

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DAS NECESSIDADES NUTRICIONAIS DE
BACTÉRIAS ACÉTICAS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO
ACÉTICO**

VITÓRIO DOS SANTOS JUNIOR

Biólogo

Dr. FUMIO YOKOYA

Orientador

Dra. WILMA APARECIDA SPINOSA

Co-orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, para
obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Santos Junior, Vitório dos
Sa59 Estudo das necessidades nutricionais de bactérias acéticas para a produção de ácido acético / Vitório dos Santos Junior. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Fumio Yokoya
Co-orientador: Wilma Aparecida Spinosa
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Nutrientes. 2. *Acetobacter*. 3. Álcool desidrogenase. 4. Produtividade. I. Yokoya, Fumio. II. Spinosa, Wilma Aparecida. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(Cars/fea)

Título em inglês: Study of the acetic bacteria nutritional necessity for the acid production

Palavra-chave em ingles (Keywords): Nutrients, Acetobacter, Alcohol dehydrogenase, Productivity

Titulação: Doutor em Ciências de Alimentos

Banca examinadora: Fumio Yokoya

Lucielen de Oliveira dos Santos

Luciana Francisco Fleuri

Hélia Harumi Sato

Reinaldo Bastos

Data da defesa: 26/02/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Fumio Yokoya
FEA/UNICAMP - Orientador**

**Profa. Dra. Lucielen de Oliveira dos Santos
FEQ / UNICAMP - Membro Titular**

**Prof. Dra. Luciana Francisco Fleuri
UNIMEP - Membro Titular**

**Prof. Dra. Hélia Harumi Sato
FEA / UNICAMP - Membro Titular**

**Prof. Dr. Reinaldo Bastos
UFSCAR - Membro Titular**

**Prof. Dr. André Luiz Dorini de Oliveira
BIOMAVALE - Membro Suplente**

**Prof. Dr. Marcio Caliar
UFG - Membro Suplente**

**Prof. Dra. Lucia Regina Durrant
FEA / UNICAMP - Membro Suplente**

DEDICATÓRIA

Às mulheres da minha família: Eneida e Julia.

Os grandes amores da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor Fumio Yokoya, pela orientação sempre muito tolerante e eficaz.

A Wilma Spinosa, pelas muitas horas dedicadas ao desenvolvimento dos experimentos e na condução da minha vida.

Ao meu amigo Estevão pela fundamental dedicação no fechamento desse trabalho.

A minha esposa Eneida, que sempre me incentivou e carinhosamente me pressionou para que pudesse terminar este trabalho.

Aos meus amigos, que sempre estiveram por perto e colaboraram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste. Em especial ao Carlinhos e ao André pela grande ajuda no desenvolvimento da tese.

As minhas alunas Renata e Kamille que apareceram na última hora e me ajudaram muito no encerramento dos experimentos.

Agradeço aos funcionários do Vinagre Dom Spinosa, em especial Milton e Airton, que dedicaram muitas horas de seu trabalho para que o meu pudesse ficar pronto.

A UNIP, FAI e BIOMAVALE, pela colaboração e disponibilização de materiais durante o desenvolvimento do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE GRÁFICOS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
<i>SUMMARY</i>	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Métodos de produção de vinagre.....	4
3.1 Métodos de produção de vinagre.....	4
3.2 Minerais e metabolismo bacteriano.....	5
3.3 Nutrição de bactérias acéticas.....	13
3.4 Taxonomia.....	22
3.5 Análise Molecular.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Ativação do reator de fermentação submersa.....	28
4.2 Planejamento fatorial para estudo qualitativo de requerimento de minerais por bactérias acéticas.....	28
4.2.1 Estudo de requerimento de minerais para bactérias acéticas.....	32
4.3 Parâmetros de eficiência do processo.....	34
4.3.1 Rendimento.....	35

4.3.2	Produtividade.....	36
4.4	Análise da expressão gênica.....	36
4.4.1	Extração de RNA e DDRT-PCR	36
4.4.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida com prata.....	38
4.5	Isolamento e identificação das linhagens de <i>Acetobacter</i> sp.	39
4.5.1	Características morfológicas dos isolados	40
4.5.2	Purificação dos isolados.....	40
4.5.3	Triagem e identificação fenotípica ao nível de família e gênero das linhagens isoladas.....	40
4.5.4	Teste de produção de oxidase	40
4.5.5	Teste de produção de catalase	41
4.5.6	Teste de produção de indol do triptofano	42
4.5.7	Teste de produção de proteases.....	42
4.5.8	Teste de redução de nitrato.....	42
4.5.9	Teste de crescimento em meio de Hoyer	43
4.5.10	Teste de produção de ácido a partir de glicose	43
4.5.11	Teste de produção de dihidroxiacetona a partir de glicerol	44
4.5.12	Teste de produção de celulose.....	44
4.5.13	Teste de produção de pigmento marron.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	Estudo do requerimento nutricional	46

5.1.1	Ativação do reator submerso de fermentação acética	46
5.1.2	Resultados dos ensaios qualitativo de requerimento de minerais para linhagem de <i>Acetobacter</i> sp. em reator submerso	46
5.1.2.1	Seleção de minerais	46
5.2	Isolamento e Identificação	66
5.2.1	Isolamento	66
5.2.2	Identificação fenotípica do gênero <i>Acetobacter</i>	67
5.2.3	Caracterização bioquímica dos isolados	68
5.3	Expressão de RNA mensageiro de Álcool desidrogenase	69
6	CONCLUSÕES	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8	ANEXO	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reator submerso de fermentação acética	30
Figura 2	Detalhes dos mecanismos de controle do reator de fermentação submersa	30
Figura 3	Teste de pareto dos efeitos de minerais sobre a produtividade.....	62
Figura 4	Gel de poliacrilamida 8% com marcadores moleculares para o gene da enzima álcool desidrogenase (ADH)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Meio de crescimento definido para <i>Acetobacter</i>	17
Tabela 2	Composição mínima do meio para crescimento de <i>Acetobacter</i>	18
Tabela 3	Meio de produção definido para <i>Acetobacter</i>	30
Tabela 4	Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial 2^{5-1} para estudo de efeito de minerais na produção de ácido acético	32
Tabela 5	Planejamento fatorial $2^{(5-1)}$ para estudo de efeito de minerais na produção de ácido acético.....	33
Tabela 6	Resultados dos ciclos fermentativos para ativação do reator	47
Tabela 7	Resultados dos efeitos dos minerais no rendimento e produtividade ..	48
Tabela 8	Médias dos ciclos fermentativos e análise estatística de tempo de fermentação, rendimento e produtividade	57
Tabela 9	Análise estatística do experimento fatorial de seleção de minerais.....	61
Tabela 10	Comparação das características das linhagens isoladas com linhagens de referências.....	68

RESUMO

As bactérias acéticas são utilizadas na produção de vinagre. O requerimento nutricional das bactérias acéticas é pouco conhecido e a reprodução desses microrganismos é muito difícil. Os reatores de fermentação acética submersa promovem condições de estresse fisiológico: acidez (acima de 10% p/v), teor alcoólico (2% p/v) e oxigenação (0,4 vvm). Esses parâmetros são considerados extremos e indicam a necessidade de ativação de rotas metabólicas específicas, para a manutenção da capacidade de conversão álcool-ácido acético e divisão celular. Este estudo tem como objetivo contribuir na avaliação qualitativa e quantitativa do efeito de minerais sobre a produtividade de ácido acético, que é definida como a porcentagem de ácido acético produzido em 24 horas. Os experimentos foram conduzidos com linhagem de *Acetobacter* sp., proveniente de indústria produtora de vinagre. As etapas do trabalho foram: ativação do reator com nutriente padrão; teste de efeitos dos minerais, empregando como ferramenta estatística um delineamento fatorial incompleto ($2^{(5-1)}$), isolamento e identificação dos microrganismos, utilizando provas bioquímicas clássicas e análise molecular da expressão de RNA mensageiro, por meio da técnica do DDRT/PCR, com utilização de *primers* da enzima álcool desidrogenase (ADH). Com os resultados obtidos a partir de um ensaio fatorial incompleto para a linhagem estudada, foram selecionados como minerais que aumentam a produtividade, são eles: o ferro, o molibdênio e o manganês e, ainda, como minerais que diminuem a produtividade, o zinco e o boro. A linhagem isolada do reator apresentou todas as características bioquímicas do gênero *Acetobacter* e a análise molecular evidenciou a expressão do gene para a enzima álcool desidrogenase em todos os experimentos.

SUMMARY

The acetical bacteria are used in vinegar production. The nutritional requirement of acetical bacteria is poorly known, and the maintenance of these microorganisms is too difficult. The reactors of submerged acetical fermentation promote conditions of physiologic stress: acidity (up to 10% p/v), alcohol (2%p/v) and oxygenation (0,4 vvm). These parameters are considerable extremes and indicate the necessity of the activation of specific metabolic to the maintenance of alcohol-acetic acid transformation capacity and cell division. This research has in view to contribute to the qualitatively and quantitatively evaluation of minerals effects on the productivity of acetic acid, which is defined as the acetic acid percentage produced until 24 hours. These experiments were conducted with of *Acetobacter* sp. strain, proceeding from vinegar industries. The work steps were: activation of the reactor with standard nutrient; minerals effects tests using the fractional factorial design (2^{5-1}) as statistic tool; isolation and identification of the microorganisms, employing classical biochemistry proofs and molecular analysis of the RNA messenger expression, through DDRT/PCR techniques, applying alcohol dehydrogenase enzyme primers. With the results obtained from the fractional factorial design for the strains studied, were selected minerals as the iron, the molybdenum and the manganese that increase productivity and, yet, minerals as zinc and boron that decrease it. The reactor isolated strain presented all biochemical characteristics of *Acetobacter* genus and the molecular analysis evidenced the expression of the gene for the enzyme alcohol dehydrogenase in all experiments.

1. INTRODUÇÃO

As necessidades nutricionais de bactérias acéticas são variáveis importantes na busca de altos rendimentos e de produtividade pelas indústrias produtoras de vinagre. Este tema foi abordado por Santos Junior (2004), que estudou a influência de minerais e vitaminas para o crescimento de bactérias acéticas. Neste trabalho, espera-se contribuir no estudo qualitativo e quantitativo das necessidades de minerais para a produção de ácido acético em fermentador industrial submerso.

Estima-se que o consumo nacional *per capita* de vinagre seja de, aproximadamente, 2L/ano. Tal índice pode ser considerado muito aquém daquele verificado nos Estados Unidos e na Europa, onde o produto também é utilizado em outras atividades cotidianas, como na lavagem de roupa para fixação de cor, retirada de manchas em aço inoxidável, tecidos, recipientes de alumínio, além da eliminação de odores indesejáveis do ambiente e de garrafas térmicas (SPINOSA, 2002).

Segundo informação da Associação Nacional das Vinagreiras, ANAVI, obtida em dezembro de 2008, a indústria da fermentação acética no Brasil conta com parque de produção de vinagre por processo submerso composto por cerca de 30 unidades, que movimentaram cerca R\$ 200.000.000,00 em 2007. A União Brasileira de Vitivinicultura - UVIBRA, localizada no Estado do Rio Grande do Sul, mostra que a produção nacional de vinagre de vinho nos anos de 2005, 2006 e

2007 foi de, respectivamente, 1.887.839, 2.219.250 e 2.835.167L. No ano de 2005, 2006 e 2007, a produção de Agrin foi de, respectivamente, 7.419.736, 7.677.906 e 7.188.135 L.

Agrin é o fermentado acético de mosto de álcool de cana-de-açúcar, adicionado de borra de fermentação de vinhos tintos e brancos. Recentemente, algumas indústrias de vinagre têm usado corante caramelo ao Agrin, como substituinte à borra de fermentação de vinho.

O primeiro equipamento comercial para o processo submerso, principal processo usado na fabricação de vinagre foi descrito por Hromatka (1952). Patenteado por Hromatka e Ebner (1955), esse processo vem sendo melhorado pela empresa Frings, sediada em Bonn, na Alemanha.

A fermentação do vinagre, na verdade um processo oxidativo, consiste na oxidação de soluções diluídas de etanol por *Acetobacter* sp. com oxigênio do ar para ácido acético e água. A solução alcoólica é chamada de calda. Esta deve conter etanol, água e nutrientes para a bactéria acética (AQUARONE; ZANCANARO, 1990).

No estado de São Paulo, os insumos mais usados na produção de vinagre são o Acetozim[®], patenteado pela empresa Frings, produzido e comercializado por sua subsidiária brasileira, e o NutriCA, da empresa Carnevalli Biotecnologia. Ambos os estabelecimentos localizam-se em Piracicaba-SP. Estes produtos são a mistura de nutrientes adicionados à calda da fermentação acética,

com o objetivo de fornecer minerais e vitaminas. O custo aproximado do quilograma é de R\$7,00¹). A recomendação de uso é de 0,1% (p/v). Na prática, sabe-se que a adição desses nutrientes aumenta o rendimento da produção de ácido acético em até 50% (FRINGS..., 1996)

Os reatores de fermentação acética submersa promovem condições de estresse fisiológico, ou seja, acidez (maior que 10% p/v), teor alcoólico (2% p/v) e oxigenação (0,4 vvm)². Tais parâmetros são considerados extremos e indicam a necessidade de ativação de rotas metabólicas específicas para a manutenção da capacidade da conversão álcool - ácido acético e divisão celular.

Este estudo foi motivado pela falta de informações sobre as necessidades nutricionais específicas de minerais para a produção de vinagre. A otimização das condições de produção e rendimento do processo de fermentação levam a custos operacionais mais baixos.

¹ Cotação janeiro/2009

² vvm é a medida da quantidade de oxigênio no reator e significa volumes de ar por volumes de meio líquido por minuto

2. OBJETIVOS

O trabalho pretende contribuir para o levantamento das exigências nutricionais qualitativas e quantitativas de linhagens do gênero *Acetobacter* em ambiente industrial. Para tal, foi necessário o estudo de:

- Requerimento de minerais (micronutrientes);
- Conhecimento da expressão da enzima álcool desidrogenase em ambiente de estresse fisiológico, por meio da análise de RNA mensageiro.
- Relação da expressão da enzima álcool desidrogenase e o fornecimento adequado de minerais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento do conhecimento científico sobre o vinagre e sua produção significa, de algum modo, a abordagem acerca do desenvolvimento histórico da química e da microbiologia. Entre os marcos aí implicados estão o reconhecimento de que a fermentação alcoólica e a produção de vinagre são processos distintos; o da existência de papel relevante do oxigênio na formação do vinagre; o da determinação da estrutura química do ácido acético; o da natureza biológica da produção do vinagre entre elas as necessidades nutricionais dos microrganismos envolvidos nessa transformação (SPINOSA, 2002).

3.1 Métodos de produção de vinagre

Existem três principais processos de conversão microbiológica de uma solução diluída de etanol em vinagre: o processo lento, denominado Orleans ou Francês, rápido ou Alemão; e o Submerso, que é atualmente a via de conversão mais utilizada pela indústria de vinagre, utilizado na condução dos experimentos deste trabalho (MORETO et al, 1988, apud SPINOSA, 2002).

No processo submerso, as bactérias acéticas encontram-se submersas no líquido a fermentar, multiplicando-se e retirando energia da reação de oxidação do álcool etílico a ácido acético. Para catalisar essa reação, que lhes fornece energia, as bactérias acéticas necessitam do suprimento contínuo e adequado de

oxigênio em todos os pontos do tanque. Interrupções breves, de minutos apenas, no fornecimento de oxigênio, sobretudo nas fases finais de fermentação, afetam quase que definitivamente o rendimento (FRINGS MICRODYN DO BRASIL, 1996; SPINOSA, 1996).

A matéria-prima diluída e corrigida em seus nutrientes é colocada no fermentador e inoculada com vinagre concentrado, sem ter sido submetido a filtração ou com uma suspensão de bactérias acéticas. O equipamento é automatizado, contendo um alcoógrafo responsável pelo registro contínuo do teor alcoólico do meio e também pelo descarregamento automático do vinagre pronto. O produto final contém ainda cerca de 0,2% de álcool, tendo em vista que o consumo total deste último prejudica as bactérias acéticas e pode provocar deterioração no vinagre acabado. Imediatamente após a retirada do vinagre, há o recarregamento com matéria-prima, utilizando-se como inóculo parte do volume de vinagre feito anteriormente, que é deixado no tanque. A partir daí, a cada 24 horas, um volume de vinagre correspondente a 1/3 do valor total do tanque é retirado, obtendo-se aumento de acidez da ordem de 4% ao dia (SPINOSA, 1996; ZANCANARO, 2001).

O acetador destaca-se pela produtividade, muito superior aos demais processos e, portanto, adequado aos moldes industriais modernos. Entretanto, seus inconvenientes estão no alto custo de investimento inicial; na necessidade de técnicos especializados para a manutenção; e na obrigatoriedade de constância

de produção, pois pequenas interrupções na aeração levam ao recomeço do processo, o que pode levar meses. Há também a necessidade de infra-estrutura completa. O vinagre produzido em 24 a 30 horas por tal processo mostra-se turvo, requerendo tratamentos de filtração para obter-se limpidez adequada (SPINOSA, 1996; ZANCANARO, 1988).

A expressão “fermentação acética submersa” demonstra a analogia dos procedimentos usuais da produção de antibióticos e de cultivo de leveduras. Neste caso, as bactérias executam o trabalho fermentativo em um líquido, que é a mistura alcoólica. Esta se realiza sem matéria de contato, como cavacos de madeira e carvão, que são utilizados nos processos com geradores. As bactérias sempre estão submersas no líquido a fermentar, onde se multiplicam e oxidam a mistura alcoólica em vinagre (FRINGS MICRODYN DO BRASIL, 1996; SPINOSA, 1996).

Diversos métodos de acetificação submersa foram patenteados nos últimos tempos, Acetador *Frings* é o mais difundido na indústria de vinagre. Segundo o fabricante, desde 1932, em termos mundiais, foram fornecidos aproximadamente 2000 aparelhos, entre Geradores e Acetadores, para a fabricação de vinagre. O equipamento foi patentado por Heinrich Frings, a partir de conclusões desenvolvidas por Otto Hromatka e Heinrich Ebner, em 1949, quando estes trabalhavam na referida empresa (FRINGS MICRODYN DO BRASIL, 1996).

A fermentação submersa para obtenção de vinagre tem as seguintes vantagens em relação aos outros métodos: (1) a velocidade de oxidação do etanol é 30 vezes mais rápida do que em qualquer outro processo; (2) a eficiência de ativação do microrganismo é maior; (3) as dimensões necessárias do equipamento de fermentação são menores do que para outros; (4) obtém-se rendimentos de 95 a 98% do teórico; (5) o processo pode ser totalmente automatizado; (6) a relação de produtividade e capital investido é alta (NDOYE et al., 2007a).

3.2 *Minerais e o metabolismo bacteriano*

As bactérias contêm grandes quantidades de pequenas moléculas e de macromoléculas. A sua massa celular é formada basicamente pelos seguintes elementos: carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio. Elementos como fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, sódio e ferro são menos abundantes, porém não menos importantes para o metabolismo bacteriano. Para a perfeita função celular as bactérias necessitam ainda de micronutrientes metálicos, que fazem parte das enzimas. Os fatores de crescimento mais comumente requeridos são as vitaminas, na maioria das vezes atuantes como co-enzimas ou como precursores importantes do metabolismo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

Muitas enzimas requerem um ou mais cofatores não protéicos para sua função catalítica, que pode ser uma molécula orgânica, ou um componente inorgânico como um íon metálico. Em algumas enzimas o cofator é participante direto do processo catalítico; em outras ele serve como transportador transitório de algum grupo funcional específico derivado do substrato. Embora esses cofatores enzimáticos ocorram em pequenas quantidades, nas células são essenciais para a ação de muitas enzimas, desempenhando papel vital no metabolismo celular (FLORKIN; STOTZ, 1971; LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Os minerais podem funcionar de três formas diferentes: ter atividade catalítica própria sobre uma reação química, sendo esta aumentada pela enzima; formar um complexo com o substrato e com o sítio catalítico da enzima; e funcionar como receptor e doador de elétrons em algum momento do ciclo da reação, especialmente nas reações de óxido-redução (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Para o cultivo de microrganismos em laboratório é necessário a adição de minerais ao meio, principalmente, quando são utilizadas fontes de nutrição com composição conhecida e de alta pureza, o que pode acarretar deficiência desses elementos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

Em materiais biológicos, o ferro ocorre primariamente na forma de complexos. O ferro livre, na forma iônica, ocorre somente em casos negligenciáveis. Desta forma, o metabolismo do ferro consiste na transformação

bioquímica da forma complexada. Estes compostos facilitam o transporte de elétrons e geralmente estão associados à fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. É componente fundamental dos citocromos, catalase, peroxidases, ferridoxina, NAD-desidrogenase e flavoproteínas (FLORKIN; STOTZ, 1971).

Zhang, Liu e Shen (2005) demonstraram que o rendimento do processo de produção de hidrogênio por *Clostridium pasteurianum* está diretamente relacionado com a concentração de ferro (Fe) do meio de fermentação. Isto indica que o referido mineral tem interferência direta na escolha das rotas metabólicas a serem ativadas.

Moore e Helmann (2005) estudaram as metaloproteínas em *Bacillus subtilis* e como o fornecimento de ferro (Fe), zinco (Zn) e manganês (Mn) interfere na homeostase do microrganismo. Os autores citaram a necessidade destes minerais na formação estrutural das proteínas e também como cofatores para ativação enzimática.

O íon zinco é um componente essencial de diversas enzimas, presente em muitas desidrogenases dependentes de NAD^+ ou NADP^+ . Estas promovem a transferência de íons hidreto de moléculas de substrato para as co-enzimas. É também um componente essencial das polimerases do DNA e RNA, participando assim das importantes reações envolvidas na replicação e transcrição da informação genética (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006).

Saravanan, Madhaiyan e Thangaraju (2007) estudaram a capacidade de metabolização de zinco (Zn) por *Gluconacetobacter diazotrophicus* participante da rizosfera de cana-de-açúcar, café e arroz. Foi relacionado a capacidade de metabolização do zinco com a quantidade de produtos biologicamente ativos que esses microrganismos produzem para a planta. Cite-se como exemplo, o ácido indol-3-acético (IAA) e as giberelinas.

Avci e Dönmez (2006) testaram a produção de etanol por duas linhagens de *Thermoanaerobacter*. Forneceram aos microrganismos distintas concentrações de zinco (Zn) e obtiveram diferentes resultados de produtividade. Isto indicou uma função biológica específica para o zinco no metabolismo de produção de etanol.

Em estudos com cianobactérias, Cavet, Borrely e Robinson (2003) descrevem a importância dos minerais para a manutenção da homeostase destes organismos. Os autores fizeram referência ao zinco (Zn) como parte da estrutura da anidrase carbônica carboxissomal. O molibdênio (Mo) é um componente das nitrogenases.

Nguyen et al. (2007), citaram que o zinco (Zn) e o ferro (Fe) são importantes componentes estruturais de peptídeo deformilase (E.C. 3.5.1.88) em *Borrelia burgdorferi*. Os autores descreveram os minerais como sendo parte do complexo que forma o sítio catalítico da enzima.

O boro (B) é um elemento encontrado em rochas, solos e águas, sua concentração é, em média, 1 mg/Kg na água e 100 mg/Kg no solo (STEINBERG, 1964, apud REZANKA; SIGLER, 2008). Para as bactérias, este elemento, serve como sensor químico para a comunicação entre os microrganismos, essa característica permite o controle da densidade celular (CHEN et al., 2002, apud REZANKA; SIGLER, 2008).

O manganês (Mn) é um elemento traço essencial e é muito importante na fisiologia celular de procariotos e eucariotos. Suas funções estão relacionadas à atividade redox, como cofator enzimático de uma série de enzimas e a capacidade de formar complexos presentes nos grupos prostéticos (KEHRES e MAGUIRE, 2003).

Horsburgh, Wharton e Foster (2002) estudaram a função de detoxificação de radicais livres (espécies de oxigênio reativos – ROS) pelo manganês como um mecanismo alternativo à eliminação destes radicais pelas enzimas catalase, peroxidase e superoxidase dismutase em *Borrelia burgdorferi*. Esta capacidade de detoxificação do manganês mostrou ser fundamental para sobrevivência dos microrganismos aeróbicos.

O íon manganês é cofator de enzimas de transferência de grupos fosfato. É responsável pela ativação não específica de hidrolases, quinases, descarboxilases e transferases. Pode, em alguns casos, substituir o íon Mg^{2+} no sistema de polimerase de ácidos nucleicos (FLORKIN; STOTZ, 1971).

O molibdênio (Mo) ocorre na crosta terrestre com a abundância de 1,0 a 1,4 mg/Kg. Bortels (1930), citado por Anke e Seifert (2007) descreveu a necessidade do metal para a fixação de nitrogênio em linhagens de *Acetobacter*. O autor citou também a utilização do molibdênio como cofator enzimático para a ativação da nitrogenase, uma enzima do complexo de fixação do nitrogênio. Arnon e Stout (1939) citados por Anke e Seifert (2007), descreveram o molibdênio como mineral essencial para a sobrevivência das plantas superiores.

O molibdênio está presente no sítio ativo de certas flavina-desidrogenases, xantina oxidases, nitrato redutases, nitrogenases e oxitransferases. Juntamente com o ferro e a flavina, participa da ação enzimática no processo de transferência de elétrons do substrato para o oxigênio (FLORKIN; STOTZ, 1971; LEHNINGER; NELSON; COX, 2006; MADINGAN, MARTINKO; PARKER, 1997).

3.3 Nutrição de Bactérias Acéticas

No processo de fabricação de vinagre parte-se de solução comumente denominada calda. Esta contém álcool, obtido de matéria-prima fermentada, que pode ser de fruta, malte, soro de leite, glicose ou arroz. Dependendo da matéria-prima, torna-se necessário a adição de nutrientes em maior ou menor quantidade. Do ponto de vista qualitativo, as necessidades nutritivas dos microrganismos que

irão processar a transformação do etanol em ácido acético são as mesmas que as de todos os seres vivos, que para renovarem seu protoplasma e exercerem suas atividades metabólicas, exigem fontes de energia e nutrientes (EBNER, 1983; LIMA et al., 2001).

Segundo Ameyama e Adachi (1982) a formação de acetato a partir do etanol por bactérias do ácido acético é catalisada pelas enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH), presentes na membrana das células dessas bactérias. Durante a conversão, a ADH transforma o etanol em aldeído e posteriormente a ALDH o transforma em ácido acético.

Em um estudo com *Acetobacter aceti* IFO 3281, Yamada e Sato (1989) estudaram o funcionamento de uma endonuclease de restrição tipo II (AatII). O manganês foi fundamental para a ativação desta enzima

Abolhassan, Sepehr e Islami (2007), estudaram o efeito dos íons Ca^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} e Zn^{++} na atividade da enzima pirroloquinolina quinona álcool desidrogenase (ADH) e encontrou aumento da atividade dessa enzima quando o íon cálcio era adicionado ao meio, os íons ferro, manganês e zinco apresentaram efeito inibitório sobre a atividade da ADH.

Rao e Stokes (1953), citados por ASAI (1968) observaram que linhagens de *Acetobacter suboxydans* e *A. melanogenus* incapazes de crescerem em meio quimicamente definido, com etanol como a única fonte de carbono,

criaram com a adição de pequena quantidade de levedura autolisada, peptona ou extrato de fígado. Os autores sugeriram que a atividade promotora de crescimento desses materiais biológicos foi devida a açúcares redutores presentes. Comprovou-se que glicose, frutose, manitol ou glicerol podem ser encontrados em extrato de levedura. Estes açúcares redutores devem ser necessários para iniciar o crescimento das bactérias, que utilizariam então o etanol, como uma fonte adicional de carbono e energia, oxidando-o a ácido acético. As bactérias do ácido acético cresceram em meio com glicose e etanol, na forma de $\text{CH}_3^{14}\text{CH}_2\text{OH}$, o ^{14}C do etanol foi incorporado no material celular.

Shchelkunova (1962), citado por Asai (1968) mostrou que *A. suboxydans* e *A. melanogenus* cresceram pouco com álcool como fonte de carbono, embora tivessem o sistema de oxidação de etanol. Além disso, uma considerável quantidade de vitaminas do complexo B (hidrolisado ácido de levedura de panificação) promoveu o crescimento. Isto foi levado em conta pela atividade tampão do meio, porque uma quantidade pequena de vitaminas do complexo B não possibilitou o crescimento em um meio de etanol com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A adição de fosfato e solução tampão acetato promoveu o crescimento.

Fewster (1958), citado por Asai (1968), examinou vários carboidratos como efetivas fontes de energia para crescimento de *A. suboxydans* ATCC 621, usando um meio complexo (contendo peptona e extrato de levedura) e um meio semi-definido (contendo hidrolisado ácido de caseína, aminoácidos, minerais e

fatores de crescimento). O crescimento máximo foi obtido com D-manitol e D-sorbitol e bom crescimento com glicerol, frutose e com glicose na presença de CaCO_3 . O crescimento de microrganismos com D-gluconato de cálcio, L-sorbose, D-manose, D-galactose, D-xilose, L-arabinose e sacarose como fonte de carbono foi desprezível.

Rao e Stokes (1953), citados por Asai (1968), relataram que fontes de carbono desejáveis para o crescimento de linhagens de *Acetobacter* sp. foram glicose, arabinose, manitol, sorbitol e glicerol. Etanol, piruvato e lactato não foram utilizados sob condições rotineiras, mas foram utilizados em presença de um ou mais componentes indefinidos encontrados em extrato de levedura e triptona, além de nitrogênio amoniacal e hidrolisado de caseína. Várias linhagens de *A. gluconicus* e *A. rancens* aparentemente requeriam um ou mais componentes indefinidos encontrados em leveduras autolisadas.

Hoyer (1898) , citado por Asai (1968), descreveu a habilidade de certas bactérias acéticas de utilizarem sais de amônio como única fonte de nitrogênio quando nem etanol nem ácido acético eram usados como fontes de carbono. A solução de Hoyer foi proposta como um meio sintético para tais organismos, consistindo em 0,1 g fosfato de amônio; 0,1 g de fosfato de potássio; 0,1 g de fosfato de magnésio; 0,1 g de acetato de sódio; e 3 mL de etanol e 100 mL de água destilada.

Frateur (1950) , citado por Asai (1968), modificou a solução de Hoyer para a seguinte composição: 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,9 g de KH_2PO_4 ; 0,1 g de K_2HPO_4 ; 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 30 mL de etanol 95% e 0,5 mL de solução (1% p/v) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, em 1 L de água destilada. Nesse meio modificado, *A. lovaniense* e *A. peroxydans* cresceram tão bem quanto *A. aceti*.

As Tabelas 1 e 2 descrevem meios de cultura quimicamente definidos para o crescimento de *Acetobacter* sp.

Tabela 1. Meio de crescimento definido para *Acetobacter* (RAO e STOKES, 1953, apud ASAI, 1968)

<i>Componente</i>	
Etanol, glicose ou outra fonte de carbono	2,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou	0,1 g
Caseína hidrolisada (livre de vitamina) (mais 10 mg de L-cisteína e 20 mg de DL-triptofano)	0,5 g
Solução de Sal A (100 g/L de KH_2PO_4 ; 100 g/L de K_2HPO_4)	0,5 mL
Solução de Sal B (40 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mL/L de HCl p.a.; 2 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 2 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2 g/L de NaCl)	0,5 mL
Mistura de vitaminas: 40 μg de cada componente: tiamina, riboflavina, ácido nicotínico e ácido pantotênico, 80 μg de piridoxina, 10 μg de ácido <i>p</i> -aminobenzóico, 1 μg de ácido fólico, 0,1 μg de vitamina B12, 0,04 μg de biotina, e 0,5 mg de inositol	
Água destilada	100 mL
pH do meio ajustado para 6,2 – 6,5	

Tabela 2 – Composição mínima do meio para crescimento de *Acetobacter* (UNDERKOFLEER et al., 1958, apud ASAI, 1968)

Componente	
Glicose	0,5 g
Aminoácidos (20 mg de cada aminoácido) forma L = glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cistina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina, lisina, histidina, fenilalanina, triptofano e prolina / forma DL = alanina e metionina	400 mg
Bases (1 mg de cada base) adenina, guanina, uracila e xantina	4 mg
Minerais = 50 mg de KH_2PO_4 , 50 mg de K_2HPO_4 , 20 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg de NaCl, 1 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	123 mg
Água destilada	100 mL
<i>pH do meio ajustado para 6,0</i>	

Ohmori et al. (1980), citados por Ndoye et al. (2007a) descrevem que uma grande quantidade de calor é gerada durante a oxidação do etanol em cultura submersa de produção de ácido acético. Os mesmos autores dizem que a temperatura ótima de crescimento das bactérias em meio industrial é de 30°C. Estas bactérias são mesofílicas e elevações na temperatura de 2 a 3°C causam grande decréscimo no rendimento.

NDOYE et al. (2007a) mencionam que o método convencional para a acetificação industrial na produção de vinagre é o semi-contínuo. Sugeriram um substrato iniciador constituído de 1g.L⁻¹ de extrato de levedura; 2 g.L⁻¹ de glicose;

1 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O); 1 g.L⁻¹ de fosfato ácido de amônio ((NH₄)₂ HPO₄); 1 g.L⁻¹ de fosfato diácido de potássio (KH₂PO₄); 1 g.L⁻¹ de citrato de sódio; 5% (v/v) de etanol e 2,5% (v/v) de ácido acético.

Encontram-se na literatura diversas referências para a composição de meios de cultura para produção de ácido acético por *Acetobacter acetii*. Kim et al. (2007) descreveram um meio de cultivo testado para a produção de vinagre de caqui constituído de 40 g.L⁻¹ de etanol; 10 g.L⁻¹ de glicerol; 10 g.L⁻¹ de água de maceração de milho; 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O), e 1 g.L⁻¹ de monofosfato de amônio (NH₄H₂PO₄). Ito et al. (1991) relatam um meio de cultura contendo 1% de glicose; 0,2% de polipeptona; 1% de extrato de levedura; 1,47% de etanol e 15% de ácido acético. Lotong et al. (1989) descreveram meio composto por 1% de extrato de levedura; 0,02% de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O) e 0,1% de fosfato monoácido de potássio(K₂HPO₄). Fragapane et al. (1999) relataram o preparo de calda contendo 4,8% de etanol; 0,2% de peptona; 0,5% de ácido acético; 0,035% de fosfato monoácido de potássio (K₂HPO₄); 0,08% de fosfato diácido de potássio (KH₂PO₄); 0,15% de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄); 0,025% de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O); 0,001% de cloreto de sódio (NaCl) e 0,001% de sulfato de manganês (MnSO₄).

Kösebaladan e Özilgen (1992) utilizaram vinho branco para testes de fermentação acética com concentração de 11,3% e 1% de álcool e açúcar,

respectivamente. Os microrganismos testados desenvolveram uma tolerância gradual ao ácido acético durante o processo fermentativo e a produção de ácido acético foi maior nas fases estacionária e declínio do que na fase de crescimento.

Em teste de termotolerância com bactérias do ácido acético, Ndoye et al. (2007b) utilizaram o meio de cultura YGM/Mg²⁺, que é constituído de 10g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de glicose, 20 g.L⁻¹ de manitol, 1 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O), 1 g.L⁻¹ de fosfato ácido de amônio [(NH₄)₂HPO₄], 1 g.L⁻¹ de fosfato diácido de potássio (KH₂PO₄), 1 g.L⁻¹ de citrato de sódio, 2,5% (v/v) de etanol e 0,5% (v/v) de ácido acético.

Em testes de produção de celulose microbiana, Hong e Qiu (2008) testaram um meio de cultura contendo 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de triptona e 15 g.L⁻¹ de açúcares redutores provenientes de hidrolisado de raiz de *Konjac (Amorphophallus rivieri)*.

Heo e Son (2002) prepararam um meio contendo 4% de glicose; 0,2% de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄); 0,25% de fosfato diácido de potássio (KH₂PO₄); 0,3% de fosfato ácido de sódio dodecaidratado (NaH₂PO₄.10H₂O); 0,05% de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O); 0,0002% de sulfato ferroso heptaidratado (FeSO₄.7H₂O); 0,00025% de ácido bórico (H₃BO₃); 0,00006% de nicotinamida; 0,00025% de inositol e 1,45% de etanol. A produção de celulose por *Acetobacter* sp. A9 neste meio sintético foi similar a produção em meio complexo convencionalmente usado para culturas deste microrganismo.

Em testes de produção de biomassa, Adachi et al. (1990) relataram a utilização de meio de cultura constituído por 4,6 g.L⁻¹ de glicerol; 6 g.L⁻¹ de glutamato de sódio; 20 mg.L⁻¹ de glutatona; 500 mg.L⁻¹ de fosfato diácido de potássio (KH₂PO₄); 200 mg.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O); 10 mg.L⁻¹ de sulfato ferroso heptaidratado (FeSO₄.7H₂O), cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de manganês heptaidratado (MnSO₄.7H₂O); 400 mg.L⁻¹ de tiamina, ácido nicotínico e pantotenato de cálcio e 100 mg.L⁻¹ de ácido aminobenzóico. Este meio mostrou ser ideal para a produção de biomassa de *Acetobacter aceti*.

Em trabalho de indução da produção da enzima álcool desidrogenase, Takemura et al. (1993) fazem referência a um meio contendo 0,5% de extrato de levedura, 0,2% de polipeptona e 3% de glicose. Eles verificaram que a presença de etanol no meio de cultura está relacionada com a correta localização da enzima na membrana celular, sendo este um dos fatores da baixa atividade da enzima na ausência de etanol.

No estudo sobre a regulação da capacidade de oxidação do álcool, foi testado o meio composto por 5 g.L⁻¹ de sulfato de amônio [(NH₄)₂.SO₄]; 3 g.L⁻¹ de fosfato diácido de potássio (KH₂PO₄); 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO₄.7H₂O); 15 mg.L⁻¹ de EDTA; 4,5 mg.L⁻¹ de sulfato de zinco (ZnSO₄); 1,0 mg.L⁻¹ de cloreto de manganês (MnCl₂); 0,3 mg.L⁻¹ de cloreto de cobalto (CoCl₃); 0,3 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre II (CuSO₄); 4 mg.L⁻¹ de molibdato

de sódio (NaMoO_4); $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloreto de cálcio (CaCl_2); 3 mg.L^{-1} de sulfato ferroso (FeSO_4) e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de iodeto de potássio (KI) e os resultados mostraram que um fornecimento limitado de etanol foi adequado para a produção de biomassa de *Acetobacter pasteurianus* com alta e estável atividade de oxidação do etanol (MACHADO et al., 1995).

3.4 Taxonomia

Bactérias acéticas pertencentes à família Acetobacteraceae (Família VI) do gênero *Acetobacter*, gram-negativas ou gram-variáveis têm formas elipsoidais ou de bastonetes, ocorrendo isoladas, em pares ou em cadeias. Quanto à nutrição, as melhores fontes de carbono para o crescimento são manitol, etanol, *n*-butanol, glicerol e lactato. Ácido é formado a partir de *n*-propanol, *n*-butanol e D-glicose. Não hidrolisam amido nem lactose e são quimiorganotróficas (DE LEY; GILLIS; SWINGS, 1984, HOLT et al., 1994).

Yamada e Yukphan (2008) descreveram a existência de 10 gêneros na família *Acetobacteraceae*, sendo seis monogêneros de bactérias acéticas: *Acidomonas* (URAKAMI et al., 1989), *Kozakia* (LISDIYANTI et al., 2002), *Swaminathania* (LOGANAHAN, NAIR, 2004), *Saccharibacter* (JOJIMA et al., 2004), *Neoasaia* (YUKPHAN et al., 2006) e *Granulibacter* (GREENBERG et al., 2006). Descreveram também a existência de mais quatro gêneros: *Acetobacter*

(BEIJERINCK, 1898) *Gluconobacter* (ASAI, 1953) , *Gluconacetobacter* (YAMADA et al., 1998) e *Asaia* (YAMADA et al., 1998).

Dos dez gêneros descritos, o gênero *Acetobacter* é caracterizado quimiotaxonomicamente por possuir como principal quinona respiratória a Q-9. Entretanto, outros gêneros possuem uma quinona Q-10 (KERSERS et al., 2006; YAMADA et al., 1969; apud YAMADA; YUKPHAN, 2008).

Yamada e Yukphan (2008) relatam que o gênero *Frateuria* (SWING et al., 1980) foi introduzido como uma única espécie, *Frateuria aurantia* (KONDO e AMEYAMA, 1958; SWINGS et al. ,1980). A linhagem tipo de *F. aurantia* foi primeiramente isolada e classificada como *Acetobacter aurantia* (IFO 3245^T = NBRC 3245^T) por Kondo e Ameyama (1958). Estes reportaram que a linhagem classificada como *A. aurantia* não oxidava acetato. Asai et al. (1964) re-examinou fenotipicamente a linhagem de *A.aurantia*, encontrando linhagens com flagelo polar, como em linhagens de *Gluconobacter*, e ainda observaram a habilidade de oxidar o acetato e lactato em gás carbônico e água como encontrado em linhagens de *Acetobacter*. Subsequentemente, Yamada et al. (1969, 1976), citados por Yamada e Yukphan (2008), indicaram como única quinona uma Q-8 e que nunca encontrou uma verdadeira bactéria do ácido acético tendo essa quinona como principal e que a posição do flagelo é intermediária.

Yamada et al. (1981), citados por Yamada e Yukphan (2008), nomearam as linhagens do gênero *Frateuria* como “bactéria do ácido

pseudoacético”. O gênero *Frateuria* foi de fato incluído na família *Gammaproteobacteria*.

Segundo Yamada e Yukphan (2008) as espécies do gênero *Acetobacter* são filogeneticamente divididas em dois grupos. O primeiro corresponde a grupo da *Acetobacter aceti*, incluindo a espécie *A. aceti*, *A. orleanensis* (HENNEBERG, 1906, LISDIYANTI et al., 2000), *A. estunensis* (CARR, 1958, LISDIYANTI et al., 2000), *A. indonesiensis* (LISDIYANTI et al., 2000), *A. cibinongensis* (LISDIYANTI et al., 2001), *A. orientalis* (LISDIYANTI et al., 2001), *A. cerevisiae* (CLEENWERCK et al., 2002), *A. malorum* (CLEENWERCK et al., 2002), *A. oeni* (SILVA et al., 2006) e *A. nitrogenifigens* (DUTTA E GACHHUI, 2006). O segundo refere-se ao grupo da *Acetobacter pasteurianus*, que inclui a *A. pasteurianus*, *A. peroxydans*, *A. pomorum* (SOKOLLEK et al., 1998), *A. lovaniensis* (FRATEUR, 1950, LISDIYANTI et al., 2000) e *A. sykyii* (SOKOLLEK et al., 1998; LISDIYANTI et al., 2000, 2001; CLEENWERCK et al., 2002; SILVA et al., 2006 e DUTTA, GACHHUI, 2006).

Os dois grupos descritos do gênero *Acetobacter* são fenotipicamente diferenciados pela produção de 2-cetogluconato, exceto *A. oeni*. Duas espécies: (*A. aceti* e *A. oeni*) produziram 5-cetogluconato. A formação de dihidroxicetona a partir de glicerol, foi observada em três espécies: *A. aceti*, *A. pomorum* e *A. nitrogenifigens*. Em contraste, linhagens do grupo da *A. pasteurianus* não apresentaram essas características fenotípicas (YAMADA; YUKPHAN, 2008).

A análise de rDNA 16S está sendo usada para entender as relações filogenéticas entre as bactérias do ácido acético (LISDIYANTI et al., 2000; SIEVERS et al., 1995; TRČEK; TEUBER, 2002; YAMADA et al., 1997, apud YAMADA, YUKPHAN, 2008). Todavia, algumas linhagens com seqüência de rDNA 16S com similaridade acima de 98% mostram níveis de reassociação DNA-DNA abaixo de 50% e portanto devem ser consideradas como espécies diferentes (FUENTES-RAMIREZ et al., 2001, apud YAMADA, YUKPHAN, 2008). Vários autores relatam procedimentos moleculares baseados na análises de fragmentos de rDNA 16S e 23S para caracterização de bactérias do ácido acético (GONZALEZ et al., 2006; GULLO et al., 2006, SIEVERS et al., 1995; TRČEK, TEUBER, 2002; apud YAMADA; YUKPHAN, 2008).

3.5 Análise Molecular

A técnica Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (DDT/PCR) permite análises comparativas, isolamento e caracterização de genes relacionados aos mais variados processos biológicos. A ampla aplicação desta técnica deve-se ao fato de ser rápida, fácil e necessita de pequena quantidade de DNA total (LIANG e PARDEE, 1992 apud OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2003).

Bauer et al. (1993) relatam em seu trabalho sobre a aplicação da técnica do DDRT/PCR como sendo um procedimento que detecta em diferentes tipos de células grande espectro de expressão dos genes.

Tooker et al. (2002) relataram o uso desta técnica para descrever os mecanismos de sobrevivência de *Mycobacterium paratuberculosis* em células de macrófagos de bovinos.

Tooker e Coussens (2004) utilizaram a técnica do DDRT-PCR com sucesso para mensurar a expressão de NADH desidrogenase e proteínas relacionadas aos mecanismos de resistência em *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, em macrófagos.

Diversos autores relatam o uso da técnica de ampliação do material genético por Polymerase Chain Reaction (PCR), para identificação de linhagens de bactérias acéticas por eletroforese. Schleyer et al. (2007) utilizaram essa técnica para identificar os plasmídeos de *Gluconobacter oxydans* com a finalidade de conhecer os genes responsáveis pelas diversas rotas oxidativas presentes nesse microrganismo. Ilabaca et al. (2008) descreveram a utilização do PCR para analisar o rDNA 16S amplificado com a finalidade de identificar linhagens de bactérias do ácido acético. González et al. (2005) mostraram as espécies de bactérias do ácido acético que cresceram durante a fermentação de vinho utilizando também a amplificação do rDNA 16S por PCR. González et al (2006) utilizaram os testes de amplificação por PCR como métodos de rotina para

identificação de bactérias do ácido acético. Trcek (2005) identificou bactérias do ácido acético baseado na sequência de nucleotídeos de rDNA 16S-23S, utilizando a técnica de PCR.

A amplificação por PCR e RAPD tem sido descrita como métodos rápidos para identificação de bactérias do ácido acético (GONZALEZ et al., 2004,; NANDA et al., 2001; TRČEK, TEUBER, 1997, apud YAMADA, YUKPHAN, 2008).

De Vero e Giudici (2008) utilizaram a técnica de Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) para identificar os integrantes da família *Acetobacteriaceae* baseando-se no perfil do rDNA 16S.

4. MATERIAL & MÉTODOS

4.1. Ativação do reator de fermentação submersa

Para a ativação do reator submerso, preparou-se 8,0 L de uma calda iniciadora contendo 2 g.L⁻¹ de nutriente padrão – Acetozim[®] DS, etanol 6% (v/v) e 4% de ácido acético (v/v) com vinagre de álcool não filtrado, que foi a fonte da cultura de microrganismos utilizada no experimento. A partir da queda do teor de álcool até o ponto de corte do reator (0,3 – 0,5%), retirou-se 2 L de vinagre e adicionou-se 2 L de calda, a uma velocidade de escoamento de 1 L/hora. Estas caldas eram constituídas de 2 g.L⁻¹ de nutriente padrão – Acetozim[®] DS e etanol 10% (v/v). O procedimento de trocas foi repetido até a uniformização dos ciclos fermentativos. Após a ativação do reator, foram iniciados os testes de requerimento de minerais (SPINOSA, 1996; SPINOSA, 2002).

4.2. Planejamento fatorial para estudo qualitativo e quantitativo de requerimento de minerais por bactérias acéticas

Os minerais utilizados e suas concentrações máximas foram: 0,5 mg/L de boro; 0,5 mg/L de molibdênio; 0,5 mg/L de zinco; 10 mg/L de ferro e 10 mg/L de manganês (SANTOS JUNIOR, 2004; RAO, STOKES, apud ASAI, 1968).

A Tabela 3 mostra a constituição do meio basal de fermentação onde foram dosados os minerais, segundo desenho experimental mostrado na Tabela 5.

Tabela 3. Meio basal de produção de ácido acético definido para *Acetobacter*

<i>Componente</i>	Quantidade
Glicose	40,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
L-cisteína	0,1 g
DL-triptofano	0,2 g
Solução de Sal 1 (25 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ e 25 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄)	0,5 mL
Solução de Sal 2 (0,5 g.L ⁻¹ de NaCl e 10 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ .7H ₂ O).	0,5 mL
Piridoxina *	0,8 g
Soluções de vitaminas: *	1 mL de
1 g.L ⁻¹ de tiamina, 0,2 g.L ⁻¹ de ácido nicotínico, 0,5 g.L ⁻¹ de ácido pantotênico, 0,2 g.L ⁻¹ de ácido <i>p</i> -aminobenzóico, 1 g.L ⁻¹ de cianocobalamina, 0,8 g.L ⁻¹ de biotina, e 5 g.L ⁻¹ de inositol	cada solução
Água destilada	1000 mL
Etanol 96°GL *	104 mL

O meio basal de produção de ácido acético foi autoclavado por 20 minutos a 121°C.

* O etanol, a piridoxina e as soluções de vitaminas foram esterilizados por filtração (membrana de 0,22 µm) e adicionados após a autoclavagem do meio de produção de ácido acético.

O reator utilizado no experimento é mostrado na Figura 1 e é construído em aço inox. Possui capacidade de 8 L, controle eletrônico de temperatura e controle manual de entrada de oxigênio (Figura 2). Após a ativação do reator temperatura de trabalho, ficou estabilizada na fixa de 30°C e a vazão de oxigênio foi mantida em 35 L/h (SPINOSA, 2002).



Figura 1 – Reator de fermentação submersa

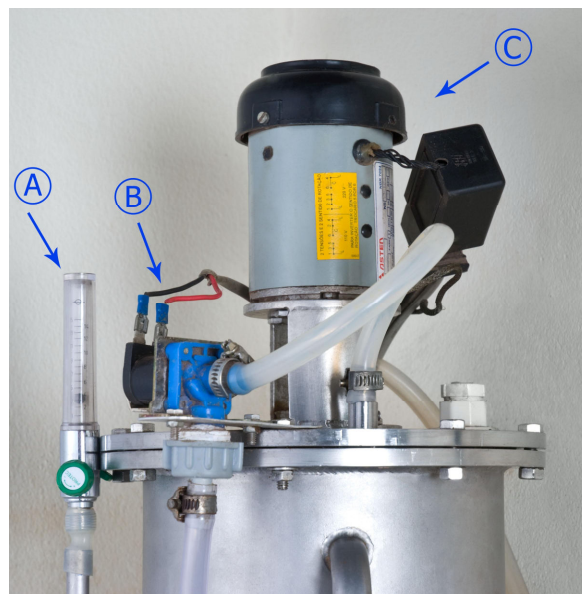


Figura 2 – Detalhes dos mecanismos de controle do reator de fermentação submersa. A – Controle manual de aeração, B – Válvula solenóide do controle de temperatura e C – Motor da turbina de aeração

4.2.1 Estudo do requerimento de minerais para bactérias acéticas

Os ensaios alternaram as concentrações dos minerais, conforme planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} (Tabela 5). A Tabela 4 mostra as concentrações de minerais utilizadas nos experimentos.

Foram preparadas soluções aquosas de forma que cada mL da solução apresentasse a concentração descrita dos minerais conforme as indicações da matriz do planejamento fatorial fracionado (Tabela 5). Cada ensaio foi repetido por cinco ciclos, para que garantir que os minerais do ensaio anterior não estivessem interferindo nos experimentos subsequentes,.

Tabela 4 – Valores decodificados e reais utilizados no planejamento fatorial $2^{(5-1)}$ para estudo do efeito de minerais no cultivo de bactérias acéticas

Nutrientes	Codificação das variáveis / Concentração (mg/L)		
	- 1	0	+ 1
Molibdênio	0,0	0,25	0,5
Boro	0,0	0,25	0,5
Zinco	0,0	0,25	0,5
Ferro	0,0	5,0	10,0
Manganês	0,0	5,0	10,0

Tabela 5 – Matriz dos experimentos do planejamento fatorial fracionado $2^{(5-1)}$ para estudo do efeito de minerais no cultivo de bactérias acéticas

Experimento	Molibdênio	Boro	Zinco	Ferro	Manganês
01	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
02	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1
03	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1
04	+ 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1
05	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1
06	+ 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1
07	+ 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1
08	+ 1	- 1	- 1	- 1	- 1
09	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1
10	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1
11	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1
12	- 1	+ 1	- 1	- 1	- 1
13	- 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1
14	- 1	- 1	+ 1	- 1	- 1
15	- 1	- 1	- 1	+ 1	- 1
16	- 1	- 1	- 1	- 1	+ 1
17 (C)	0	0	0	0	0
18 (C)	0	0	0	0	0
19 (C)	0	0	0	0	0

O programa Statistica[®] 5.0 foi utilizado para avaliar os resultados obtidos. A partir dos resultados, foram determinados quais os efeitos dos minerais estudados na produtividade, em termos de ácido acético por linhagem de *Acetobacter sp.*. Em experimentos preliminares, na fase de definição do modelo estatístico, houve efeitos positivos e negativos relativos à presença de cada componente testado (BARROS NETO et al, 1995; BOX, DRAPER, 1987)

4.3 Parâmetros de eficiência do processo

As análises de álcool e ácido acético utilizadas nos cálculos da taxa de rendimento e produtividade foram realizadas por ebulliometria e titulação com NaOH 0,1N, respectivamente (SPINOSA, 1996; ZANCANARO JR, 1988, SPINOSA, 2002) . Tais parâmetros cinéticos foram utilizados como resposta para a eficiência do processo de fermentação acética. Os resultados das análises de álcool foram posteriormente confirmados por cromatografia gasosa.

Durante os ciclos fermentativos também foi acompanhada a população de bactérias acéticas. A medida foi realizada utilizando a técnica de contagem direta em câmara de Neubauer com corante azul de trypan como indicador de células vivas/mortas (SPINOSA, 2002).

Estequiometricamente tem-se 1 litro de etanol produzindo 1,036 kg de ácido acético e 0,313 kg de água. Durante o processo fermentativo, ocorre um aumento de volume na ordem de 1 a 3% da concentração de etanol utilizado. Isto significa que aproximadamente 1% (v/v) de etanol produz 1% (p/v) de ácido acético. Esta relação é tomada como base para os cálculos de rendimento para a previsão da acidez do produto. Considerando-se nulas as perdas por evaporação e por sobreoxidação, tem-se que a soma da concentração do etanol (% v/v) e do ácido acético (% p/v) é igual à concentração total (CT) ou *GK*, do alemão *Gesammte Konzentration*. A CT (*GK*) é constante durante todo o processo de acetificação (Adams, 1998).

A solução contendo álcool no processo industrial é chamada de calda. Já o quociente entre a concentração de ácido acético do vinagre produzido e a "concentração total" da calda dá o rendimento em ácido ($Y_{\text{ácido}}$) (EBNER, 1983; EBNER, FOLLMANN, SELLMER, 1983).

Os cálculos empregados para comparar linhagens em escala piloto foram baseados naqueles preconizados na literatura e correntemente utilizados na indústria do setor vinagreiro.

4.3.1 Rendimento em ácido acético

Lima et al. (2001) descreveram o rendimento como sendo um produto da quantidade de produto formado pela concentração total de substrato e produto.

$$Y_{\text{ácido}} = \frac{\%acidez_{\text{produto}}}{\%CT_{\text{calda}}}$$

Onde:

$Y_{\text{ácido}}$ = rendimento em ácido.

$\%acidez_{\text{produto}}$ = concentração de ácido acético produzido (%);

$\%CT$ = concentração total da calda (%(v/v) de etanol + %(p/v) de ácido acético);

4.3.2 Produtividade em ácido acético

A produtividade em ácido acético ($P_{\text{ácido acético}}$), de acordo com Hromatka e Ebner (citado por Ebner, 1983), é dada pelo aumento de ácido acético em g por mL em 24 horas.

$$P_{\text{ácidoacético}} = \frac{\%aa(\text{final} - \text{inicial})}{\text{tempo}(\text{final} - \text{inicial})} * 24$$

Onde:

$P_{\text{ácidoacético}}$ = produtividade de ácido acético em g/100 mL, em 24 horas

$\%aa$ = concentração de ácido acético [(% ou g/100 mL (p/v))];

tempo = intervalo de tempo considerado (h);

4.4 Análise da expressão gênica

Para cada combinação de minerais testados, foi realizada uma análise de expressão de RNA para observação da rota metabólica ativada ou inativada em cada condição de fornecimento de minerais.

4.4.1 Extração de RNA e DDRT-PCR

O RNA foi extraído utilizando-se o método descrito por Simms et al (1993). Resumidamente: os *pellets* obtidos pela centrifugação de culturas isoladas do acetador foram homogeneizados individualmente em 1 mL do reagente Trizol

(Gibco BRL – MD, USA) e incubados durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após adição de 200 µl de clorofórmio e a incubação por 20 minutos, em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas 12000 rpm (centrífuga Sanyo – Hawk 15/05), durante 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida e precipitada com isopropanol (0,5 mL/1 mL de Trizol) durante 30 minutos a temperatura ambiente. O RNA foi isolado por centrifugação a 12000 rpm, durante 10 minutos a 4°C, seco e diluído em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). As amostras foram tratadas com desoxiribonuclease I (Gibco BRL–MD, USA), para eliminar contaminação com DNA genômico, de acordo com o protocolo do fabricante.

A quantificação de DNA e RNA foi realizada mediante a leitura em espectrofotômetro (Ultrospec III-Pharmacia, UK) nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A pureza foi determinada pela razão das absorbâncias a 260 nm e 280 nm (A260/A280), considerando de boa qualidade as amostras cujo valor da razão A260/A280 variou em torno de 1,8 para o DNA e 2,0 para o RNA.

O RNA foi transcrito de forma reversa pelo uso de Oligo DT20 como iniciadores, utilizando o kit ThermoScript RT-PCR System (GIBCO-BRL). Cerca de 5 µg do RNA total, em um volume de 10 µl, foi desnaturado a 65°C, durante 5 minutos e colocado no gelo. Uma mistura de reação de 10 µL contendo ditioneitol (DTT) 10 mM, 20 mM de cada dNTP, 50 pmol de Oligo DT20, 5X *first strand buffer* (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCL, 15 mM MgCl₂) e transcriptase reversa 40U (Gibco BRL) foi adicionada à solução de RNA total e incubada, nas seguintes

condições: 50°C durante 60 minutos, 85°C durante 5 minutos. Após esta etapa foi adicionado RNase H e a amostra foi incubada a 37°C, durante 20 minutos, conforme especificações do fabricante. O cDNA resultante foi, então, amplificado usando iniciadores aleatórios de 10 bases cada. Utilizou-se, em cada reação, 2 µL de cDNA, 140 pmol de um único iniciadores, 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1X tampão de PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) e 2U Taq DNA Polimerase. As reações foram incubadas a 95°C durante 5 minutos. Em seguida, foram realizados dois ciclos nas seguintes condições: 95°C por 30 segundos para que ocorresse a desnaturação; 30°C durante 2 minutos para o anelamento e 72°C por 1 minuto para a extensão, seguidos de 31 ciclos, durante os quais, a temperatura de anelamento foi alterada para 40°C e o tempo de extensão aumentado para 5 minutos no ciclo final. Na seqüência, as amostras foram armazenadas a -20°C. Uma reação de amplificação foi realizada, nas mesmas condições, como controle de uma possível contaminação do RNA total com o DNA genômico.

4.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com prata

Cada produto de amplificação foi acrescido do tampão de amostra (0,125% azul bromofenol, 0,125% xileno cianol, e 15% glicerol) e, posteriormente, aplicado em géis de poliacrilamida 8% (acrilamida-bisacrilamida 29/1) em tampão TBE (90mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8,0). Em seguida, os géis foram fixados em uma mistura de 10% de etanol e 0,5% de ácido acético (v/v), corados com

0,2% de nitrato de prata, lavados com água deionizada e reduzido numa solução contendo NaOH 0,75M e formaldeído 0,1M (SANTOS et al., 1993).

4.5 Isolamento e identificação das linhagens de bactérias acéticas

Retirou-se uma alíquota de aproximadamente, 50 mL de suspensão, a partir do ponto de amostragem do reator de fermentação submersa para a imediata inoculação em placas com meio de isolamento, em duplicatas. O tempo entre a retirada da amostra no ponto de coleta da dorna e a inoculação não excedeu 60 segundos. As alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para as placas com meio de cultura MYP descrito por De Ley et al. (1984), que é composto de 25 g.L⁻¹ de manitol, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 3 g.L⁻¹ de peptona. A técnica de preparo do meio foi a da dupla camada proposta por Entani et al. (1985), com 0,5% de ágar na camada inferior e 1% de ágar na camada superior. As alíquotas de 0,1 mL foram espalhadas com alça de drigalski e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30° C, por 48 horas. Monitorou-se a umidade relativa no interior da estufa, mantendo-a sempre superior a 90% com termohigrômetro.

Após o período de incubação, as colônias obtidas foram isoladas e purificadas de acordo com metodologia proposta por Pelczar et al. (1982). Com os isolados, foram realizados os testes bioquímicos para a identificação do gênero, segundo procedimentos descritos por Carr (1968) e Entani et al. (1985).

4.5.1 Características morfológicas dos isolados

As colônias foram observadas em relação às seguintes características: bordas, elevação, pigmentação, detalhes ópticos, tamanho, forma e superfície (PELCZAR et al., 1981; MAEDA, 1997). Colônias obtidas no meio de isolamento foram observadas após 48 horas de incubação.

4.5.2 Purificação dos isolados

Procedeu-se à triagem dos microrganismos que se desenvolveram no meio de cultura. A partir das diferenças macroscópicas, as colônias foram separadas para a purificação. Foi executada a técnica de esgotamento em ágar de dupla camada e incubados à temperatura de 30°C por no mínimo 48 horas. Para a adequada purificação, repetiu-se este procedimento por, no mínimo, quatro vezes, acompanhando-se a pureza da cultura em microscópio óptico após a coloração de Gram (RIBEIRO, SOARES, 1993).

4.5.3 Triagem e identificação fenotípica ao nível de gênero das linhagens isoladas

A triagem foi iniciada com o teste de Coloração de Gram (RIBEIRO, SOARES, 1993). As linhagens que se apresentaram como bastonetes Gram negativos foram submetidas a uma identificação fenotípica para diferenciar os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

O método de identificação do gênero usado foi o proposto por Cirigliano (1982) com o meio de cultura *DSM* composto por 1 g.L⁻¹ de glicose, 15 g.L⁻¹ de lactato de cálcio, 2 g.L⁻¹ de manitol, 1 g.L⁻¹ de sorbitol, 3,3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de proteose peptona, 1 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,02 g.L⁻¹ de MnSO₄, 0,01 g.L⁻¹ de actidiona, 10 g.L⁻¹ de ágar, 0,03 g.L⁻¹ de púrpura de bromocresol e 29 µg.L⁻¹ de verde brilhante. A capacidade de superoxidação dos isolados pôde ser observada pela alteração de cor do meio de cultura.

4.5.4 Teste de produção de oxidase

Uma alçada da colônia crescida em ágar *MYP* foi transferida assepticamente para uma tira de papel de filtro embebido com solução a 1% de cloridrato de N-N-N'-N'-tetrametil-p-fenilenodiamina. A mudança de cor da tira de branca para azul indica reação positiva.

4.5.5 Teste de produção de catalase

Gotas de água oxigenada (H₂O₂) a 3% foram colocadas sobre as colônias, diretamente nas placas de Petri com ágar *MYP*. O borbulhamento indica a presença de catalase.

4.5.6 *Teste de produção de indol do triptofano*

Uma alíquota de 0,1 mL da cultura *MYP* foi inoculada em tubos contendo 3 mL meio de cultura, descrito no anexo 7.1 e incubada a 30°C, em agitador rotatório a 120 rpm, por 48 horas. Após esse período, foi adicionado 0,1 mL do reativo de Kovacs em cada tubo, que, por sua vez, foi agitado. Decorridos 10 minutos, foi feita a leitura. Uma coloração vermelha do anel superficial no álcool butílico do reativo indica resultado positivo; coloração amarela indica resultado negativo; a coloração laranja indica resultado dúbio.

4.5.7 *Teste de produção de proteases (gelatinases)*

As linhagens de microrganismos foram inoculadas em tubos inclinados de ágar gelatina (anexo 7.2) e incubadas a 30°C por 96 horas. Após incubação por 1 hora na geladeira, observou-se a liquefação do meio, indicativo de produção de proteases. Os tubos foram reincubados até o 14º dia e novamente reavaliados.

4.5.8 *Teste de redução de nitrato*

Uma quantidade de 0,1 mL das culturas de microrganismos em meio *MYP* foi inoculada em tubos contendo 10 mL de caldo nutriente (anexo 7.3) com 0,1% de KNO_3 e incubados a 30°C em incubador rotatório a 120 rpm, por 6 dias. Após a incubação, foram adicionadas quantidades iguais dos reagentes A e B

(anexo 7.3). A formação da coloração rosa ou vermelha indica a presença de nitrito. Caso a reação não apresente essa mudança, acrescenta-se uma pequena quantidade de pó de zinco, que reduz nitrato, para testar os reagentes, eliminando-se a possibilidade de resultados falsos.

4.5.9 Teste de crescimento em meio de Hoyer

Ao meio de *Hoyer* (anexo 7.4), após a esterilização, foi adicionado etanol a 20%, previamente esterilizado por filtração, de modo a obter-se concentração final de 3% de etanol. Uma alíquota de 0,1 mL da cultura do microorganismo em meio MYP (anexo 7.1) foi adicionada a erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de Hoyer e foram incubados em agitador a 120 rpm, a 30°C, por cerca de 14 dias.

4.5.10 Teste de produção de ácido a partir de glicose

As linhagens dos microrganismos foram inoculados na forma de estrias em placas de petri contendo o meio de cultura descrito no anexo 7.5 e incubadas por 96 horas a 30°C, em estufa com umidade relativa superior a 90%.

A reação positiva é indicada pelo aparecimento de uma área clara em torno da colônia. Em caso de resultado negativo, as colônias crescem, mas não produzem halo.

4.5.11 Teste de produção de dihidroxiacetona a partir do glicerol

As linhagens dos microrganismos foram inoculadas na forma de estrias em placa de petri contendo o meio de cultura descrito no anexo 7.6 e incubadas a 30°C, em estufa com umidade relativa superior a 90%.

A produção de dihidroxiacetona foi detectada cobrindo-se a placa inoculada com menos de 48 horas, com a solução de Fehling (anexo I). Em torno das colônias positivas, ocorre a formação de um halo de óxido cuproso de cor alaranjada.

4.5.12 Teste de produção de celulose

Um volume de 0,1 mL da cultura foi inoculado em tubo de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura descrito no anexo 7.7 e incubado em estufa bacteriológica a 30°C até a visualização da película.

A celulose foi detectada pela formação de película amarelo creme e o fluido sobrenadante claro. Um teste comprobatório foi feito adicionando-se ácido sulfúrico a 60% e gotas de solução de lugol. Na presença de celulose, há a formação de coloração azul intensa.

4.5.13 Teste de produção de pigmento marrom

As linhagens dos microrganismos foram inoculadas na forma de estrias em placas de petri contendo o meio de cultura descrito no anexo 7.8 e incubadas a 30°C por 48 horas em estufa com umidade relativa superior a 90%. O aparecimento de pigmentação marrom ao redor da colônia indica teste positivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DO REQUERIMENTO NUTRICIONAL

5.1.1 Ativação do reator

Para a ativação do reator de fermentação submersa foram conduzidos cinco ciclos de fermentação com nutriente padrão do mercado de fermentação acética (Acetozim® Ds). Esse número de ciclos foi suficiente para que a duração dos ciclos estivesse uniforme. Os resultados da ativação estão descritos na Tabela 6.

5.1.2 Resultados do ensaio qualitativo de requerimento de minerais para a linhagem de Acetobacter em reator submerso de fermentação acética

5.1.2.1 Seleção de minerais

A Tabela 7 mostra a condução dos ciclos fermentativos de acordo com o desenho experimental descritos no item 4.3.2.1 e Tabelas 4 e 5. Os parâmetros obtidos no experimento foram Rendimento (Y AA) e Produtividade (P AA) em ácido acético, sendo o rendimento a taxa de conversão de etanol para ácido acético e a produtividade expressa a quantidade de ácido acético em g/100 mL (%) produzido em 24 horas. A Tabela 8 mostra as médias e a análise estatística dos parâmetros analisados na condução dos experimentos.

Tabela 6. Resultados dos ciclos fermentativos para ativação do reator de fermentação submersa.

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	CALDA			
0 h	6	20	3,50	6,12	9,62					6	3,50	6,12	9,62	PADRÃO	330	0,81	0,12
18 h	6	23	3,00	6,20	9,20												
41 h	6	24	2,40	6,33	8,73												
65 h	6	23	2,30	6,09	8,39												
137 h	5,8	25	2,20	6,42	8,62												
187 h	5,8	25	1,90	6,52	8,42												
212 h	5,8	28	1,70	6,60	8,30												
235 h	5,5	27	1,50	6,84	8,34												
258 h	5,5	27	1,10	6,95	8,05												
283 h	5,5	28	0,80	7,25	8,05												
304 h	5,5	28	0,70	7,40	8,10												
330 h	5,5	28	0,40	7,75	8,15					2,5	10,00	1,47	11,47	PADRÃO	96	0,81	0,86
2 h	8	28	3,10	5,79	8,89												
23 h	8	29	2,90	5,90	8,80												
48 h	8	30	2,80	6,00	8,80												
71 h	8	30	2,30	7,05	9,35												
96 h	8	30	0,30	9,24	9,54	2	0,30	9,24	9,54	2	10,00	0,00	10,00	PADRÃO	23	0,90	1,67
2 h	8	28	2,00	7,26	9,26												
21 h	8	29	0,70	8,55	9,25												
23 h	8	30	0,30	9,00	9,30	2	0,30	9,00	9,34	2	10,00	0,00	10,00	PADRÃO	27	0,88	1,28
2 h	8	29	1,90	7,39	9,29												
23 h	8	29	0,80	8,43	9,23												
27 h	8	30	0,50	8,83	9,33	2	0,50	8,83	9,33	2	10,00	0,00	10,00	PADRÃO	27	0,89	1,47
2 h	8	29	2,10	7,20	9,30												
19 h	8	30	1,30	7,98	9,28												
24 h	8	30	0,90	8,34	9,24												
27 h	8	30	0,50	8,85	9,35	2	0,50	8,85	9,35	2	10,00	0,00	10,00	INICIO DOS EXPERIMENTOS			

% ET: % (v/v) etanol

% CT: % (v/v) etanol + % (p/v) ácido acético

P AA: (Produtividade) g de ácido acético por 100 mL de calda em 24 h

% AA: % (p/v) ácido acético

Y AA: (Rendimento) taxa de conversão de etanol para ácido acético

Tabela 7 – Efeito de minerais no rendimento e produtividade de acordo com o desenho experimental

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	%CT	CALDA			
0 h	8	30	0,50	8,85	9,35	2	0,50	8,85	9,35	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 1	21	0,89	1,81
2 h	8	29	2,00	7,28	9,28												
15 h	8	30	1,20	8,06	9,26												
21 h	8	30	0,40	8,86	9,26	2	0,40	8,86	9,26	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 1	19	0,88	1,83
2 h	8	30	1,90	7,31	9,21												
18 h	8	30	0,60	8,66	9,26												
19 h	8	30	0,50	8,76	9,26	2	0,50	8,76	9,26	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 1	17	0,88	2,30
2 h	8	29	2,10	7,18	9,28												
15 h	8	30	0,90	8,31	9,21												
17 h	8	30	0,50	8,81	9,31	2	0,50	8,81	9,31	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 1	19	0,88	1,97
2 h	8	30	1,90	7,28	9,18												
12 h	8	30	1,30	7,91	9,21												
19 h	8	30	0,40	8,84	9,24	2	0,40	8,84	9,24	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 1	19	0,88	1,89
2 h	8	30	2,00	7,28	9,28												
13 h	8	30	1,00	8,26	9,26												
19 h	8	30	0,50	8,78	9,28	2	0,50	8,78	9,28	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 2	28	0,88	1,41
2 h	8	28	2,10	7,14	9,24												
16 h	8	29	1,50	7,78	9,28												
25 h	8	29	0,80	8,41	9,21												
28 h	8	30	0,40	8,79	9,19	2	0,40	8,79	9,19	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 2	30	0,87	1,00
2 h	8	30	2,10	7,10	9,20												
14 h	8	28	1,50	7,68	9,18												
26 h	8	29	0,80	8,35	9,15												
30 h	8	30	0,50	8,68	9,18	2	0,50	8,68	9,18	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 2	31	0,88	1,23
2 h	8	30	2,00	7,22	9,22												
12 h	8	30	1,40	7,84	9,24												
31 h	8	30	0,40	8,81	9,21	2	0,40	8,81	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 2	31	0,87	1,08
2 h	8	30	1,90	7,30	9,20												
23 h	8	30	1,00	8,18	9,18												
31 h	8	30	0,50	8,69	9,19	2	0,50	8,69	9,19	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 2	32	0,88	1,28

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	CALDA			
2 h	8	29	2,10	7,12	9,22												
18 h	8	30	1,10	8,10	9,20												
32 h	8	30	0,30	8,83	9,13	2	0,30	8,83	9,13	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 3	24	0,88	1,49
2 h	8	30	1,90	7,31	9,21												
16 h	8	29	1,20	8,00	9,20												
24 h	8	30	0,40	8,80	9,20	2	0,40	8,80	9,20	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 3	23	0,88	1,50
2 h	8	29	1,90	7,38	9,28												
14 h	8	30	1,30	8,00	9,30												
23 h	8	30	0,50	8,82	9,32	2	0,50	8,82	9,32	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 3	21	0,89	1,97
2 h	8	28	2,10	7,21	9,31												
18 h	8	29	0,70	8,56	9,26												
21 h	8	30	0,30	8,93	9,23	2	0,30	8,93	9,23	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 3	21	0,89	1,93
2 h	8	29	2,00	7,21	9,21												
12 h	8	30	1,30	7,99	9,29												
21 h	8	30	0,40	8,90	9,30	2	0,40	8,90	9,30	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 3	19	0,90	2,19
2 h	8	29	2,00	7,27	9,27												
16 h	8	30	0,60	8,65	9,25												
19 h	8	30	0,30	9,00	9,30	2	0,30	9,00	9,30	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 4	22	0,89	1,67
2 h	8	30	1,90	7,34	9,24												
12 h	8	30	1,20	8,09	9,29												
22 h	8	30	0,40	8,87	9,27	2	0,40	8,87	9,27	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 4	25	0,88	1,56
2 h	8	29	2,10	7,17	9,27												
18 h	8	30	1,10	8,17	9,27												
25 h	8	30	0,50	8,79	9,29	2	0,50	8,79	9,29	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 4	25	0,89	1,69
2 h	8	29	2,10	7,15	9,25												
16 h	8	29	1,40	7,79	9,19												
25 h	8	30	0,30	8,91	9,21	2	0,30	8,91	0,30	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 4	24	0,88	1,80
2 h	8	29	2,20	7,01	9,21												
14 h	8	29	1,30	7,84	9,14												
24 h	8	29	0,40	8,81	9,21	2	0,40	8,81	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 4	26	0,88	1,63
2 h	8	28	2,20	6,98	9,18												
15 h	8	29	1,30	7,84	9,14												

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	%CT	CALDA			
26 h	8	30	0,40	8,75	9,15	2	0,40	8,75	9,15	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 5	20	0,89	2,12
2 h	8	29	2,10	7,09	9,19												
12 h	8	29	1,50	7,75	9,25												
20 h	8	30	0,40	8,86	9,26	2	0,40	8,86	9,26	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 5	19	0,89	2,24
2 h	8	28	2,10	7,17	9,27												
16 h	8	29	0,70	8,57	9,27												
19 h	8	29	0,30	8,94	9,24	2	0,30	8,94	9,24	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 5	21	0,88	2,06
2 h	8	28	2,20	7,03	9,23												
21 h	8	29	0,40	8,83	9,23	2	0,40	8,83	9,23	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 5	20	0,88	1,92
2 h	8	29	2,00	7,19	9,19												
16 h	8	29	0,90	8,31	9,21												
20 h	8	29	0,50	8,79	9,29	2	0,50	8,79	9,29	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 5	20	0,88	2,03
2 h	8	27	2,20	7,07	9,27												
12 h	8	28	1,50	7,66	9,16												
20 h	8	29	0,40	8,76	9,16	2	0,40	8,76	9,16	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 6	23	0,88	1,77
2 h	8	29	2,10	7,05	9,15												
18 h	8	30	0,90	8,25	9,15												
23 h	8	30	0,40	8,75	9,15	2	0,40	8,75	9,15	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 6	25	0,88	1,72
2 h	8	28	2,20	7,00	9,20												
10 h	8	29	1,40	7,79	9,19												
25 h	8	30	0,40	8,79	9,19	2	0,40	8,79	9,19	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 6	24	0,88	1,60
2 h	8	29	2,00	7,21	9,21												
18 h	8	29	1,00	8,20	9,20												
24 h	8	30	0,40	8,81	9,21	2	0,40	8,81	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 6	24	0,89	1,74
2 h	8	28	2,10	7,17	9,27												
18 h	8	30	0,90	8,31	9,21												
24 h	8	30	0,30	8,91	9,21	2	0,30	8,91	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 6	22	0,89	1,75
2 h	8	29	1,90	7,33	9,23												
18 h	8	30	0,70	8,59	9,29												
22 h	8	30	0,30	8,93	9,23	2	0,30	8,93	9,23	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 7	16	0,88	2,58
2 h	8	29	2,10	7,09	9,19												
14 h	8	30	0,70	8,51	9,21												

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	%CT	CALDA			
16 h	8	30	0,50	8,81	9,31	2	0,50	8,81	9,31	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 7	16	0,89	2,37
2 h	8	30	2,00	7,29	9,29												
10 h	8	30	0,80	8,50	9,30												
16 h	8	30	0,40	8,87	9,27	2	0,40	8,87	9,27	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 7	14	0,90	2,85
2 h	8	30	2,00	7,29	9,29												
14 h	8	30	0,30	8,95	9,25	2	0,30	8,95	9,25	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 7	14	0,89	2,90
2 h	8	30	2,10	7,20	9,30												
12 h	8	30	0,60	8,69	9,29												
14 h	8	30	0,40	8,89	9,29	2	0,40	8,89	9,29	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 7	14	0,89	3,00
2 h	8	29	2,10	7,18	9,28												
8 h	8	30	1,00	8,27	9,27												
14 h	8	30	0,40	8,93	9,33	2	0,40	8,93	9,33	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 8	18	0,89	2,27
2 h	8	29	2,10	7,19	9,29												
12 h	8	30	1,00	8,28	9,28												
18 h	8	30	0,40	8,89	9,29	2	0,40	8,89	9,29	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 8	19	0,88	1,95
2 h	8	29	2,00	7,27	9,27												
18 h	8	30	0,90	8,30	9,20												
19 h	8	30	0,50	8,81	9,31	2	0,50	8,81	9,31	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 8	18	0,89	2,32
2 h	8	29	2,10	7,19	9,29												
18 h	8	30	0,60	8,69	9,29												
2 h	8	30	0,30	8,93	9,23	2	0,30	8,93	9,23	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 8	18	0,89	2,15
10 h	8	30	1,90	7,27	9,17												
18 h	8	30	0,40	8,88	9,28	2	0,40	8,88	9,28	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 8	18	0,90	2,35
2 h	8	30	2,00	7,20	9,20												
7 h	8	30	0,70	8,49	9,19												
18 h	8	30	0,30	8,96	9,26	2	0,30	8,96	9,26	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 9	32	0,88	1,03
2 h	8	29	2,10	7,19	9,29												
12 h	8	29	1,30	7,96	9,26												
22 h	8	30	0,60	8,56	9,16												
32 h	8	30	0,40	8,76	9,16	2	0,40	8,76	9,16	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 9	32	0,88	1,32
2 h	8	29	2,10	7,08	9,18												
10 h	8	30	1,70	7,38	9,08												

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	%CT	CALDA			
24	8	30	1,00	8,12	9,12												
32 h	8	30	0,30	8,84	9,14	2	0,30	8,84	9,14	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 9	32	0,87	1,27
2 h	8	29	2,10	7,00	9,10												
17	8	30	0,90	8,22	9,12												
32 h	8	30	0,50	8,69	9,19	2	0,50	8,69	9,19	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 9	32	0,88	1,34
2 h	8	29	2,20	7,01	9,21												
10 h	8	29	1,60	7,59	9,19												
24 h	8	30	0,70	8,41	9,11												
32 h	8	30	0,30	8,80	9,10	2	0,30	8,80	9,10	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 9	36	0,88	1,17
2 h	8	28	2,10	7,04	9,14												
24 h	8	29	1,00	8,10	9,10												
36 h	8	30	0,30	8,79	9,09	2	0,30	8,79	9,09	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 10	28	0,87	1,41
2 h	8	29	2,00	7,09	9,09												
16 h	8	30	1,30	7,92	9,22												
28 h	8	30	0,40	8,74	9,14	2	0,40	8,74	9,14	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 10	30	0,87	1,24
2 h	8	29	2,00	7,16	9,16												
14 h	8	30	1,60	7,61	9,21												
26 h	8	30	0,70	8,50	9,20												
30 h	8	30	0,50	8,71	9,21	2	0,50	8,71	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 10	28	0,88	1,41
2 h	8	29	1,90	7,19	9,09												
28 h	8	30	0,30	8,84	9,14	2	0,30	8,84	9,14	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 10	27	0,88	1,54
2 h	8	29	2,10	7,04	9,14												
27 h	8	30	0,40	8,77	9,17	2	0,40	8,77	9,17	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 10	27	0,89	1,63
2 h	8	30	2,10	7,02	9,12												
24 h	8	30	0,60	8,51	9,11												
27 h	8	30	0,30	8,85	9,15	2	0,30	8,85	9,15	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 11	21	0,87	1,94
2 h	8	28	2,20	6,99	9,19												
21 h	8	30	0,40	8,69	9,09	2	0,40	8,69	9,09	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 11	19	0,89	2,26
2 h	8	29	2,00	7,11	9,11												
12 h	8	30	1,00	8,18	9,18												
19 h	8	30	0,30	8,90	9,20	2	0,30	8,90	9,20	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 11	20	0,89	2,17
2 h	8	28	2,10	7,10	9,20												

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	%CT	CALDA			
17 h	8	29	0,60	8,71	9,31												
20 h	8	29	0,40	8,91	9,31	2	0,40	8,91	9,31	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 11	19	0,88	2,27
2 h	8	28	2,20	7,01	9,21												
15 h	8	29	0,80	8,49	9,29												
19 h	8	30	0,50	8,81	9,31	2	0,50	8,81	9,31	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 11	23	0,88	1,54
2 h	8	29	1,90	7,34	9,24												
20 h	8	30	0,70	8,51	9,21												
23 h	8	30	0,40	8,82	9,22	2	0,40	8,82	9,22	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 12	32	0,89	1,37
2 h	8	28	2,10	7,09	9,19												
19 h	8	29	1,20	8,00	9,20												
32 h	8	30	0,30	8,91	9,21	2	0,30	8,91	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 12	34	0,88	1,17
2 h	8	28	2,10	7,16	9,26												
17 h	8	29	1,20	7,08	8,28												
34 h	8	30	0,40	8,82	9,22	2	0,40	8,82	9,22	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 12	29	0,87	1,44
2 h	8	29	2,20	7,00	9,20												
19 h	8	29	1,00	8,24	9,24												
29 h	8	30	0,50	8,74	9,24	2	0,50	8,74	9,24	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 12	33	0,90	1,36
2 h	8	29	2,10	7,10	9,20												
20 h	8	29	1,20	8,03	9,23												
33 h	8	30	0,30	8,97	9,27	2	0,30	8,97	9,27	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 12	31	0,87	1,31
2 h	8	28	2,20	7,05	9,25												
29 h	8	29	0,60	8,59	9,19												
31 h	8	30	0,40	8,74	9,14	2	0,40	8,74	9,14	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 13	25	0,89	1,77
2 h	8	28	2,10	7,07	9,17												
22 h	8	30	0,60	8,62	9,22												
25 h	8	30	0,30	8,91	9,21	2	0,30	8,91	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 13	24	0,88	1,81
2 h	8	28	2,20	7,03	9,23												
21 h	8	30	0,70	8,50	9,20												
24 h	8	30	0,40	8,84	9,24	2	0,40	8,84	9,24	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 13	26	0,88	1,53
2 h	8	29	2,10	7,12	9,22												
21 h	8	30	0,80	8,41	9,21												
26 h	8	30	0,50	8,78	9,28	2	0,50	8,78	9,28	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 13	27	0,89	1,58

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	%CT	CALDA			
2 h	8	28	2,20	7,07	9,27												
22 h	8	30	0,90	8,24	9,14												
27 h	8	30	0,30	8,85	9,15	2	0,30	8,85	9,15	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 13	24	0,88	1,59
2 h	8	29	2,00	7,20	9,20												
19 h	8	30	0,80	8,41	9,21												
24 h	8	30	0,40	8,79	9,19	2	0,40	8,79	9,19	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 14	36	0,88	1,15
2 h	8	29	2,10	7,08	9,18												
16 h	8	30	1,60	7,63	9,23												
36 h	8	30	0,40	8,81	9,21	2	0,40	8,81	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 14	35	0,87	1,14
2 h	8	28	2,20	7,03	9,23												
31 h	8	30	0,70	8,51	9,21												
35 h	8	30	0,50	8,69	9,19	2	0,50	8,69	9,19	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 14	36	0,88	1,08
2 h	8	29	2,00	7,18	9,18												
20 h	8	29	1,40	7,73	9,13												
36 h	8	30	0,30	8,80	9,10	2	0,30	8,80	9,10	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 14	37	0,88	1,02
2 h	8	30	1,90	7,21	9,11												
32 h	8	30	0,70	8,49	9,19												
37 h	8	30	0,40	8,79	9,19	2	0,40	8,79	9,19	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 14	33	0,88	1,27
2 h	8	29	2,10	7,07	9,17												
24 h	8	30	1,00	8,09	9,09												
33 h	8	30	0,30	8,81	9,11	2	0,30	8,81	9,11	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 15	26	0,89	1,61
2 h	8	29	2,00	7,11	9,11												
26 h	8	30	0,30	8,85	9,15	2	0,30	8,85	9,15	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 15	27	0,87	1,43
2 h	8	30	2,10	7,08	9,18												
27 h	8	30	0,40	8,69	9,09	2	0,40	8,69	9,09	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 15	25	0,87	1,71
2 h	8	29	2,20	6,94	9,14												
25 h	8	30	0,40	8,72	9,12	2	0,40	8,72	9,12	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 15	24	0,86	1,69
2 h	8	29	2,20	6,93	9,13												
24 h	8	30	0,50	8,62	9,12	2	0,50	8,62	9,12	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 15	26	0,86	1,43
2 h	8	30	2,00	7,09	9,09												
26 h	8	30	0,50	8,64	9,14	2	0,50	8,64	9,14	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 16	20	0,87	2,04
2 h	8	29	2,10	7,03	9,13												

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	%CT	CALDA			
20 h	8	30	0,40	8,73	9,13	2	0,40	8,73	9,13	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 16	19	0,88	2,21
2 h	8	29	2,10	7,04	9,14												
15 h	8	39	0,70	8,49	9,19												
19 h	8	30	0,30	8,79	9,09	2	0,30	8,79	9,09	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 16	18	0,87	2,37
2 h	8	28	2,20	6,93	9,13												
18 h	8	30	0,40	8,71	9,11	2	0,40	8,71	9,11	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 16	22	0,87	1,77
2 h	8	28	2,10	7,06	9,16												
22 h	8	30	0,50	8,68	9,18	2	0,50	8,68	9,18	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 16	19	0,88	2,26
2 h	8	29	2,20	7,00	9,20												
19 h	8	30	0,30	8,79	9,09	2	0,30	8,79	9,09	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 17	26	0,87	1,48
2 h	8	29	2,00	7,10	9,10												
19 h	8	30	0,90	8,23	9,13												
26 h	8	30	0,50	8,70	9,20	2	0,50	8,70	9,20	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 17	27	0,89	1,68
2 h	8	29	2,20	7,00	9,20												
17 h	8	30	1,30	7,95	9,25												
27 h	8	30	0,30	8,89	9,19	2	0,30	8,89	9,19	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 17	23	0,88	1,70
2 h	8	29	2,00	7,15	9,15												
16 h	8	29	1,00	8,15	9,15												
23 h	8	30	0,40	8,78	9,18	2	0,40	8,78	9,18	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 17	24	0,87	1,61
2 h	8	29	2,10	7,09	9,19												
20 h	8	30	0,80	8,31	9,11												
24 h	8	30	0,50	8,70	9,20	2	0,50	8,70	9,20	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 17	23	0,89	2,00
2 h	8	29	2,20	7,00	9,20												
23 h	8	30	0,30	8,92	9,22	2	0,30	8,92	9,22	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 18	25	0,89	1,80
2 h	8	29	2,10	7,03	9,13												
15 h	8	30	1,10	8,05	9,15												
25 h	8	30	0,30	8,91	9,21	2	0,30	8,91	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 18	26	0,87	1,50
2 h	8	29	2,10	7,12	9,22												
20 h	8	30	0,90	8,27	9,17												
26 h	8	30	0,50	8,74	9,24	2	0,50	8,74	9,24	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 18	24	0,88	1,80
2 h	8	29	2,20	7,01	9,21												
18 h	8	30	0,90	8,29	9,19												

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tempo	FERMENTADOR					DESCARGA DE VINAGRE				CARGA DE CALDA DE ETANOL					t (h)	Y AA	P AA
	V (L)	T (°C)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	% CT	V (L)	% ET	% AA	%CT	CALDA			
24 h	8	30	0,40	8,81	9,21	2	0,40	8,81	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 18	26	0,88	1,57
2 h	8	29	2,10	7,14	9,24												
22 h	8	30	0,60	8,66	9,26												
26 h	8	30	0,40	8,84	9,24	2	0,40	8,84	9,24	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 18	23	0,89	1,75
2 h	8	30	2,00	7,21	9,21												
20 h	8	30	0,70	8,48	9,18												
23 h	8	30	0,30	8,89	9,19	2	0,30	8,89	9,19	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 19	26	0,89	1,55
2 h	8	29	1,90	7,23	9,13												
23	8	30	0,60	8,54	9,14												
26 h	8	30	0,30	8,91	9,21	2	0,30	8,91	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 19	27	0,87	1,30
2 h	8	29	1,90	7,23	9,13												
21 h	8	30	0,90	8,22	9,12												
27 h	8	30	0,40	8,69	9,09	2	0,40	8,69	9,09	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 19	26	0,88	1,54
2 h	8	29	2,10	7,11	9,21												
17 h	8	30	0,80	8,43	9,23												
26 h	8	30	0,40	8,78	9,18	2	0,40	8,78	9,18	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 19	24	0,88	1,70
2 h	8	29	2,10	7,11	9,21												
16 h	8	30	0,80	8,39	9,19												
24 h	8	30	0,40	8,81	9,21	2	0,40	8,81	9,21	2	10,00	0,00	10,00	TESTE 19	23	0,88	1,72
2 h	8	30	2,10	7,11	9,21												
14 h	8	30	0,90	8,35	9,25												
23 h	8	30	0,50	8,76	9,26	2	0,50	8,76	9,26	2	10,00	0,00	10,00	FIM DO EXPERIMENTO			

% ET: % (v/v) etanol

% CT: % (v/v) etanol + % (p/v) ácido acético

P AA: (Produtividade) g de ácido acético por 100 mL de calda em 24 h

% AA: % (p/v) ácido acético

Y AA: (Rendimento) taxa de conversão de etanol para ácido acético

Tabela 8. Médias e análise estatística do tempo de fermentação, rendimento, produtividade e população.

CALDA	t (h)	População Células/mL	Y AA	P AA	TEMPO (horas)			RENDIMENTO(Y)			PRODUTIVIDADE(P)			POPULAÇÃO (células/mL)			
					média	S	C.V.	média	S	C.V.	média	S	C.V.	Média	S	C.V.	
PADRÃO	330	3,2 x 10 ⁶															
	94	4,6 x 10 ⁸	ativação														
	25	1,3 x 10 ⁹	0,90	1,67	26	1,154	4,38	0,86	0,009	1,09	1,47	0,195	13,26	1,7x10 ⁹	4x10 ⁸	428,9	
	27	1,8 x 10 ⁹	0,88	1,28													
	27	2,1 x 10 ⁹	0,89	1,47													
TESTE 1	21	2,6 x 10 ⁹	0,89	1,81													
19	3,3 x 10 ⁹	0,88	1,83														
TESTE 1	17	4,1 x 10 ⁹	0,88	2,30	19	1,414	7,44	0,88	0,004	0,47	1,96	0,200	10,23	4x10 ⁹	1x10 ⁹	334,2	
	19	4,3 x 10 ⁹	0,88	1,97													
	19	5,8 x 10 ⁹	0,88	1,89													
	TESTE 2	28	5,3 x 10 ⁹	0,88													1,41
	30	5,9 x 10 ⁹	0,87	1,08													
TESTE 2	31	6,0 x 10 ⁹	0,88	1,23	30	1,516	4,99	0,88	0,007	0,80	1,22	0,144	11,86	6x10 ⁹	9x10 ⁸	696,6	
	31	5,3 x 10 ⁹	0,87	1,08													
	32	7,4 x 10 ⁹	0,88	1,28													
	TESTE 3	24	6,5 x 10 ⁹	0,88													1,49
	23	7,0 x 10 ⁹	0,88	1,50													
TESTE 3	21	7,3 x 10 ⁹	0,89	1,97	22	1,949	9,02	0,89	0,008	0,92	1,82	0,306	16,91	7,2x10 ⁹	6x10 ⁸	1245,3	
	21	7,3 x 10 ⁹	0,89	1,93													
	19	8,1 x 10 ⁹	0,90	2,19													
	TESTE 4	22	8,3 x 10 ⁹	0,89													1,67
	25	9,3 x 10 ⁹	0,88	1,56													
TESTE 4	25	8,5 x 10 ⁹	0,89	1,69	24	1,516	6,22	0,88	0,006	0,72	1,67	0,089	5,34	8,5x10 ⁹	5x10 ⁸	1634,2	
	24	8,3 x 10 ⁹	0,88	1,80													
	26	7,9 x 10 ⁹	0,88	1,63													
	TESTE 5	20	8,3 x 10 ⁹	0,89													2,12
	19	8,5 x 10 ⁹	0,89	2,24													
TESTE 5	21	8,9 x 10 ⁹	0,88	2,06	20	0,707	3,54	0,88	0,006	0,79	2,07	0,117	5,65	8,8x10 ⁹	4x10 ⁸	2200,0	
	20	9,3 x 10 ⁹	0,88	1,92													
	20	9,0 x 10 ⁹	0,88	2,03													

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CALDA	t (h)	População Células/mL	Y AA	P AA	TEMPO (horas)			RENDIMENTO(Y)			PRODUTIVIDADE(P)			POPULAÇÃO (células/mL)		
					média	S	C.V.	média	S	C.V.	média	S	C.V.	Média	S	C.V.
TESTE 6	23	$8,3 \times 10^9$	0,88	1,77	24	1,140	4,83	0,88	0,007	0,89	1,72	0,067	3,94	$8,4 \times 10^9$	3×10^8	2762,8
	25	$8,5 \times 10^9$	0,88	1,72												
	24	$8,7 \times 10^9$	0,88	1,60												
	24	$7,9 \times 10^9$	0,89	1,74												
	22	$8,5 \times 10^9$	0,89	1,75												
TESTE 7	16	$9,3 \times 10^9$	0,88	2,58	15	1,094	7,40	0,89	0,005	0,62	2,74	0,257	9,42	$1,2 \times 10^{10}$	4×10^9	316,7
	16	$9,9 \times 10^9$	0,89	2,37												
	14	$1,1 \times 10^{10}$	0,90	2,85												
	14	$1,3 \times 10^{10}$	0,89	2,90												
TESTE 8	18	$9,3 \times 10^9$	0,89	2,27	18	0,447	2,46	0,89	0,005	0,64	2,21	0,164	7,45	$9,2 \times 10^9$	2×10^8	3845,1
	19	$9,0 \times 10^9$	0,88	1,95												
	18	$8,9 \times 10^9$	0,89	2,32												
	18	$9,5 \times 10^9$	0,89	2,15												
	18	$9,2 \times 10^9$	0,90	2,35												
TESTE 9	32	$8,3 \times 10^9$	0,88	1,03	33	1,788	5,45	0,88	0,005	0,64	1,22	0,129	10,57	8×10^9	2×10^8	4169,4
	32	$8,0 \times 10^9$	0,88	1,32												
	32	$7,9 \times 10^9$	0,87	1,27												
	32	$7,8 \times 10^9$	0,88	1,34												
	36	$8,1 \times 10^9$	0,88	1,17												
TESTE 10	28	$8,3 \times 10^9$	0,87	1,41	28	1,224	4,37	0,88	0,006	0,70	1,45	0,146	10,11	$8,6 \times 10^9$	5×10^8	1789,6
	30	$8,1 \times 10^9$	0,87	1,24												
	28	$8,5 \times 10^9$	0,88	1,41												
	27	$8,9 \times 10^9$	0,88	1,54												
	27	$9,3 \times 10^9$	0,89	1,63												
TESTE 11	21	$9,5 \times 10^9$	0,87	1,94	20	1,673	8,20	0,88	0,008	1,00	2,04	0,306	15,04	1×10^{10}	1×10^9	716,2
	19	$9,7 \times 10^9$	0,89	2,26												
	20	$9,9 \times 10^9$	0,89	2,17												
	19	$1,3 \times 10^{10}$	0,88	2,27												
	23	$1,0 \times 10^{10}$	0,88	1,54												

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CALDA	t (h)	População Células/mL	Y AA	P AA	TEMPO (horas)			RENDIMENTO(Y)			PRODUTIVIDADE(P)			POPULAÇÃO (células/mL)		
					média	S	C.V.	média	S	C.V.	média	S	C.V.	Média	S	C.V.
TESTE 12	32	9,3 x 10 ⁹	0,89	1,37	32	1,923	6,05	0,88	0,010	1,16	1,33	0,099	7,50	8,4x10 ⁹	8x10 ⁸	1119,9
	34	9,1 x 10 ⁹	0,88	1,17												
	29	8,3 x 10 ⁹	0,87	1,44												
	33	8,0 x 10 ⁹	0,90	1,36												
	31	7,5 x 10 ⁹	0,87	1,31												
TESTE 13	25	8,3 x 10 ⁹	0,89	1,77	25	1,303	5,17	0,88	0,005	0,59	1,66	0,123	7,46	8,2x10 ⁹	2x10 ⁸	3347,6
	24	8,0 x 10 ⁹	0,88	1,81												
	26	7,9 x 10 ⁹	0,88	1,53												
	27	8,5 x 10 ⁹	0,89	1,58												
	24	8,3 x 10 ⁹	0,88	1,59												
TESTE 14	36	7,9 x 10 ⁹	0,88	1,15	35	1,516	4,28	0,88	0,005	0,58	1,13	0,090	7,96	5,8x10 ⁹	1x10 ⁹	409,1
	35	6,5 x 10 ⁹	0,87	1,14												
	36	5,3 x 10 ⁹	0,88	1,08												
	37	5,0 x 10 ⁹	0,88	1,02												
	33	4,3 x 10 ⁹	0,88	1,27												
TESTE 15	26	5,3 x 10 ⁹	0,89	1,61	26	1,142	4,45	0,87	0,009	1,04	1,57	0,135	8,62	6,1x10 ⁹	7x10 ⁸	931,1
	27	5,9 x 10 ⁹	0,87	1,43												
	25	6,0 x 10 ⁹	0,87	1,71												
	24	6,3 x 10 ⁹	0,86	1,69												
	26	7,1 x 10 ⁹	0,86	1,43												
TESTE 16	20	7,3 x 10 ⁹	0,87	2,04	20	1,516	7,74	0,87	0,004	0,56	2,13	0,235	11,07	8x10 ⁹	5x10 ⁸	1722,0
	19	7,9 x 10 ⁹	0,88	2,21												
	18	8,2 x 10 ⁹	0,87	2,37												
	22	8,5 x 10 ⁹	0,87	1,77												
	19	8,3 x 10 ⁹	0,88	2,26												
TESTE 17	26	8,8 x 10 ⁹	0,87	1,48	25	1,816	7,38	0,88	0,010	1,18	1,69	0,193	11,44	8,4x10 ⁹	4x10 ⁸	1925,7
	27	8,3 x 10 ⁹	0,89	1,68												
	23	7,9 x 10 ⁹	0,88	1,70												
	24	8,3 x 10 ⁹	0,87	1,61												
	23	9,0 x 10 ⁹	0,89	2,00												

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CALDA	t (h)	População Células/mL	Y AA	P AA	TEMPO (horas)			RENDIMENTO(Y)			PRODUTIVIDADE(P)			POPULAÇÃO (células/mL)		
					média	S	C.V.	média	S	C.V.	média	S	C.V.	Média	S	C.V.
TESTE 18	25	$8,5 \times 10^9$	0,89	1,80	25	1,303	5,26	0,88	0,006	0,76	1,68	0,142	8,48	$8,7 \times 10^9$	3×10^8	2550,1
	26	$8,3 \times 10^9$	0,87	1,50												
	24	$9,1 \times 10^9$	0,88	1,80												
	26	$8,9 \times 10^9$	0,88	1,57												
	23	$9,0 \times 10^9$	0,89	1,75												
TESTE 19	26	$8,9 \times 10^9$	0,89	1,55	25	1,643	6,52	0,88	0,008	0,91	1,56	0,169	10,85	$8,9 \times 10^9$	2×10^8	3720,4
	27	$8,8 \times 10^9$	0,87	1,30												
	26	$9,3 \times 10^9$	0,88	1,54												
	24	$9,1 \times 10^9$	0,88	1,70												
	23	$8,7 \times 10^9$	0,88	1,72												

Y AA: (Rendimento) taxa de conversão de etanol para ácido acético

P AA: (Produtividade) g de ácido acético por 100 mL de calda em 24 h

S: Desvio Padrão

C.V.: Coeficiente de Variação

A análise estatística das variáveis tempo, rendimento, produtividade e população mostrou valores de desvio padrão (S) e de coeficiente de variação (C.V.) dentro de limites aceitáveis para experimentos biológicos. Os valores das médias de produtividade foram utilizados para a análise estatística a partir do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Os resultados da análise dos efeitos das respostas de produtividade no reator de fermentação submersa, obtidas a partir do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} , com 3 repetições no ponto central, estão demonstrados na Tabela 9. Observou-se que o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,98785. Os experimentos de seleção de minerais para a linhagem estudada obtiveram coeficiente de correlação superior a 0,9. Este valor pode ser considerado significativo uma vez que trata-se de um experimento biológico.

Tabela 9 – Estimativa dos efeitos das variáveis independentes (Mo, B, Zn, Fe e Mn) na produção de ácido acético.

Fonte de variação	Efeito	Desvio Padrão	t (3)	P
(1) Molibdênio	0,356125	0,053969	6,598674	0,00708500
(2) Boro	-0,317130	0,053969	-5,876040	0,00983300
(3) Zinco	-0,386130	0,053969	-7,154550	0,00562300
(4) Ferro	0,281375	0,053969	5,213624	0,01371900
(5) Manganês	0,350625	0,053969	6,496764	0,00740500
Interações	1,729000	0,024763	69,822600	0,00000647

Coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,98785

Todos os efeitos medidos e descritos na tabela 9 foram significativos em um nível de confiança de 95%.

A Figura 3 mostra o gráfico de pareto dos efeitos das variáveis na resposta em termos de produtividade.

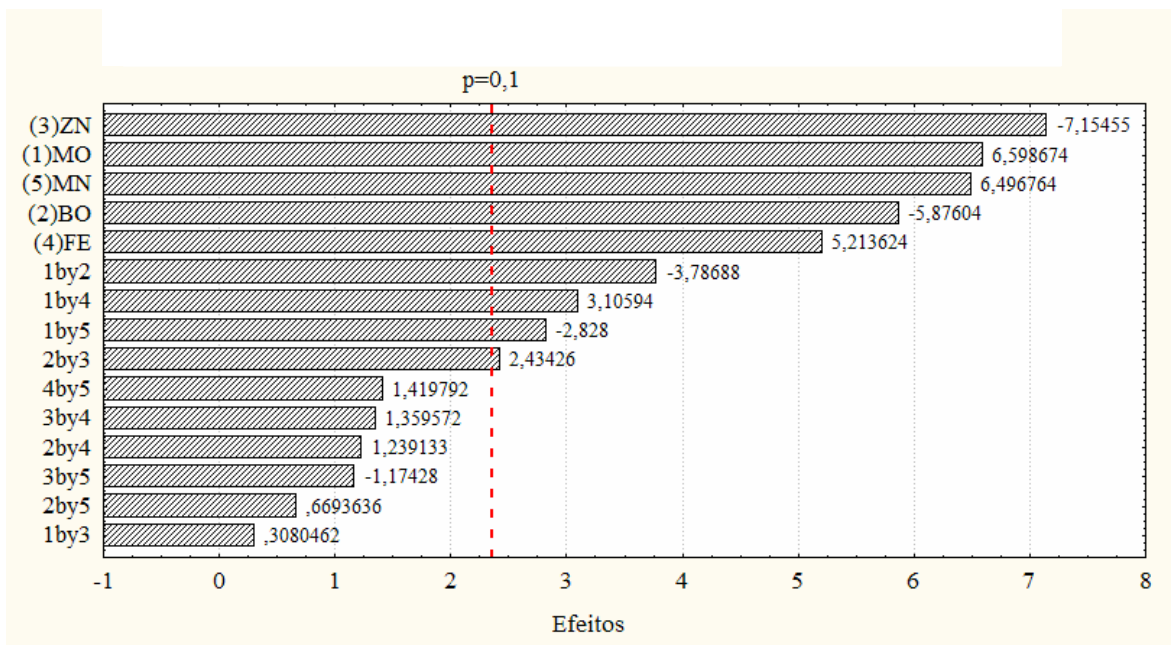


Figura 3 – Gráfico do teste de pareto dos efeitos de minerais sobre a produtividade

Pôde-se medir a influência dos minerais sobre a produtividade. Todos os minerais testados afetaram significativamente a resposta. Observou-se que o molibdênio (0,356), o ferro (0,281) e o manganês (0,351) exerceram efeitos significativos ($p < 0,05$) positivos, em um nível de confiança de 95%, indicando que o aumento da concentração destes componentes aumentaria a produtividade. Já o boro (-0,317) e o zinco (-0,386) exerceram efeitos significativos ($p < 0,05$) negativos, indicando que a diminuição da concentração destes aumentaria a produtividade em termos de percentual de ácido acético por 24 h.

O rendimento foi similar em termos de grandeza nas 19 formulações avaliadas. Estas taxas situaram na faixa de 0,87 a 0,89. Isso pode ser explicado

por se tratar de uma fermentação do tipo batelada alimentada. A cada experimento preparou-se calda conforme Tabela 3 e Tabela 5, com 10% de etanol. A retirada do fermentado ocorria quando a concentração de etanol estava entre 0,3 e 0,5% (v/v). Este limite de teor de álcool deve-se ao fato de que é fundamental a presença de etanol no meio de fermentação para que a enzima álcool desidrogenase fique localizada na membrana celular (TAKEMURA et al 1993). O tempo de conversão foi afetado com a variação na concentração dos minerais na calda bem como a produtividade de ácido acético.

Os testes 6, 12 e 17 apresentaram a mesma população ($8,4 \times 10^9$ células/mL) e produtividades diferentes (1,72; 1,33 e 1,69 g de ácido acético por 24 h, respectivamente). Estes resultados mostraram que não existiu relação direta entre a população e a produtividade obtida nos diversos experimentos. No entanto, deve observar que no teste 7 (Mo, Fe e Mn presentes e B e Zn ausentes) a maior produtividade (2,74 g/24h) foi obtida quando a população atingiu o maior valor ($1,2 \times 10^{10}$ células/mL). Um número elevado de células no reator é importante para garantir maior produtividade, mas o ajuste das condições nutricionais com relação aos minerais mostrou-se determinante para a obtenção de maiores taxas de produção de ácido acético.

De acordo com a literatura (SPINOSA, 2002; SOKOLLEK, HAMMES, 1997) um inóculo para ser viável deve apresentar população igual ou superior a 10^9 células por mL. Spinosa (2002) em estudo com bactérias acéticas considerou a população de 10^9 células/mL como término da fase de crescimento logarítmico. A avaliação dos resultados deste trabalho possibilita inferir que para a conversão

do etanol em ácido acético a população deve estar em valores igual ou superior a 10^9 células por mL.

Os minerais testados são componentes descritos como cofatores enzimáticos envolvidos na transformação do etanol em ácido acético (FLORKIN; STOTZ, 1971; LEHNINGER; NELSON; COX, 2006; MADIGAN, MARTINKO; PARKER et al., 1997; KEHRES; MAGUIRE, 2003; MOORE; HELMANN, 2005; AVCI; DÖNMEZ, 2006). Desta forma o fornecimento adequado de minerais deve influenciar a atividade das enzimas envolvidas na produção de ácido acético, sem necessariamente influenciar no crescimento das linhagens ativas no processo.

Ácido acético produzido é um metabólito secundário das bactérias acéticas uma vez que é produzido no final da fase de crescimento. Madigan; Martinko; Parker (1997) relatam que a produção de metabólitos secundários dependem essencialmente das condições nutricionais do meio de produção e ainda, que a síntese destes metabólitos não são essenciais ao crescimento e reprodução.

Santos Junior (2004) analisou a importância desses mesmos minerais no crescimento de linhagens de *Acetobacter* sp. Em linhagem isolada de ambiente industrial o molibdênio e o zinco exerceram efeito positivo e o boro, ferro e manganês exerceram efeito negativo na resposta analisada. O parâmetro usado foi o de aumento da densidade óptica para medir crescimento das linhagens. O molibdênio e o zinco apresentaram a mesma resposta quando comparados aos dados atuais, enquanto, o boro, o ferro e o manganês mostraram efeitos contrários

aos aqui descritos.

Como o atual trabalho mediu a resposta em termos de produtividade, a discrepância dos resultados encontrados se justifica pela mudança do parâmetro avaliado e pelas diferentes condições de condução dos experimentos. Enquanto o trabalho de 2004 tinha por objetivo criar condições de crescimento de linhagens de *Acetobacter* sp., o atual propõe-se a ajustar as condições de produção de ácido acético.

No trabalho de Abolhassan, Sepehr e Islami (2007), o zinco exerceu efeito negativo sobre a atividade de álcool desidrogenase (ADH), o que é compatível com o efeito negativo sobre a produtividade de ácido acético, uma vez que esta enzima é determinante na cadeia de reações que transformam o etanol em ácido acético. A produtividade medida é essencialmente dependente da atividade desta enzima.

Sabe-se que a função específica dos minerais para os organismos vivos é atuar como cofator e grupo prostético de enzimas. O ferro, elemento selecionado pela linhagem avaliada, participa no complexo citocromo, é componente de catalases, peroxidases, oxidases e todas as nitrogenases. As bactérias pertencentes ao gênero *Acetobacter* são catalases positivas e oxidases negativas. Os citocromos a₁, a₂, a₄, b, c, c₁ e d têm sido encontrados em *Acetobacter* mas não estão sempre presentes todos juntos em uma linhagem. O citocromo a₁ parece ser típico de *Acetobacter* e não tem sido detectado em *Gluconobacter*. O molibdênio tem função celular em várias enzimas que contêm flavina e em nitrogenases, redutases e algumas desidrogenases (FLORKIN; STOTZ, 1971;

LEHNINGER, 2006; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997; KEHRES; MAGUIRE, 2003; MOORE; HELMANN, 2005; AVCI; DÖNMEZ, 2006).

5.2 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

5.2.1 Isolamento

Durante o experimento foram realizadas coletas para isolamento de bactérias acéticas do reator de fermentação submersa. As coletas foram realizadas no início e após a realização de todos os testes de minerais para verificação da manutenção da linhagem que estava ativa do reator.

A técnica de preparo do meio em dupla camada mostrou-se eficiente para o isolamento de bactérias acéticas. Outros trabalhos de isolamento de microrganismos são encontrados utilizando-se essa técnica e variando-se meios de cultivo e outras particularidades inerentes a cada estudo (SPINOSA, 2002; NDOYE, 2007).

Tanto no início como no final do experimento foi isolada apenas uma linhagem do reator. As colônias crescidas apresentaram as mesmas características macroscópicas e os resultados apresentados na Tabela 10 evidenciam que a linhagem se manteve a mesma durante a condução do experimento.

As colônias isoladas apresentaram-se em forma irregular, superfície lisa, bordas irregulares, planas, sem pigmentação, opacas e de consistência viscosa.

5.2.2 Identificação fenotípica do gênero *Acetobacter*

Após a coloração de Gram, os isolados ao serem observados em microscópio, ocorriam como bastonetes Gram negativos em pares ou isolados. Estas características são compatíveis com a família *Acetobacteriaceae*. (SPINOSA, 2002; De LEY et al., 1984)

Para a diferenciação entre gêneros foi usado o ágar dextrose, sorbitol e manitol (*DSM*) e este possibilitou verificar a capacidade de oxidação do lactato apresentado somente pelas linhagens de *Acetobacter* sp., permitindo-se então identificar os isolados. As linhagens isoladas cresceram e mudaram a coloração do meio de amarela para púrpura, indicando que o gênero é *Acetobacter*.

A mudança de cor do meio deve-se aos produtos da superoxidação do lactato e esse é um dos critérios de identificação do gênero, pois, somente as bactérias do gênero *Acetobacter* são capazes de superoxidar esse composto (CIRIGLIANO, 1992; De LEY et al. 1984).

5.2.3 Caracterização bioquímica dos isolados identificados como *Acetobacter* sp.

As características dos isolados, identificados como *Acetobacter* sp. com linhagens-referência das espécies do gênero estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Comparação das características das linhagens isoladas com linhagens-referência (De LEY, 1984, SPINOSA, 2002).

Características	Início	Final	<i>A. acetii</i> CCT0190	<i>A. acetii</i> CCT1724
Crescimento meio Frateur modificado por Hoyer	+	+	(+)	(+)
Produção de ácido a partir de glicose	+	+	(+)	(-)
Produção de catalase	+	+	(+)	(+)
Produção de celulose	-	-	(-)	(-)
Produção de dihidroxiacetona a partir glicerol	-	-	(-)	(-)
Produção de indol do triptofano	-	-	(-)	(-)
Produção de oxidase	-	-	(-)	(-)
Produção de pigmentos marrons	-	-	(-)	(-)
Produção de proteases (gelatinase)	-	-	(-)	(-)
Redução de nitrato	+	+	(+)	(+)

As linhagens isoladas no início e no final do experimento mostraram as mesmas características quando comparadas entre si. E quando comparadas com as linhagens de referência pode-se inferir que os isolados são linhagens de *Acetobacter acetii*.

5.3 Expressão de RNA mensageiro de Álcool desidrogenase

Em todos os testes realizados foi possível visualizar a banda referente a expressão do gene da enzima álcool desidrogenase, como está mostrado na Figura 4. Tal resultado era esperado uma vez que em todos os testes houve a conversão de etanol para ácido acético. Na figura estão descritas as bandas referentes à expressão da enzima álcool desidrogenase nos testes de maior produtividade (T0, T3, T5, T7, T8, T11 e T16) e nos testes de menor produtividade (T2, T6, T9, T12 e T14).



Figura 4 – Gel de poliacrilamida 8% com marcadores moleculares para o gene da enzima álcool desidrogenase (ADH); P – marcador molecular (100 pb); (-) controle negativo.

A variação no fornecimento de minerais para as bactérias acéticas não impediu que a enzima ADH fosse expressa, entretanto, uma relação com os resultados de produtividade pode indicar que diferentes concentrações de

minerais interferem na velocidade da ação dessa enzima, uma vez que a produção de ácido acético é dependente da álcool desidrogenase.

6 CONCLUSÕES

Os minerais estudados exerceram efeitos significativos sobre a produtividade de ácido acético por bactérias acéticas em processo submerso de fermentação acética.

O zinco e o boro exerceram efeito negativo sobre a produtividade de ácido acético, indicando que a diminuição da sua concentração no meio de fermentação aumenta a resposta. Já o ferro, o molibdênio e o manganês exerceram efeito positivo, indicando que o aumento da sua concentração no meio de fermentação aumenta a produtividade. Estes dados são significativos do ponto de vista industrial e úteis para a obtenção de suplemento com concentrações adequadas dos minerais estudados.

Dentre os minerais selecionados; ferro, boro e manganês mostraram efeitos diferentes quando utilizados para o crescimento de linhagens de *Acetobacter* sp. e produção de ácido acético, indicando a existência de vias metabólicas diferenciadas para estes parâmetros.

O fornecimento de minerais em diferentes concentrações mostrou não influenciar na expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH), entretanto, a atividade do complexo enzimático [álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase

(ALDH)], envolvida na conversão do etanol em ácido acético era diferenciada, fato este evidenciado pelos diferentes valores de produtividades obtidos nos experimentos.

A ferramenta estatística do delineamento fatorial incompleto foi eficaz na seleção qualitativa de nutrientes, reduzindo o número de experimentos e indicando efeitos positivos e negativos de cada elemento além das interações entre eles.

O número de células viáveis necessárias para uma produtividade superior a 1,5 g de ácido acético em 24 h deve ser igual ou acima de 10^9 células/mL.

Estudos que disseminam conhecimentos relativos a uma área pouco estudada como o da fermentação acética, alavancam desenvolvimento econômico para o país. Permitem ainda, estreitar os vínculos entre a pesquisa e a atividade industrial, preservando-se as características inerentes a cada um desses universos.

7. BIBLIOGRAFIA

ABOLHASSAN, M. S.; SEPEHR, S.; ISLAMI, M. Purification and characterization of membrane-bound quinoprotein alcohol dehydrogenase from a native strain of *Acetobacter*. **Journal of Biological Sciences**, v. 7 (2), p. 315-320, 2007.

ADACHI, O.; OKAMOTO, K.; MATSUSHITA, K.; SHINAGAWA, E.; AMEYAMA, M. An ideal medium for assaying growth stimulating activity of pyrroloquinone quinone with *Acetobacter aceti* IFO 3284. **Agriculture, Biologic, Chemistry**, v. 20, p. 2751-2752, 1990.

ADAMS, M.R. Vinegar. In: WOOD, B.J.B. **Microbiology of fermented foods**. London: Elsevier Applied Science, 1998. v. 1, p. 1-44.

AMEYAMA, M.; ADACHI, O. Alcohol-dehydrogenase from acetic acid bacteria. **Methods Enzymology**, v. 89, p. 450-457, 1982.

AMEYAMA, M.; MATSUSHITA, K.; SHINAGAWA, E. Ethanol oxidative respiratory chain of acetic acid bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, p. 304-310, 1992.

ANKE, M.; SEIFERT, M. The biological and toxicological importance of molybdenum in the environment and in the nutrition of plants, animals and man. **Acta Biologica Hungarica**, v. 58, n. 3, p. 311-324, 2007.

ASAI T. **Acetic acid bacteria classification and biochemical activities**. Tokyo: University of Tokyo, 1968. 343 p.

AVCI, A.; DÖNMEZ, S. Effect of zinc on ethanol production by two *Thermoanaerobacter* strains. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 984-989, 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: ed. Unicamp, 1995. 299p.

BAUER, D.; MÜLLER, H.; REICH, J.; RIEDEL, H.; AHRENKIEL, V.; WARTHOF, P.; STRAUSS, M. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). **Nucleic Acids Research**, v. 21, n.18, p. 4272-4280, 1993.

BOX, G.E.P.; DRAPER, N.E. **Empirical model building and response surfaces**. 3ed. New York: John Wiley and Sons, 1987. 669p.

CARR, J.G. Methods for identifying acetic acid bacteria. In: GIBBS, B. M.; SHAPTON, D. A. (ed.). **Identification methods for microbiologists**. London: Academic Press, 1968. v. 2.

CAVET, J. S.; BORRELY, G. P. M.; ROBINSON, N. J. Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 165-181, 2003.

CIRIGLIANO, M. C. A selective medium for the isolation and differentiation of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, n. 3, p. 1038-1039, 1982.

COULTHURST, S. J.; WHITENEAD, N. A.; WELCH, M.; SALMOND, G. P. C. Can boron get bacteria talking? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 217-219, 2002.

DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J. Family VI. *Acetobacteriaceae*. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 267-277, 1984.

DE VERO, L.; GIUDICI, P. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 96-101, 2008.

EBNER, H. Vinegar: production of vinegar. In: PRESCOTT, S.C., DUNN, C.G. **Industrial Microbiology**. Westport: AVI, 1983.

EBNER, H.; FOLLMANN H.; SELLMER, S. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. VCH Verlagsgesellschaft, 1996. vol. A27, Germany.

ENTANI, E.; OHMORI, S.; MASAI, H.; SUSUKI, K. I. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. **Journal General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 31, n. 5, p. 475-490, 1985.

FRAGAPANE, G.; RUBIO-FERNÁNDEZ, H.; NIETO, J.; SALVADOR, M.D. Wine vinegar production using noncommercial 100-litre bubble column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 2, p. 141-146, 1999.

FLORKIN, M.; STOTZ, E. H. **Comprehensive biochemistry: metabolism of vitamins and trace elements**. (vol 21). Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1971. 297p.

FRINGS MICRODYN DO BRASIL. **Arquivos técnicos em fermentação submersa**. Piracicaba, 1996.

GONZÁLEZ, A.; HIERRO, N.; POBLET, M.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 295-304, 2005.

GONZÁLEZ, A.; POBLET, M.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 141-146, 2006.

HEO, M. S.; SON, H. J. Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. **Biotechnology applied Biochemistry**, v. 36, p. 41-45, 2002.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (Ed.). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HONG, F.; QIU, K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p.545-549, 2008.

HORSBURGH, M. J.; WHARTON, M. K.; FOSTER, S. J. Manganese: elemental defence for a life with oxygen? **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 11, p.496-501, 2002.

ILABACA, C.; NAVARRETE, P.; MARDONES, P.; ROMERO, J.; MAS, A. Application of culture independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 245-249, 2008.

ITO, T.; SOTA, H.; HONDA, H.; SHIMIZU, K.; KOBAYASHI, T. Efficient acetic acid production by repeated fed-batch fermentation using two fermentors, **Applied Microbiology Biotechnology**, v.36, p.295-299, 1991.

KEHRES, D. G.; MAGUIRE, M. E. Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 263-190, 2003.

KIM, J. N.; CHOO, J. S.; WEE, Y. J.; YUN, J. S.; RYU, H. W. Culture medium optimization for acetic acid production by a persimmon vinegar-derived bacterium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 123, n.1-3, p. 861-869, 2005.

KÖSEBALADAN, F.; ÖZILGEN, K. Kinetics of wine spoilage by acetic acid bacteria. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 55, p. 59-63, 1992.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Editora Sarvier, 4ª edição, 2006.

LIANG, P.; PARDEE, A. P. Differential display of eukariotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, n. 5072, p. 967-971, 1992.

LIMA, U. A.; BORZANI, W.; AQUARONE, E.; SCHIMIDELL (Coordenadores) **Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p. (Biotecnologia Industrial, v.2)

LOTONG, N.; MALAPAN, W.; BOONGORSRANG, A.; YONGMANITCHAI, W. Production of vinegar by *Acetobacter* cells fixed on a rotating disc reactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 32, p. 27-31, 1989.

MACHADO, S. S; LUTTIK, M. A. H.; DIJKEN, J. P. van; JONGEJAN, J. A.; PRONK, J. T. Regulation of alcohol-oxidizing capacity in chemostat cultures of *Acetobacter pasteurianus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 1061-1066, 1995.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**: 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAEDA, A. H. **Estudo de bactérias acéticas de usina de açúcar e álcool**. Campinas, 1997. 67 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MOORE, C. C.; HELMANN, J. D. Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 188-195, 2005.

NDOYE, B.; LEBECQUE, S.; DESTAIN, J.; GUIRO, A. T.; THONART, P. A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1561-1565, 2007a.

NDOYE, B.; WEEKERS, F.; DIAWARA, B.; GUIRO, A.T.; HONART, P. Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria from tropical products of Sub-Saharan Africa. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 1374-1382, 2007b.

NGUYEN, K. T.; WU, J. C.; BOYLAN, J. A.; GHERARDINI, F. C.; PEI, D. Zinc is the metal cofactor of *Borrelia burgdorferi* peptide diformylase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 469, p. 217-225, 2007.

OLIVEIRA-JUNIOR, W. P.; DIAS-OLIVEIRA, J.; GOULART, L. R.; BRANDEBURGO, A. M., Use of non radioactive differential display for te study of

work division gene expression in *Apis mellifera*. **Journal of Bioscience**, v. 19, n.2, p. 105-107, 2003.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAIN, E. C. S. **Microbiologia**. Trad. Manuel Adolpho May Pereira. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981. v.1.

REZANKA, T.; SIGLER, K. Biologically active compounds of semi-metals. **Phytochemistry**, n. 69, p. 585-606, 2008.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática**: roteiro e manual - bactérias e fungos. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. 112 p.

SANTOS, F.R.; PENA, S. D. J.; EPPLER, J.T. Genetic and population study of a Y-linked intranucleotide repeat DNA polymorphism. **Human Gene**. v. 90 p. 655-656, 1993.

SANTOS JUNIOR, V. **Estudo dos fatores de crescimento e de produção de ácido acético por bactérias acéticas isoladas de indústrias de vinagre**. Campinas, 2004. 87 p. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SARAVANAN, V.S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconoacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, v. 66, p. 1794-1798, 2007.

SCHLEYER, U.; BRINGER-MEYER, S.; SAHM, H. An easy cloning and expression vector system for *Gluconobacter oxydans*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 91-95, 2008.

SIMMS, D., et al.. Trizol: A New reagent for optimal single-step isolation of RNA. **Focus**, v. 15, p. 99 – 102, 1993.

SPINOSA, W. A. **Utilização do amido da quirera de arroz na produção de vinagre**. Londrina, 1996. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina.

SPINOSA, W. A. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre**. Campinas, 2002. 243 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

TAKEMURA, H.; KONDO, K.; HORINOUCI, S.; BEPPU, T. Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6857-6866, 1993.

TOOKER, B. C.; BURTON, J. L.; COUSSENS, P. M. Survival tactics of *M. paratuberculosis* in bovine macrophage cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, p. 429-437, 2002.

TOOKER, B. C.; COUSSENS, P. M. Phagocytosis of *M. paratuberculosis* fails to activate expression of NADH dehydrogenase and nucleolin-related protein in bovine macrophage. **Immunology Letters**, v. 93, p. 137-142, 2004.

TRCEK, J. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 735-745, 2005.

YAMADA, Y.; SATO, H. The manganese ion strongly activates restriction endonuclease Aat II from *Acetobacter aceti* IFO 3281. **Agriculture, Biologic, Chemistry**, v. 53, p. 1745-1746, 1989.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P. Genera and species in acetic acid bacteria **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 96-101, 2008.

ZANCANARO JR., O. **Otimização do processo lento de fermentação acética**. São Paulo, 1988. 69 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

ZANCANARO JR., O. Vinagres. In: AQUARONE et al. (ed.). **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 4, 2001.

ZHANG, Y.; LIU, G.; SHEN, J. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 30, p. 855-860, 2005.

8 ANEXO

Composição dos meios de cultura e soluções usadas nos testes bioquímicos

7.1 Teste de produção de indol do triptofano

O meio de cultura a ser utilizado é composto de:

Triptona	10 g
Água destilada e deionizada	1000 mL

7.2 Teste de produção de proteases (gelatinases)

O meio de cultura usado no teste foi ágar gelatina, composto de:

Triptona	5 g
Extrato de levedura	3 g
Gelatina	5 g
Ágar	15 g
Água destilada e deionizada	1000 mL

7.3 Teste de redução de nitrato

Caldo Nutriente	
Extrato de Carne	10 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

Reagente (A)	
Dimetil-alfa naftil-amina	6 g
Ácido acético (5N)	1000 mL

Reagente (B)	
Ácido sulfanílico	8 g
Ácido acético	1000 mL

7.4 Teste de crescimento em meio de *Hoyer*

Composição do meio:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 g
K_2HPO_4	0,01 g
KH_2PO_4	0,09 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,002 g
Água destilada e deionizada (q.s.p.)	100 mL

7.5 Teste de produção de ácido a partir de glicose

Composição do meio de cultura:

Extrato de levedura	3 g
Glicose	10 g
Carbonato de Cálcio	3 g
Ágar	2 g
Água destilada e deionizada	100 mL

7.6 Teste de produção de dihidroxiacetona de glicerol

Meio de cultura:

Extrato de levedura	3 g
Glicerol	3 mL
Ágar	2 g
Água destilada e deionizada	100 mL

Solução de Fehling (A)

Sulfato de cobre	34,65 g
Água destilada e deionizada	500 mL

Solução de Fehling (B)

Tartarato de potássio e sódio	173 g
Hidróxido de potássio	125 g
Água destilada e deionizada	500 mL

Porções iguais das soluções A e B são misturadas na hora do uso.

7.7 Teste de produção de celulose

Meio de cultura

Extrato de levedura	2 g
Glicose	2 g
Água destilada e deionizada	100 mL

Solução de lugol:

Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada e deionizada	300 mL

7.8 Teste de produção de pigmento marrom

Meio de cultura	
Extrato de levedura	2 g
Glicose	2 g
Carbonato de cálcio	2 g
Ágar	2 g
Água destilada e deionizada	100 mL