relações filogenéticas pelos seguintes grupos: a (grupo *Lb. delbrueckii*), b (grupo *Lb. casei-Pediococcus*) e c (grupo *Leuconostoc*), existindo as seguintes combinações Aa, Ab, Ba, Bb, Cb e Cc.

Para além destas discrepâncias filo-fenéticas, a maior dificuldade que surge ao sumarizar os grupos taxonómicos de BAL actualmente reconhecidos prende-se com a própria definição deste grupo funcional de bactérias.

De facto, consoante as BAL são encaradas como um grupo de bactérias gram positivas que produzem ácido láctico como único, principal ou importante produto da fermentação de açúcares como mecanismo de produção de energia (*BAL sensu lato*), ou como um sub-grupo destas que, para além de serem anaeróbias, micro-aerófilicas ou aero-tolerantes, possuem um teor molar de G+C<50%, não produzem catalase e não formam endósporos (*BAL sensu strictu*), assim varia o número de géneros considerados e a correspondente diversidade filogenética.

Na Figura 2 apresenta-se a organização taxonómica deste grupo funcional de bactérias, no seu conceito mais amplo, e recorrendo à informação disponível no TOBA (“Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea”, versão 7.7, 06.Março.2007, Garrity *et al.*, 2007) e na LPNSN (“List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature”, Euzéby, 2007), para a compilação dos géneros actualmente reconhecidos (em termos de publicação válida) e do número de espécies incluídas.

Neste conceito de *BAL sensu lato* incluíram-se, além das *BAL sensu strictu* (Ordem “Lactobacillales”), os seguintes grupos bacterianos:

(i) o género *Bifidobacterium* e a espécie *Actinomyces israelii* (homofermentativa em condições de anaerobiose), na sequência do descrito por Holzapfel e Wood (1995);

(ii) as espécies de *Bacillus* spp. e o género *Sporolactobacillus* tal como referido por Fritze e Claus (1995), com as correspondentes actualizações taxonómicas resultantes da transferência de *Bacillus*

Bactérias do Ácido Láctico (BAL)	
Domínio Bacteria	364
Filo "Firmicutes"	328
Classe "Bacilli"	324
Ordem "Lactobacillales"	302
Família Lactobacillaceae	113
<i>Lactobacillus</i>	103
<i>Paralactobacillus</i>	1
<i>Pediococcus</i>	9
Família "Aerococaceae"	18
<i>Aerococcus</i>	6
<i>Abiotrophia</i>	1
<i>Doliosoccus</i>	1
<i>Eremococcus</i>	1
<i>Facklamia</i>	6
<i>Globicatella</i>	2
<i>Ignavigranum</i>	1
Família "Carnobacteriaceae"	31
<i>Carnobacterium</i>	10
<i>Agitococcus</i>	1
<i>Alkalibacterium</i>	3
<i>Allofusis</i>	1
<i>Alloiococcus</i>	1
<i>Atopococcus</i>	1
<i>Atopostipes</i>	1
<i>Desemzia</i>	1
<i>Dolisoqramulum</i>	1
<i>Granulicatella</i>	3
<i>Isobaculum</i>	1
<i>(Lactosphaera)</i>	0
<i>Marinilactibacillus</i>	2
<i>Trichococcus</i>	5
Família "Enterococaceae"	46
<i>Enterococcus</i>	33
<i>Atopobacter</i>	1
<i>Catelicoccus</i>	1
<i>Melissococcus</i>	1
<i>Pilibacter</i>	1
<i>Tetragenococcus</i>	4
<i>Vagococcus</i>	5
Família "Leuconostocaceae"	27
<i>Leuconostoc</i>	14
<i>Oenococcus</i>	2
<i>Weissella</i>	11
Família Streptococaceae	67
<i>Streptococcus</i>	61
<i>Lactococcus</i>	5
<i>Lactovum</i>	1
Filo "Actinobacteria"	36
Classe "Actinobacteria"	36
Ordem Bifidobacteriales	28
Família Bifidobacteriaceae	28
<i>Bifidobacterium</i>	28
Ordem Coriobacteriales	7
Família Coriobacteriaceae	7
<i>Atopobium</i>	5
<i>Olsenella</i>	2
Ordem Actinomycetales	1
Família Actinomycetaceae	1
<i>Actinomyces israelii</i>	1
Ordem Clostridiales	1
Família "Lachnospiraceae"	1
<i>Ruminococcus hansenii</i>	1
Classe Mollicutes	3
Ordem Incertae sedis 8	3
Família "Erysipelothricaceae"	3
<i>Erysipelothrix</i>	3
Família "Sporolactobacillaceae"	5
<i>Sporolactobacillus</i>	5
Família Bacillaceae	6
<i>Bacillus coagulans</i>	1
<i>Bacillus laevolacticus</i>	1
<i>Bacillus smithii</i>	1
<i>Bacillus</i> sp. ("racemilacticus")	1
<i>Bacillus</i> sp. ("vesiculiferous")	1
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1
Família "Paenibacillaceae"	2
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	1
<i>Paenibacillus popilliae</i>	1
Família "Staphylococcaceae"	1
<i>Gemella morbillorum</i>	1
Família "Listeriaceae"	8
<i>Listeria</i>	6
<i>Brochothrix</i>	2

Fig. 2 - Organização taxonómica das BAL de acordo com o índice taxonómico dos procariotas (TOBA, versão 7.7 06/03/2007; Garrity *et al.*, 2007) e a lista de nomes procarióticos com nomenclatura reconhecida (LPNSN, versão 04/09/2007; Euzéby, 2007). Os números referem-se ao total de espécies descritas em cada grupo.

Taxonomic organization of LAB according to the Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea (TOBA, version 7.7 06/03/2007) and the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPNSN, version 04/09/2007). The numbers refer to the total number of species described in each group.

stearotermophilus para o novo género *Geobacillus*, e de *B. lentimorbus* e *B. popilliae* para o novo género *Paenibacillus*;

(iii) as espécies *Gemella morbillorum* e *Ruminococcus hansenii*, anteriormente incluídas no género *Streptococcus*;

(iv) os géneros *Atopobium* e *Olsenella* que, além de incluírem as antigas espécies *Lactobacillus minutus* e *Lb. rimae* (*Atopobium*) e *Lb. uli* (*Olsenella*), se caracterizam globalmente por produzirem ácido láctico como produto principal da fermentação da glucose (Dewhirst *et al.*, 2001);

(v) os géneros *Listeria*, *Brochothrix* e *Erysipelothrix*, produtores de ácido láctico e com alguma proximidade filogenética das BAL *sensu strictu* (Robertson e McCullough, 1968; Jones, 1992; Jones e Seeliger, 1992).

Deste modo, o grupo das BAL *sensu lato* inclui 364 espécies distribuídas por 49 géneros actualmente reconhecidos (não incluindo o género *Lactosphaera*, cuja única espécie reconhecida foi transferida para o género *Trichococcus*). Entre estas, 302 espécies estão distribuídas por 36 géneros que constituem o grupo das BAL *sensu strictu*, mais frequentemente considerado em termos práticos pelos investigadores desta área científica e que será maioritariamente adoptado nesta revisão.

1.3. METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

1.3.1 Fermentação da glucose

As BAL subdividem-se em dois grupos segundo a natureza e a concentração dos produtos finais produzidos a partir da glucose: as homofermentativas que produzem quase exclusivamente lactato, pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e as heterofermentativas que produzem, para além de CO₂, lactato e etanol, pela via hexose-monofosfato ou via 6P-gluconato/fosfocetolase. As espécies do género *Bifidobacterium* produzem lactato e acetato na proporção de (1:1,5) pela via frutose-6P-fosfocetolase (Desmazeud e Roissart, 1994).

A via homofermentativa tem um rendimento energético de 2 ATP por mole de glucose oxidada, enquanto que na via heterofermentativa este rendimento é de apenas 1 ATP e na via das bifidobactérias é de 2,5 ATP. Estas vias têm em comum o facto de apenas serem oxidadas as moléculas com gluco-configuração. A diferença entre as mesmas reside no modo como a molécula fosforilada é cindida, conduzindo assim a diferentes produtos finais (Kandler, 1983).

Via homofermentativa

Nas bactérias homofermentativas, ocorre inicialmente

a fosforilação da glucose e posteriormente da frutose-6-fosfato originando frutose-1-6-difosfato, que é cindida através da frutose-1,6-difosfato-aldolase em duas trioses interconvertíveis, a di-hidroxiacetona-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato. Este último é oxidado a 1,3-difosfoglicerato que, por um conjunto de reacções que envolvem cinases, mutase e enolase, origina o piruvato. Neste caso, o piruvato funciona como receptor final de electrões gerados na oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, reduzindo-se a lactato (Gottschalk, 1986; Axelsson, 1993).

Os isómeros de ácido láctico produzidos (L(+) e D(-)) surgem como resultado da estereoespecificidade da lactato-desidrogenase presente na célula (Kandler, 1983) e são parâmetros particularmente importantes na identificação das BAL. A forma racémica (DL) também pode ser formada quando estão presentes ambas as enzimas na célula, D- e L-lactato-desidrogenase, ou mais raramente, pela acção de uma L-lactato-racemase induzida, em combinação com uma L-lactato-desidrogenase (Stetter e Kandler, 1973 cit. por Kandler e Weiss, 1986).

Via heterofermentativa

Nas bactérias heterofermentativas, a glucose fosforilada, é oxidada a 6-fosfogluconato que, por uma descarboxilação oxidativa, origina ribulose-5-fosfato. Até este momento do processo metabólico, estão formadas uma mole de CO₂ e duas moles de coenzima reduzido-NADH+H⁺. Por meio de uma epimerização a ribulose-5-fosfato é convertida em xilulose-5-fosfato, que é posteriormente cindida em gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato, pela xilulose-5-fosfato-fosfocetolase. O gliceraldeído-3-fosfato é metabolizado do mesmo modo como na via glicolítica (EMP), referida para as bactérias homofermentativas, resultando uma mole de lactato e uma de ATP. O acetil-fosfato é reduzido a etanol via acetil-CoA e acetaldeído (Gottschalk, 1986; Axelsson 1993; Thompson e Gentry-Weeks, 1994). Muitas estirpes de bactérias heterofermentativas podem usar o oxigénio como receptor de electrões através de uma flavoproteína, produzindo CO₂, acetato e lactato como produtos finais a partir da fermentação da glucose, o que se traduz num acréscimo de ATP formado na conversão de acetil-fosfato a acetato (Brock, 1997).

Via das bifidobactérias

As bifidobactérias por não possuírem aldolase e apresentarem reduzida actividade da fosfofrutocinase, metabolizam a glucose por um processo diferente. Existe assim uma via específica para estas bactérias metabolizarem os açúcares, designada por 'shunt' da frutose-6-fosfato ou via das bifidobactérias. A enzima chave desta via metabólica, a frutose-6-fosfato-fosfocetolase, em presença de fosfato inorgânico (Pi), cinde a frutose-6-fosfato em eritrose-4-fosfato (C4)

e acetil-fosfato (C2) (Thompson e Gentry-Weeks, 1994). O acetil-fosfato é convertido a acetato, tal como referido para as heterofermentativas, e a eritrose-4-fosfato mais uma molécula adicional de frutose-6-fosfato, pela acção de uma transaldolase, dão origem à sedoheptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Por acção de uma transcetolase formam-se xilulose-5-fosfato e ribose-5-fosfato. A última é convertida também em xilulose-5-fosfato pela acção de uma isomerase e epimerase. As duas moles de xilulose-5-fosfato são cindidas em duas moles de gliceraldeído-3-fosfato e duas de acetil-fosfato pela acção da xilulose-5-fosfato-fosfocetolase. O gliceraldeído-3-fosfato pela acção das enzimas da via EMP é transformado em lactato e o acetil-fosfato é convertido em acetato pela acetato cinase com produção concomitante de ATP (Thompson e Gentry-Weeks, 1994). O balanço deste trajecto metabólico é o seguinte: a partir de 2 moles de glucose formam-se 3 moles de acetato, 2 moles de lactato e 5 moles de ATP por consumidas (Gottschalk, 1986).

1.3.2 Fermentação de outros açúcares

Para além da glucose, outros açúcares são metabolizados pelas BAL, nomeadamente a frutose, a galactose, a manose, a sacarose, a lactose, a maltose e pentoses (Gottschalk, 1986). A maior parte das hexoses são transportadas por permeases (ATP-dependentes) e/ou pelo sistema da fosfotransferase (fosfoenolpiruvato-dependente) (Figura 3) e são metabolizadas pelas vias descritas anteriormente, após isomerização e/ou fosforilação (Axelsson, 1993). Relativamente às pentoses, quase todas as estirpes heterofermentativas têm capacidade de as utilizar, embora existam algumas pentose-negativas. As pentoses são geralmente transportadas para o interior da célula através de permeases. No interior, as pentoses são fosforiladas e convertidas a D-xilulose-5-fosfato por epimerases e/ou isomerases (Kandler, 1983). Este composto dá origem a quantidades equimolares de lactato e acetato pelas reacções que ocorrem na parte final da via heterofermentativa, anteriormente descrita.

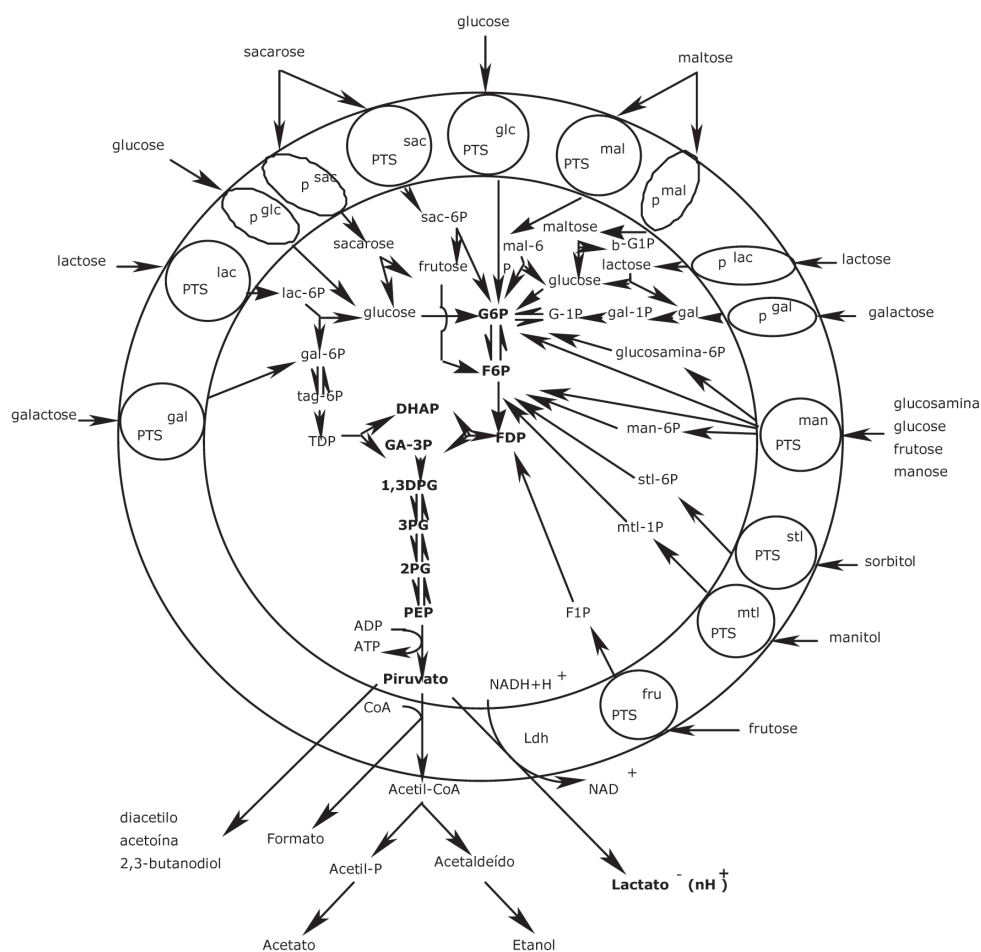


Fig. 3 - Vias de transporte e metabolismo de açúcares pelas bactérias lácticas (adaptado de Thompson e Gentry-Weeks, 1994). A letra p designa os sistemas de transporte activos por permeases. PTS designa o sistema de transporte por fosfotransferase. A via EMP está representada a negrito.

Transport and metabolic sugar pathways of lactic bacteria (adapted from Thompson and Gentry-Weeks, 1994). p means active transport systems by permeases. PTS means phosphotransferase system. The EMP pathway is shown in bold.

1.4 HABITATS E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS BAL

As BAL constituem provavelmente o grupo mais numeroso de bactérias relacionadas com os seres humanos. Estas bactérias encontram-se naturalmente associadas às superfícies das mucosas, particularmente nos tractos gastrointestinal, respiratório e genital do homem e de outros animais (Axelsson, 1993; Makarova *et al.*, 2006), e são também indígenas em habitats muito diversos, desde produtos alimentares (leite e derivados; vegetais, frutos e cereais; carne; peixe; vinho) a solo, água, estrume e águas residuais (Konings *et al.*, 2000; Hansen, 2002; Makarova e Koonin, 2007).

Os alimentos fermentados, originários do Oriente, datam de tempos pré-históricos. As fermentações alcoólica, láctica e acética eram efectuadas empiricamente no passado, no sentido de preservar alimentos. Hoje em dia, com o desenvolvimento de sistemas eficientes de refrigeração e de esterilização por calor, poder-se-ia pensar que a fermentação teria perdido a sua importância como método de preservação nos países industrializados (Buckenhüskes, 1993). Tal não aconteceu porque cada vez mais a aplicação controlada de microrganismos é efectuada no sentido de preservar ou até melhorar as características físico-químicas e organolépticas dos alimentos. Os alimentos fermentados tornaram-se uma classe independente de géneros alimentícios. Estima-se que 25% da dieta dos europeus e 60% da dieta de muitos países em desenvolvimento seja constituída por alimentos fermentados (Holzapfel *et al.*, 1995; Stiles 1996; Leroy e DeVuyst, 2004).

Relativamente ao aroma, sabor, aparência visual, textura, consistência, durabilidade e segurança, estes produtos diferentes apresentam propriedades peculiares comparativamente às matérias primas ou outros alimentos semelhantes. Por exemplo, a acidificação da carne picada, durante a produção de enchidos secos, pode ser atingida pela aplicação de aditivos químicos (glucono-delta-lactona) ou por fermentação. Em ambos os casos, a durabilidade, a segurança e a textura do enchido serão alcançadas, porém, o sabor e o aroma característicos de um produto de qualidade só serão obtidos por fermentação (Buckenhüskes, 1993).

Todas as classes de microrganismos são, regra geral, usadas na fermentação de alimentos. Na Europa, as bactérias e as leveduras são mais utilizadas que os fungos filamentosos. Entre as bactérias, as BAL são as mais importantes (Buckenhüskes, 1993; Hansen, 2002), não só por serem indispensáveis na produção de certos alimentos e bebidas, dotando-os de uma miríade de atributos sensoriais únicos e desejáveis, mas também pela sua actividade antimicrobiana, inibindo microrganismos patogénicos e de deterioração que afectariam a segurança e qualidade dos mesmos (Daeschel, 1993).

De acordo com Klaenhammer *et al.* (2002), as

aplicações das BAL na indústria alimentar recaem genericamente em seis géneros/espécies chave benéficas e não patogénicas: *Lactococcus* (leite), *Lactobacillus* (leite, carne, vegetais e cereais), *Leuconostoc* (vegetais, leite), *Pediococcus* (vegetais, carne), *Oenococcus oeni* (vinho) e *Streptococcus thermophilus* (leite).

Embora já tenham sido observados casos pontuais em que algumas estirpes se comportaram como agentes patogénicos oportunistas em indivíduos com o sistema imunitário debilitado (Olano *et al.*, 2001; Zé-Zé *et al.*, 2004), as BAL são maioritariamente consideradas organismos GRAS (“Generally Recognized As Safe”) e desempenham um papel fundamental na biopreservação de uma grande variedade de alimentos fermentados, permitindo o seu consumo com segurança. São ainda de referir os seus potenciais benefícios nutricionais resultantes da biodisponibilidade de minerais, produção de aminoácidos e vitaminas, aumento da digestibilidade da lactose e eliminação de toxinas endógenas e de compostos antinutricionais de alimentos de origem vegetal (Buckenhüskes, 2001).

É também de salientar o seu efeito no controlo de microrganismos patogénicos presentes no intestino por exclusão competitiva, a sua actividade anticarcinogénica e o seu papel no sistema imunológico, bem como na redução do nível do colesterol (Fernandes *et al.*, 1987; Gilliland, 1990; Brink e Veld, 1992; Hammes e Tichaczek, 1994; Klaenhammer *et al.*, 2002; Leroy e DeVuyst, 2004), por isso algumas espécies têm sido utilizadas como probióticos para o homem e animais. A sua utilização em espécies pecuárias tornou-se ainda mais premente e relevante, a partir de 01/01/2006, após a proibição pela União Europeia da utilização de antibióticos para o mesmo fim, devido aos riscos inerentes.

As BAL também têm sido usadas na produção industrial de produtos biológicos e químicos, incluindo biopolímeros (*Leuconostoc* spp.), enzimas (*Lactobacillus brevis*), etanol e ácido láctico (*Lactobacillus casei*, *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. brevis*) (Gold *et al.*, 1992; Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000 cit. por Klaenhammer *et al.*, 2002), compostos aromáticos e substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas, peróxido de hidrogénio e reuterina (Vanderbergh, 1993; Sybesma *et al.*, 2006). Deve ainda referir-se o potencial das BAL como produtoras de proteínas com aplicação em cuidados de saúde ou para o desenvolvimento de novas vacinas (Sybesma *et al.*, 2006).

1.5 AS BAL NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE VINHO

1.5.1 Fases do processo em geral e intervenção das BAL

A produção de vinho pode ser vista como uma das tecnologias mais antigas da humanidade, inclusive

anterior à produção de pão (Ribéreau-Gayon, 1985), e actualmente pode ser considerada como um dos processos biotecnológicos mais prósperos em termos comerciais. Os avanços na segunda metade do século XX mostraram claramente que a fermentação do mosto de uvas e a produção de vinhos de qualidade não é tão simples como Pasteur, o fundador da enologia moderna, sugeriu há mais de um século. Na última década foram realizados progressos consideráveis no conhecimento da bioquímica e das interações de leveduras, bactérias lácticas e outros microrganismos durante o processo de vinificação (Moreno-Arribas e Polo, 2005).

O processo biológico da vinificação é assim o resultado de uma série de transformações bioquímicas, pela acção de várias enzimas de diferentes microrganismos, nomeadamente de leveduras (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*), que são responsáveis pela fermentação alcoólica (FA), principal parte do processo, e de bactérias lácticas (predominantemente *Oenococcus oeni*), que são responsáveis por um processo secundário, a fermentação maloláctica (FML) (van Rensburg e Pretorius, 2000; Alexandre *et al.*, 2004; Moreno-Arribas e Polo, 2005; Renouf *et al.*, 2007).

1.5.2 As BAL do vinho

Durante o processo de vinificação, as populações indígenas de BAL variam quantitativa e qualitativamente (Wibowo *et al.*, 1985). Esta variação traduz-se numa sucessão de espécies e estirpes antes, durante e após a FA (Fleet *et al.*, 1984). De acordo com os dados obtidos por Lafon-Lafourcade *et al.*, (1983) no final da maturação das uvas as BAL isoladas são bastante reduzidas em número e pouco diversificadas (10^0 a 10^1 ufc/ml), aumentando ligeiramente após a prensagem, encontrando-se no mosto ca. de 10^2 a 10^4 ufc/ml de BAL (Wibowo *et al.*, 1985; Lonvaud-Funel, 1995; Lonvaud-Funel, 1999). As principais espécies de BAL já referenciadas por diversos investigadores como tendo sido isoladas nesta fase do processo de vinificação são: *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. hilgardii*, *Lb. brevis*, *Lb. confusus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus damnosus* e *Oenococcus oeni* (Costello *et al.*, 1983; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Fleet *et al.*, 1984; Pardo e Zuñiga 1992; Fleet, 1993; Fugelsang, 1997). Normalmente estas populações sofrem um declínio rápido de cerca de 1 a 2 log e permanecem em números reduzidos ($<10^2$ ufc/ml), podendo não se desenvolver até ao final da FA (Fugelsang, 1997). Excepcionalmente, em ocasiões particulares, pode ocorrer uma proliferação ligeira de algumas espécies neste período (Wibowo *et al.*, 1985). Após esta fase de latência, cuja duração é dependente das características do vinho, as células sobreviventes começam a multiplicar-se e entram na fase exponencial de crescimento, atingindo populações de 10^6 a 10^8 ufc/ml, quase exclusivamente

constituídas por estirpes de *Oenococcus oeni*, espécie que domina nesta fase e realiza a FML.

Reguant e Bordous (2003) observaram uma grande diversidade de estirpes de *O. oeni* no início da FML, enquanto que no final apenas uma ou duas predominavam. Contudo, em algumas situações, em vinhos com pH mais elevado (pH 3,5 a 4,0) podem-se desenvolver estirpes de *Pediococcus* spp. e de *Lactobacillus* spp. que também podem efectuar a FML.

No Quadro II apresenta-se uma listagem das espécies de BAL isoladas de uvas, mostos e vinhos com FML espontânea ou vinhos com alterações, oriundos de diversas regiões vitivinícolas do mundo. Como se pode verificar, as espécies isoladas a partir deste tipo de amostras pertencem aos géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus*.

Para além da morfologia, o carácter fermentativo é um factor decisivo na sua classificação. As bactérias do género *Pediococcus* são homofermentativas e as dos géneros *Leuconostoc* e *Oenococcus* são heterofermentativas. Os lactobacilos podem apresentar os dois comportamentos e são divididos em 3 grupos: homofermentativos estritos (grupo A), heterofermentativos facultativos (grupo B) e heterofermentativos estritos (grupo C) (Kandler e Weiss, 1986). Os lactobacilos do grupo A não fermentam pentoses (com excepção de *Lb. vini*; Rodas *et al.*, 2005) formam duas moléculas de lactato a partir de uma molécula de glucose pela via glicolítica (EMP). Nos do grupo B, uma molécula de glucose, tal como no caso do grupo A, conduz a duas moléculas de lactato, mas as pentoses são fermentadas em lactato e acetato pela via heterofermentativa das pentoses fosfato. As bactérias do grupo C não possuem a frutose 1,6-difosfato aldolase que é característica da via EMP, fermentando a glucose a CO₂, lactato, acetato, e etanol pela via das pentoses, e pentoses em lactato e acetato do mesmo modo que os lactobacilos do grupo B (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Num estudo recente, Bae *et al.* (2006) isolaram estirpes de *Enterococcus* spp., *Weissella* spp. e *Lactococcus* spp. a partir da superfície dos bagos de várias castas cultivadas na Austrália. Este resultados são surpreendentes atendendo a que estes géneros de BAL normalmente não estão associados a este nicho ecológico particular. Encontraram-se ainda referências ao isolamento de duas estirpes de *Lactococcus lactis* em amostras de vinho tinto: uma isolada a partir de vinho da região espanhola de Rioja (Navarro *et al.*, 2000) e outra isolada de um vinho italiano (Spano *et al.*, 2002).

1.5.3 Factores que afectam o crescimento/sobrevivência das BAL no vinho

O sucesso no isolamento das diferentes espécies

QUADRO II

Espécies de BAL isoladas a partir de uvas, mostos e vinhos, distribuídas de acordo com o seu carácter fermentativo
LAB species isolated from grapes, musts and wines, distributed according to its fermentative character

Tipo de fermentação / Espécies	Referências bibliográficas ^a
Homofermentativos	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	35, 36, 44, 45
<i>Pc. damnosus</i>	3, 9, 14, 23, 44, 45
<i>Pc. dextrinicus</i>	44
<i>Pc. inopinatus</i>	9
<i>Pc. parvulus</i>	5, 9, 34, 44
<i>Pc. pentosaceus</i>	3, 23, 24, 32, 40, 42, 44, 45
<i>Pediococcus spp.</i>	31
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	7, 18, 23, 46
<i>Lb. jensenii</i>	3
<i>Lb. mali</i>	4, 32, 33, 44
<i>Lb. vini</i>	34
Heterofermentativos facultativos	
<i>Lactobacillus casei</i>	5, 22, 40, 44
<i>Lb. coryniformis</i>	32
<i>Lb. curvatus</i>	38
<i>Lb. homohoichii</i>	16
<i>Lb. paracasei</i>	8, 26, 32, 33, 44, 45
<i>Lb. pentosus</i>	33
<i>Lb. plantarum</i>	5, 11, 22, 32, 33, 38, 39, 41, 44, 45
<i>Lb. sakei</i>	16, 44
<i>Lb. zaeae</i>	41
<i>Lb. nagelli</i>	13
<i>Lb. diolivorans</i>	44
Heterofermentativos	
<i>Lactobacillus brevis</i>	2, 3, 6, 8, 11, 18, 22, 24, 28, 32, 33, 42, 44, 45
<i>Lb. buchnerii</i>	3, 5, 7, 24, 44
<i>Lb. collinoides</i>	4, 32, 33, 44
<i>Lb. fermentum</i>	3, 5, 24, 44
<i>Lb. fructivorans</i>	4, 11, 25, 27, 30, 46
<i>Lb. hilgardii</i>	3, 4, 6, 7, 8, 11, 18, 22, 23, 25, 28, 32, 33, 40, 44
<i>Lb. kunkeei</i>	12
<i>Lb. sanfranciscensis</i>	44
<i>Lactobacillus spp</i>	31
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	19
<i>Leuc. mesenteroides subsp. dextranicum</i>	2, 42
<i>Leuc. mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	14, 15, 22, 32, 44, 45, 46
<i>Leuconostoc spp.</i>	31
<i>Weissella confusa</i>	25
<i>W. paramesenteroides</i>	25
<i>Oenococcus oeni</i>	1, 2, 6, 10, 14, 17, 20-23, 25, 27-29, 32, 33, 37, 38, 40, 42, 44, 45

1 Beelman *et al.* (1977); 2 Chalfan *et al.* (1977); 3 Costello *et al.* (1983); 4 Couto e Hogg (1994); 5 Davis *et al.* (1986); 6 Dicks e van Vuuren (1988); 7 Du Plessis e Van Zyl (1963); 8 Du Plessis *et al.* (2004); 9 Edwards e Jensen (1992); 10 Edwards *et al.* (2000); 11 Edwards *et al.* (1991); 12 Edwards *et al.* (1993); 13 Edwards *et al.* (1998); 14 Fleet *et al.* (1984); 15 Fornachon (1965); 16 Fulgesang (1996); 17 Guerrini *et al.* (2003); 18 Ingraham *et al.* (1960); 19 Kunkee (1967); 20 Lafon-Lafourcade *et al.* (1983); 21 Li *et al.* (2006); 22 Lonvaud-Funel (1999); 23 Manca de Nadra e Strasser de Saad (1987); 24 Pan *et al.* (1982); 25 Pardo e Zuñiga (1992); 26 Patarata *et al.* (1994); 27 Peynaud e Domercq (1968); 28 Peynaud e Domercq (1970); 29 Pilone *et al.* (1991); 30 Radler e Hartel (1984); 31 Rankine (1977); 32 Rodas *et al.* (2003); 33 Rodas *et al.* (2005); 34 Rodas *et al.* (2006); 35 Rojo-Bezares *et al.* (2006); 36 Rojo-Bezares *et al.* (2007); 37 Sato *et al.* (2001); 38 Sieiro *et al.* (1990); 39 Spano *et al.* (2002); 40 Strasser de Saad e Manca de Nadra (1987); 41 Stratiotis A.L. e Dicks, L.M.T. (2002); 42 Suárez *et al.* (1994); 43 Weiller e Radler (1970); 44 Claisse *et al.* (2007); 45 Navarro *et al.* (2000); 46 Yurdugül e Bozoglu 2002;

representativas da diversidade das BAL do vinho pode ser condicionado pelas técnicas de isolamento e meios de cultura utilizados e, principalmente, pela dinâmica da sucessão de estirpes e espécies de BAL ao longo do processo de vinificação, que depende fortemente de diversos factores. Os factores que influenciam a

sobrevivência e crescimento das BAL no vinho podem ser agrupados em três categorias: (i) características do vinho, (ii) factores associados com a vinificação; e (iii) interacções entre as BAL e outros microrganismos.

Características do vinho

Relativamente às características do vinho destacam-se os seguintes parâmetros: pH, dióxido de enxofre, teor alcoólico, temperatura, oxigénio e dióxido de carbono. O pH é um dos parâmetros mais importantes que afecta o comportamento das BAL no vinho, influenciando a duração da fase de latência, a taxa de crescimento e consequentemente a duração da FML, as espécies que crescem no vinho, o seu comportamento metabólico e a sua sobrevivência.

Normalmente observa-se que em vinhos com pH inferior a 3,5, predomina a espécie *Oenococcus oeni*, não ocorrendo o crescimento de estirpes de *Lactobacillus* spp. e de *Pediococcus* spp..

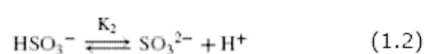
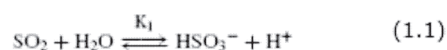
As espécies destes dois géneros têm maior incidência em vinhos com pH próximo de 4,0, podendo realizar a FML ou comportarem-se como agentes de deterioração após a FML efectuada por *Oenococcus oeni* (Wibowo *et al.*, 1985). A maior tolerância da espécie *O. oeni* explica o isolamento quase exclusivo desta espécie a partir de vinhos com pH inferior a 3,5 (Davis *et al.*, 1988).

Para além de afectar o crescimento das BAL, o pH também afecta a actividade maloláctica e os substratos transformados e metabolitos produzidos (Serpa-Pimentel *et al.*, 1994). Apesar da enzima maloláctica purificada apresentar o máximo de actividade a pH ótimo de 5,9, na célula a actividade máxima observa-se a valores de pH entre 3,0 e 3,2, ou seja na gama de valores normalmente observados em vinhos. O período de duração da FML nos vinhos reduz-se à medida que o pH aumenta.

De um modo geral as BAL, particularmente *O. oeni*, assimilam em primeiro lugar o ácido málico e posteriormente os açúcares.

O dióxido de enxofre (SO₂) é um aditivo alimentar (conservante E220) vulgarmente utilizado na indústria enológica pelas suas propriedades antisépticas, antioxidantes e antioxidásicas (Fugelsang, 1997; Carreté *et al.*, 2002; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Durante a solubilização do SO₂ estabelecem-se os equilíbrios:



Em função do pH do vinho, o SO₂ total encontra-se em equilíbrio sob as formas de SO₂ livre (forma molecular, iões sulfito e bisulfito) e SO₂ combinado (com compostos carbonados, nomeadamente aldeídos, cetonas, ácido pirúvico, ácido ?-cetoglutárico ou açúcares). A 20°C, os pKs correspondentes às reacções de dissociação são 1,81 e 6,91, respectivamente (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Estes valores justificam que a forma ácida H₂SO₃ não

exista em solução e que nos valores de pH do vinho o SO₂ livre esteja predominantemente sob a forma de ião bisulfito. A forma activa é a forma molecular e a percentagem a que corresponde pode ser calculada, em função do pH do vinho, pela fórmula de Sudraud e Chauvaet (1985; citado por Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006):

$$\text{SO}_2^{\text{activo}} = \frac{100}{10^{\text{pH}-1.81} + 1} \quad (1.3)$$

Por exemplo, a pH 3,2 a percentagem de SO₂ activo é de 3,91%, a pH 3,5 é de 2,00% e a pH 3,8 é de 1,01%. Concentrações de 100-150 mg/L de SO₂ total, de 50-100 mg/L SO₂ combinado ou de 1-10 mg/L SO₂ livre são suficientes para inibir as BAL e provocar uma paragem da FML (Wibowo *et al.*, 1985). Regra geral as BAL têm dificuldade em desenvolver-se na presença de concentrações de SO₂ total e livre superiores a 100 mg/L e 10 mg/L, respectivamente (Reguant *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Esta será a dose recomendada para estabilizar os vinhos após a FML ou para evitar naqueles em que não for desejada (Mendes-Faia, 1987).

A sensibilidade ao SO₂ varia com a espécie e com a estirpe. Os cocos são menos resistentes que os lactobacilos e entre os cocos as espécies pertencentes aos géneros *Leuconostoc* e *Oenococcus* apresentam maior sensibilidade do que as do género *Pediococcus*. O efeito bactericida do SO₂ é atribuído à fracção de SO₂ livre que entra na célula por difusão e, no seu interior, é convertida em ião bisulfito (HSO₃⁻), que reage com proteínas, ácidos nucleicos e alguns cofactores, inibindo enzimas e consequentemente conduzindo à morte das células (Romano e Suzzi, 1993). Recentemente, Carreté *et al.* (2002) observaram um decréscimo na actividade maloláctica e na viabilidade de *O. oeni* associada à inibição da actividade da ATPase pela acção do dióxido de enxofre.

O etanol, metabolito principal resultante da FA por *Saccharomyces cerevisiae* ou adicionado no caso dos vinhos fortificados, também afecta os parâmetros de crescimento das BAL e a sua actividade maloláctica. A capacidade de sobrevivência e crescimento das BAL decresce à medida que as concentrações de etanol aumentam (Wibowo *et al.*, 1985).

A sensibilidade ao etanol varia entre as espécies de BAL. De um modo geral, os lactobacilos heterofermentativos apresentam maior tolerância ao etanol do que leuconostocs, oenococos e pediococos. Os cocos podem tolerar cerca de 12 a 14% de etanol. Relativamente aos lactobacilos, já foram isoladas estirpes de *Lactobacillus fructivorans*, *Lb. brevis* e *Lb. hilgardii* em vinhos fortificados com teores alcoólicos de 16 a 20% (Radler e Hartel, 1984; Couto e Hogg, 1994; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Esta variabilidade é o resultado de modificações estruturais

(composição em ácidos gordos, fosfolípidos e proteínas) e funcionais da membrana celular (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

É de salientar que a tolerância ao etanol é muito menor quando as estirpes são cultivadas em laboratório comparativamente ao seu crescimento em vinho. Fernandes *et al.* (1991) observaram um efeito estimulante do etanol a baixas concentrações (2 a 4%) nas taxas de crescimento de BAL, e sugerem a utilização do etanol nestas concentrações na formulação de meios de cultura para isolamento e para multiplicação de fermentos. A tolerância ao etanol é fortemente afectada pela temperatura e pH, decrescendo à medida que a temperatura aumenta e o pH decresce (Lafon-Lafourcade, 1975).

A temperatura, tal como o pH influencia os parâmetros de crescimento das BAL e consequentemente a velocidade da FML. Este é o factor mais facilmente monitorizado e controlado no processo de vinificação. As temperaturas óptimas de crescimento das BAL isoladas dos vinhos variam entre 20-30°C em meios de cultura e entre 20-23°C no vinho. A temperatura ideal para que durante o processo de vinificação ocorra o crescimento das BAL, nomeadamente de *O. oeni*, e a degradação do ácido málico é aproximadamente 20°C. Valores inferiores atrasam e prolongam a FML, enquanto que valores superiores a 25°C afectam a biomassa produzida e a qualidade do produto final pela maior produção de ácido acético levando à sua depreciação ou deterioração (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Relativamente aos efeitos do oxigénio e dióxido de carbono no crescimento e sobrevivência das BAL, os resultados obtidos por diferentes investigadores têm sido bastante contraditórios. Efeitos estimulantes no crescimento e na actividade malolática das BAL têm sido observados, quer em condições de anaerobiose ou microaerofilia (Kunkee, 1967; Stamer, 1979), quer em condições de algum arejamento (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). O efeito estimulante do CO₂ no crescimento das BAL, descrito por alguns autores (van der Westhuizen *et al.*, 1981; Mayer, 1974 citado por Wibowo *et al.*, 1985), não foi observado nos ensaios de optimização das condições de cultura de BAL realizados por Tenreiro (1995).

Factores associados com a vinificação

Estes factores englobam operações tecnológicas como a clarificação, contacto com as películas, trasfega, termovinificação e adição de conservantes. A estabilização por frio, a troca iónica e a pasteurização são ainda exemplos de outros procedimentos utilizados em vinificação que também podem influenciar a sobrevivência das BAL e consequentemente comprometer a realização da FML (Wibowo *et al.* 1985).

A operação de clarificação de mostos ou vinhos

efectuada por sedimentação, filtração ou centrifugação, pode remover um número considerável de BAL bem como nutrientes imprescindíveis ao seu crescimento, e deste modo reduzir a probabilidade da ocorrência da FML pela flora indígena. Normalmente, o contacto com as películas e o atraso na trasfega ou contacto com as borras após fermentação alcoólica também estimula a FML, pela libertação de substâncias estimulantes da película e nutrientes provenientes da autólise das leveduras. Os vinhos obtidos pela técnica de termovinificação são menos susceptíveis à ocorrência da FML, por uma maior retenção de SO₂ (Wibowo *et al.*, 1985). Para além do SO₂, outros conservantes, como o ácido fumárico, o ácido sórbico (sob a forma de sorbato de potássio) e o pirocarbonato de metilo, têm sido utilizados na indústria enológica. Alguns destes aditivos alimentares têm o inconveniente de apresentarem um efeito fungicida forte e limitada actividade sobre as BAL, podendo inclusivamente ser metabolizados por este grupo de bactérias e dar origem a compostos desagradáveis. Tal é o caso do ácido sórbico (ácido 2,4-hexadienónico) que é reduzido a 2,4-hexadienol e que, esterificando com o etanol, origina 2-etoxihexa-3,5-dieno, composto responsável pelo odor a gerânio (Crowell e Guymont, 1975).

Embora o uso de SO₂ pela indústria enológica durante a produção dos diferentes tipos de vinhos esteja estritamente regulamentado, devido aos seus efeitos indesejáveis (características sensoriais negativas e problemas alergénicos), têm sido investigados vários compostos alternativos, que permitam a estabilização dos vinhos e garantam a sua qualidade final. Assim a utilização de lisozima tem-se revelado eficiente no controlo das BAL de mostos e vinhos (Gerbaux *et al.*, 1997; Delfini *et al.*, 2004) e de outros alimentos nomeadamente de queijos.

Apesar da nisina ter revelado, em laboratório, uma acção inibidora do crescimento das BAL isoladas de vinho (Mendes-Faia e Radler, 1990; Cortez, 1993; Daeschel *et al.*, 1991; Rojo-Bezares *et al.*, 2007), até recentemente, é apenas aplicada em queijos, cerveja e enlatados, onde desempenha um papel eficaz no controlo de bactérias patogénicas como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, entre outros. Face à relutância na aplicação da nisina no controlo das BAL indesejáveis no vinho, a pesquisa e detecção de outras bacteriocinas em BAL de origem enológica torna-se assim relevante e promissora. São exemplos a pediocina N5p produzida por *Pediococcus pentosaceus* (Strasser de Saad e Manca de Nadra, 1993), a pediocina PD-1 produzida por *Pc. damnosus* NCFB 1832 (Nel *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2005) e a plantaricina produzida por *Lactobacillus plantarum* (Navarro *et al.*, 2000) ou substâncias semelhantes produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* (Yurdugiel e Bozoglu, 2002).

Interacções entre as BAL e outros microrganismos

Durante o processo de vinificação, a existência de culturas mistas (leveduras, fungos filamentosos, bactérias acéticas e lácticas, “bacteriófagos”) promove o estabelecimento de relações antagonísticas e sinérgicas entre os diferentes microrganismos (Wibowo *et al.*, 1985; Fleet, 2003; Arnick e Henick-Kling, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

As leveduras, por competirem pelos nutrientes e por produzirem substâncias inibidoras (etanol, SO₂, ácidos gordos de cadeia média) retardam o crescimento das BAL durante a FA (Wibowo *et al.*, 1985; Carreté *et al.*, 2002; Carreté *et al.*, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Contudo, as leveduras também podem ter um papel estimulante no crescimento das BAL e na actividade maloláctica. Capucho e San Romão (1994) verificaram que os ácidos decanoico e dodecanoico em concentrações inferiores a 12,5 e 2,5 mg/L, respectivamente, estimulavam a actividade maloláctica e o crescimento das BAL. Após a FA, durante a autólise das leveduras são excretadas e libertadas vitaminas, bases azotadas, péptidos e aminoácidos que estimulam o crescimento das BAL (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006) e que podem explicar a sucessão das espécies de BAL observada durante a FA.

Adicionalmente, algumas estirpes de BAL, pela produção de substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogénio, ácidos orgânicos e bacteriocinas podem inibir outras estirpes da mesma ou de diferentes espécies de BAL. Relativamente a fungos e bactérias acéticas, mais frequentes em uvas danificadas, o seu efeito sobre o crescimento das BAL parece ser negligenciável segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006).

A observação de FML incompletas ou irregulares associadas à presença de bacteriófagos foi descrita por vários autores (Sozzi *et al.*, 1982; Cazelles e Gnaegi, 1982; Davis *et al.*, 1985; Henick-Kling *et al.*, 1986; Jarvis, 1989 - citados por Fleet, 2003). Num ‘screening’ de fagotipagem de uma colecção de estirpes de *O. oeni*, realizado por Poblet-Icart *et al.*, (1998), foram detectadas aproximadamente 90% de estirpes lisogénicas. Estes autores observaram pelos perfis de restrição obtidos, que os fagos isolados não eram idênticos, o que confirmava a coexistência de várias estirpes de *O. oeni* durante a FML. Assim, de acordo com a sensibilidade ao ataque dos fagos, as diferentes estirpes sucedem-se umas às outras, ou seja, a eliminação de uma estirpe por um fago é provavelmente seguida pela multiplicação de outras estirpes. Segundo Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), só se deve reechar uma FML anulada por bacteriófagos em circunstâncias excepcionais, quando as duas populações atingem o mesmo número. Outros autores referem ainda que os fagos são inactivados pelo baixo pH e dióxido de enxofre presente no vinho. Contudo, os bacteriófagos devem ser considerados na selecção de culturas ‘starter’, para evitar perdas de culturas a

grande escala (Poblet-Icart *et al.*, 1998). Culturas ‘starter’ constituídas por várias estirpes com diferentes sensibilidades a fagos e a rotação destas culturas podem ser soluções para garantir uma FML sem problemas desta natureza (Buckenhüskes, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.* 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Axelsson L.T., 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria*. 1-63. Salminen, S. and von Wright, A. (ed.) Marcel Dekker, New York.

Axelsson L.T., 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 1-66. Salminen, S., von Wright, A. and Ouwehand, A. (ed.), 3rd edition Marcel Dekker, New York.

Bae S., Fleet G.H., Heard G.M., 2006. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J. Appl. Microbiol.* **100** (4), 712-727.

Bauer R., Chikindas M.L., Dicks L.M.T., 2005. Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Int J Food Microbiol* **101** (1), 17-27.

Beelman R., Gavin A., Keen R., 1977. A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malolactic fermentation in eastern wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **28** (3), 159-165.

Brink T.B., Huis In't Veld J.H.J., 1992. Application of metabolic properties of lactic acid bacteria In: *Les bactéries lactiques*. 58-66. Novel G, Le Querler J-F. (editors) Ardie Normandie, Caen, France.

Brock T.D., 1997. *Biology of Microorganisms*. 767 p. 8th edition. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Buckenhüskes H.J., 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 253-272.

Buckenhüskes, H.J., 2001. Fermented Vegetables. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 665-679. (2nd Edition). ASM Press, Washington.

Capucho I., San Romão, M.V., 1994. Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 391-395.

Carreté R., Reguant C., Rozès N., Constantí M., Bordons A., 2006. Analysis of *Oenococcus oeni* strains in simulated microvinifications with some stress compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* **57** (3), 356-362.

Carreté R., Vidal M.T., Bordons A., Constantí M., 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol Lett* **211** (2), 155-159.

Chalfan Y., Goldberg I., Mateles R., 1977. Isolation and characterization of malolactic bacteria from Israeli red wines. *J. Food Sci.* **42**, 939-943.

Claissé O., Renouf V., Lonvaud-Funel A., 2007. Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *J Microbiol Methods* **69** (2), 387-390.

- Coenye T., Vandamme P., 2003. Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. *Microbiol.* **149** (Pt 12), 3507-3517.
- Cortez M., 1993. *Utilização de nisina no controlo do crescimento de bactérias lácticas*. 41p. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica Aula teórico-prática, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Costello P.J., Morrison G.J., Lee T.H., Fleet G.H., 1983. Numbers and species of lactic acid bacteria in wine during vinification. *Food Technol. Austr.* **35**, 14-18.
- Couto J.A., Hogg T.A., 1994. Diversity of ethanol-tolerant lactobacilli isolated from Douro fortified wine: Clustering and identification by numerical analysis of electrophoretic protein profiles. *J Appl Bacteriol*, **76** (5), 487-491.
- Crowell E.A., Guymon J.F., 1975. Wine Constituents Arising from Sorbic Acid Addition, and Identification of 2-Ethoxyhexa-3,5-Diene as Source of Geranium-Like Off-Odor. *Am. J. Enol. Vitic.* **26**, 97-102
- Daeschel M.A., Jung D., Watson, B.T., 1991. Controlling wine malolactic fermentation with Nisin and Nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57** (2), 601-603.
- Daeschel M.A., 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. in: D. G. Hoover e L. R. Steeson (eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, Inc., San Diego, Califórnia, pp. 63-91.
- Davis C., Silveira N.F., Fleet G.H., 1985. Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50** (4), 872-876.
- Davis C., Wibowo D., Fleet G., Lee T., 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 137-142.
- Davis C., Wibowo D., Lee T., Fleet G., 1986. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 539-545.
- Delfini C., Cersosimo M., Prete V.D., Strano M., Gaetano G., Pagliara A., Ambrò S., 2004. Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. *J. Agric. Food. Chem.*, **52** (7), 1861-1866.
- Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M.C. e Janssens D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: *Bactéries Lactiques*. 25-116. de Roissart H.e Luquet F.M. (Coordonnateurs), Vol. I. Loriga, Uriage, France.
- Desmazeaud, M., de Roissart, H. 1994. Métabolisme général des bactéries lactiques. In: *Bactéries Lactiques*. 169-208. de Roissart H.e Luquet F.M. (Coordonnateurs), Vol. I. Loriga, Uriage, France.
- Dewhirst F.E., Paster B.J., Tzellas N., Coleman B., Downes J., Spratt D.A., Wade W.G., 2001. Characterization of novel human oral isolates and cloned 16S rDNA sequences that fall in the family *Coriobacteriaceae*: description of *Olsenella* gen. nov., reclassification of *Lactobacillus uli* as *Olsenella uli* comb. nov. and description of *Olsenella profusa* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**: 1797-1804.
- Dicks L., van Vuuren H., 1988. Identification and physiological characteristics of heterofermentative strains of *Lactobacillus* from South African red wines. *J. Appl. Bacteriol.*, **64**, 505-513.
- Du Plessis H., Dicks L., Lambrechts M., Pretorius I., Du Toit M., 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *Int. J. Food Microbio.* **91**, 19-29.
- Du Plessis L., Van Zyl J., 1963. The microbiology of South African winemaking: Part IV. The taxonomy and the incidence of lactic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. Agric. Sci.* **6**, 261-273.
- Edwards C.G., Collins M.D., Lawson P.A., Rodriguez A.V., 2000. *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *Int J Syst Evol Microbiol* **50** (Pt 2), 699-702.
- Edwards C., Jensen K., 1992. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington State wines: *Pediococcus* spp. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**, 233-238.
- Edwards C.G., Haag K.M., Collins M.D., 1998a. Identification and characterization of two lactic acid bacteria associated with sluggish/stuck fermentations. *Am.J.Enol.Vitic.*, **49** (4), 445-448.
- Edwards C.G., Haag K.M., Collins M.D., Hutson R.A., Huang Y.C., 1998b. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *J. Appl. Microbiol.*, **84** (5), 698-702.
- Edwards C., Jensen K., Spayd S., Seymour B., 1991. Isolation and characterization of native strains of *Leuconostoc oenos* from Washington state wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 219-226.
- Edwards C., Powers J., Jensen K., Weller K., Peterson J., 1993. *Lactobacillus* spp. from Washington state wines: Isolation and characterization. *J.Food Sci.*, **58**, 453-458.
- Euzéby J., 2007. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. on-line.
- Fernandes C.F., Shahani K.M. e Amer M.A., 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 343-356.
- Fernandes L., Loureiro V., Mendes-Faia A., 1991. Efeito do etanol no crescimento de bactérias lácticas. *Rev. Port. Farm.* **XL**, 144-48.
- Fleet G.H., 1993. The microorganisms of winemaking, isolation enumeration and identification. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. 1-25. Fleet G.H., (ed.), Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland,
- Fleet G.H., Lafon-Lafourcade S., Ribéreau-Gayon P., 1984. Evolution of yeasts and Lactic Acid Bacteria during fermentation and storage of Bordeaux Wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48** (5), 1034-1038.
- Fleet G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*, **86** (1-2), 11-22.
- Fornachon J., 1965. A *Leuconostoc* causing malolactic fermentation in Australian wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **15**, 184-186.
- Fritze D., Claus D., 1995. Spore-forming, lactic acid producing bacteria of the genera *Bacillus* and *Sporobacillus*. In: *The genera of Lactic acid bacteria*. 367-387. Wood B.J.B., Holzapel W.H., (eds.) Chapman & Hall. London.
- Fugelsang K.C., 1997. *Wine Microbiology*. 245 p. Chapman & Hall. London.
- Garrity G.M., Lilburn T.G., Cole J.R., Harrison S.H., Euzéby J., Tindall B.J., 2007. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea., Release 7.7. Michigan State University Board of

Gerbaux V., Villa A., Monamy C., Bertrand A., 1997. Use of Lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48** (1), 49-54.

Gilliland S.E., 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **7** (1-2), 175-188.

Gottschalk, G. 1986. *Bacterial metabolism*. 380 p. 2nd ed. Springer Verlag, New York .

Guerrini S., Bastianini A., Blaiotta G., Granchi L., Moschetti G., Coppola S., Romano P., Vincenzini M., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int. J. Food. Microbiol.*, **83** (1), 1-14.

Hammes W.P., Tichaczek P.S., 1994. The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z Lebensm Unters Forsch*, **198** (3), 193-201

Hammes W.P., Vogel R.F., 1995. The genus *Lactobacillus*. In: *The genera of Lactic acid bacteria*. 19-49. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (eds.) Chapman & Hall. London.

Hansen E.B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food. Microbiol.*, **78** (1-2), 119-131.

Holzapfel W.H., Geisen R., Schillinger U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**, 343-362.

Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **73** (2 Suppl), 365S-373S.

Holzapfel W.H., Wood B.J.B., 1995. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In: *The genera of Lactic acid bacteria*. 1-7. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (eds.) Chapman & Hall. London.

Inês, A.F.H. 2007. *Abordagem polifásica na caracterização e seleção de bactérias do ácido láctico de vinhos da Região Demarcada do Douro*. 198 p. Tese de Doutorado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Ingraham J., Vaughn R., Cooke G., 1960. Studies on malolactic organisms isolated from California wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **11**, 1-4.

Jones D., 1992. The genus *Brochthrix*. In: *The Prokaryotes*. 2nd ed. 1617-1628. Balows, A., H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (Eds). Springer-Verlag. New York.

Jones D., Seeliger H.P.R., 1992. The genus *Listeria*. In: *The Prokaryotes*. 2nd ed. 1595-1616. Balows, A., H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (Eds). Springer-Verlag. New York.

Kandler O., 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49** (3), 209-224.

Kandler O., Weiss N., 1986. Regular, nonsporng Gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. 1208-1234. Sneath H.A., Mair N.S. Sharpe M.E. e Holt J.G. (eds.), Williams & Wilkins, Baltimore.

Klaenhammer T., Altermann E., Arigoni F., Bolotin A., Breidt F.,

Broadbent J., Cano R., Chaillou S., Deutscher J., Gasson M., van de Guchte M., Guzzo J., Hartke A., Hawkins T., Hols P., Hutkins R., Kleerebezem M., Kok J., Kuipers O., Lubbers M., Maguin E., McKay L., Mills D., Nauta A., Overbeek R., Pel H., Pridmore D., Saier M., van Sinderen D., Sorokin A., Steele J., O'Sullivan D., de Vos W., Weimer B., Zagorec M., Siezen R., 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82** (1-4), 29-58.

Konings W.N., Kok J., Kuipers O.P., Poolman B. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3** (3), 276-282.

Kunkee R., 1967. Control of malolactic fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **18**, 71-77.

Lafon-Lafourcade S., 1975. Factors of the malo-lactic fermentations of wines. In: *Lactic acid bacteria in beverages and food*. 43-53. Carr J.G., Cutting C.V., Whiting, G.C. (Eds). Academic Press, London.

Lafon-Lafourcade S., Carre E., Ribéreau-Gayon P., 1983. Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46** (4), 874-880.

Leroy F., De Vuyst L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, **15** (2), 67-78.

Li H., Zhang C., Liu Y., 2006. Species attribution and distinguishing strains of *Oenococcus oeni* isolated from Chinese wines *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 515-518.

Lonvaud-Funel A., 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects *FEMS Microbiol. Lett.*, **26**, 209-214.

Lonvaud-Funel A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76** (1-4), 317-331.

Makarova K.S., Koonin E.V., 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, **189** (4), 1199-1208.

Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D.M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J., Díaz-Muñiz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R., Lorca G., Altermann E., Barrangou R., Ganesan B., Xie Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, **103** (42), 15611-15616.

Manca de Nadra M., de Saad A.S., 1987. Evolution of lactic acid bacteria during the different stages of vinification of Cafayate (Argentina) wines. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **5**, 235-240.

Mendes-Faia A., Radler F., 1990. Investigation of the bactericidal effect of nisin on lactic acid bacteria of wine. *Vitis*, **29**, 233-238.

Mendes-Faia M.A., 1987. *Crescimento e metabolismo de bactérias lácticas provenientes de vinhos da região de Trás-os-Montes. Sua intervenção na fermentação maloláctica*. 163 p. Tese de Doutorado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Moreno-Arribas M.V., Polo M.C., 2005. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future

- trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45** (4), 265-286.
- Navarro L., Zarazaga M., Sáenz J., Ruiz-Larrea F., Torres C., 2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 44-51.
- Nel H., Bauer R., Wolfaardt G., Dicks L., 2002. Effect of bacteriocins Pediocin PD-1, Plantaricin 423, and Nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *Am. J. Enol. Vitic.*, **53** (3), 191-196.
- Olano A., Chua J., Schroeder S., Minari A., La Salvia M., Hall G., 2001. *Weissella confusa* (Basonym: *Lactobacillus confusus*) bacteremia: a case report. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1604-1607.
- Pan C.S., Lee T.H., Fleet G.H., 1982. A comparison of five media for the isolation of lactic acid bacteria from wines. *Aust. Grapegrower and winemaker*, **220**, 42-46.
- Pardo I., Zuñiga M., 1992. Lactic acid bacteria in Spanish red, rosé and white musts and wines under cellar conditions. *J. Food. Sci.*, **57**, 392-405.
- Pardo I., García M., Zúñiga M., Uruburu F., 1988. Evaluation of API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39** (4), 347-350.
- Patarata L., Pimentel M., Pot B., Kersters K., Faia A.M. 1994. Identification of lactic acid bacteria isolated from Portuguese wines and musts by SDS-PAGE. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**, 288-293.
- Peynaud E., Domercq S., 1968. Etude de quatre cents souches de coques heterolactiques isolés de vins. *Ann. Inst. Pasteur*, **19**, 159-169.
- Peynaud E., Domercq S., 1970. Étude de deux cent-cinquante souches de bacilles hétérolactiques isolés de vins. *Arch. Mikrobiol.*, **70**, 348-360.
- Pilone G., Clayton M., van Duivenboden R., 1991. Characterization of wine lactic acid bacteria: Single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42** (2), 153-157.
- Radler F., Hartel S., 1984. *Lactobacillus trichodes*, ein alkoholabhängiges Milchsäurebakterium. *Wein-Wiss*, 106-112.
- Rankine B., 1977. Developments in malolactic fermentation of Australian red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **28** (1), 27-33.
- Reguant C., Bordons A., 2003. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J. Appl. Microbiol.*, **95** (2), 344-353.
- Reguant C., Carreté R., Constantí M., Bordons A., 2005. Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiol. Lett.*, **246** (1), 111-117.
- Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75** (1), 149-164.
- Ribéreau-Gayon P., 1985. New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 1-10.
- Robertson D.C., McCullough W.G., 1968. Glucose Catabolism of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Bacteriol.*, **95** (6), 2112-2116.
- Rodas A.M., Chenoll E., Macián M.C., Ferrer S., Pardo I., Aznar R., 2006. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56** (Pt 3): 513-517.
- Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I., 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.*, **26** (3), 412-422.
- Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I., 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55** (Pt 1), 197-207.
- Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C., 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. Food. Microbiol.*, **111** (3), 234-240.
- Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Zarazaga M., Torres C., Ruiz-Larrea F., 2007. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **116** (1), 32-36.
- Romano P., Suzzi G., 1993. Sulphur dioxide and wine microorganisms. 372-392. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G.H. (Ed.). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Sato H., Yanagida F., Shinohara T., Suzuki M., Suzuki K., Yokotsuka K., 2001: Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.*, **202** (1), 109-114.
- Serpa-Pimentel M, Silva M.H, Cortês I, Mendes Faia A., 1994. Growth and metabolism of sugar and acids of *Leuconostoc oenos* under different conditions of temperature and pH. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**, 42-48.
- Sieiro C., Cansado J., Agrelo D., Velazquez J., Villa T.G., 1990. Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of Northwestern Spain', *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2936-2938.
- Spano G., Beneduce L., Tarantino D., Zapparoli G., Massa S., 2002. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species. *Let. Appl. Microbiol.*, **35**, 370-374.
- Stamer J.R., 1979. *Food Technology*, chapter The lactic acid bacteria: microbes of diversity, pp. 60-65.
- Stiles M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **70** (2-4), 331-345.
- Stiles M.E., Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, **36** (1), 1-29.
- Strasser de Saad A.M., Manca de Nadra M.C., 1993. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J. Appl. Bacteriol.*, **74** (4), 406-410.
- Strasser de Saad, A., Manca de Nadra, M. 1987. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Cafayate (Argentina) wines. *Micr. Alim. Nutr.*, **5**, 45-49.
- Stratiotis A., Dicks L., 2002. Identification of *Lactobacillus* spp. isolated from different phases during the production of a South-African fortified wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **23**, 14-21.
- Suárez J.A., Gonzalez M.C., Callejo J.J., Colomo B., González A., 1994. Contribution to the study of varietal wines from Rioja and Navarra. I. Microbial growth trends during grape maturation. *Bull. D.L. 'O.I.V.*, **759-760**, 389-407

- Sybesma W., Hugenholtz J., de Vos W.M., Smid E.J., 2006. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups and industry. *Elect. J. Biotechnol.*, **9** (4), 424-448.
- Tenreiro R., 1995. *Análise taxonómica em Leuconostoc oenos - uma perspectiva polifásica*. 284 p. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Thompson J., Gentry-Weeks C., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries. In: *Bactéries Lactiques*. 239-290. de Roissart H.e Luquet F.M. (Coordonnateurs), Vol. I. Loriga, Uriage, France.
- Van der Westhuizen L., Agenbach W., Loos M., Schoombee N., 1981. Comparison of procedures for isolation malolactic bacteria from wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **32** (2), 168-170.
- van Rensburg P., Pretorius I., 2000. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations - A review. *South African J. Enol. Vitic.*, **21**, 52-73.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, **60** (2), 407-438.
- Vanderbergh P., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Reviews*, **12**, 221-236.
- Weiller H.G., Radler F., 1970. Milchsäurebakterien aus Wein und von Rebenblättern. *Zentralbl. Bakteriol Parasitenkd Infektionskr. Hyg.*, **124**, 707-732.
- Wibowo D., Eschenbruch R., Davis C., Fleet G., Lee T., 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36** (4), 302-313.
- Wood, B. & Holzapfel, W., 1995. *The genera of lactic acid bacteria*. 1st Ed. Blackie Academic & Professional. Great Britain.
- Zé-Zé L., Tenreiro R., Duarte A., Salgado M.J., Melo-Cristino J., Lito L., Carmo M.M., Felisberto S. e Carmo, G. 2004. Case of aortic endocarditis caused by *Lactobacillus casei*. *J. Med. Microbiol.*, **53**, 451-453.
- Zuniga M., Champomier-Verges M., Zagorec M., Perez-Martinez G., 1998. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sake*. *J. Bacteriol.*, **180** (16), 4154-4159.
- Zuniga M., Miralles Md M.C. Perez-Martinez G., 2002. The Product of *arcR*, the sixth gene of the *arc* operon of *Lactobacillus sakei*, is essential for expression of the arginine deiminase pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** (12), 6051-6058.