

# Atividade de bactérias lácticas durante a vinificação e aspectos relacionados com a qualidade química do vinho

Gildo Almeida da Silva

## 1. Introdução

Embora o foco desta apresentação esteja relacionado com bactérias, não é possível falar em vinho sem resgatar, pelo menos uma vez, o nome do principal agente da fermentação alcoólica, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Muitos dos problemas do vinho advêm ou da má qualidade da linhagem empregada, ou de sua competitividade inadequada, permitindo a atuação de bactérias e de leveduras não *Saccharomyces* com atividade metabólica capaz de comprometer a qualidade do vinho elaborado. Convém salientar que, embora a atuação de bactérias lácticas seja uma opção desejável na elaboração de determinados vinhos, a atividade destes microrganismos em momento não oportuno pode causar danos à qualidade do produto final. O comprometimento na elaboração do vinho pode ir desde parada de fermentação alcoólica promovida pela inibição da atividade da linhagem de *Sacch. cerevisiae* empregada à formação apreciável de acidez volátil.

É de conhecimento geral que a qualidade do vinho depende da qualidade da matéria prima e dos microrganismos envolvidos no processo de sua elaboração. Isto é verdadeiro tanto para o principal agente de transformação do mosto em vinho, *Saccharomyces cerevisiae*, como para agentes microbianos outros que, de forma direta ou indireta, participam da vinificação. Há fatores que exacerbam determinados mecanismos que induzem os microrganismos envolvidos no processo de vinificação a ter um desempenho medíocre ou inadequado. Após a vinificação, o vinho, especialmente o tinto, não estará isento de ataques microbianos. É certo que quanto maior for o teor alcoólico do vinho e mais baixo for seu pH haverá menos riscos de desenvolvimento de microrganismos. Se dadas forem condições de crescimento para espécies de *Lactobacillus* e de *Pediococcus*, além da fermentação maloláctica, poderá ocorrer alterações durante a estocagem e envelhecimento do vinho.

Há vários gêneros e espécies de bactérias lácticas. Nem todas as bactérias lácticas presentes no mosto em processo de fermentação são desejáveis. De uma forma geral, estas bactérias podem ser divididas em homofermentativas e heterofermentativas. As espécies dos gêneros *Pediococcus* e *Streptobacterium* são todas homofermentativas e todas as espécies do gênero *Leuconostoc* são heterofermentativas. O gênero *Lactobacillus* possui representantes homofermentativos e heterofermentativos. A diferença entre estes dois grupos reside na concentração de ácido láctico formada em relação a outros produtos do metabolismo. Os representantes homofermentativos formam quase que exclusivamente ácido láctico a partir de açúcares. As bactérias lácticas heterofermentativas, por sua vez, transformam o açúcar em ácido láctico, etanol, ácido acético, glicerol, dióxido de carbono, manitol e outros poliálcoois. Esta informação é de extrema significância para a enologia porque o microrganismo mais importante existente no mosto envolvido no processo de fermentação maloláctica durante a elaboração de vinho é a espécie *Leuconostoc oenos*. Esta espécie, devidamente descrita (Garvie, 1975), sofreu uma reclassificação, apoiada em estudos de fermentação, crescimento em meios ácidos e características filogenéticas. O nome proposto para a espécie foi *Oenococcus oeni* Dicks et al., 1995. Este gênero, embora se distinga do *Leuconostoc* spp. e das bactérias lácticas, possui características heterofermentativas (Dicks et al., 1995). Isto significa dizer que o potencial de formação de ácido acético a partir de

açúcares é, por parte deste microrganismo, uma real preocupação. Esta espécie é uma das bactérias mais resistentes ao etanol e ao pH baixo.

A fermentação maloláctica depende de fatores físico-químicos e biológicos. A fermentação maloláctica pode ser inibida por produtos empregados em controle de doenças fúngicas que, mesmo em doses pequenas, inibem o metabolismo deste microrganismo (Vidal et al., 2001). Certas linhagens de *Sacch. cerevisiae* são formadoras de SO<sub>2</sub> (Silva e Ficagna, 2003), podendo exercer uma inibição significativa sobre a atividade das bactérias lácticas. Estas, por sua vez, são produtoras de bacteriocinas (Stiles, 1994; Nel et al., 2002). Estes antibióticos podem atuar sobre leveduras, inibindo-as. Portanto, durante a elaboração de vinho, a interação entre estes dois grupos deve ser considerada. Os prejuízos são apreciáveis quando, na elaboração de vinho, a interação favorece à bactéria. Parece razoável que a fermentação maloláctica deva ser estimulada apenas quando a fermentação alcoólica tiver sido concluída. Esta recomendação não se deve apenas ao risco de parada ou retardo da fermentação alcoólica mas também devido à evolução da acidez volátil. Tem, portanto, implicação sobre a qualidade do vinho.

## 2. Benefícios da Fermentação Maloláctica

Durante a fermentação alcoólica protagonizada por linhagens de *Sacch. cerevisiae* o mosto é fermentado a etanol, CO<sub>2</sub> e compostos aromáticos. Uma segunda fermentação poderá ocorrer sob ação de bactérias lácticas, utilizando como substrato o ácido málico presente no mosto. Para determinados vinhos, a fermentação maloláctica se reveste de importância porque proporciona a transformação de um ácido dicarboxílico (ácido málico) em outro monocarboxílico (lático).

A fermentação maloláctica:

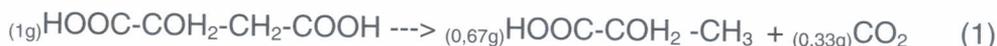
- Reduz a acidez titulável de 1 a 4,5 g/L (ácido tartárico)
- Aumenta o pH em 0,1 a 0,45 unidades
- Torna o vinho mais macio
- Aumenta a estabilidade microbiológica do vinho
- Confere ao vinho maior complexidade

A conversão afeta a acidez total, o pH e as características organolépticas do vinho. Há várias vias metabólicas propostas para a formação de ácido lático a partir de ácido málico. Veremos a seguir as rotas metabólicas com o intuito de esclarecer o que pode ocorrer com o vinho no qual a formação de ácido lático foi estimulada.

- Reação I-Formação Direta do Ácido Lático
- Enzima Maloláctica

Consideremos a Reação I como aquela na qual haverá uma descarboxilação do ácido málico para a formação do ácido lático.

A maioria das bactérias lácticas, entre elas a bactéria *Oenococcus oeni* (*Lactobacillus oenus*) possui a enzima maloláctica. É importante salientar que *Oenococcus oeni* não cresce em meio contendo ácido L-málico como a única fonte de carbono. Esta deficiência indica falta das enzimas málica e malicodesidrogenase (MDH). A formação do ácido lático a partir do ácido málico (Vuuren e Dicks, 1993), reação a seguir, é promovida pela **enzima maloláctica**:

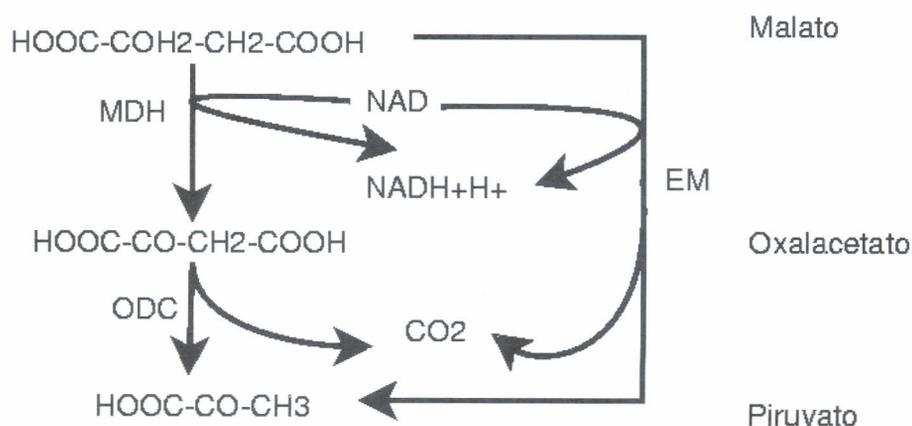


A fermentação maloláctica, como mostra a reação (1), parece ser extremamente simples e não apresenta envolvimento direto de síntese de moléculas ricas em energia metabólica. Sob esta simplicidade pode se esconder reações complexas que envolvem a

síntese de moléculas ricas em energia. Se assim não fosse, a reação não proporcionaria viabilidade celular. A energia metabólica para justificar a atividade da enzima maloláctica advém da geração de energia pelo processo antiport. Este processo é caracterizado pela entrada de ácido málico e pela saída de ácido láctico. Este movimento através da membrana do procarioto gera uma força protomotiva capaz de formar ATP. Há experimentos que sugerem ser este o mecanismo provável de geração de ATP na formação de ácido láctico mediada pela enzima maloláctica Poolman et al., 1991). A importância deste mecanismo para a enologia é grande porque não haveria, teoricamente, espaço para a síntese de ácido acético. Conseqüentemente, não haveria elevação da acidez volátil do vinho. No entanto, não é bem isso que ocorre na prática. No mosto, outras bactérias podem estar presentes como *Lactobacillus plantarum*. Esta bactéria, além da enzima maloláctica, possui **malato desidrogenase** (MDH) cujas reações estão apresentadas a seguir.

#### 4. Reação II-Formação do Ácido Pirúvico

O ácido láctico a partir de ácido málico, sem a participação da enzima maloláctica, pode se originar do ácido málico ou do ácido cítrico. Partindo do ácido málico, há o envolvimento de três enzimas importantes. Estas estão representadas por siglas MDH, ODC e EM<sup>1</sup>. O ácido oxalacético pode, por sua vez, ter como precursor os ácidos málico ou cítrico.



##### 4.1 Malato Desidrogenase/Citrato Liase/Oxalacetato Descarboxilase/Enzima Málica

A enzima malatodesidrogenase (MDH) se encarrega de transformar o ácido málico em ácido oxalacético, como podemos ver na reação acima. A oxalacetato descarboxilase (ODC) converte o ácido oxalacético em ácido pirúvico. A enzima málica (EM) promove uma oxidação e uma descarboxilação do ácido málico, gerando ácido pirúvico.

O ácido oxalacético pode, por sua vez, ter como precursor o ácido málico, como já apresentado, ou o ácido cítrico. As reações de síntese de ácido oxalacético a partir do ácido cítrico envolve a enzima citrato liase (CL) e estão apresentadas a seguir:

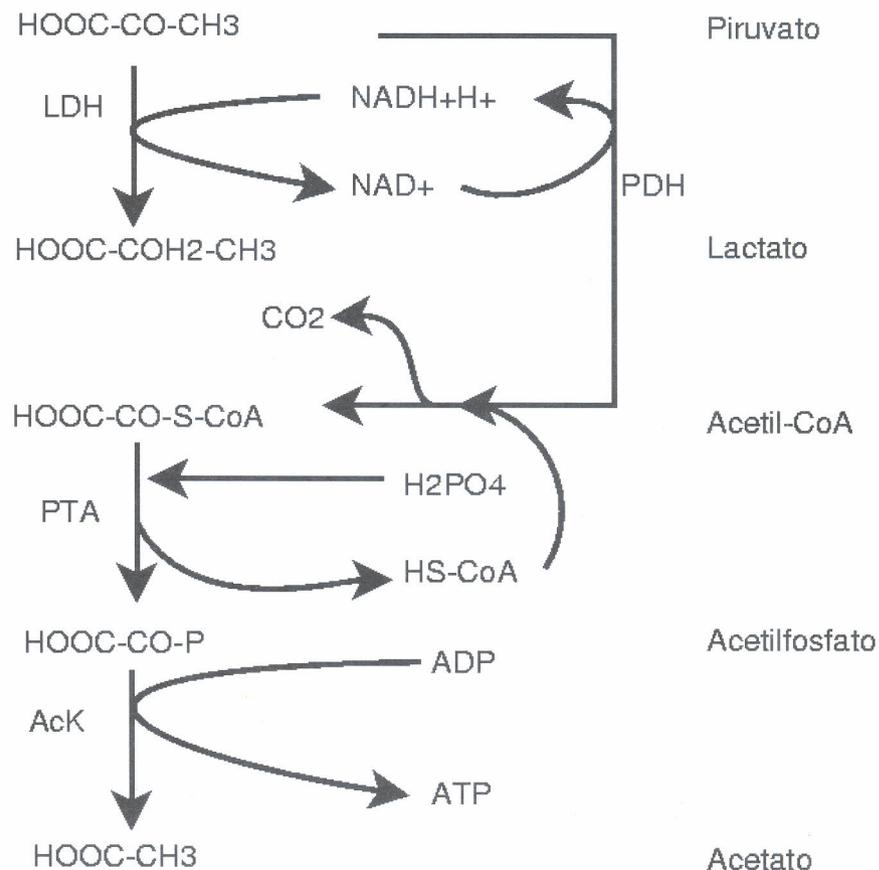


<sup>1</sup>MDH-Malato Desidrogenase; ODC-Oxalacetato Descarboxilase; EM-Enzima Málica

Observe que esta reação resulta na síntese de ácido acético. O ácido oxalacético formado poderá ser convertido em ácido pirúvico pela ação da ODC, vista no item anterior. Algumas bactérias lácticas convertem o ácido oxalacético em málico, este se transforma em fumárico e, por fim, em ácido succínico. A bactéria *Oenococcus oeni* não possui o aparato enzimático necessário para converter o ácido oxalacético em málico (Vuuren e Dicks, 1993).

## 5. Reação III-Destino do Ácido Pirúvico}

É neste ponto da reação que o vinho apresenta um risco potencial de ter sua acidez volátil aumentada. Se o ácido pirúvico sofrer redução intermediada pela enzima **lactato desidrogenase**, o resultado será a formação de ácido láctico, como pode ser visto na reação a seguir, e conseqüentemente, não haverá formação de ácido acético. Se no lugar da lactato desidrogenase houver a atuação da enzima **piruvato desidrogenase**, o risco de o vinho vir a ter sua acidez volátil aumentada é real. A enzima usará o ácido pirúvico como substrato para transformá-lo em ácido acético, envolvendo ainda as enzimas<sup>2</sup> fosfatotransacetilase e acetato quinase. A ação destas duas enzimas está descrita a seguir:



A formação de ácido acético, nesta reação, se caracteriza por necessitar de NAD, fornecer uma molécula rica em energia metabólica (ATP) e gerar uma molécula de NADH. Para a célula, a síntese de acetato é importante porque gera uma molécula de ATP mas este processo parece ser intermitente por causa da falta de NAD e excesso de NADH. A reação que envolve a LDH necessita de NADH, gera NAD mas não forma ATP.

<sup>2</sup>LDH-Lactato Desidrogenase; PDH-piruvato desidrogenase; PTA-fosfatotransacetilase; AcK-acetato quinase

É razoável que as duas reações estejam acopladas, tendo como engrenagem, que faz mover os dois processos, as moléculas de NAD e NADH.

A reação que envolve a enzima piruvato oxidase (POX) promove uma descaboxilação do ácido pirúvico, formando diretamente  $\text{CO}_2$  e ácido acético (Tomar et al., 2003).

Além de ácido acético pode ser formado ainda ácido fórmico, acetoína e diacetil (Vuuren e Dicks, 1993).

## 6. Uso de Diferentes Substratos por Bactérias

Outros substratos presentes no vinho podem ser usados para a formação de ácido pirúvico. Deste metabólito intermediário poderão se formar todos aqueles produtos finais descritos nas reações acima. O ácido tartárico e cítrico poderão produzir ácido oxalacético e este, por sua vez, resultar em ácido pirúvico. Não são todas as bactérias que podem degradar o ácido tartárico. A bactéria *Oenococcus oeni* não apresenta aparato enzimático com tal competência. A degradação do ácido tartárico pode levar a um processo de deterioração do vinho denominado **tourne**. Esta degradação confere ao vinho aromas desagradáveis.

Observando as vias metabólicas apresentadas, chega-se à conclusão que o microrganismo mais adequado para executar a tarefa de transformação do ácido málico em láctico, sem prejuízo para a qualidade organoléptica do vinho, seria aquele que apresentasse maior atividade da enzima maloláctica e menor atividade das demais enzimas aqui mostradas. O nome **fermentação maloláctica** deve ser usado apenas para aquela reação de transformação do ácido málico em ácido láctico. A transformação do ácido cítrico em ácido láctico deve ser denominada **fermentação citroláctica**. Por conseqüência, a transformação da glicose em ácido láctico poderia ser denominada **fermentação glicoláctica**. Os açúcares residuais presentes no vinho, durante a fermentação maloláctica, são os maiores entraves para se obter vinhos de qualidade. Embora o microrganismo mais indicado para a fermentação maloláctica seja a espécie *Oenococcus oeni*, por possuir enzima maloláctica e pela falta da atividade das enzimas málica e malatodesidrogenase, esta bactéria não apresenta atividade **aldolásica** (Garvie, 1975), o que é um inconveniente. Esta deficiência coloca a espécie no grupo das bactérias heterofermentativas (Garvie, 1975).

Considerando a bactéria *Oenococcus oeni* a representante legítima das bactérias presentes no mosto e de atuação desejável, deve-se levar em conta seu metabolismo com relação à utilização de açúcares residuais. A implicação da inexistência de aldolase faz esta espécie ser incapaz de degradar a glicose pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), como fazem bactérias homolácticas. Sendo heteroláctica, a espécie *Oenococcus oeni* utiliza a via pentose fosfato para a síntese de energia metabólica. Como conseqüência, há a formação de ácido láctico e etanol e/ou ácido acético e ainda com possibilidade de formação do poliálcool denominado manitol. Os passos importantes desta via a partir da glicose seriam:

- Transformação da glicose em glicose-6-fosfato, com gasto de 1 ATP.
- Reações que resultam na formação de xilulose-5-fosfato, com produção de 2 moléculas de NAD(P) reduzidas ( $2 \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ ).
- Clivagem da xilulose-5-fosfato para formar gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato mediada pela enzima fosfocetolase.
- gliceraldeído-3-fosfato seguirá os passos normais como os da glicólise até ácido láctico. Convém salientar que:
  - Nesta operação, é gerada uma molécula de NAD reduzida e esta mesma molécula será oxidada durante a redução do ácido pirúvico.
  - Haverá formação de duas moléculas de ATP. Logo, o saldo líquido será de 1 ATP.
  - As moléculas de NAD reduzidas no início do processo ainda estão intactas, mas precisam ser oxidadas.

- A função de oxidação destas duas moléculas de NAD reduzidas está sob responsabilidade das enzimas que atuam sobre o acetil-fosfato gerado ou sobre a frutose, formando manitol.

A molécula de acetil-fosfato formada poderá ser convertida em:

- **Etanol-** Neste processo, há transformação do acetil-fosfato em acetil-CoA e este em acetaldeído, com a oxidação de uma molécula de NAD(P) reduzida. A conversão do acetaldeído em etanol promove a oxidação de outra molécula de NAD(P) reduzida. Portanto, as duas moléculas de NAD(P) reduzidas formadas foram oxidadas, mas não houve formação de ATP.
- **Ácido acético-** Nesta alternativa, há formação de uma molécula de ATP, mas não há oxidação das moléculas de NAD(P) reduzidas formadas.

Sob ponto de vista energético, a síntese de ácido acético é mais vantajosa para a célula que a formação de etanol. A decisão de formar etanol ou ácido acético dependerá da relação  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+ / \text{NAD(P)}$  intracelular. Com tarefa tão importante para o metabolismo celular, a molécula de acetil-fosfato pode ser formada por três diferentes vias.

- Por clivagem da xilulose-5-fosfato, como já enfatizado.
- Por clivagem da Frutose-6-fosfato. Esta reação, compreenderá, além da formação de acetil fosfato :
  - ✓ entrada de fósforo inorgânico,
  - ✓ formação de eritrose-4-fosfato,
  - ✓ síntese de eritritol, com oxidação de uma molécula de NAD(P) reduzida e liberação de fósforo inorgânico. Não há formação de ATP.
- A cisteína, reagindo com  $\text{H}_2\text{O}$ , pode gerar  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$  e ácido pirúvico. Este, sob ação de uma piruvato oxidase e reagindo com  $\text{H}_2\text{O}$ , liberará  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ . Logo após, será incorporado fósforo inorgânico, formando uma molécula de acetil-fosfato. Desta molécula serão sintetizadas uma molécula de ATP e outra de ácido acético. Com a formação da molécula de ATP adicional, o balanço energético líquido celular se equipara ao da glicólise (EMP) (2 ATP/molécula de glicose metabolizada). É importante observar que utilização da cisteína para a síntese de ácido pirúvico resulta numa preocupação a mais por formar  $\text{H}_2\text{S}$ .

Os riscos de uma apreciável queda na qualidade do vinho se dão especialmente quando *Oenococcus oeni* atua durante a fermentação alcoólica ou durante uma parada ou até mesmo quando ocorre retardamento no processo fermentativo (Silva e Muratore, 2003). A diferença entre uma fermentação com e sem parada de fermentação está representada nas Figuras 1 e 2).

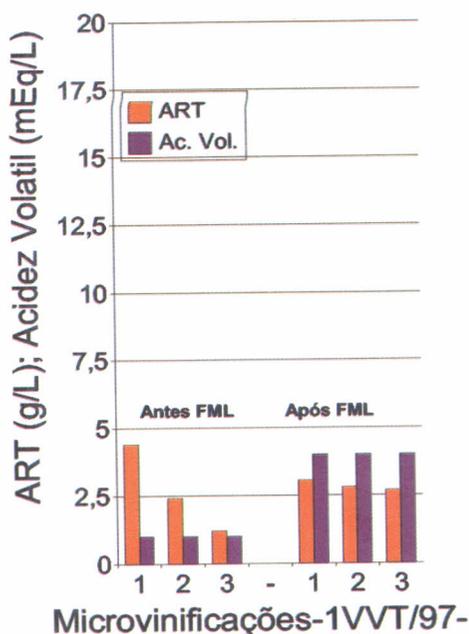


Fig. 1. Acidez volátil antes da fermentação maloláctica e após a fermentação maloláctica, sem parada de fermentação alcoólica. O processo de vinificação foi efetuado com a linhagem *Sacch. Cerevisiae* Embrapa *lvvt/97* e com a cultivar Cabernet Sauvignon. (Fonte: Silva e Gurak, 2005)

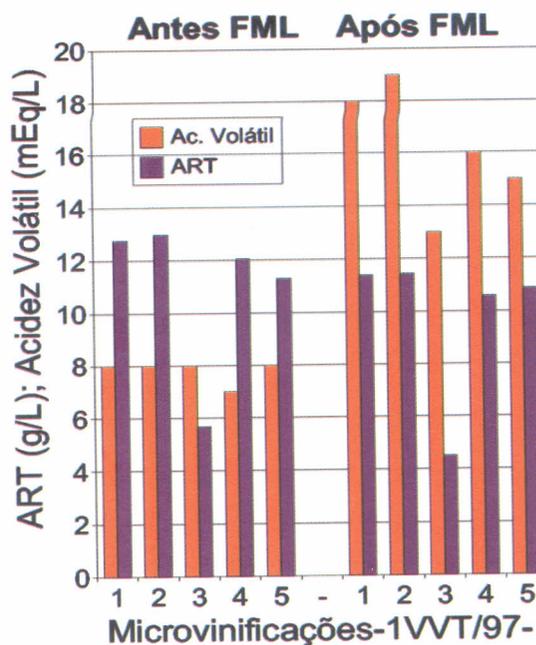


Fig. 2. Acidez volátil antes da fermentação maloláctica e após a fermentação maloláctica, durante uma parada de fermentação alcoólica. O processo de vinificação foi efetuado com a linhagem *Sacch. Cerevisiae* Embrapa *lvvt/97* e com a cultivar Cabernet Sauvignon. (Fonte: Silva e Muratore, 2005)

## 7. Efeitos Indesejáveis da Ação de Bactérias Lácticas

Observe que está sendo chamada a atenção sobre a ação de bactérias lácticas sobre a qualidade do vinho. Isto não significa dizer que a fermentação maloláctica, especificamente, não ofereça riscos. Esta quando não desejada acarreta problemas de qualidade (Davis et al., 1985a). Entre os problemas sobre a qualidade do vinho, relacionados diretamente com a fermentação maloláctica estão:

- Redução excessiva da acidez de vinhos com pH elevado, conduzindo a riscos de contaminação
- Elevação do pH
- Gosto indesejável (rato), atribuído à presença de 2-acetil-2-etil-tetraidropiridina e acetil-prolina e formados pela ação de *Lactobacillus* e de *Pediococcus* (Chatonnet et al., 1990)
- Alteração na cor
- Formação de aminas

## 8. Uso de Bactérias Lácticas e Interferências de Fagos

O uso das bactérias lácticas da espécie *Oenococcus oeni* se reveste de importância devido ao fato de possuir enzima maloláctica e de formar aminas em concentrações extremamente baixas. No entanto, a inoculação de tais bactérias não garante o desempenho esperado. Isto se deve à ação de bacteriófagos. Estes vírus se replicam dentro da célula hospedeira causando lise celular e, portanto, levando à inibição da fermentação maloláctica. A fase lítica do processo gera novos vírus que procurarão infectar outras células e, desta forma, o ciclo se repete podendo comprometer todo o processo da fermentação.

Algumas características dos fagos têm sido observadas. Estes fagos não lisam todas as linhagens de *Oenococcus oeni*, são ativos em vinhos com valores de pH maiores que 3,5 e inativos em valores de pH abaixo de 3,5. Têm sua ação inibida pelo SO<sub>2</sub> e pelo uso de bentonita (Davis et al., 1985b).

As precauções que devem ser tomadas para evitar a interferência de fagos são:

- Iniciar a fermentação maloláctica após a fermentação alcoólica
- Utilizar múltiplas linhagens de *Oenococcus oeni*
- *Manter o ambiente limpo*
- *Empregar uma carga elevada de inóculo*
- Usar linhagens resistentes a fagos
- Efetuar rotação de linhagens

Como pode ser observado, pela explanação feita, a bactéria *Oenococcus oeni* deve ser a mais indicada para efetuar a fermentação maloláctica. Embora seja, devido a sua fisiologia, o gênero que menos acidez volátil confere ao vinho, pela capacidade de transformar diretamente o ácido málico em láctico, a formação deste ácido não está totalmente afastada do processo de elaboração de vinho. Os açúcares redutores residuais presentes no vinho podem ser utilizados pela bactéria e, com isto, elevar os teores de acidez volátil do vinho.

## 9 Referências

CHATONNET, P.; Masneuf, I.; Gubbiotti, M.-C.; Dubourdieu, D. Prévention et détection des contaminations par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage des vins. *Revue Française D'Oenologie*, v. 179, p. 20–24, 1990.

DAVIS, C. R.; Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Lee, T. H.; Fleet, G. H. Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 36, n. 4, p. 290-301, 1985a.

DAVIS, C.; N. F. Silveira, N. F.; Fleet, G. H. Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl Environ Microbiol*, v. 50, n. 4, p. 872-876, 1985b.

DICKS, L. M.; Dellaglio, F.; Collins, M. D. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, v. 45, n-2, p. 395–397, 1995.

GARVIE, E. J. Genus II. *Leuconostoc* van hieghem 1978, 198, emend. mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66. In: Buchanan, R. E.; Gibbons, N. E. (Ed.). *Begeys's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1975. 1268 p. Part 14, p. 510-513.

NEL, H. A.; Bauer, R.; Wolfaardt, G. M.; Dicks, L. M. T. Effect of bacteriocins pediocin PD-1, Plantaricin 423, and Nisin on biofilms of *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 53, n. 3, p. 191–196, 2002.

POOLMAN, B.; Molenaar, D.; Smid, E. J.; Ubbink, T.; Abee, T.; Renault, P. P.; Konings, W. N. Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J Bacteriol*, v. 173, n. 19, p. 6030–6037, 1991.

SILVA, G. A. da; FICAGNA, E. Características fermentativas de quatro linhagens de leveduras autóctones e uma linhagem comercial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10., 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves; Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 213.

SILVA, G. A. da; Muraore, L. Influência da fermentação maloláctica espontânea sobre a evolução da acidez volátil em vinhos Cabernet Sauvignon. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2003. 1 CD-ROM.

STILES, M. E. Bacteriocins produced by leuconostoc species. *J. Dairy Sci.*, v. 77, n. 9, p. 2718–2724, 1994.

TOMAR, A.; Eiteman, M. A.; Altman, E. The effect of acetate pathway mutations on the production of pyruvate in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 62, n. 1, p. 76–82, 2003.

VIDAL, M. T.; Poblet, M.; Constanti, M.; Bordons, A. Inhibitory effect of copper and dichlofluanid on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 52, n. 3, p. 223–229, 2001.

VUUREN, H. J. J. Van; Dicks, L. M. T. *Leuconostoc oenos*: A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 44, n. 1, p. 99–112, 1993.