

INDUÇÃO DA FERMENTAÇÃO MALOLÁCTICA EM VINHO GEWÜRZTRAMINER¹

INDUCTION OF MALOLACTIC FERMENTATION IN GEWÜRZTRAMINER WINE

Larissa Dias de Avila¹ Carlos Eugênio Daudt²

RESUMO

Fermentação maloláctica é o processo metabólico de degradação do ácido L-málico em ácido L-láctico e CO₂. É responsável pela redução da acidez total, além de contribuir para a estabilidade biológica e modificação de flavor nos vinhos. Em operações normais de vinificação a fermentação maloláctica normalmente ocorre em vinhos tintos, mas recentemente seu uso vem aumentando em alguns vinhos brancos, tal como Chardonnay. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o comportamento de duas culturas comerciais de *Leuconostoc oenos* na indução da fermentação maloláctica. Uvas da cv. Gewürztraminer foram vinificadas e inoculadas com duas culturas lácticas, Viniflora Oenos e Vino, em diferentes níveis de açúcar residual: 55; 21,9; 1,1 e 0,9g/l. Os níveis de açúcares, em duas repetições, foram comparados com a ocorrência espontânea da fermentação maloláctica (controle). A degradação do ácido málico foi acompanhada através de cromatografia em papel. As determinações dos ácidos orgânicos foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência. Foram avaliados os açúcares redutores, °Brix, pH, acidez total e álcool. Foi observada uma baixa incidência (22,7 %) de fermentação maloláctica nos vinhos. Naqueles em que ocorreu, foi necessário longo tempo para o término, entre 56 e 92 dias. Nos estágios com 1,1 e 0,9g/l de açúcares redutores, os vinhos inoculados e os controles não realizaram a fermentação maloláctica. Os isolados de bactérias nativas foram identificados como pertencentes ao gênero *Leuconostoc* e devido algumas características fisiológicas encontradas nos isolados do vinho inoculado suspeitou-se da perda de viabilidade das culturas puras. O comportamento dos

ácidos málico, acético, láctico, pirúvico e tartárico foi demonstrado pelos resultados.

Palavras-chave: cultura láctica, *Leuconostoc oenos*, mosto, vinho branco.

SUMMARY

Malolactic fermentation is the metabolic process of L-malic acid degradation in L-lactic acid and CO₂. It is responsible by the reduction in total acidity and also contributes to the biological stability and a flavor modification of the wines. In normal winery operation it occurs commonly in red wines. However, recently malolactic fermentation had been also used in some white wines, such as Chardonnay. The main aim of this work was to evaluate the behavior of two commercial strains of *Leuconostoc oenos* in the induction of malolactic fermentation. Gewürztraminer grapes were fermented and inoculated with two lactic cultures, Viniflora Oenos and Vino, in several residual sugar levels: 55.0 - 21.9 - 1.1 e 0.9g/l. The sugar levels were compared with spontaneous malolactic fermentation (control), with two repetitions. Degradation of malic acid was followed by paper chromatography. Organic acids determinations were performed using efficiency high liquid chromatography. Reducing sugars, °Brix, pH, total acidity and alcohol values were evaluated. A low incidence (22.7%) of the malolactic fermentation in wines was observed. However, in those wines in which malolactic fermentation occurred it took a long time to reach

¹Parte da Dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

²Farmacêutica Bioquímica, Mestre, Rua Tuiuti, 925/34, 97015-661, Santa Maria, RS. Autor para correspondência.

³Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Titular, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, UFSM.

the end, between 56 and 92 days. Using 1.1 and 0.9g/l of residual sugar the inoculated wines and the control did not undergo the malolactic fermentation. The wild lactic acid bacteria were identified as being as *Leuconostoc* genus and, due to some physiologic characteristics observed in the inoculated wine isolated, there was a raised suspicion that the cultures had lost the viability. The behaviour of the malic, acetic, lactic, piruvic and tartaric acids were demonstrates by the results.

Key words: *Leuconostoc oenos*, must, starter culture, white wine.

INTRODUÇÃO

A fermentação maloláctica (FML) é o processo metabólico, realizado por bactérias lácticas (BL), de descarboxilação do ácido L-málico resultando em ácido L-láctico e CO₂ (RANKINE, 1972). A FML é o principal meio para reduzir a acidez total, na maioria das vezes excessiva em vinhos jovens, ao mesmo tempo que proporciona maior estabilidade biológica e complexidade de aroma e sabor aos vinhos (DAVIS *et al.*, 1985).

A FML espontânea em vinhos brancos não é freqüente e tem sido considerada indesejada. No entanto, desde que cepas de *Leuconostoc oenos* tornaram-se disponíveis comercialmente, esta fermentação vem sendo realizada em vinhos brancos, como em Chardonnay (RODRIGUEZ *et al.*, 1990; AVEDOVECH JR. *et al.*, 1992). Culturas comerciais para a indução da FML em vinhos são disponíveis desde o início da década de 80. As vantagens da indução por inoculação incluem o melhor controle sobre o início e o término da FML, assim como sobre a cepa de BL responsável pelo processo.

A seleção de cepas de BL cada vez mais especializadas e resistentes às condições adversas do vinho, continua sendo explorada para uso na indução da FML e tem levado ao desenvolvimento de estudos de classificação e metabolismo deste grupo de bactérias em diversos laboratórios e regiões vitícolas (KUNKEE, 1967; TRACEY & BRITZ, 1987; DAVIS *et al.*, 1988; VAN VUUREN & DICKS, 1993). Nas regiões vitivinícolas brasileiras pouco é conhecido sobre as BL nativas responsáveis pela FML e raras vinícolas fazem uso da prática de indução por inoculação.

A execução deste trabalho teve como objetivos: (1) observar o comportamento de duas culturas comerciais de *Leuconostoc oenos*, Viniflora Oenos e Vino, na indução da FML em comparação

com as bactérias nativas dos vinhos que não foram inoculados; (2) verificar as alterações de determinados ácidos orgânicos durante a FML, e (3) identificar isolados de BL nativas, em nível de gênero, a fim de conhecer mais sobre a flora natural responsável pela FML.

MATERIAIS E MÉTODOS

Uvas da cv. Gewürztraminer oriundas de Garibaldi, RS, da safra de 1993, foram esmagadas e separadas do rãquis. A composição do mosto obtido é apresentada na Tabela 1. Este mosto foi submetido a decantação, após 10 horas em congelador a -11°C. Foi feita a adição de 30mg/l de SO₂, para a correção do açúcar para 22° Brix, e a adição de pé-de-cuba (2%) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* 20B isolada no Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (EMBRAPA).

Tabela 1 - Características químicas e conteúdo de ácidos orgânicos presentes no mosto e no vinho, nos estágios (55,0; 21,9; 1,1 e 0,9g/l de açúcar residual) da vinificação em que as culturas foram inoculadas.

Análises	Mosto	Estágios de inoculação (g/l de açúcar redutor)			
		55.00	21.90	1.10	0.90
* Brix	17,70	4,80	1,50	-1,40	-1,60
Acidez total (g/l)	9,15	9,30	7,72	7,72	7,27
Álcool (°G.L.)	--	10,00	11,50	12,30	12,70
pH	3,17	2,91	2,76	2,82	3,05
Ácido tartárico (g/l)	5,51	4,75	4,71	4,76	3,57
Ácido pirúvico (mg/l)	12,80	401,50	292,47	149,86	61,60
Ácido málico (g/l)	2,76	2,79	2,71	2,50	2,30
Ácido láctico (mg/l)	--	219,15	--	235,09	--
Ácido acético (mg/l)	342,03	761,86	788,68	745,15	847,13

Quando o mosto atingiu os seguintes estágios de fermentação, 55,0; 21,9; 1,1 e 0,9g/l de açúcar residual, seis porções de 2,2 litros do mosto em fermentação foram separadas. Quatro destas porções foram inoculadas com culturas comerciais de *Leuconostoc oenos*, sob a forma liofilizada e contendo aproximadamente 5 x 10¹¹ células viáveis por grama. Duas delas receberam a cultura Viniflora Oenos (VO), produzida por CHR HANSEN Ind. e Com. Ltda. e, as outras duas foram inoculadas com a cultura Vino (V), da Condimenta. Cada cultura foi inoculada diretamente

no vinho nas concentrações de 20g/2500 litros e 20g/150 litros, respectivamente, conforme instruções dos fabricantes, sendo que a cultura *Vino* exigiu uma rápida hidratação. As outras duas porções não sofreram inoculação e serviram como controle.

Na separação das porções o vinho foi retirado pela parte superior e inferior do tanque, de maneira que o volume de borra se aproximasse àquele do tanque original. Exceção foi feita para o último estágio (0,9g/l), no qual o vinho foi separado da borra por *trasfega*, cinco dias após o término da fermentação alcoólica. Todas as porções foram mantidas em garrações de vidro, munidos de rolhas de borracha com sistema de saída para o CO₂. A temperatura da fermentação alcoólica e maloláctica foi em média de 23 e 25°C, respectivamente.

O pH dos vinhos não foi corrigido antes da inoculação, no entanto alguns testes foram realizados onde foi feita a correção de pH do vinho para valores acima de 3,2, para observar a influência do pH sobre a incidência da FML.

Sólidos solúveis totais foram determinados com o uso de mostímetro (?Brix), açúcares redutores pelo método de Fehling Causse Bonans, acidez total por titulometria, álcool por destilação e ebulimetria e pH pelo método eletrométrico.

A degradação do ácido málico foi acompanhada por cromatografia em papel, segundo o método de RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1980). Durante a FML foram retiradas amostras e congeladas para análise quantitativa dos ácidos orgânicos individuais, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Todos os reagentes apresentaram grau analítico e as soluções foram preparadas com água ultrapura, qualidade Milli-Q. As amostras foram descongeladas em banho de água quente (em torno de 50°C), agitadas manualmente, submetidas a banho de ultra-som durante cinco minutos, filtradas com filtro de membrana 0,45µm e diluídas 1:1 com água.

O método cromatográfico foi desenvolvido num sistema modular VARIAN, equipado com bomba modelo n° 5050, detector UV/VIS modelo n° 5100, injetor tipo Reodyne, integrador modelo n° 4290, coluna de guarda (C₁₈, 5µm) modelo C-135 B e coluna Bondesil C₁₈ (250 x 4,6mm i.d., tamanho da partícula = 5µm). As condições cromatográficas foram: tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄) 0,2M, levado a pH 2,4 com ácido fosfórico 10%, como fase móvel; temperatura: ambiente; fluxo: 0,6ml/min.; absorvância: 210 nm.; sensibilidade do detector de 0,08AUFS.

Para a validação do método, cada ácido foi identificado pelo seu tempo de retenção (t_R) em comparação com as soluções padrões de compostos

puros e, pelo aumento da área do pico com a adição de cada ácido sobre uma amostra. A quantificação dos ácidos foi realizada pelo método do padrão externo, utilizando soluções padrões que consistiram da mistura dos ácidos em cinco concentrações diferentes.

Amostras de vinhos que não sofreram inoculação bacteriana e, amostras de vinhos inoculados com a cultura *Vino*, ambos do estágio 55g/l (C55 e V55, respectivamente), foram coletadas durante a FML para identificação em nível de gênero e confirmação das bactérias responsáveis pela FML. As amostras foram estriadas em placas contendo ágar APT acidificado a pH 4,5 e incubadas por seis dias a 32 °C. Após o crescimento, colônias foram isoladas em caldo e submetidas aos seguintes testes, segundo COLLINS & LYNE (1989) e PILONE *et al.* (1991): Produção de ácido láctico a partir de hexoses, coloração de Gram, prova da catalase, prova da heterofermentação, produção de manitol a partir da frutose e hidrólise da arginina com formação de amônia. Este último foi feito em caldo APT pH 4,5 acrescido de 10 g/l de glicose e 6g/l de arginina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estágio de 55g/l de açúcar residual, o vinho não inoculado (controle) terminou a FML em torno de 92 dias e o vinho inoculado com a cultura *Vino* em torno de 84 dias. No estágio de 21,9g/l de açúcar residual, para o vinho inoculado com a cultura *Vino*, a FML foi completada após o 59° dia. Neste dia, a concentração de ácido málico se apresentava em 61,76mg/l. Na sua repetição a FML ocorreu em torno de 77 dias. No vinho inoculado com *Viniflora Oenos*, a degradação completa do ácido málico ocorreu em aproximadamente 56 dias (Figura 1). Nas repetições desses e nos demais tratamentos (cultura ou controle x estágio) a FML não ocorreu, durante o período de estudo de 136 dias (Tabela 2). Os resultados demonstraram uma baixa incidência (22,7%) de FML, sendo que quando a FML ocorreu, foi necessário um longo período para o seu término.

Pode ser observado que no momento da inoculação, os valores de pH se situaram abaixo de 3,0, na maioria dos casos (Tabela 1). É bem conhecido o efeito repressivo de fatores como o pH e etanol sobre a taxa de crescimento e a duração da fase "lag" em *Leuconostoc oenos*, podendo inclusive levar a perda de viabilidade (FERNANDES *et al.*, 1991). Na maioria dos testes em que foi feita a correção de pH para valores acima de 3,2, antes da inoculação, a FML também não ocorreu. Isso demonstrou que possivelmente há outros fatores que possuem maior

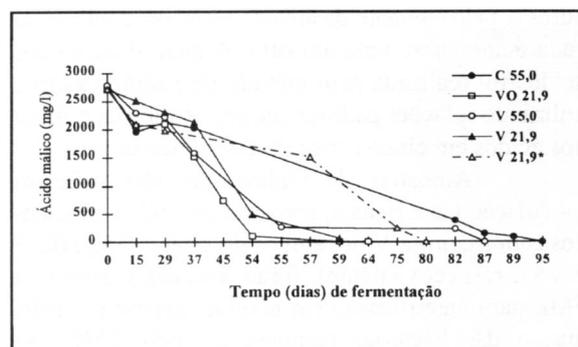


Figura 1 - Concentrações de ácido málico durante a fermentação maloláctica nos vinhos inoculados com as culturas Vино (V) e Viniflora Oenos (VO) e no controle (C), nos estágios de 55,0 e 21,9g/l de açúcar.

* Representa uma das duas fermentações realizadas.

Tabela 2 - Concentrações finais de ácidos orgânicos.

Tratamentos			Ácidos orgânicos				
Culturas	Níveis de açúcar(g/l)	Dias	Tartárico (g/l)	Pirúvico (mg/l)	Málico (g/l)	Láctico (g/l)	Acético (g/l)
Controle	55,00	87,0	5,03	72,30	1,60	0,15	--
Controle	55,00	95,0	4,48	0,00	0,00	2,12	1,47
VO*	55,00	87,0	4,67	76,42	1,72	0,24	1,00
Vino	55,00	87,0	4,80	0,00	0,00	2,37	0,97
Vino	55,00	87,0	4,80	86,60	1,69	0,24	--
Controle*	21,90	94,5	4,43	78,06	1,67	--	0,89
VO	21,90	64,0	5,26	0,00	0,00	1,99	0,82
VO	21,90	59,0	5,08	73,97	1,52	--	0,36
Vino*	21,90	69,5	5,13	0,00	0,03	1,45	1,03
Controle*	1,10	86,0	4,43	121,75	1,80	--	1,20
VO*	1,10	86,0	5,21	106,07	1,62	--	0,78
Vino*	1,10	86,0	4,20	88,86	1,79	--	0,95
Controle*	0,90	81,0	4,39	69,45	1,78	--	1,03
VO	0,90	88,0	4,63	49,56	1,47	--	0,93
Vino	0,90	81,0	3,64	49,28	1,59	--	0,86

* Médias entre duas fermentações;
VO = Cultura láctica Viniflora oenos;
Vino = Cultura láctica Vино.

influência sobre a incidência da FML, além do pH. A concentração de nutrientes, ou de um nutriente específico seria provavelmente um desses fatores. Sabe-se que BL possuem complexas exigências nutricionais (SHARPE & FRYER, 1965), e que na vinificação um longo contato com a película resulta na extração de fatores estimulantes para o seu crescimento (WIBOWO *et al.*, 1985), o que não é prática

comum com cultivares para vinificação em branco. O uso da debourbage pode ter colaborado para a baixa incidência da FML nesta cultivar, daí a conveniência de reduzir ao mínimo o uso de operações de clarificação para este tipo de vinho, quando se pretende induzir a FML.

Os resultados dos testes de identificação das BL isoladas durante a FML, os quais são demonstrados posteriormente, não permitem a afirmação de que as culturas inoculadas foram responsáveis pela FML. Foi demonstrado que os isolados do tratamento V55, não apresentaram o caracter de formação de amônia a partir da arginina ao contrário do isolado da cultura Vино liofilizada, utilizada como cepa de referência. Estes testes foram feitos com um vinho inoculado porque a FML foi muito lenta, o que colocou em dúvida a eficiência e

a viabilidade das culturas. Estes resultados sugerem a perda de viabilidade da cultura após a inoculação, bem como o desenvolvimento de cepas nativas que conduziram a FML neste tratamento, o que também pode ter acontecido com os demais.

Observou-se que os tratamentos nos quais ocorreu a FML foram aqueles que apresentaram maior teor de açúcar residual (55,0 e 21,9 g/l) no momento da inoculação. Se bactérias nativas realizaram a FML nestes casos, é possível que nestes estágios o vinho tenha permanecido com um volume maior de borra, em relação aos demais estágios. Isto pode ter enriquecido o meio com aminoácidos, oriundos das células de leveduras depositadas, no período após a fermentação alcoólica, ou até mesmo ter permanecido um maior número de BL. Se alguma das fermentações foi realizada pelas culturas inoculadas,

poderia se atribuir ao fato do teor alcoólico não ser ainda tão elevado e aos nutrientes não terem sido totalmente esgotados do meio pelas leveduras. Estes fatores podem ter colaborado para a manutenção da viabilidade das bactérias. Neste caso, salienta-se a importância na perda de viabilidade das BL, do efeito sinérgico do álcool e da falta de nutrientes sobre o pH, já que no último estágio da vinificação houve um aumento do pH inicial, e mesmo assim a

FML ocorreu somente nos estágios anteriores, onde o pH apresentou-se inferior a 3,0. Em pH inicial mais baixo, mas com esses efeitos sinérgicos atenuados, a FML tornou-se viável.

Houve redução de 9,42 % do ácido málico durante a fermentação alcoólica (Tabela 1) o qual, posteriormente, foi totalmente metabolizado durante a FML. Para os vinhos que não realizaram a FML também houve redução nos níveis de ácido málico, permanecendo em média 1,7g/l (Tabela 2). Para os estágios inoculados após a fermentação alcoólica esta diminuição foi de 25,2 e 45,2 %. A diminuição do teor de ácido málico pode ser devido ao ataque de leveduras aeróbicas, as quais atacam ácidos orgânicos ocasionando uma queda na acidez fixa e aumento da acidez volátil, já que estes vinhos permaneceram com a superfície em contato com o ar por muito tempo, a espera da FML. Como não houve aumento do ácido láctico nestas amostras, não se tratou de uma FML parcial, ou de ataque por outras BL.

Ao final da fermentação alcoólica o vinho apresentou 235,1mg/l de ácido láctico (Tabela 1). Níveis estes que subiram para 1,6 e 2,3g/l ao final da FML, os quais estão incluídos dentro da faixa citada por OLALLA HERRERA *et al.* (1993).

O estado sanitário das uvas não foi dos melhores, pois havia muita podridão nos cachos, trazendo como conseqüência um nível inicial já elevado de ácido acético no mosto (342,03mg/l). Durante a fermentação alcoólica este nível aumentou para 780 mg/l e, provavelmente, as condições da microvinificação acrescidas das condições sanitárias das uvas devem ter influenciado as quantidades encontradas. Este nível foi ainda maior, como seria de se esperar, quando os vinhos foram deixados em repouso por longo tempo, a espera da FML. Tanto leveduras aeróbicas como bactérias acéticas podem ter se desenvolvido. Devido a soma destes fatores as médias de ácido acético nos tratamentos foram elevadas, 1,07g/l nos vinhos em que a FML ocorreu e 0,91 g/l naqueles em que, apesar da longa espera, a FML não ocorreu.

Os dados demonstraram uma aparente liberação de ácido pirúvico durante a fermentação alcoólica (Tabela 1), pois os valores em 4,8 °Brix se apresentaram mais elevados em relação ao mosto. Estes valores diminuíram a medida que a fermentação se aproximou do final, provavelmente metabolizado pelas leveduras, deixando um residual que foi consumido durante a FML (Figura 2). Em todos os tratamentos os valores de ácido pirúvico chegaram a zero e uma média de 83,14mg/l foi encontrada nos vinhos que não sofreram FML.



Figura 2 - Concentrações de ácido pirúvico (mg/l) durante a fermentação maloláctica.

* Representa uma das duas fermentações, ou seja, a repetição do tratamento.

A baixa incidência de FML nos vinhos impossibilitou a utilização de um número adequado de repetições para a aplicação do tratamento estatístico aos dados obtidos.

As médias de acidez total e pH, ao final da FML foram de 7,82g/l e 3,27 e, para aqueles que não realizaram a FML foram de 8,07g/l e 3,16, respectivamente. A redução da acidez total causada pela FML não foi marcante, em relação aos vinhos que não realizaram a FML. Considerando a elevação de ácido acético em todos os vinhos, pode-se dizer que a redução, em torno de 50%, dos valores de ácido málico nos vinhos que não realizaram a FML, provavelmente foi a responsável pela média de acidez total nestes vinhos.

As médias de açúcares redutores e álcool, ao final da FML foram de 0,90g/l e 12,48 °GL e, para aqueles em que não houve FML foram de 0,96g/l e 12,65 °GL, respectivamente, o que demonstra que não houve parada de fermentação alcoólica em nenhum dos casos.

O aspecto das colônias em meio sólido (APT pH 4,5), para todos os isolados, foi de formato circular, bordas regulares, superfície lisa, aparência translúcida e na sua maioria com diâmetro menor que 1,0mm. Em caldo (2 a 4 dias a 30°C) apresentaram formação de sedimento e turvação da solução.

Todos os isolados se apresentaram como cocos Gram positivos, arranjados em pares ou longas cadeias. Todos foram catalase negativos, formaram ácido láctico a partir das hexoses, apresentaram caracter heterofermentativo e produziram manitol a partir da frutose.

O teste da produção de amônia a partir da arginina foi positivo para a bactéria de referência (Vino), os demais foram negativos. Portanto, foi a única característica que diferiu entre os isolados e poderia auxiliar em alguma distinção entre eles.

Pode-se concluir que a bactéria nativa responsável pela FML no controle (C55) pertence ao gênero *Leuconostoc* e, poderia ser dito que a espécie é *Leuconostoc oenos*, visto que foi isolada do vinho durante a FML. *L. oenos* é a única espécie do gênero que é capaz de sobreviver nos níveis de álcool e de pH do vinho; com base nestas características esta espécie foi diferenciada dos outros membros do gênero *Leuconostoc* (GARVIE & FARROW, 1980; GARVIE, 1986).

CONCLUSÕES

Ocorre baixa incidência da fermentação maloláctica nos vinhos brancos que está relacionada com a falta de nutrientes para as bactérias lácticas, em associação com outros fatores, tais como a elevada quantidade de etanol presente no momento da inoculação. As bactérias nativas quando realizam a fermentação maloláctica degradam de maneira lenta e total, o ácido L-málico e pirúvico.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a vinícola Maison Forestier, ao CNPQV-EMBRAPA, a HA-LA do Brasil e a Condimenta pelo apoio prestado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVEDOVECH JR., R.M., McDANIEL, M.R., WATSON, B.T., *et al.* An evaluation of combinations of wine yeast and *Leuconostoc oenos* strains in malolactic fermentation of Chardonnay wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 43, n. 3, p. 253-260, 1992.
- COLLINS, C.H., LYNE, P.M. **Metodos microbiologicos**. 5. ed. Zaragoza: Acribia, 1989. 524 p.
- DAVIS, C.R., WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., *et al.* Practical implications of malolactic fermentation: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 36, n. 4, p. 290-301, 1985.
- DAVIS, C.R., WIBOWO, D., FLEET, G.H., *et al.* Properties of wine lactic acid bacteria: their potencial enological significance. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n.2, p. 137-142, 1988.
- FERNANDES, L., LOUREIRO, V., FAIA, A. M. Efeito do etanol no crescimento de bactérias lácticas. **Revista Portuguesa de Farmácia**, Lisboa, v. XLI, n. 1, p. 44-48, 1991.
- GARVIE, E.I. Gram-positive cocci. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E., *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. V. 2, Section 12, p. 1071-1079.
- GARVIE, E.I., FARROW, J.A.E. The differentiation of *Leuconostoc oenos* from non-acidophilic species of *Leuconostoc*, and the identification of five strains from the american type culture collection. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 31, n.2, p. 154-157, 1980.
- KUNKEE, R.E. Malo-lactic fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 9, p. 235-279, 1967.
- OLALLA HERRERA, M., LÓPEZ GARCÍA, H., VILLALÓN MIR, M., *et al.* Determination by high performance liquid chromatography of organic acids in spanish rosé wines from the Alpujarra-Contraviesa region of Granada. **Journal of Liquid Chromatography**, Granada, v. 16, n. 14, p. 3101-3112, 1993.
- PILONE, G.J., CLAYTON, M.G., VAN DUIVENBODEN, R.J. Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 42, n. 2, p. 153-157, 1991.
- RANKINE, B.C. Influence of yeast strain and malo-lactic fermentation on composition and quality of table wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 23, n. 4, p. 152-158, 1972.
- RIBÉREAU-GAYON, J., PEYNAUD, E., SUDRAUD, P., *et al.* **Tratado de enología, ciencias y tecnicas del vino**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1980. 671 p.
- RODRIGUEZ, S.B., AMBERG, E., THORNTONT, R.J., *et al.* Malolactic fermentation in Chardonnay: growth and sensory effects of commercial strains of *Leuconostoc oenos*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, p. 139-144, 1990.
- SHARPE, M.E., FRYER, T.F. Media for lactic acid bacteria. **Laboratory Practice**, p. 697-701, jun, 1965.
- TRACEY, R.P., BRITZ, T.J. A numerical taxonomic study of *Leuconostoc oenos* strains from wine. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 63, p. 523-532, 1987.
- VAN VUUREN, H.J.J., DICKS, M.T. *Leuconostoc oenos*: A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 44, n. 1, p. 99-112, 1993.
- WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., DAVIS, C.R., *et al.*