

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS DE ESPÉCIES
DE ACETOBACTER

Vanderlei Perez Canhos
Engº Tecnólogo de Alimentos

Orientador:
Dr. Fumio Yokoya
Professor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, Josefina e Manoel

com muito carinho.

ÍNDICE

	página
I - INTRODUÇÃO	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
III - MATERIAL E MÉTODOS	12
IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

RESUMO

O trabalho consta da caracterização de diferentes linhagens de Acetobacter e de estudos da influência da temperatura e do teor de etanol nos valores das constantes de crescimento e produção de biomassa.

Com os valores das constantes de crescimento foram traçados gráficos de Arrhenius. Os valores das características de temperatura obtidos variaram entre 8,6 kcal/mol (A. lovaniense 48) a 11,4 kcal/mol (A. suboxydans 52) para microrganismos crescendo em meio basal. A adição de etanol ao meio basal acarretou um aumento no valor da característica de temperatura para A. lovaniense 48 (de 8,6 kcal/mol para 0% de etanol a 15,4 kcal/mol para 6% de etanol).

Os valores do máximo de biomassa produzida pelas espécies a diferentes temperaturas, em 48 horas de incubação, variaram entre 0,08 mg/ml (A. suboxydans 52) a 0,83 mg/ml (A. lovaniense 48).

SUMMARY

The characterization of Acetobacter species and the effect of temperature and ethanol concentration on the growth constants and cell mass production were studied. Arrhenius plots were drawn using growth constants. Temperature characteristic values between 8.6 kcal/mol (A. lovaniense 48) and 11.4 kcal/mol (A. suboxydans 52) were obtained for growth in basal medium. The addition of ethanol to the basal medium increased the temperature characteristic of A. lovaniense 48 (from 8.6 kcal/mol for 0% ethanol to 15.4 kcal/mol for 6% ethanol).

The maximum cell mass obtained after 48 hours of incubation at different temperatures varied from 0.08 mg/ml (A. suboxydans 52) to 0.83 mg/ml (A. lovaniense 48).

INTRODUÇÃO

A importância de bactérias acéticas reside nas suas aplicações industriais para a obtenção de produtos alimentares e farmacêuticos como vinagre, ácido glucônico, dihidroxiacetona e sorbose. Por outro lado, as bactérias acéticas tem importância como agente de deterioração de certos produtos fermentados, como vinho. Além disso a sua utilização em estudos bioquímicos dos mecanismos de oxidação de etanol, poliálcoois e açúcares, como bactérias aeróbias representativas, tem contribuído no desenvolvimento dos conhecimentos dessa área (Asai, 1968).

As espécies do gênero Acetobacter variam muito na capacidade de oxidar e desidrogenar os vários substratos. Dependendo da matéria-prima utilizada, pode-se ter oxidações e desidrogenações de importância industrial.

A fermentação industrial produzida pelas bactérias acéticas superoxidativas, de maior importância, é a produção de vinagre. Mesmo atualmente, os conhecimentos científicos tem sido pouco usado nas indústrias de vinagre. O tipo de flora atuante é obtida pela seleção natural sem estar sob o controle do homem. O estado da "arte de manufatura do vinagre" é refletido pela falta de patentes, e as poucas existentes são relativas aos aspectos de engenharia de equipamentos e ao processo de produção.

A falta de interesse em um maior controle microbiológico da fermentação é devido ao alto teor de ácido e álcool do substrato, o que evita o crescimento de outros microrganismos que não os do gênero Acetobacter. A fermentação acética é um processo em que o equipamento, matéria-prima e ar utilizado não sofrem esterilização prévia. Dificuldades no estudo de isolamento de espécies Acetobacter dos fermentadores, devido a formação de mutantes e variantes, prejudicam na caracterização com segurança das culturas responsáveis pela fermentação. Tentativas de manutenção de culturas inóculo de bactérias acéticas em meios de laboratório não tem

sido bem sucedidas. Em escala industrial o que se usa é o "vinagre semente" que é o produto da fermentação quando o teor de álcool torna-se reduzido a cerca de 0,8% a 0,9%.

Nos anos recentes, tentativas tem sido feitas para se obter uma caracterização adequada para o crescimento e propriedades metabólicas dos microrganismos com respeito à temperatura. A distinção entre as diferentes espécies de Acetobacter com base na dependência de temperatura para o crescimento é pouco estudada. O presente trabalho apresenta os resultados de estudos, relacionando essa dependência através do gráfico de Arrhenius e também o gráfico da produção de biomassa a diversas temperaturas de incubação.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BACTÉRIA ACÉTICA E FERMENTAÇÃO INDUSTRIAL

A. Produção de Vinagre

Segundo Lopes e colaboradores (1961) as culturas iniciadas de fermentação submersa do vinagre são mais reprodutíveis quando mantidas em meio líquido. Com os devidos cuidados, uma fermentação submersa pode ser reiniciada no período de 3 a 5 dias, mas esse período pode ser prolongado para 10 a 14 dias quando não se trabalha em condições adequadas. (Beaman, 1967). Para poder estabelecer as condições adequadas no início dessa fermentação há uma necessidade de informações mais precisas na fisiologia de Acetobacter, particularmente com relação aos fatores que afetam o crescimento em condições submersas.

O metabolismo das bactérias do ácido acético, com ênfase às vias de utilização de lactato, etanol, glicose, glicerol e glicol foi revisto por Doelle (1969). Revisão semelhante foi feita por Asai (1968) que se estendeu aos estudos da taxonomia e atividades bioquímicas das bactérias acéticas.

O uso de culturas puras em processo de fermentação submersa é importante, uma vez que possibilita um melhor controle de rendimento. O equipamento utilizado por esse processo é adequado para a manutenção da cultura pura.

De acôrdo com Allgeier e Hildebrandt (1960) até por volta de 1950 não tinha sido possível a obtenção de vinagre pela utilização de cultura pura, quer em condições de laboratório, quer nos processos comerciais. Shimwell (1954) isolou bactéria pertencente ao grupo Mesoxydans, segundo a classificação de Frateur, que usada para a obtenção de vinagre deu melhores resultados que a flora de ocorrência natural. Das seis espécies de Acetobacter testadas sob condições de fermentação submersa em meio sintético, por Lopes e colaboradores (1961) a que deu melhores resultados foi Acetobacter acetigenum. Vinagre do resíduo de suco de abacaxi, con-

tendo mais de 7% de ácido acético (pêso/volume) foi obtido por Richardson (1967) em um acetador de planta pilôto. A fermentação foi conduzida usando cultura pura de Acetobacter aceti, o tempo de fermentação foi menos de 24 horas e apresentou um rendimento superior a 90%.

Yanagida e colaboradores (1971) classificaram 45 linhagens de bactérias acéticas isoladas de vinagre e agruparam 26 linhagens como A. aceti, 13 linhagens como A. pasteurianum e 6 como A. xylinum, todas pertencentes aos grupos Oxydans e Mesoxydans de Frateur. Linhagens mais eficientes na acetificação do substrato contendo etanol foram obtidas por Harada e Mori (1971) através do tratamento das espécies de Acetobacter com N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

Recentemente, Divies e colaboradores publicaram vários trabalhos sobre a cinética de fermentação para diferentes linhagens de Acetobacter. A oxidação de acetato por A. rancens em meio contendo etanol como principal fonte de carbono, foi estudada por Divies e Dupuy (1969). Em substrato contendo baixo teor de substâncias orgânicas e acetato, 95% do etanol foi oxidado a acetato. O acetato formado também serviu como fonte de carbono, e o aumento da capacidade de oxidação do acetato foi gradativo, variando de acordo com a quantidade de acetato acumulada. Os mesmos autores (Divies e Dupuy, 1970) publicaram uma nota sobre o mecanismo enzimático da transformação de etanol em acetato.

Em estudos com Acetobacter rancens determinando as enzimas dos ciclos glioxílico e tricarbóxico, durante a adaptação das células para a oxidação do acetato, Divies (1972a), mostrou o aumento da atividade específica da maioria das enzimas com a substituição de etanol por acetato no meio de cultura. O etanol, também inibiu a oxidação do acetato pelas células na fase estacionária.

A influência do substrato carbonado na oxidação de etanol e acetaldeído por A. aceti foi estudada por Divies (1970). As células em crescimento no etanol apresentaram maiores atividades ox

dativas de etanol e acetaldeído que as células em crescimento em acetato, lactato e glucose-alanina.

A cinética de oxidação do etanol e acetaldeído, por células intactas e extrato celular de A. mesoxydans, isolado em um processo de acetificação submersa, foi estudada por Divies (1972b). Concluiu-se que o ácido acético é um inibidor competitivo da oxidação do etanol, com atuação em sua forma não dissociada. O efeito da inibição foi muito maior sobre as enzimas particuladas do que sobre as células intactas. Uma nota sobre os tipos e ação das álcool-desidrogenases foi publicada por Divies (1972c).

A fermentação acética em cultura contínua de A. mesoxydans foi estudada por Divies (1973). Foram observadas flutuações na população de células e acidez, variando de acordo com a taxa de diluição, decorrentes do fato de que, na fermentação acética, tanto o substrato (etanol) quanto o produto (ácido acético) são inibidores do crescimento de bactérias nas concentrações em que são usados.

Um aspecto importante na microbiologia da fermentação acética é a determinação dos principais requerimentos nutricionais. Para que a fermentação de vinagre de álcool apresente bons rendimentos, há necessidade de adição de um sistema de nutrientes que geralmente contém açúcar de milho e uma fonte de nitrogênio, normalmente fosfato de amônio, junto com vários outros sais de cálcio e magnésio. À essa formulação normalmente se adiciona certos aminoácidos e outros fatores de crescimento ou vitaminas através da adição de levedura autolisada, ou, menos frequentemente, caldo de infusão de milho concentrado. A formulação citada por Beaman (1967) substituiu completamente as fontes de proteínas por uma pequena dosagem de pantotenato de cálcio, usada como fator de crescimento. A comparação do efeito de várias misturas nutrientes sobre a fermentação submersa foi estudada por Dave e Vaughn (1969). A formulação que apresentou melhores resultados continha açúcar de milho, fosfato de amônio dibásico, levedura autolisada, ácido cítrico, soro de leite desidratado e cloreto de potássio. Rao e

Stokes (1953) mostraram que açúcares redutores como glicose e fructose e substâncias relacionadas como manitol e glicerol promovem o crescimento de espécies Acetobacter.

Fatores do extrato de levedura que diminuem o tempo de latência e aumentam a atividade de oxidação do álcool em culturas submersas de A. rancens foram isolados por Hijikata e colaboradores (1970) através da diálise. Foram obtidas duas frações que isoladamente apresentavam pequenos efeitos e quando juntas mostravam ação sinérgica, diminuindo significativamente o tempo de latência e aumentando a velocidade de produção de ácido. Destas duas frações foram isoladas as substâncias ativas, identificadas como glicerol, L-alanina e ácido succínico. Essas substâncias apresentaram efeito sinérgico sobre as atividades metabólicas (Hijikata e colaboradores, 1972b).

O efeito da adição de metabólitos simples na diminuição da fase de latência do crescimento de bactérias acéticas foi estudado por Hijikata e colaboradores (1972a). Alguns metabólitos provocaram aumento da razão de ácido produzido por crescimento celular. Um resultado de importância industrial foi que a adição de ácido láctico (1mM) em combinação com extrato de levedura (0,1%) estimulou a fermentação mesmo à concentrações relativamente altas de ácido acético e etanol.

B. Produção de Cetoses e Cetoácidos

Das fermentações industriais empreendidas pelas bactérias acéticas sub-oxidativas, as oxidações e desidrogenações responsáveis pela produção de cetoses e cetoácidos são de grande importância, uma vez que esses produtos são preparados com grandes dificuldades por métodos puramente químicos. Lockwood (1954) fez a revisão dos principais processos de importância industrial. Dentre eles:

Produção de sorbose - A produção industrial de vitamina C

tem sido baseada na síntese de Reichstein. Neste processo D-glicose é quimicamente hidrogenado fornecendo D-sorbitol, que pela desidrogenação bioquímica por A. suboxydans produz a L-sorbose. Esta é quimicamente oxidada a diacetona-ácido-2-ceto-L-gulônico que por hidrólise, enolização e lactonização dá o ácido L-ascórbico.

A bioquímica da transformação do sorbitol em sorbose foi examinada em vários aspectos por Cheldelin e colaboradores (King e Cheldelin, 1952; King e Cheldelin, 1954; King e Cheldelin, 1956 e Kitos e outros 1958). Os aspectos técnicos do processo de conversão foram revistos por Prescott e Dunn (1959) e Ward (1967) e mais recentemente por Kulhánek (1970) que fez revisão extensiva dos fatores que afetam essa desidrogenação biológica além das considerações sobre os novos processos de preparação de vitamina C a partir de aldoses e ácidos aldônicos. Ainda hoje, os procedimentos mais utilizados em escala industrial para a produção de sorbose a partir de sorbitol por A. suboxydans são baseados nos trabalhos de Wells e colaboradores (1937; 1939). Na revisão feita por Ward (1967) há considerações sobre a estatística de produção e referência aos métodos de análise química de sorbose.

Produção de dihidroxiacetona - A preparação industrial deste composto por oxidação microbiológica do glicerol é recente (década de 1960) mas tende a aumentar muito devido a grande utilização em alimentos para diabéticos e também em produtos bronzeadores da pele (Hall, 1963). Várias espécies de Acetobacter tem a capacidade de oxidar glicerol a dihidroxiacetona (Frateur, 1950), mas os maiores rendimentos foram obtidos com linhagens de A. suboxydans (Green, 1967).

Produção de ácido 5-cetoglucônico e ácido tartárico - As culturas são as mesmas utilizadas para a produção de sorbose. A glicose é oxidada a ácido glucônico que é transformado em 5-cetogluconato, precursor do ácido tartárico.

Segundo Lockwood (1954), o processo de produção de ácido tartárico por oxidação de ácido 5-cetoglucônico em presença de ca

talisador de pentóxido de vanádio era pouco competitivo, pois o ácido tartárico é um sub-produto da indústria do vinho.

Recentes pesquisas de Kotera e colaboradores (1972a), o tratamento com N-metil-N¹-nitro-N-nitrosoguanidina implicou na obtenção de mutantes que acumulavam grandes quantidades de ácido tartárico no meio de cultura. Trabalhos posteriores de Kotera e colaboradores (1972b) levaram à conclusão de que a concentração hidrogeno-iônica e o ácido glicólico acumulado durante a fermentação é que limitavam a formação do ácido tartárico. Essa limitação foi evitada pela obtenção de mutantes mais resistentes à acidez e ao acúmulo de glicolato. Kotera e colaboradores (1972c) demonstraram que o ácido tartárico é um intermediário na formação do ácido tartárico a partir de ácido 2-cetoglucônico e essa transformação é acarretada por células intactas de Gluconobacter suboxydans.

Produção de ácido glucônico - Os Acetobacter oxidam a glicose a ácido glucônico e linhagens selecionadas podem ser utilizadas para esta fermentação. De acordo com Lockwood (1954) a fermentação por fungo ou a oxidação química da glicose suprem o mercado para ácido glucônico e gluconato de cálcio. Grande parte da produção comercial de gluconatos (Ward, 1967) é baseada no crescimento submerso de Aspergillus niger, em meio contendo glicose. A inconveniência da fermentação por Acetobacter é que o ácido glucônico produzido sofre a posterior conversão em ácidos ceto-glucônicos.

EVOLUÇÃO DA TAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE ACETOBACTER

A classificação das bactérias acéticas em dois gêneros foi feita pela primeira vez por Asai (1934 e 1935 citado por Asai, 1968) denominando-os de Acetobacter e Gluconobacter, com base nas diferenças de propriedades fisiológicas. Vinte anos após os primeiros trabalhos de Asai, foi redescoberta a dualidade das bactérias acéticas por Leifson (1954) com base na diferenciação do tipo de flagelo. Foi proposto um novo gênero Acetomonas para linhagens com flagelo polar, e não oxidavam nem acetato e nem lactato. Era quase idêntico ao gênero Gluconobacter de Asai. Por isso, vários pesquisadores preferem, por razões históricas, utilizar o nome Gluconobacter e dentre eles De Ley (1961), mas excluindo as linhagens incapazes de oxidar etanol a ácido acético. Na classificação feita por Asai e Shoda (1958) foram incluídas várias linhagens que não oxidavam etanol a ácido acético no gênero Gluconobacter e eram possivelmente Pseudomonas.

A literatura mostra que há evidências convincentes para a divisão das bactérias acéticas em dois grupos distintos:

- (1) Linhagens com flagelo peritrico ou não flageladas com fisiologia similar, denominadas Acetobacter, como redefinidas por Leifson (1954).
- (2) Linhagens com flagelo polar ou não flageladas com fisiologia similar, para as quais usa-se o nome Gluconobacter Asai, ou Acetomonas Leifson.

No sistema de classificação de Frateur (1950) todas as linhagens estão distribuídas em quatro grupos com as características apresentadas na tabela 1.

Kondo e Ameyama (1957) propuseram a classificação das espécies Acetobacter em dois grupos, de acordo com a capacidade de oxidação dos carboidratos.

Tabela 1: Resumo das propriedades dos quatro grupos de bactérias do ácido acético, de acordo com Frateur (1950)

Grupo	Catalase	Produção de CO ₂ a partir de ácido acético e ácido lático	Cetogenese (glicerol a dihidroxiacetona; manitol a fructose; glucose a 5 ce-to-gluconato)	Oxidação de glicose a ácido glucônico
<u>Peroxydans</u>	-	+	- ou muito fraco	-
<u>Oxydans</u>	+	+	- ou muito fraco	+ (ou - para <u>A. ascendens</u>)
<u>Mesoxydans</u>	+	+	+	+
<u>Suboxydans</u>	+	-	++	++

Grupo I: espécies isoladas de substâncias contendo etanol ou ácido acético. Apresentam forte atividade oxidativa de alcôois, mas a atividade oxidativa de açúcares é fraca; oxidam a glicose, mas não o ácido glucônico e são incapazes de oxidar alcôois como sorbitol, manitol e glicerol.

Grupo II: espécies isoladas de materiais contendo açúcares, como frutas ou flores. Portanto são linhagens que apresentam forte capacidade oxidativa de açúcares. Oxidam ácido-glucônico, sorbitol e manitol; apresentam fraca atividade oxidativa para etanol e não oxidam o ácido acético.

A classificação apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (Breed e outros, 1957) tem por base o sistema de agrupamento de linhagens relacionadas de acordo com as atividades bioquímicas e morfológicas estabelecidas por Vaughn (1942). Essa classificação não reflete a filogenia bacteriana e, decorrente disso, existe atualmente uma intenção de reorganização das bactérias acéticas segundo uma relação natural onde todas as propriedades morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, enzimáticas, ecológicas, imunológicas e outras tenham um igual valor.

De Ley (1961) trabalhou na classificação de bactérias acéticas tendo em vista a filogenia bacteriana e propôs a divisão do gênero Acetobacter em dois biótipos: Gluconobacter oxydans e Acetobacter aceti considerando as demais espécies existentes como variedades desses dois tipos principais. Estudando a oxidação de 20 carboidratos e derivados por 45 espécies Acetobacter, chegou à conclusão de que os grupos Peroxydans e Oxydans (segundo Frateur, 1950) tinham poderes oxidativos limitados enquanto que linhagens dos grupos Suboxydans e Mesoxydans oxidaram grande variedade de substratos e possuíam sistemas enzimáticos mais complexos.

MATERIAL E MÉTODOS

I. Microorganismos

Foram testadas linhagens de microrganismos dos grupos Peroxydans, Oxydans, Mesoxydans e Suboxydans (Frateur, 1950). A origem e a especificação das linhagens utilizadas estão relacionadas na tabela 2.

Tabela 2: Origem e especificação das linhagens

Coleção (procedência do organismo)	Número de linhagem usado no trabalho	Grupo segundo Frateur	Linhagens enviadas por:
Departamento de Agricultura e Horticultura, Universidade de Bristol			Dr. J.G.Carr
<u>Acetobacter suboxydans</u>	52	<u>Suboxydans</u>	
<u>Acetobacter aceti</u>	46	<u>Mesoxydans</u>	
<u>Acetobacter mesoxydans</u>	47	<u>Mesoxydans</u>	
<u>Acetobacter estunense</u>	51	<u>Mesoxydans</u>	
The National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torry Research Station, Aberdeen			NCIB
<u>Acetobacter peroxydans</u>	53	<u>Peroxydans</u>	
Universidade Tecnológica , Delft, Holanda.			Dr. J.De Ley
<u>Acetobacter lovaniense</u>	48	<u>Oxydans</u>	

II. Caracterização das Bactérias acéticas

Os testes realizados foram os citados por Carr (1968). Todos os meios de cultura foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. A incubação dos microrganismos foi feita em estufa a 30°C.

A- Caracterização em nível do gênero - Feita através da diferenciação da propriedade de super-oxidação do etanol. A composição do meio de cultura foi a seguinte:

extrato de levedura (Difco)	- 3g
agar (Difco)	- 2g
solução 2,2% debromocresol verde	- 1ml
H ₂ O destilada	- 100ml

Após a esterilização do meio de cultura adicionou-se etanol a 20%, previamente esterilizado por filtração, de modo a resultar concentração final de 2% de etanol. Distribuiu-se em tubos previamente esterilizados e fez-se o inclinado de agar. Como crescimento das espécies Acetobacter a cor do meio passa de verde azulado para amarelo, mas para as superoxidativas se obtém novamente a coloração original do meio, após incubação prolongada.

B- Caracterização em nível específico - feita pelos seguintes testes:

1. Crescimento no meio de Hoyer baseado na utilização de nitrogênio amoniacal, quando a única fonte de carbono disponível é o etanol. A composição do meio de cultura foi a seguinte:

(NH ₄) ₂ .SO ₄	- 0,1g
K ₂ HPO ₄	- 0,01g
KH ₂ PO ₄	- 0,09g
MgSO ₄ .7H ₂ O	- 0,025g
FeCl ₃ .6H ₂ O	- 0,002g
H ₂ O destilada	- 100ml

Após a esterilização adicionou-se etanol a 20%, previamente esterilizado por filtração, de modo a obter a concentração final de 3% de etanol. Distribuiu-se o meio em tubos esterilizados. O teste é demorado, de modo que, às vezes, necessita de 14 dias para que ocorra crescimento.

2. Produção de ácido de glucose. A composição do meio de cultura foi a seguinte:

extrato de levedura (Difco)	- 3g
glicose (Difco)	- 10g
CaCO ₃	- 3g
agar (Difco)	- 2g
H ₂ O destilada	- 100ml

A reação positiva é indicada pelo aparecimento de área clara em torno da colônia. As que dão reação negativa, geralmente crescem, mas não produzem halo.

3. Produção de catalase. Adicionou-se sobre as colônias com menos de 48 horas de incubação no meio do teste 2, gotas de água oxigenada a 3% (v/v). A formação de borbulhas indicou a presença de catalase.

4. Produção de dihidroxiacetona de glicerol. A composição do meio de cultura foi a seguinte:

extrato de levedura (Difco)	- 3g
glicerol	- 3ml
agar (Difco)	- 2g
H ₂ O destilada	- 100ml

A produção de dihidroxiacetona foi detectada cobrindo-se a placa inoculada a menos de 48 horas com solução de Fehling. Em torno das colônias positivas houve a formação de um halo de óxido cuproso.

Solução de Fehling:

Solução A - sulfato de cobre	- 34,65g
H ₂ O destilada	- 500ml

Solução B - tartarato de potássio e sódio	- 173g
KOH	- 125g
H ₂ O destilada	- 500ml

Misturar porções iguais das soluções A e B, na hora de

usar.

5. Produção de celulose. A composição do meio de cultura foi a seguinte:

extrato de levedura (Difco)	- 2g
glicose (Difco)	- 2g
H ₂ O destilada	- 100ml

A celulose foi detectada pela produção de película amarelo creme e fluido sobrenadante claro. O teste confirmatório foi feito adicionando-se H₂SO₄ a 60% e gotas de solução de lugol. Na presença de celulose, houve formação de coloração azul intensa.

Solução de lugol:

iôdo	- 1g
iodeto de potássio	- 2g
H ₂ O destilada	- 300ml

6. Produção de pigmento marrom. A composição do meio de cultura foi a seguinte:

extrato de levedura (Difco)	- 2g
glicose (Difco)	- 2g
CaCO ₃	- 2g
agar (Difco)	- 2g
H ₂ O destilada	- 100ml

Fez-se a distribuição em agar inclinado.

III. Determinação da constante de Arrhenius

A formulação do meio basal utilizado em todos os ensaios foi a seguinte:

(NH ₄) ₂ SO ₄	- 1g
casaminoácidos (Difco)	- 1g
glicose (Difco)	- 1g
extrato de levedura (Difco)	- 15g

solução de sais A - 5ml
solução de sais B - 5ml

Completou-se o volume a 1000ml com água destilada, ajustou-se a pH 6,5 e procedeu-se a esterilização por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. As formulações das soluções A e B foram:

Solução estoque de sais A:

K_2HPO_4 - 50g
 KH_2PO_4 - 50g
 H_2O destilada - 500ml

Solução estoque de sais B:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 20g
NaCl - 1g
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1g
 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ - 1g
HCl concentrado - 1ml
 H_2O destilada - 500ml

Nos testes de crescimento em meio contendo álcool, adicionou-se etanol absoluto ao meio basal estéril, de modo a se obter concentrações finais de 3% e 6% em etanol (v/v).

O inóculo foi preparado semeando-se uma alçada da cultura em frasco Erlenmeyer (com aletas para proporcionar maior aeração) de 500ml contendo 50ml de meio de cultura e incubando-se a 30°C por 24 horas em incubador agitador rotatório (New Brunswick cat.G 25) a 250 r.p.m..

A semeadura nos tubos, para a determinação da constante de crescimento, foi feita transferindo-se de 0,02 a 0,1ml (dependendo da espécie) do inóculo, para cada tubo do incubador contendo 10ml de meio de cultura. Nos testes de crescimento em meio contendo álcool usou-se 0,1ml de inóculo para cada tubo. Esses tubos especiais em forma de "L" foram usados para operar no incubador

de temperatura gradiente da Scientific Industries Inc., New York, N.Y.. Ajustou-se o intervalo de temperatura do incubador entre 5 e 50°C e utilizou-se 30 tubos nessa faixa de temperatura gradiente. Antes da inoculação os tubos foram deixados no incubador pelo menos 20 minutos, para se obter o equilíbrio de temperatura entre o meio e o incubador. A variação na temperatura dos diferentes tubos do incubador gradiente foi de $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$.

A incubação foi feita sob agitação recíproca na velocidade de 30 R.P.M. e o crescimento dos microrganismos foi determinado pelo método colorimétrico usando o espectrofotômetro "Bausch and Lomb Spectronic 20" adaptado para operar com tubos de 20mm de diâmetro. A leitura foi efetuada a comprimento de onda de 600mm e em intervalos de 15 a 30 minutos, dependendo da velocidade de crescimento.

IV. Determinação da Biomassa

Após 48 horas no incubador gradiente, foi feita a medida do crescimento da cultura, determinando-se para cada tubo a densidade óptica da cultura após a diluição de 10 vezes com água destilada. Estes valores de densidade óptica foram transformados em biomassa (mg/ml) através da curva que correlacionava massa celular seca (mg/ml) com a densidade óptica das diluições sucessivas da suspensão do organismo (Figura 3).

A massa celular seca foi determinada por secagem diferencial do filtro de membrana Millipore HA com diâmetro de poro de $0,45\mu$, seco em estufa a vácuo a 65°C , antes e depois de se fazer passar 10ml de meio de cultura inoculado e incubado a 30°C por 48 horas em incubador agitador rotatório (New Brunswick cat. G25 a 250 r.p.m.).

A construção da curva de calibração foi feita locando-se em gráfico os valores de densidade óptica determinada para as diferentes diluições versus ml de suspensão de organismos presente em 10ml de volume.

A suspensão de organismos foi obtida pela centrifugação de

40ml de cultura incubada a 30°C por 48 horas à gravidade de 13000 g pelo tempo de 10 minutos em centrífuga refrigerada Internacional Modelo B-20A. Após a centrifugação as células foram lavadas, ressuspensas e novamente centrifugadas. Obteve-se a suspensão final completando-se o volume a 100ml.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

I. Caracterização das bactérias acéticas

Os resultados dos testes bioquímicos utilizados para a caracterização das diferentes espécies de bactérias acéticas estão representados na tabela 3.

Os resultados obtidos para os testes realizados foram os esperados (dados obtidos para as cepas padrão, relatados no trabalho de Carr, 1968) com exceção do resultado para o teste de produção de dihidroxiacetona a partir de glicerol, que devendo ser positivo para as espécies A. lovaniense 48 e A. estunense 51, apresentou-se negativo.

Tabela 3: Resultados dos testes bioquímicos para as espécies de Acetobacter testadas

		Superoxidação do etanol	Catalase	Crescimento em meio do Hoyer	Ácido de glicose	Dihidroxiacetona de glicerol	Produção de celulose	Pigmento marrom
<u>A. peroxydans</u>	53	+	-	-	-	-	-	-
<u>A. lovaniense</u>	48	+	+	+	+	-	-	-
<u>A. aceti</u>	46	+	+	+	+	-	-	-
<u>A. mesoxydans</u>	47	+	+	-	+	-	-	-
<u>A. estunense</u>	51	+	+	-	+	-	-	-
<u>A. suboxydans</u>	52	-	+	-	+	+	-	-

II. Determinação dos parâmetros de crescimento (constante de crescimento e característica de temperatura)

As curvas de crescimento foram obtidas locando-se em gráfico o logaritmo das densidades ópticas versus tempo. As constantes de crescimento [k] foram determinadas das porções retilíneas de máximo declive nas curvas de crescimento. A figura 1 mostra 4 exemplos dessas curvas para A. mesoxydans 47 cultivado em meio basal a temperaturas de 31,7; 32,9; 34,0 e 35,2°C. Os valores de k obtidos foram respectivamente 0,00584; 0,00513; 0,00435 e 0,00318 min⁻¹ e foram calculados pela fórmula:

$$k = \frac{2,303 (\log x_2 - \log x_1)}{t_2 - t_1} \text{ min}^{-1}; \text{ onde } x_1 \text{ e } x_2 \text{ são as densidades ópticas nos tempos } t_1 \text{ e } t_2, \text{ respectivamente.}$$

A partir das constantes de crescimento [k] obtidas a diferentes temperaturas, foram traçados os gráficos de Arrhenius para as diversas espécies de Acetobacter (Figura 2). A espécie que apresentou maiores constantes de crescimento foi A. lovaniense 48 enquanto que as apresentadas por A. suboxydans 52 foram as menores. Não foi possível a determinação do gráfico de Arrhenius para A. peroxydans 53 devido a sua incapacidade de utilizar a fonte de carbono glicose. Segundo De Ley e Stouthamer (1959) (citado por Asai 1968) a linhagem A. peroxydans originou-se dos grupos Mesoxydans e Oxydans, por mutações caracterizadas pela perda de catalase, quinase, permeases, tal que, polissacarídeos, açúcares C₆ e C₅ e seus derivativos não podem ser introduzidos no metabolismo intermediário desse microrganismo.

A característica de temperatura (u) é definida pela equação $\log k = u/2,303 RT + C$, na qual k é a velocidade específica de crescimento (ou constante de crescimento), R a constante dos gases ($1,986 \times 10^{-3}$ kcal/g mole x °K), T a temperatura absoluta, e C constante. O uso da característica de temperatura (u) é adequadamente discutido no texto de Lamanna e Mallette (1965).

Os valores das características de temperatura (u), das di

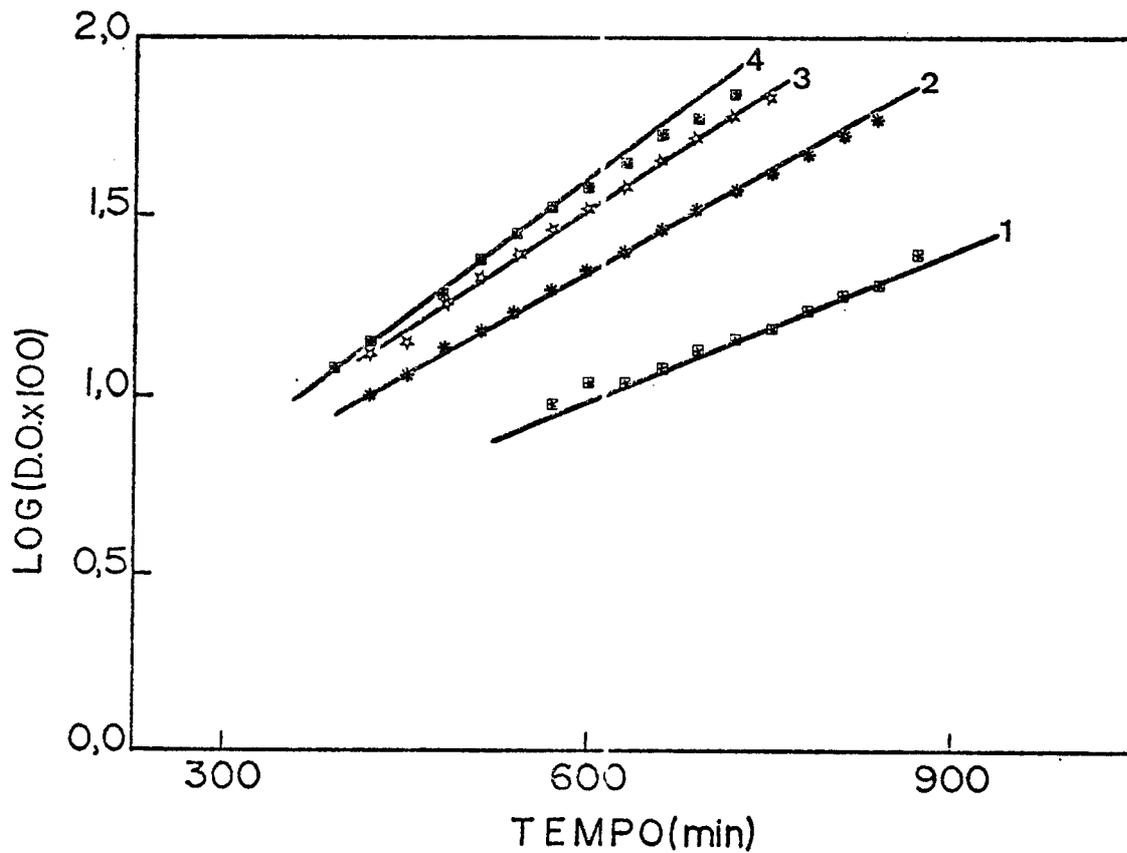


Figura 1: Exemplos das curvas de crescimento de Acetobacter mesoxydans 47 incubado a diferentes temperaturas.

- (1) $T = 31,7^{\circ}\text{C}$ e $k = 5,84 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$;
- (2) $T = 32,9^{\circ}\text{C}$ e $k = 5,13 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$;
- (3) $T = 34,0^{\circ}\text{C}$ e $k = 4,35 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$;
- (4) $T = 35,2^{\circ}\text{C}$ e $k = 3,18 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$.

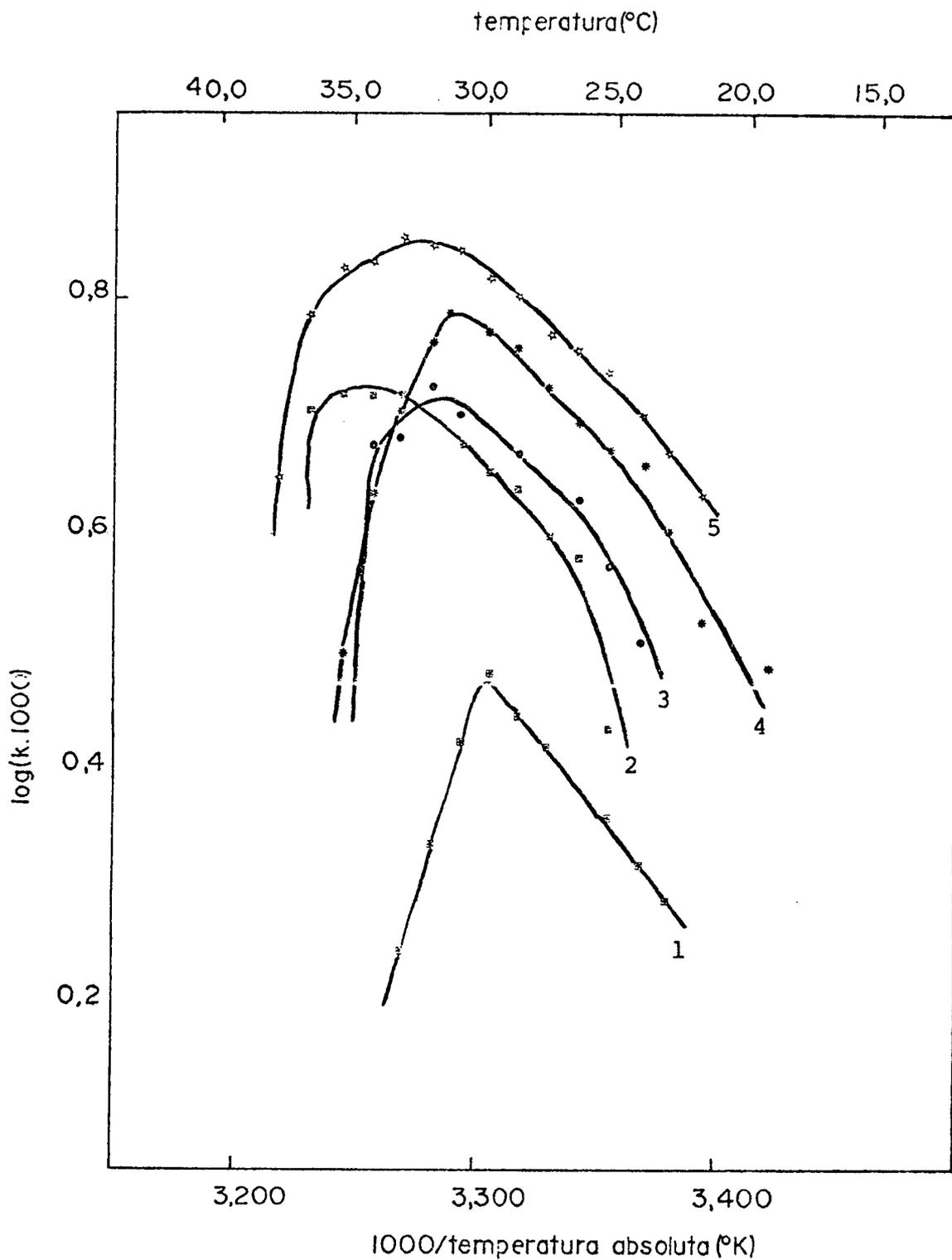


Figura 2: Gráfico de Arrhenius para as diferentes espécies de Acetobacter. (1) A. suboxydans 52; (2) A. estunense 51; (3) A. aceti 46; (4) A. mesoxydans 47 e (5) A. Lovanien se 48.

ferentes espécies Acetobacter foram calculados dos declives das retas que melhor ajustaram aos pontos do centro do intervalo de temperatura onde o declive é relativamente constante. Aplicando este método, os valores de u obtidos foram semelhantes para as espécies de Acetobacter testadas. O valor médio foi de 9,5 kcal/mol e os valores variaram de 8,6 kcal/mol (A. lovaniense 48) a 11,4 kcal/mol (A. suboxydans 52).

Tabela 4: Constantes (k) e temperaturas (T) de mais rápido crescimento e características de temperatura (u) de diferentes espécies de Acetobacter

Microrganismo	Constante de mais rápido crescimento (k) (min ⁻¹)	Temperatura de mais rápido crescimento (T) (°C)	Característica de temperatura (u) (kcal/mol)
<u>A. lovaniense</u> 48	0,00718	32,5	8,6
<u>A. acetii</u> 46	0,00539	32,0	8,8
<u>A. mesoxydans</u> 47	0,00619	30,5	9,3
<u>A. estunense</u> 51	0,00543	33,0	9,4
<u>A. suboxydans</u> 52	0,00306	29,5	11,4

Os valores da característica de temperatura para espécies de Acetobacter foram inferiores aos obtidos para bactérias mesófilas e psicrófilas por outros autores. Hanus e Morita (1968) obtiveram valores de u variando entre 14,4 a 16,4 kcal/mol para espécies de Vibrio (linhagens mesófilas e psicrófilas) Yokoya (1974) trabalhando com S. aureus nº 50, obteve valores de u na faixa de 14,8 a 16,1 kcal/mol em meio de cultura contendo concentrações de sal variando de 0 a 9%. Shaw (1967) que trabalhou com li-

nhagens psicrofílicas e mesófilas de levedura, concluiu que não era possível a distinção em grupos, com base na característica de temperatura (u) que foi encontrada ser cêrca de 12 kcal/mol para ambos os tipos.

Os resultados mostram que o valor u embora não sirva para a diferenciação de mesófilos e psicrofílicos, pode ser considerado como constante e característico, para um determinado grupo de microrganismos, em uma dada condição do meio de cultura e aeração.

A construção dos gráficos de biomassa (mg/ml) versus temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para as diferentes espécies de Acetobacter (Figura 4) foi feita a partir dos valôres obtidos da correlação entre densidade óptica e massa celular sêca (Figura 3). As temperaturas de máxima produção de biomassa, para tôdas as espécies testadas, foram inferiores às temperaturas de mais rápido crescimento, diferença esta que variou entre $3,4^{\circ}\text{C}$ para A. suboxydans 52 e $10,2^{\circ}\text{C}$ para A. estunense 51.

As diferenças nos valôres de biomassa máxima produzida foram consideráveis entre as espécies analisadas (Tabela 5). Para A. lovaniense 48 a biomassa máxima produzida foi cêrca de 10 vezes superior à do A. suboxydans 52. O baixo valor de biomassa produzida por A. suboxydans 52 é provavelmente devido a escassez dos metabólitos simples, sintetizados através do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Greenfield e Claus, 1972).

Segundo Greenfield e Claus (1969) a espécie A. suboxydans é a única espécie, entre as heterotróficas aeróbias obrigatórias, que não contém o ciclo funcional dos ácidos tricarbóxicos. A evidência da falta do ciclo dos ácidos tricarbóxicos é baseada na inabilidade, de células intactas ou extratos celulares de A. suboxydans, de oxidar intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos.

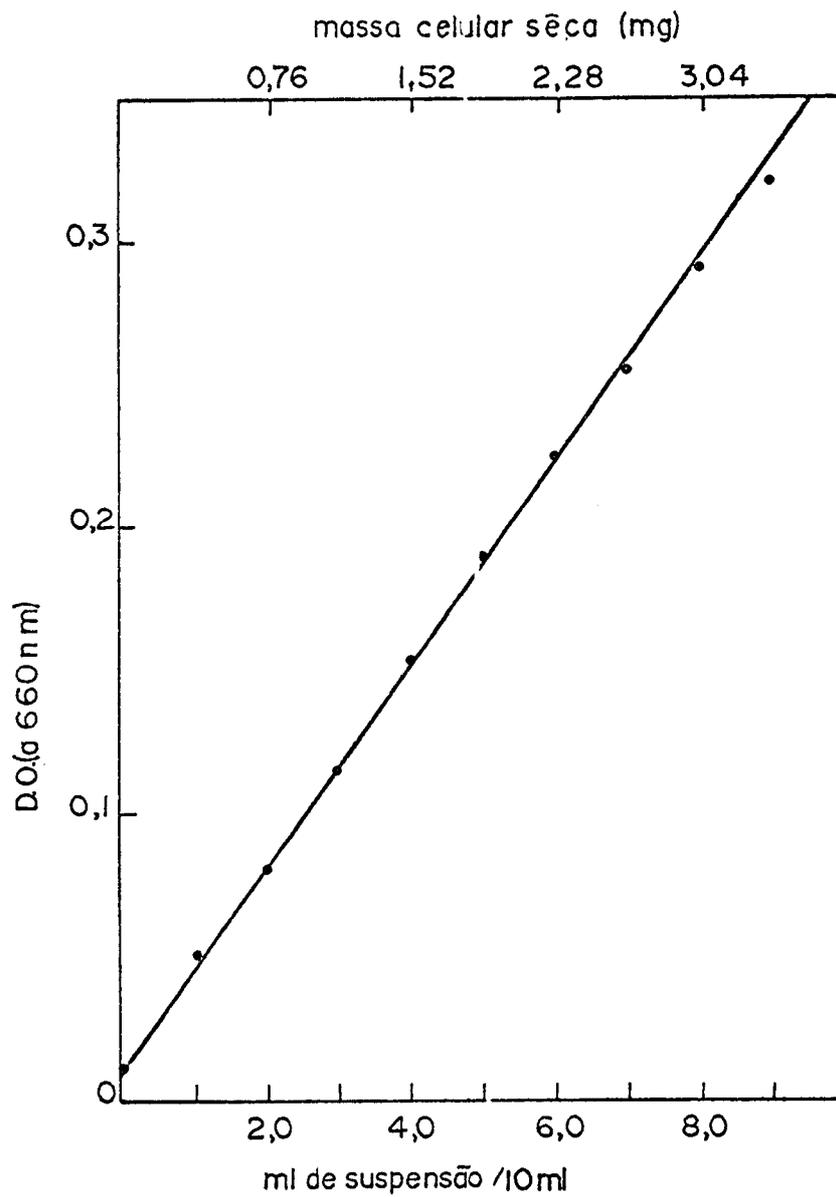


Figura 3: Curva utilizada na transformação dos valôres de densida des ópticas em massa celular sêca, para cultura de A. lo vaniense 48.

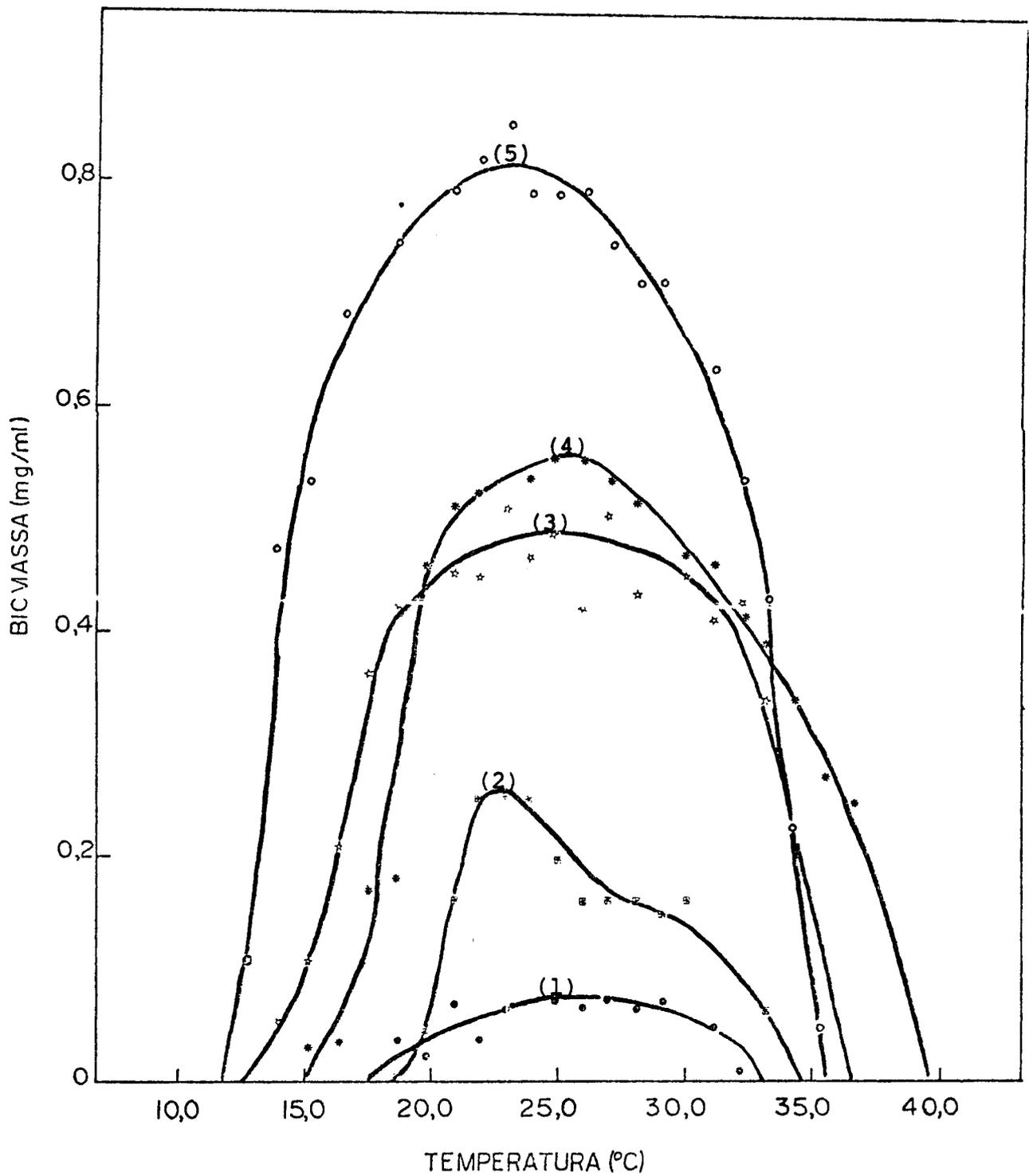


Figura 4: Produção de biomassa pelas diferentes espécies de Acetobacter. (1) A. suboxydans 52; (2) A. estunense 51; (3) A. aceti 46; (4) A. mesoxydans 47 e (5) A. lovanien se 48.

Tabela 5: Produção máxima de biomassa (mg/ml) em 48 horas de incubação, a diferentes temperaturas, por diferentes espécies de Acetobacter

Microrganismo	Temperatura de máxima produção de biomassa (°C)	Máximo de biomassa produzida (mg/ml)
<u>A. lovaniense</u> 48	22,8	0,83
<u>A. aceti</u> 46	23,8	0,48
<u>A. mesoxydans</u> 47	26,1	0,55
<u>A. estunense</u> 51	22,8	0,26
<u>A. suboxydans</u> 52	26,1	0,08

III. Efeito do teor de álcool no crescimento de A. lovaniense 48

A adição de etanol ao meio basal acarretou um aumento considerável no valor da característica de temperatura do A. lovaniense 48, passando de 8,6 kcal/mol (sem etanol) a 10,9 kcal/mol (3% de etanol) e 15,4 kcal/mol (6% de etanol). Também a temperatura de mais rápido crescimento diminuiu com o teor de etanol adicionado de 32,9°C (sem etanol) a 28,4°C (6% de etanol).

Para um teor de 9% de etanol não foi possível a obtenção de dados para a determinação do gráfico de Arrhenius, provavelmente devido as condições insuficientes de aeração do incubador gradiente. Para essa concentração de etanol e condições do experimento o crescimento foi extremamente lento e irregular, de modo a não permitir a obtenção de dados reprodutíveis.

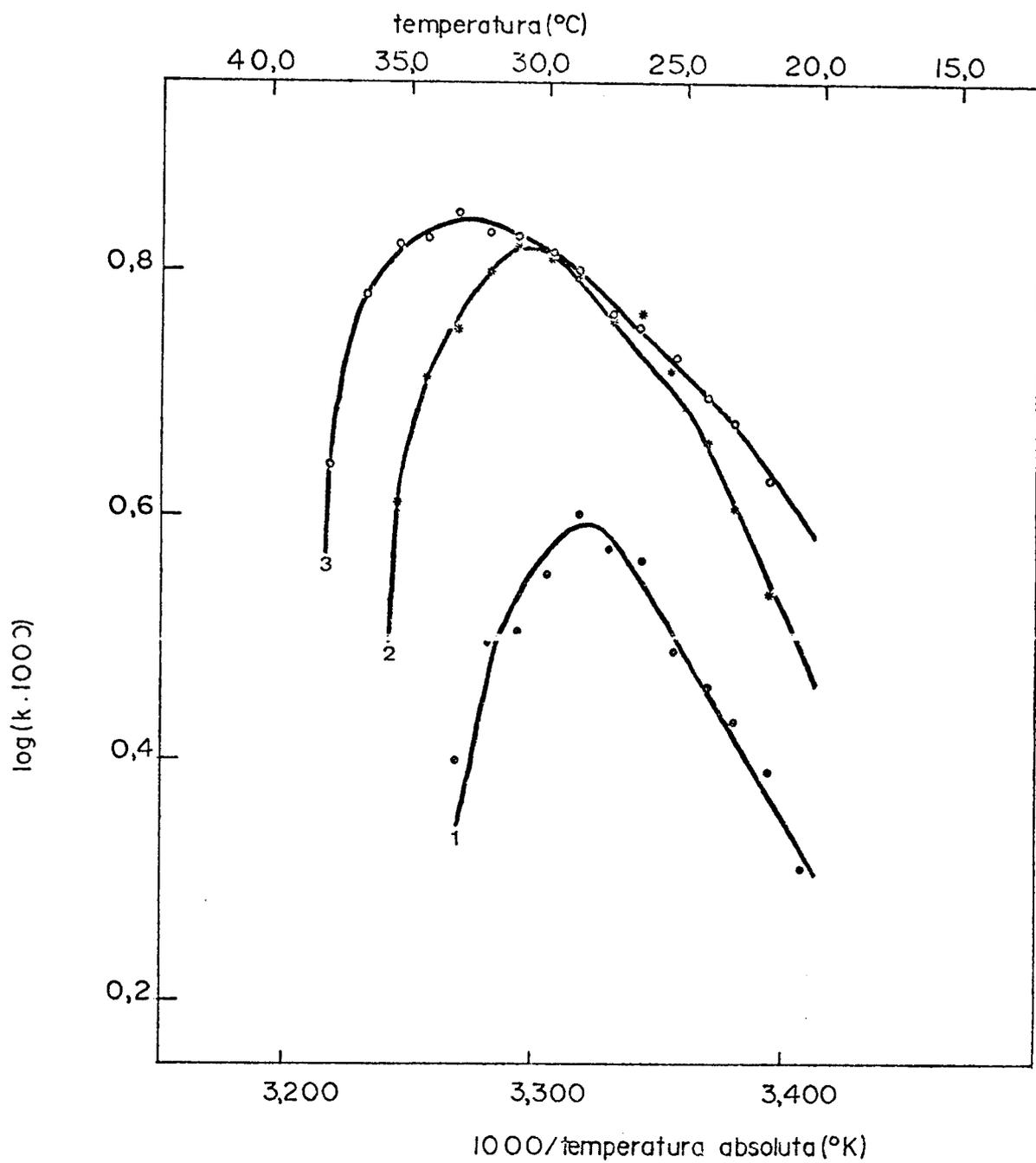


Figura 5: Gráfico de Arrhenius para *A. lovaniense* 48 cultivado em meio basal com diferentes teores de etanol.

- (1) meio basal com 6% de etanol (v/v);
- (2) meio basal com 3% de etanol (v/v) e
- (3) meio basal sem etanol.

Tabela 6: Constantes (k) e temperaturas (T) de mais rápido crescimento e características de temperatura (u) para A. lovaniense 48 cultivado em meio basal contendo diferentes porcentagens de etanol

% de etanol adicionado ao meio basal (v/v)	Constante de mais rápido crescimento (k) (min ⁻¹)	Temperatura de mais rápido crescimento (T) (°C)	Característica de temperatura (u) (Kcal/mol)
0	0,00718	32,9	8,6
3	0,00675	30,6	10,9
6	0,00407	28,4	15,4

Nas condições de fermentação submersa, onde a aeração é adequada, foi conseguido bom desenvolvimento de bactérias acéticas mesmo com teor elevado de etanol no meio como 9 a 11% (Beaman, 1967; Casida, 1968; Ebner, 1965 e White, 1970).

Os valores da tabela 6, confirmam, para cultura de Acetobacter lovaniense 48, cultivada em condições de laboratório, os resultados para culturas mistas obtidos por Hromatka e colaboradores em 1952 (citado por Allgeier e Hilldebrandt, 1960) em condições de fermentação submersa (Tabela 7). O trabalho desses pesquisadores evidenciou que a temperatura de máxima atividade fermentativa diminuía com o aumento da concentração total - GK (teor de álcool em porcentagem (v/v) mais gramas de ácido acético por 100 ml).

A temperatura de mais rápido crescimento em condições de laboratório, 28,4°C para 6% de etanol, foi bastante inferior à temperatura de máxima atividade fermentativa na acetificação submer-

sa, 35,0°C para G.K. equivalente a 5,0. (Tabela 6 e 7).

Tabela 7: Relação de temperatura em fermentação submersa (após Hromatka e colaboradores, 1952)

Concentração total - GK (volume de álcool em % mais g de ácido acético por 100 ml)	Temperatura de má- xima atividade fer- mentativa. (°C)
5,0	35
7,0	34
9,0	30
11,0	28

A adição de etanol ao meio basal, (tanto 3% como 6%), acarretou um aumento no valor da biomassa produzida por A. lovaniense 48. Isto foi devido a uma maior disponibilidade de substrato carbonado. (Figura 6).

Para 6% de etanol adicionado os valores de biomassa foram inferiores aos obtidos para 3% de etanol, devido as condições adversas do meio de cultura (toxidez do etanol). O etanol adicionado implicou na diminuição do valor da temperatura de máxima produção de biomassa (Tabela 8).

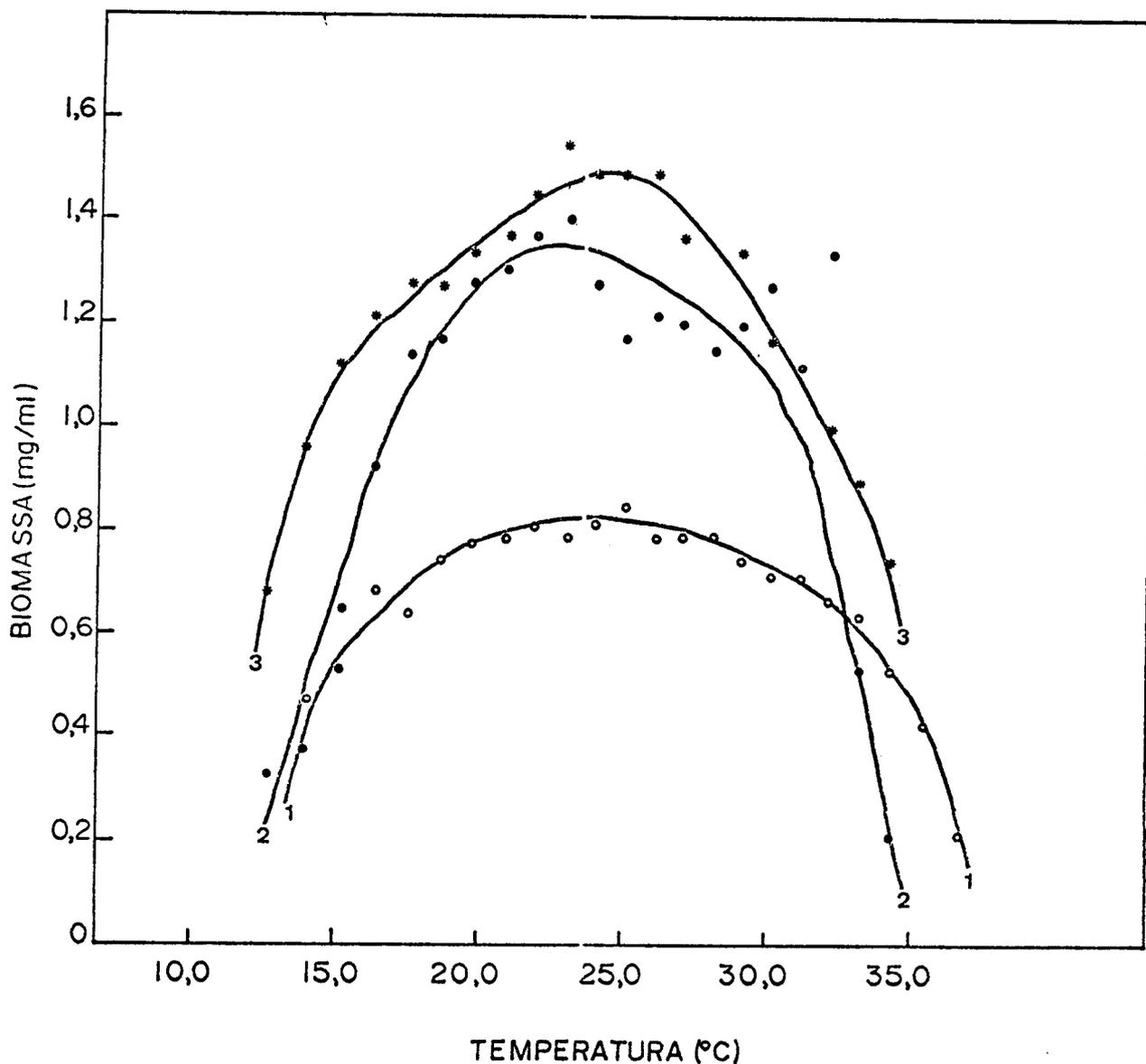


Figura 6: Produção de biomassa por *A. lovaniense* 48 em:
 (1) meio basal; (2) meio basal com 6% de etanol (v/v) e
 (3) meio basal com 3% de etanol (v/v)

Tabela 8: Produção máxima de biomassa (mg/ml) por A. lovaniense 48 em meio basal contendo diferentes porcentagens de etanol (48 horas de incubação a diferentes temperaturas - incubador gradiente)

% de etanol adicionado ao meio basal (v/v)	Temperatura de máxima produção de biomassa (°C)	Máximo de biomassa produzida (mg/ml)
0	25,0	0,83
3	23,8	1,49
6	22,8	1,35

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allgeier, R.J. e Hildebrandt, F.M. 1960 - Newer developments in vinegar manufacture. Em: Umbreit, W.W. (ed.). "Advances in Applied Microbiology". 2: 163-182. Academic Press. New York N.Y.

- Asai, T. 1968 - Acetic acid bacteria: classification and biochemical activities. University of Tokyo Press. Tokyo.

- Asai, T. e Shoda, K. 1958 - The taxonomy of Acetobacter and allied oxidative bacteria. J. gen. appl. Microbiol. 4: 298-305.

- Beaman, R.G. 1967 - Vinegar Fermentation. Em: Peppler, H. J. (ed.). "Microbial Technology". Reinhold Publishing Corporation. New York.

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1957 - 7ª ed. Ed. por Breed, R.S., Murray, E.G.D. e Smith, N.R. Baltimore, U.S.A. The William and Wilkins Co.

- Carr, J.G. 1968 - Methods for identifying acetic acid bacteria. Em: Gibbs, B.M. e Shapton, D.A. (eds.). "Identification methods for microbiologists". Academic Press, London.

- Casida, Jr., L. 1968 - Industrial Microbiology. John Wiley & Sons. Inc. New York, London e Sidney.

- Dave, B.A. e Vaughn, R.H. 1969 - Production of vinegar by aspiration. Amer. J. Enol. Vitic. 20: 56 - 65.

- De Ley, J. 1961 - Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic

- acid bacteria. J. gen. Microbiol. 24: 31-50.
- De Ley, J. e Stouthamer, A.H. 1959 - The mechanism and localisation of hexonate decomposition by Acetobacter suboxydans and A. melanogenum. Biochim. Biophys. Acta 34: 171-176.
 - Divies, C. e Dupuy, P. 1969 - Oxydation de l'acétate par Acetobacter rancens. Ann. Technol. agric. 18: 339-350.
 - Divies, C. e Dupuy, P. 1970 - Physiologie Bactérienne. Mise en évidence d'acétaldéhyde facilement échangeable au cours de l'oxydation de l'éthanol par les particules d'Acetobacter rancens. C.R.Acad. Sc. Paris. 270: 1182-1184.
 - Divies, C. 1970 - Action du substrat carboné sur l'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par Acetobacter aceti. Ann Technol. agric. 19: 187-196.
 - Divies, C. 1972.a - Action de l'éthanol sur l'oxydation de l'acétate par Acetobacter rancens. Biochimie. 54: 1073-1083.
 - Divies, C. 1972.b - Cinétique d'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par Acetobacter mesoxydans. Ann. Technol. agric. 21: 5-16.
 - Divies, C. 1972.c - Physiologie Bactérienne. Mise en évidence de plusieurs alcool déshydrogénases liées respectivement au NAD et au NADP chez Acetobacter mesoxydans. C.R. Acad. Sc. Paris. 274: 334-336.
 - Divies, C. 1973 - Étude de la production d'acide acétique par A. mesoxydans en culture continue en fonction de la teneur initiale en éthanol. Ann. Technol. agric. 22: 91-109.
 - Doelle, H.D. 1969 - Bacterial Metabolism. Academic Press, N.Y.

- Ebner, H. 1965 - Vinegar-Making Leaps Ahead. Food Eng. 37: 42-44.
- Frateur, J. 1950 - Essai sur la systématique des Acetobacters La Cellule. 53: 228-250.
- Green, S.R. 1967 - Dihydroxyacetone. Em: Pepler, H.J. (ed.). "Microbial Technology". Reinhold Publishing Corporation. N.Y.
- Greenfield, S. e Claus, G.W. 1969 - Isocitrate dehydrogenase and glutamate synthesis in Acetobacter suboxydans. J. Bacteriol. 100: 1264-1270.
- Greenfield, S. e Claus, G.W. 1972 - Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in Acetobacter suboxydans. J. Bacteriol. 112: 1295-1301.
- Hall, A.N. 1963 - Miscellaneous oxidative transformations. Em: Rainbow, C. e Rose, A.H. (eds.). "Biochemistry of industrial micro-organisms". Academic Press, New York. N.Y.
- Hanus, F.J. e Morita, R.Y. 1968 - Significance of the temperature characteristic of growth. J. Bacteriol. 95: 736-737.
- Harada, T. e Mori, H. 1971 - Mutants of acetic acid bacteria used in vinegar production. J. Ferment. Technol. 49: 836-841.
- Hijikata, Y.; Takano, M. e Terui, G. 1970 - Studies on factors to promote acetic acid fermentation by Acetobacter rancens (I). J. Ferment. Technol. 48: 79-83.
- Hijikata, Y.; Okuma, H. e Terui, G. 1972.a - Studies on factors to promote acetic acid fermentation by Acetobacter rancens

(II) Effect of some simple metabolites. J.Ferment.Technol.
50: 7-12.

- Hijikata, Y. e Terui, G. 1972.b - Studies on factors to promote acetic acid fermentation by Acetobacter rancens (III) Fractionation of effective factors in yeast extract. J.Ferment. Technol. 50: 13-20.
- Hromatka, O.; Kastner, G. e Ebner, H. 1952 - Untersuchungen über die essigarund V., Über den Einfluss von temperature under gesamtkonzentration auf die subnersegarung. Enzymologia 16: 337-350.
- King, T.E. e Cheldelin, V.H. 1952 - Oxidative dissimilation in Acetobacter suboxydans. The J. Biol. Chem. 198: 127-133.
- King, T.E. e Cheldelin, V.H. 1954 - Piruvic carboxylase of Acetobacter suboxydans. The J. Biol. Chem. 208: 821-831.
- King, T.E. e Cheldelin, V.H. 1956 - Oxidation of acetaldehyde by Acetobacter suboxydans.. The J. Biol. Chem. 220: 177-191
- Kitos e outros, 1958 - Glucose and gluconate dissimilation in Acetobacter suboxydans. J. Biol. Chem. 223: 1295-1298.
- Kodama, T.; Kotera, U. e Yamada, K. 1972.a - Induction of mutants from the tartrate producing bacterium, Gluconobacter suboxydans and their properties. Agr. Biol. Chem. 36:1299-1305.
- Kondo, K. e Ameyama, M. 1957 - Microbiological Studies on Acetobacter species. The Annual Repts of the Dept. of Agric., Shizvoka Univ. (Japan). 7: 118-162.
- Kotera, U.; Umehara, K.; Kodama, T. e Yamada, K. 1972.b - Isola

tion method of highly tartaric acid producing mutants of Gluconobacter suboxydans. Agric. Biol. Chem. 36: 1307-1313

- Kotera, U.; Kodama, T.; Minoda, Y. e Yamada, K. 1972.c - Isolation and chemical structure of new oxidative product of 5-ketogluconic acid, and a hypothetical pathway from glucose to tartaric acid through this new compound. Agric. Biol. Chem. 36: 1315-1325.
- Kulhánek, M. 1970 - Fermentation processes employed in vitamin C synthesis. Em: Perlman, D. (ed.). "Advances in Applied Microbiology". 12: 11-33. Academic Press. New York. N.Y.
- Lamana, C. e Mallette, M.F. 1965 - Basic bacteriology its biological and chemical background. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- Leifson, E. 1954 -The flagellation and taxonomy of species of Acetobacter. Antonie v. Leeuwenhoek. 20: 102-107.
- Lockwood, L.B. 1954 - Ketogenic fermentation processes. Em: Underkofler, L.A. e Hickey, R.J. (eds.). "Industrial Fermentations". Chemical Publishing Co., Inc. New York. N.Y.
- Lopez, A.; Johnson, L.N. e Wood, C.B. 1961 - Observations on a laboratory method for submerged acetic acid fermentation Appl. Microbiol. 9: 425-433.
- Prescott, S.C. e Dunn, G.G. 1959 - Industrial Microbiology. Mc Graw-Hill Book Company, Inc. Tokyo. Japan.
- Rao, M.R.R. e Stokes, J.L. 1953 - Utilization of ethanol by acetic acid bacteria. J. Bacteriol. 66: 634-638.
- Richardson, K.C. 1967 - Submerged acetification of a vinegar ba

- se produced from waste pineapple juice. Biotechnol. and Bioeng. 9: 171-186.
- Shaw, M.K. 1967 - Effect of abrupt temperature shift on the growth of a mesophilic and psychrophilic yeasts. J. Bacteriol. 93: 1332-1336.
 - Shimwell, J.L. 1954 - Pure culture vinegar production. J. Inst. Brewing. 60: 136-141.
 - Vaughn, R.H. 1942 - The acetic acid bacteria. Wallerstein Labs. Communs. 14: 5-26.
 - Ward, G.E. 1967 - Production of gluconic acid, glucose oxidase, fructose and sorbose. Em: Pepler, H.J. (ed.). "Microbial Technology". Reinhold Publishing Corporation. New York.
 - Wells, P.A.; Stubbs, J.J.; Lockwood, L.B. e Roe, E.T. 1937 - Sorbose from sorbitol. Production by submerged growths of Acetobacter suboxydans. Ind. Eng. Chem. 29: 1385-1388.
 - Wells, P.A.; Lockwood, L.B.; Stubbs, J.J.; Roe, E.T. Porges, N. e Gastrock, F.A. 1939 - Sorbose from sorbitol. Semiplant-scale production by Acetobacter suboxydans. Ind. Eng. Chem. 31: 1518-1521.
 - White, J. 1970 - Malt vinegar manufacture. Proc. Biochem. 5: 54-56.
 - Yanagida, F.; Asano, M. e Suminoe, K. 1971 - Studies on acetic acid bacteria and their utilization. I. Classification of acetic acid bacteria isolated from vinegar mash. J. Soc. Brew. Japan. 66: 991-996.
 - Yokoya, F. 1974 - Efeito da concentração salina sobre o cresci-

mento de Staphylococcus aureus. VI Congresso Latinoamerica
no de Microbiologia. Caracas. Venezuela.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Fumio Yokoya, pela orientação e dedicação durante a realização deste trabalho.

À Direção da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pelas possibilidades oferecidas para o desenvolvimento desta tese.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia de Alimentos, pela sua colaboração nas experiências realizadas.