

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

ISOLAMENTO, SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E PARÂMETROS
CINÉTICOS DE BACTÉRIAS ACÉTICAS PROVENIENTES DE
INDÚSTRIAS DE VINAGRE

WILMA APARECIDA SPINOSA

Engenheiro Químico

Dr. FUMIO YOKOYA

Orientador

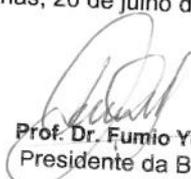
Dr. PEDRO DE OLIVA NETO

Co-orientador

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Wilma Aparecida Spinosa**, aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de julho de 2002.

Campinas, 26 de julho de 2002.


Prof. Dr. Fumio Yokoya
Presidente da Banca

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

Campinas

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Sp47i
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50292
PROC 16-837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 13/08/02
Nº CPD _____

CM00171943-0

BIB ID 250719

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

Sp47i Spinosa, Wilma Aparecida
Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de
bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre / Wilma
Aparecida Spinosa. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

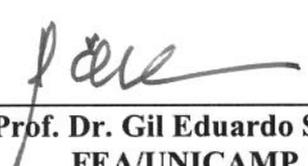
Orientador: Fumio Yokoya
Co-orientador: Pedro de Oliva Neto
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Vinagre. 2.*Acetobacter*. I.Yokoya, Fumio. II.Oliva Neto,
Pedro de. III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV.Título.

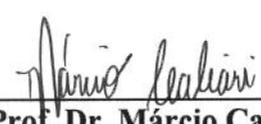
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fumio Yokoya
FEA/UNICAMP
Orientador



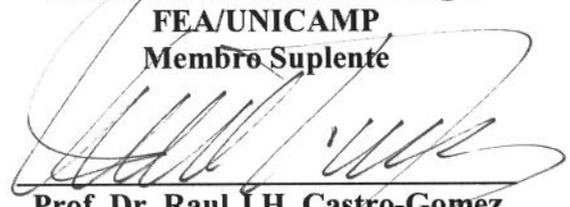
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
FEA/UNICAMP
Membro Titular



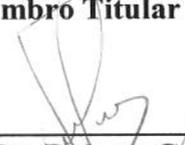
Prof. Dr. Márcio Caliari
UNIBH
Membro Titular

Prof. Dr. Maria da Graça Stupiello Andrieta
CPQBA/UNICAMP
Membro Suplente

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
FEA/UNICAMP
Membro Suplente



Prof. Dr. Raul J.H. Castro-Gomez
DTA/UEL
Membro Titular



Prof. Dr. Rubens Cruz
FCL/UNESP
Membro Titular

200237233

DEDICATÓRIA

Para Clara, Zanchetta,
Vitório e minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de registrar os nomes de pessoas e de empresas que de algum modo colaboraram comigo no percurso deste trabalho, a quem agradeço particularmente:

Ao Estêvão e à Rhavena, pela diligência e companhia durante este percurso;

Ao Manoel e ao Márcio, pelo cuidado e companhia desde o início;

Aos professores doutores Fumio Yokoya e Pedro de Oliva Neto, pela orientação segura, confiança e tolerância;

À Empresa Vinagre Saboroso e, em especial, a Ricardo Llorca e Ana Rapacci; à Frings Mycrodin do Brasil, em especial ao Gerhard, pela atenção e condições de trabalho sempre acolhedoras;

Aos professores doutores João Tadeu Ribeiro Paes, pela gentileza do auxílio em momentos importantes desta pesquisa; aos professores doutores Rubens Cruz e Raul J.H. Castro-Gomez, pelo incentivo desde sempre;

Aos amigos e colaboradores sempre prontos Mônica, Fabiano, Patrícia, Gil, Renata, Karina, Carol, Erico, Aleicho, Gisele, Vivian, Val e todos os colegas de trabalho, que não só procuraram ajudar no trabalho, como oferecendo condições para que pudéssemos nos concentrar nesta atividade;

À Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA-pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Rodolfo, pela colaboração nas análises moleculares, por sua disposição e atenção durante o desenvolvimento do trabalho;

À Elaine, pela colaboração na análise estatística;

Ao professor doutor José Carlos Dalmas e ao Departamento de Matemática aplicada da Universidade Estadual de Londrina, pela análise estatística;

À Lourdes, Elisangela e à Usina Maracaí, pela cessão de equipamento;

Ao Eduardo Ardiles, Eliete e à Usina Nova América;

À Empresa Carnevalli Biotecnologia Ltda., em especial a Willians T. Carnevalli, pelas informações prestadas;

À Associação Nacional dos Produtores de Vinagre -ANAVI, em especial ao senhor Leo; e à União Brasileira de Viticultura - UVIBRA, pelas informações prestadas;

Às empresas A. Borin S.A. e Oldecar S.A., produtoras dos vinagres Toscano e Neval, pela permissão da coleta de material.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv	
LISTA DE TABELAS.....	xix	
LISTA DE TABELAS DO ANEXO.....	xxiii	
LISTA DE FIGURAS DO ANEXO.....	xxv	
RESUMO	xxvii	
SUMMARY	xxix	
1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1	Aspectos da Produção de Vinagre	9
2.1.1	História do Vinagre.....	9
2.1.2	Métodos de produção de vinagre	12
2.1.2.1	Processo Lento, Orleans ou Francês:	12
2.1.2.2	Processo Rápido ou Alemão	13
2.1.2.3	Processo submerso	15
2.1.2.4	Comparação entre os processos	17
2.2	Fermentação Acética.....	17
2.3	Medição do Crescimento Celular.....	24
2.3.1	Contagem Total de Células.....	24
2.3.2	Contagem de Viáveis	25
2.3.3	Medidas de Turbidez.....	26
2.3.4	Número Mais Provável (NMP).....	27
2.3.5	Membrana Filtrante.....	28
2.4	Classificação das Bactérias Acéticas	31
2.4.1	Família VI – <i>Acetobacteraceae</i>	33
2.4.2	Diferenciação de Gênero na Família <i>Acetobacteraceae</i>	33
2.4.3	Rápida Identificação Fenotípica da Família <i>Acetobacteraceae</i>	35
2.5	Gênero <i>Acetobacter</i>	37
2.5.1	Rápida Identificação Fenotípica do Gênero <i>Acetobacter</i>	37

2.5.2	Bioquímica.....	39
2.5.3	Nutrição e Fatores de Crescimento	43
2.5.4	<i>Habitat</i>	44
2.5.5	Diferenciação de Espécies no Gênero <i>Acetobacter</i>	44
2.6	Isolamento e Meios de Crescimento	53
2.7	Preservação de Bactérias Acéticas.....	62
2.7.1	Preservação de microrganismos e estocagem em nitrogênio líquido	62
2.7.2	Preservação de bactéria acética.....	64
3	MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1	Material	69
3.1.1	Microrganismos	69
3.1.2	Meios de cultura.....	69
3.1.3	Descrição dos fermentadores onde foram isoladas bactérias acéticas	72
3.1.3.1	Dorna de fermentação acética submersa das indústrias vinagreiras	72
3.1.3.2	Acetificador rápido para fermentação acética em operação na Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA	73
3.1.3.3	Acetador submerso Frings	75
3.2	Métodos.....	79
3.2.1	Amostragem.....	79
3.2.2	Características morfológicas dos isolados	89
3.2.3	Purificação dos isolados.....	89
3.2.4	Triagem e identificação ao nível de gênero das linhagens isoladas.....	90
3.2.5	Caracterização bioquímica das linhagens isoladas e identificadas como gênero <i>Acetobacter</i>	90
3.2.5.1	Teste de produção de oxidase	90
3.2.5.2	Teste de produção de catalase.....	91
3.2.5.3	Teste de produção de indol do triptofano	91
3.2.5.4	Teste de produção de proteases (gelatinases)	91
3.2.5.5	Teste de redução de nitrato	91

3.2.5.6	Teste de crescimento em meio de <i>Hoyer</i>	92
3.2.5.7	Teste de produção de ácido a partir de glicose	92
3.2.5.8	Teste de produção de dihidroxiacetona de glicerol.....	92
3.2.5.9	Teste de produção de celulose	92
3.2.5.10	Teste de produção de pigmento marrom.....	93
3.2.6	Preservação das culturas purificadas	93
3.2.6.1	Estudo para escolha do crioprotetor.....	93
3.2.6.2	Armazenamento das linhagens isoladas.....	94
3.2.7	Comparação de métodos de quantificação da população	94
3.2.7.1	Contagem de células	95
3.2.7.2	Plaqueamento em superfície	96
3.2.7.3	Número Mais Provável (NMP).....	97
3.2.7.4	Membrana filtrante.....	98
3.2.8	Preparo de inóculo	102
3.2.9	Seleção das linhagens com maior potencial para conversão de etanol a ácido acético	102
3.2.10	Caracterização das linhagens selecionadas com maior potencial para conversão de etanol a ácido acético	103
3.2.10.1	Características fisiológicas e bioquímicas	103
3.2.11	Estudo de produção de ácido acético das linhagens selecionadas	104
3.2.12	Cálculos de rendimento.....	106
3.2.12.1	Rendimento em ácido acético	106
3.2.12.2	Rendimento da concentração total.....	107
3.2.12.3	Produtividade em ácido acético	107
3.2.13	Caracterização molecular de bactérias acéticas	107
3.2.14	Métodos analíticos	108
3.2.14.1	Etanol	108
3.2.14.2	Determinação da acidez total	108
3.2.14.3	Massa células	109

3.2.14.4	Técnica de polimorfismo de DNA amplificado.....	109
3.2.14.4.1	Extração do DNA.....	109
3.2.14.4.2	Amplificação do DNA.....	110
3.2.14.4.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com prata.....	110
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
4.1	Isolamento de bactérias acéticas em fermentadores de vinagre com concentração total (CT) variando de 6 a 11%.....	111
4.2	Caracterização das bactérias acéticas isoladas em fermentadores de vinagre com concentração total (CT) variando de 6 a 11%.....	116
4.2.1	Características morfológicas.....	116
4.2.2	Rápida identificação fenotípica das linhagens isoladas.....	125
4.2.3	Rápida identificação fenotípica e do Gênero <i>Acetobacter</i>	127
4.2.4	Caracterização fisiológica e bioquímica dos isolados identificados como <i>Acetobacter</i>	134
4.3	Preservação das linhagens purificadas.....	136
4.4	Enumeração de bactérias acéticas.....	142
4.4.1	Escolha de corante para uso na contagem de células viáveis e não viáveis.....	142
4.4.2	Comparação entre técnicas de contagem para uso com bactérias acéticas.....	143
4.5	Estudo de linhagens isoladas de unidades produtoras de vinagre capazes de oxidar etanol.....	154
4.5.1	Triagem dos isolados identificados como <i>Acetobacter</i> sp. quanto à capacidade para oxidar etanol.....	154
4.5.2	Caracterização das linhagens isoladas e selecionadas pela capacidade de oxidação de etanol em meio <i>MYP</i> modificado.....	159
4.5.3	Crescimento das linhagens isoladas e selecionadas pela capacidade de oxidação de etanol nas temperaturas de 30, 35 e 40°C.....	160
4.5.4	Crescimento das linhagens isoladas e selecionadas pela capacidade de oxidação de etanol nas concentrações em ácido acético de 5; 10 e 15%... ..	161

4.5.5	Características bioquímicas e fisiológicas das linhagens isoladas e selecionadas pela capacidade de oxidação de etanol	161
4.6	Estudo cinético das linhagens isoladas e selecionadas como capazes de oxidar o etanol.....	169
4.6.1	Monitoramento de parâmetros cinéticos em escala laboratorial.....	169
4.6.2	Monitoramento dos parâmetros cinéticos em escala piloto para um ciclo fermentativo	170
4.6.3	Comparação entre parâmetros de produção de fermentação acética em escala piloto e industrial	181
4.6.4	Estudo comparativo de população de bactérias acéticas.....	190
5	CONCLUSÕES	193
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	195
7	ANEXO.....	203

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da reação de oxidação do etanol a ácido acético	19
Figura 2	Oxidação do etanol a ácido acético.....	41
Figura 3	Esquema do acetificador rápido.....	75
Figura 4	Acetificador rápido	75
Figura 5	Foto do acetador submerso <i>Frings</i>	77
Figura 6	Acetificador rápido de bancada	87
Figura 7	Hemocitômetro (câmara de <i>Neubauer</i>).....	96
Figura 8	Unidade de filtração.....	99
Figura 9	Bactéria acética isolada em meio ágar dupla camada, após 96 h de incubação a 30°C.....	119
Figura 10	Bactéria acética isolada em meio ágar dupla camada, após 96 h de incubação a 30°C.....	119
Figura 11	Bactéria acética isolada em meio ágar dupla camada, após 96 h de incubação a 30°C.....	121
Figura 12	Bactéria acética isolada em meio ágar dupla camada, após 96 h de incubação a 30°C.....	121
Figura 13	Fotomicrografia ótica de linhagem recuperada de fermentação de vinagre fixada e corada pela técnica de Gram.	125
Figura 14	Linhagem 086/07 incubado a 30° C após 96 h em meio Carr (esquerda) e 72 h em meio <i>DSM</i> (direita).....	131
Figura 15	Linhagem de <i>Acetobacter aceti</i> incubada a 30° C após 96 h em meio Carr (esquerda) e 72 h em meio <i>DSM</i> (direita).....	131
Figura 16	Linhagem de <i>Gluconobacter oxydans</i> incubada a 30° C após 96 h em meio Carr (esquerda) e 72 h em meio <i>DSM</i> (direita).....	131
Figura 17	Plaqueamento possível de quantificar.....	149
Figura 18	Plaqueamento impossível de quantificar.	149

Figura 19	Tubo A com prova negativa e Tubo B com prova positiva.	149
Figura 20	Tubo A com prova negativa e Tubos B e C com respostas dúbias.	149
Figura 21	Contagem de bactérias acéticas pela membrana filtrante, meio <i>MYP</i> dupla camada, após 24 h de incubação a 30°C e umidade relativa de 96% - 2ª Repetição.....	151
Figura 22	Contagem de bactérias acéticas pela membrana filtrante, meio <i>MYP</i> dupla camada, após 24 h de incubação a 30°C e umidade relativa de 96% - 2ª Repetição.....	151
Figura 23	Capacidade de oxidação do etanol pela linhagem 086/06 em ágar <i>MYP</i> modificado após 48 horas de incubação a 30°C.....	157
Figura 24	Capacidade de oxidação do etanol pela linhagem-referência <i>Acetobacter</i> <i>aceti</i> CCT1706 em ágar <i>MYP</i> modificado após 48 horas de incubação a 30°C.....	157
Figura 25	Crescimento de linhagem 086/06 em diferentes fontes de carbono, em meio <i>MYP</i> modificado, após 72 h de incubação a 30°C.	165
Figura 26	Crescimento de linhagem-referência CCT1706 em diferentes fontes de carbono, em meio <i>MYP</i> modificado, após 72 h de incubação a 30°C.....	165
Figura 27	Crescimento de linhagem isolada em diferentes fontes de carbono em meio <i>Suomalainem</i> modificado após 72 h de incubação a 30°C.....	167
Figura 28	Crescimento de linhagem-referência CCT1706 em diferentes fontes de carbono em meio <i>Suomalainem</i> modificado após 72 h de incubação a 30°C.	167
Figura 29	Curvas dos parâmetros medidos para a linhagem 086/06 em um ciclo fermentativo com CT 7,5%.....	173
Figura 30	Curvas dos parâmetros medidos para a linhagem 082/05 em um ciclo fermentativo com CT 7,5%.....	173
Figura 31	Comparativo entre produtividade e rendimento em ácido acético para linhagem 086/06 em CT de 5; 6,5; 7,5; 9,0 e 9,5%.	177

Figura 32	Comparativo entre produtividade e rendimento em ácido acético para linhagem 082/05 em CT de 5; 6,5; 7,5; 9,0 e 9,5%.	179
Figura 33	Curvas dos parâmetros medidos para cultura mista na indústria 1 em um ciclo fermentativo com CT 10%.	183
Figura 34	Curvas dos parâmetros medidos para linhagem 086/06, isolada da indústria 1, em um ciclo fermentativo com CT 10%.	187
Figura 35	<i>Primer 2</i> (CTGATGCTAC); 1- Padrão de peso molecular (1Kb); 2- Linhagem 082/05 estocada; 3- Fermentador com inóculo da linhagem 082/05; 4- Linhagem 086/06; 5- Fermentador com inóculo da linhagem 086/06; 6- Linhagem-referência CCT0190.	191
Figura 36	<i>Primer 4</i> (AGTGCTACGT); 1-Padrão de peso molecular (1 Kb); 2- Linhagem 082/05 estocada; 3- Fermentador com inóculo da linhagem 082/05; 4- Linhagem 086/06; 5- Fermentador com inóculo da linhagem 086/06; 6- Linhagem-referência CCT0190.	191
Figura 37	<i>Primer 8</i> (CTCTCCGCCA) 1- Padrão de peso molecular (1 Kb); 2- Linhagem 082/05 estocada; 3- Fermentador com inóculo da linhagem 082/05; 4- Linhagem 086/06; 5- Fermentador com inóculo da linhagem 086/06; 6- Linhagem-referência CCT0190; 7- Cultura mista (indústria 1); 8- Cultura mista (Frings).	191

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diferenciação de bactérias <i>Gram</i> negativas que oxidam etanol a ácido acético em meio neutro ou acidificado (pH 4,5).....	36
Tabela 2	Características diferenciais das espécies do gênero <i>Acetobacter</i>	46
Tabela 3	Relação de meios de crescimento.	70
Tabela 4	Composição de meios de cultura.	71
Tabela 5	Dados referentes à 1ª coleta.	81
Tabela 6	Dados referentes à 3ª coleta.	83
Tabela 7	Dados referentes à 5ª coleta - indústria 2.....	84
Tabela 8	Dados referentes à 5ª coleta - indústria 3.....	84
Tabela 9	Dados referentes à 6ª coleta.	85
Tabela 10	Dados referentes à 8ª coleta.	86
Tabela 11	Dados referentes à 9ª coleta - indústria 2.....	87
Tabela 12	Dados referentes à 9ª coleta - indústria 3.....	89
Tabela 13	Local de origem, técnica de preparo de placas e quantidade de linhagens identificadas por coleta.	112
Tabela 14	Número de linhagens isoladas por meio de cultura utilizado em cada coleta nas unidades produtoras vinagre.....	114
Tabela 15	Resumo das características macroscópicas das linhagens isoladas de unidades produtoras de vinagre.	123
Tabela 16	Teores de ácido acético e etanol em que ocorreram a superoxidação de linhagens isoladas em unidades produtoras de vinagre, com concentração total (CT) variando de 6 a 11%.....	128
Tabela 17	Rápida identificação fenotípica da família <i>Acetobacteraceae</i> , segundo <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> (Holt et al., 1994), e <i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology</i> (Krieg et al.,1984), e identificação de Gênero pela capacidade de oxidação do lactato em meio dextrose, sorbitol e manitol - <i>DSM</i> , segundo Cirigliano (1982).	133

Tabela 18	Comparação das características das 70 linhagens isoladas, purificadas e identificadas como <i>Acetobacter</i> sp. com linhagens-referência.....	135
Tabela 19	Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 017/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C	137
Tabela 20	Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 024/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C	138
Tabela 21	Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 052/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C	139
Tabela 22	Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 056/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C	140
Tabela 23	Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 057/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C	141
Tabela 24	Comparação entre técnicas da contagem de células, plaqueamento em superfície, número mais provável e membrana filtrante para enumeração de bactérias acéticas, 1ª repetição realizada na indústria 1.....	144
Tabela 25	Comparação entre técnicas da contagem de células, plaqueamento em superfície, número mais provável e membrana filtrante para enumeração de bactérias acéticas, 2ª repetição realizada em laboratório com linhagem-referência <i>Acetobacter aceti</i> CCT0190.....	146
Tabela 26	Capacidade de oxidação do etanol, medido pelo formação de halo (mm), a 30°C em ágar <i>MYP</i> modificado, após 48 horas de incubação.....	156
Tabela 27	Local e dados de onde as linhagens selecionadas foram coletas.	160

Tabela 28	Reações bioquímicas das linhagens isoladas e selecionadas como capazes de oxidar etanol e de linhagens-referência, preparadas conforme procedimento padrão de inóculo.....	163
Tabela 29	Crescimento após 96 horas de incubação a 30°C em diferentes fontes de carbono de linhagens isoladas e selecionadas como capazes de oxidar etanol e linhagens-referência.....	164
Tabela 30	Monitoramento do ciclo fermentativo da linhagem 086/06 em meio RAE em reator <i>Frings</i> com volume total de 8 L.....	171
Tabela 31	Monitoramento do ciclo fermentativo da linhagem 082/05 em meio RAE em reator <i>Frings</i> com volume total de 8 L.....	172
Tabela 32	Ciclos fermentativos com linhagem 086/06 nas concentrações totais (%CT) de 5,0; 6,5; 7,5; 9,0 e 9,5.....	177
Tabela 33	Ciclos fermentativos com linhagem 082/05 nas concentrações totais (%CT) de 5,0; 6,5; 7,5; 9,0 e 9,5.....	179
Tabela 34	Monitoramento do ciclo fermentativo de cultura mista na indústria 1, substrato álcool em dornas de fermentação com volume total de 20 m ³ ...	183
Tabela 35	Monitoramento do ciclo fermentativo da linhagem 086/06, isolada da indústria 1, em meio RAE com CT de 10% em reator <i>Frings</i> com volume total de 8 L.....	186
Tabela 36	Influência das concentrações de ácido acético e etanol na produtividade e tempo de fermentação para a linhagem 086/06.....	189

LISTA DE TABELAS DO ANEXO

Tabela A1.	Características macroscópicas das colônias após 96 h de crescimento, coletadas em unidades produtoras de vinagre e incubadas a 30°C com umidade relativa >90%.	207
Tabela A2.	Análise de variância para resposta crioprotetor extrato de malte 20%.	213
Tabela A3.	Análise de variância para resposta crioprotetor glicerol 10%.	213
Tabela A4.	Comparação entre as médias dos resultados (Teste de Tukey) obtidos para contagem de bactérias acéticas pelas técnicas da Contagem Direta, Plaqueamento em Superfície, Número Mais Provável e Membrana Filtrante, na repetição 1, indústria 1, admitindo-se 5% de diferença entre os resultados comparados.	214
Tabela A5.	Análise de variância da comparação entre os resultados obtidos na enumeração de bactérias acéticas pela técnica do Número Mais Provável e Membrana Filtrante para repetição 1, na indústria 1, para $p < 0,05$	214
Tabela A6.	Comparação entre as médias dos resultados (Teste de Tukey) obtidos para contagem de bactérias acéticas pelas técnicas da Contagem Direta, Plaqueamento em Superfície, Número Mais Provável e Membrana Filtrante, na repetição 2, em laboratório para linhagem CCT0190, admitindo-se 5% de diferença entre os resultados comparados.	215
Tabela A7.	Análise de variância da comparação entre os resultados obtidos na enumeração de bactérias acéticas pela técnica da Contagem Direta e Membrana Filtrante para repetição 2, em laboratório com linhagem CCT0190 para $p < 0,05$	215
Tabela A8.	Monitoramento das medidas da linhagem 006/01 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.	217
Tabela A9.	Monitoramento das medidas da linhagem 011/01 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.	219
Tabela A10.	Monitoramento das medidas da linhagem 016/03 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.	221

Tabela A11.	Monitoramento das medidas da linhagem 055/03 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.....	223
Tabela A12.	Monitoramento das medidas da linhagem 067/04 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.....	225
Tabela A13.	Monitoramento das medidas da linhagem 068/04 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.....	227
Tabela A14.	Monitoramento das medidas da linhagem 078/05 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.....	229
Tabela A15.	Monitoramento das medidas da linhagem 082/05 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.....	231
Tabela A16.	Monitoramento das medidas da linhagem 086/06 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.....	233
Tabela A17.	Parâmetros cinéticos e rendimentos calculados a partir do monitoramento da produção de ácido, partindo de CT 6% (2a/4e), meio RAE, 30°C, 120 rpm.	235
Tabela A18.	Produtividade a 30°C em g de ácido acético /100 mL em 24 horas.....	235

LISTA DE FIGURAS DO ANEXO

Figura F1.	Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 006/01.	217
Figura F2.	Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 011/01.	219
Figura F3.	Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 016/03.	221
Figura F4.	Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 055/03.	223
Figura F5.	Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 067/04.	225
Figura F6.	Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 068/04.	227
Figura F7.	Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 078/05.	229
Figura F8.	Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 082/05.	231
Figura F9.	Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 086/06.	233
Figura F10.	Produtividade em g de ácido acético por 100 mL em 24 horas para diferentes valores de concentração total (%CT).	237
Figura F11.	Curva de massa celular seca da linhagem 082/06.	239
Figura F12.	Curva de massa celular seca da linhagem 086/06.	239
Figura F13.	Varição das taxas específicas para a linhagem 086/06 com CT de 7,5% .	241
Figura F14.	Varição das taxas específicas para a linhagem 082/05 com CT de 7,5% .	241
Figura F15.	Varição das taxas específicas para a cultura mista da indústria 1 com CT de 10% .	243
Figura F16.	Varição das taxas específicas para a linhagem 086/06 com CT de 10% .	243

RESUMO

Esta pesquisa objetivou estudar e padronizar procedimentos de isolamento de linhagens em fermentadores de alta produção de vinagre, seleção das culturas com características importantes para a produção de vinagre, além da identificação, manutenção dessas linhagens, contagem de bactérias acéticas e estudo de parâmetros cinéticos de produção. Observou-se, por um lado, o fato de a produção industrial ter sido pouco beneficiada com os estudos sobre as bactérias acéticas e, por outro, o estado de manufatura em que se encontra a fermentação acética nas unidades produtoras.

O trabalho iniciou-se a partir do isolamento de microrganismos em unidades produtoras de vinagre no Estado de São Paulo. Ao todo foram isoladas 98 linhagens, das quais 74 foram selecionadas, em rápida identificação fenotípica, como pertencentes à família *Acetobacteraceae*, e, destas, 70 linhagens identificadas como pertencentes ao gênero *Acetobacter*, também por rápida identificação fenotípica. Com a técnica do ágar em dupla camada e a inoculação por espalhamento, verificou-se que 94,6% das linhagens isoladas foram identificadas como *Acetobacter* e cresceram em atmosfera com umidade relativa de 93 a 97%, e temperatura de $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em tempo máximo de 96 horas. Dos meios de cultura testados, os dois principais, em termos de recuperação de colônias, foram o meio *MYP*, que recuperou 44,3%, e o *Suomalainem*, que recuperou 25,7% do total de *Acetobacter* sp. isoladas.

As coletas de microrganismos foram executadas entre 1998 e 2001, em três indústrias vinagreiras e três laboratórios de pesquisa. O material coletado foi preservado em condições tais que ao final de dois anos a recuperação celular média foi de 75% para linhagens armazenadas em extrato de malte 20% a -80°C . Já para outro crioprotetor estudado, o glicerol 10%, com linhagens também mantidas a -80°C , a recuperação média foi de 68%. No desenvolvimento desse processo também se chegou a uma técnica de contagem de células viáveis de bactérias acéticas e testes rápidos para contagem usando

membrana filtrante. Do material isolado, avaliaram-se as características de crescimento, a morfologia celular das colônias e fontes de crescimento. A identificação de bactérias foi feita por série bioquímica, triando-se as linhagens capazes de oxidar o etanol e estudando o seu potencial fermentativo através de parâmetros cinéticos.

Além da análise molecular pela técnica de *RAPD-PCR*, para comparar a população das bactérias acéticas das unidades produtoras de vinagre, os isolados purificados foram armazenados a -80°C ou -196°C e posteriormente usados para preparo de inóculo e em fermentação de escala piloto. Duas linhagens isoladas, capazes de oxidar o etanol, foram avaliadas quanto aos seus parâmetros de produção em fermentador piloto *Frings*. O tempo de um ciclo fermentativo em uma concentração total média, que é a soma da concentração do etanol (%v/v) e do ácido acético (% p/v), de 7,5%, foi de 17 e 22 horas para cada linhagem, respectivamente. As linhagens diferiram entre si quanto à produtividade sob as mesmas condições de trabalho. E o estudo comparativo entre a linhagem isolada da indústria e a cultura mista da mesma indústria, em igual concentração total (%CT), mostrou-se positivo para a cultura mista quanto à produtividade em gramas de ácido acético por 100 mL, por 24 horas. O estudo comparativo de população demonstrou a diferença entre a população dos fermentadores industriais e a dos fermentadores-piloto. Os isolados armazenados a -196°C eram iguais aos dos fermentadores-piloto em que foram inoculados.

SUMMARY

The industrial production of vinegar has so far only insufficiently benefited from research on acetic bacteria. Hence, in spite of being highly qualified in terms of equipment, it is microbiologically deficient.

The aims of the present work are (1) to study and standardize the isolation of strains used in the production of highly acid fermented vinegar, (2) to select, identify, and maintain cultures with the relevant characteristics for vinegar production, (3) to count acetic bacteria, and (4) to investigate the kinetic parameters of vinegar production. 98 strains of microorganisms were collected in vinegar producing units from São Paulo State. Rapid phenotypic identification revealed that 74 belonged to the family Acetobacteraceae and 70 to the genus *Acetobacter*. Using the double-layer agar plate technique and inoculation by spreading, the *Acetobacter* strains were obtained and grew in up to 96 hours under 93 to 97% of relative humidity and $30\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Colony recovering was best in two media; 44,3% of the *Acetobacter* species were recovered in MYP and 25,7% in Suomalainen.

The microorganisms were collected from 1998 through 2001 in three factories and three research laboratories. After two years, the average cell recovering was 75% for strains preserved in 20% malt extract at -80°C and 68% in 10% glycerol at -80°C .

A technique for counting viable cells of acetic bacteria and rapid counting tests with filtration membranes were developed. Growth traits, colony cell morphology, and growth sources were evaluated. Bacterial identification was performed through biochemical series in which lineages able to oxidize ethanol were sorted and had their fermentation kinetic parameters studied.

To compare bacterial populations from different vinegar production units, molecular analysis using the RAPD-PCR technique was employed. Purified strains were stored at either -80°C. or -196°C. and afterwards utilized in inoculum preparation and fermentation in pilot acetators. Two lineages capable of oxidizing ethanol had their production parameters evaluated in an 8 L pilot acetator (Frings CO., Bonn, Germany). With an average total concentration (%TC) [i. e., the sum of ethanol (%v/v) plus acetic acid (%p/v) concentrations] of 7,8%, the fermentation cycle of the two lineages was 17 and 22 hours. Under equal conditions, the productivity of the two lineages was different. Compared to the strain isolated from the factory under the same total concentration (%TC), the mixed culture from the same factory proved more productive in grams of acetic acid per 100mL in a 24 hour period. The populations from the industrial and the pilot acetators were also different. The strains kept at -196°C. equaled those from the pilot acetators in which they were inoculated.

1 INTRODUÇÃO

O *habitat* e a biologia das bactérias da família *Acetobacteraceae* são bastante conhecidos. Esse conhecimento deve-se tanto aos consideráveis benefícios propiciados por essas bactérias, quanto ao prejuízo causados por elas à indústria, fatores esses que serão abordados no decorrer do presente trabalho. Desde sua primeira descrição, por Persoon, em 1822, uma extensa literatura tem abordado a taxonomia, a bioquímica, a cinética de crescimento e a produção desses organismos. Na natureza, a bactéria acética parece bem adaptada a soluções açucaradas ou alcólicas. Trabalhos encontrados na literatura enfatizam a bactéria acética na fabricação de vinagre, bem como o seu papel como agente na deterioração de cerveja e de vinhos. A ocorrência da bactéria acética em outros nichos, como em flores, frutas, colmeias, “*tea fungus*” e vinho de palma, foi somente descrita muito mais tarde (Swings, 1992).

A produção de ácido acético a partir da oxidação do etanol é bastante eficiente pelas linhagens de *Acetobacter*, sendo por isso usadas na fabricação do vinagre. Já as atividades oxidativas e cetogênicas são elevadas em *Gluconobacter*, o que favorece a produção de ácido glicônico e cetoglicônico, fermentação de sorbitol para a produção de vitamina C e outras fermentações. O presente estudo limita-se ao trabalho com bactérias acéticas do gênero *Acetobacter*.

Apesar dos conhecimentos adquiridos sobre as bactérias acéticas, a produção industrial de vinagre beneficia-se muito pouco dos resultados obtidos a partir de trabalhos científicos com esses microrganismos. No estudo publicado por Sokollek & Hammes (1997), sobre preparo de cultura iniciadora para a fermentação acética, enfatiza-se que a produção de vinagre dispõe de alto padrão tecnológico, podendo ser obtida uma concentração final de até 17% em ácido acético. Por outro lado, o manuseio das bactérias acéticas fora do ambiente de fermentação induzida está longe de atingir um *status* adequado. Existem problemas no isolamento de linhagens, na manutenção das culturas, no

cultivo fora do acetador, na transferência do meio de cultivo sólido para o líquido e vice-versa, na contagem de células viáveis e na preservação das linhagens.

Em trabalho posterior, Sokollek et al. (1998a) foram categóricos ao afirmarem que a microbiologia da fermentação de vinagre não é desenvolvida adequadamente com respeito a um conhecimento completo da posição taxonômica dos organismos envolvidos, da resposta para fatores ecológicos, da fisiologia e genética. Ainda é considerado um estado artesanal começar o processo de fermentação por meio de inoculação com "semente de vinagre", que consiste em utilizar vinagre diluído, microbiologicamente indefinido, retirado de acetador em fermentação. A falta de culturas iniciadoras puras é devida a dificuldades no isolamento de linhagens, cultivo e preservação das bactérias de vinagre (Kittelmann et al., 1989; Sievers et al., 1992; Sokollek & Hammes, 1997). A dificuldade de isolamento e cultivo foi parcialmente reduzida pela introdução da técnica de camada dupla e meio AE (ácido acético-etanol), descrita por Entani et al. (1985), que demonstrou ser a mais eficiente. Esse novo método permite cultivar bactérias acéticas capazes de produzir concentrações acéticas entre 10 a 15%.

Há poucos trabalhos publicados no Brasil sobre ecologia microbiana da fermentação acética. A ecologia microbiana está centrada em dois aspectos principais: a biodiversidade, incluindo o isolamento, a identificação e a quantificação dos microrganismos; e a atividade microbiana que os microrganismos têm em seu *habitat*. Sabendo-se que há competição entre microrganismos por recursos disponíveis e que tal disputa pode ser intensa, o resultado dessa interação competitiva depende da taxa de incorporação de nutrientes, das taxas metabólicas inerentes e, em última instância, da velocidade de crescimento. Em decorrência, torna-se importante estudar a ecologia microbiana nas unidades produtoras de vinagre, almejando melhor condução do processo fermentativo para obter produtividade maior (Madigan et al., 1997).

O Brasil conta com um parque industrial de produção de vinagre por processo submerso composto por 60 unidades. Entre as mais significativas em termos de produção, duas são de grande porte, com 30.000 m³/ano; há seis unidades de médio porte, que, juntas, produzem 72.000 m³/ano; e existem 37 fábricas de pequeno porte, produzindo, ao todo, 28.000 m³/ano¹. No Estado do Rio Grande do Sul estão localizadas aproximadamente 90% dessas indústrias². Segundo dados da União Brasileira de Vitivinicultura - UVIBRA, localizada naquele Estado, a produção nacional de vinagre de vinho nos anos de 1999, 2000 e 2001 foi respectivamente de 2.426.530, 6.654.097 e 1.767.848 L. No ano de 2001, a produção de Agrin foi de 7.169.864 L. Entretanto, outras fontes indicam que a produção deve alcançar 130.000 m³/ano de vinagre 'duplo', com concentração de 10% em ácido acético³. O consumo brasileiro *per capita* situa-se em 2 L/ano⁴.

O vinagre, dependendo de sua matéria-prima, apresenta diferente composição em ácidos orgânicos secundários e sabor. O padrão de identidade e qualidade do vinagre no Brasil é regulamentado pelo Ministério da Agricultura. Em meados da década de 1990, após extensas discussões com o Ministério sobre a regulamentação do produto no mercado e também com as negociações do Brasil para a viabilização do Mercosul, os produtores de vinagre, por meio de sua associação, registraram a marca Agrin para o produto da fermentação acética que misturava álcool de cana, vinho e açúcar. Tal produto, até então comercializado como 'vinagre', já tinha sabor fixado pelo consumidor brasileiro, havendo, entretanto, a necessidade de divulgar e comercializar a informação correta, isto é, a de que não se tratava propriamente de vinagre, pois não havia procedência exclusiva do vinho.

As empresas passaram então a voltar-se para a descoberta da verdadeira origem da matéria-prima de produção do vinagre, algo que exige análises laboratoriais

¹ Dados obtidos por meio de consulta à empresa Carnevalli Biotecnologia Ltda., em março de 2002.

² Informação obtida junto a ANAVI, março de 2002.

³ Informação obtida junto a Vinagre Castelo Ltda., março de 2002.

⁴ Informação obtida junto à empresa Frings Microdyn do Brasil, em março de 2002.

dispendiosas e complexas ainda não realizadas rotineiramente no Brasil. Estudos nessa direção estão sendo desenvolvidos para determinação da origem da matéria-prima por técnicas de isótopos do carbono.

A partir de 1999, através de instrução normativa, a Secretaria de Defesa Agropecuária, ligada ao Ministério da Agricultura e Abastecimento, aprovou regulamento técnico que fixa padrões de identidade e qualidade para fermentados acéticos. Tais fermentados são definidos como o produto obtido a partir da fermentação acética do fermentado alcóolico de mosto de frutas, cereais ou de outros vegetais, de mel, de mistura de vegetais, ou ainda da mistura hidroalcóolica. Devem apresentar acidez volátil mínima de 4 g/100 mL, expressa em ácido acético, podendo-se adicionar vegetais, partes de vegetais ou extratos aromáticos ou de sucos, aromas naturais ou condimentos. A classificação e designação do produto serão dadas de acordo com a origem da matéria-prima.

Levando-se em conta o panorama posto há pouco, a proposta e os encaminhamentos dados à presente pesquisa estão dispostos a seguir. Partiu-se do isolamento de microrganismos nas unidades produtoras de vinagre no Estado de São Paulo. Ao todo foram isoladas 98 linhagens e 70 foram selecionadas em rápida identificação fenotípica como pertencentes ao gênero *Acetobacter*. Essas coletas foram executadas no período compreendido entre 1998 e 2001, em três diferentes indústrias vinagreira e três diferentes laboratórios de pesquisa. O material coletado foi preservado em condições tais que ao final de dois anos a recuperação celular média foi de 75% para linhagens armazenadas com extrato de malte 20% a -80°C. No desenvolvimento desse processo, chegou-se à significativa adaptação em técnica de contagem de células viáveis de bactérias acéticas e testes rápidos para contagem usando membrana filtrante. Do material isolado, avaliaram-se as características de crescimento e a morfologia celular. A identificação de bactérias foi feita por série bioquímica, triando-se as linhagens capazes de oxidar o etanol e estudando-se o seu potencial fermentativo através de parâmetros cinéticos. Além do uso da análise molecular pela técnica de *RAPD-PCR*, para comparar a população das bactérias

acéticas das unidades produtoras de vinagre, os isolados purificados foram armazenados a -80°C ou -196°C e posteriormente usados para preparo de inóculo e em fermentação de escala piloto.

Cabe lembrar o considerável progresso conseguido pelo Japão na recuperação da bactéria do fermentador em ágar de dupla camada, além dos trabalhos de cultivo e preservação da bactéria desenvolvidos na Alemanha, por um grupo de pesquisa da Universität Hohenheim, em Stuttgart. Retomando essa experiência e tendo como ponto de partida o caminho percorrido por Sokollek et al. (1997, 1998a), tal como se disse antes, trabalhou-se com a hipótese de se conseguir selecionar linhagens a partir das condições de indústria, que requeiram menores quantias de nutrientes, não superoxidem o ácido acético formado, tolerem concentrações maiores de etanol e tenham melhores taxas de produção.

Frise-se a dificuldade de operar com microrganismos acéticos provenientes das unidades produtoras, dada a sua alta sensibilidade e conseqüente fragilidade, condições estas que poderiam ser mais facilmente equacionadas conduzindo-se o processo apenas em ambientes laboratoriais. A fermentação acética é importante não só na produção de vinagre mas também na utilização do microrganismo para obtenção de produtos de valor comercial, como o ácido acético, que tem relevância na indústria química e alimentícia. Isso contribuiu também para nortear esse trabalho, que tem como um dos seus objetivos contribuir para o desenvolvimento desse processo biotecnológico, por intermédio do estudo do isolamento, purificação, identificação, preservação, desenvolvimento de técnica microbiológica de enumeração e teste em escala piloto com linhagens selecionadas em unidades produtoras de vinagre no Estado de São Paulo. Pretende-se contribuir para melhorar as condições de manipulação dos inóculos na situação de produção, algo que pode melhorar técnica e produtividade.

Em suma, os objetivos gerais e específicos do trabalho são os seguintes:

Objetivos gerais

- a) Contribuir para o desenvolvimento de condições que viabilizem a identificação e estocagem de melhores linhagens para cada situação industrial, utilizadas para reinício do processo fermentativo, após situações adversas tais como: queda de energia, quebra de equipamento ou bacteriófagos, provocadoras da perda das condições ótimas de produção;
- b) Estreitar os vínculos entre a pesquisa acadêmica e a atividade industrial, preservando-se as características inerentes a cada um desses universos;
- c) Consolidar núcleo de pesquisa e disseminar conhecimentos relativos a uma área ainda pouco estudada no país.

Objetivos específicos

- a) Definição de uma técnica de isolamento de bactérias acéticas em reatores de fermentação submersa em indústrias vinagreiras do Estado de São Paulo, levando-se em conta a necessidade de recuperação quantitativa da população de microrganismos no momento da coleta;
- b) Levantamento, na literatura disponível, de meios de cultura para o isolamento de bactérias acéticas, tendo como propósito a escolha de um que possa isolar o maior número possível de microrganismos;
- c) Identificação dos gêneros da família *Acetobacteraceae* nas linhagens isoladas;
- d) Caracterização bioquímica das bactérias isoladas e identificadas como membros do gênero *Acetobacter*;

- e) Teste de crioprotetores para armazenamento das linhagens isoladas, a fim de se obter a maior taxa possível de recuperação da viabilidade celular;
- f) Definição de um procedimento para preservar linhagens isoladas de reatores de fermentação submersa em indústrias vinagreiras, levando-se em conta a necessidade de manter as linhagens de cada unidade produtora;
- g) Definição de um procedimento para preparo de inóculo em escala laboratório e piloto que possa servir como cultura iniciadora;
- h) Busca de um método apropriado às condições industriais, para a quantificação da população de bactérias, a partir da comparação entre os métodos estabelecidos na literatura especializada;
- i) Definição de critérios para a seleção das linhagens mais apropriadas, para a conversão de etanol em ácido acético em condições industriais, a partir do universo de microrganismos obtidos nas etapas anteriores;
- j) Estudo do comportamento cinético das linhagens selecionadas em acetador piloto Frings.

Esta pesquisa dá continuidade ao trabalho desenvolvido desde 1995 pelo laboratório do Centro de Pesquisa em Ciências (Cepec), da Fundação Educacional de Assis (FEMA). São os seguintes os projetos na área já concluídos ou em execução: 1) Utilização do Amido da Quirera de Arroz na Produção de Vinagre (dissertação apresentada em 1996 ao curso de Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos, por Wilma Aparecida Spinosa, sob orientação do professor doutor Raul J. H. Castro Gomez); 2) Estudo de Bactérias Acéticas:

Isolamento, Purificação, Rápida Identificação Fenotípica e Armazenamento (projeto de iniciação científica, PIBIC – CNPq, apresentado por Vitório dos Santos Júnior, sob orientação do professor doutor Pedro de Oliva Neto e co-orientação de Wilma Aparecida Spinosa, durante os anos de 1999 e 2000); 3) Estudo do Perfil Fermentativo de Bactérias Acéticas Isoladas de Unidades Produtoras de Vinagre do Estado de São Paulo (projeto de iniciação científica, apoiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, desenvolvido por Estêvão Zilioli, sob orientação do professor doutor Pedro de Oliva Neto e co-orientação de Wilma Aparecida Spinosa, durante os anos de 2001 e renovado em 2002); 4) Estudo da otimização da fermentação acética submersa (parte experimental do projeto de mestrado de Vitório dos Santos Júnior, sob orientação do professor doutor Fumio Yokoya).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos da Produção de Vinagre

2.1.1 História do Vinagre

Em 1992, Swings apresentou o seguinte relato histórico acerca do vinagre. No passado, a fabricação de vinho e vinagre era vista de forma associada. Em 4000 a.C. o vinagre foi mencionado em escritos babilônicos como um produto da palmeira de tâmara, cultura então desenvolvida. Em 1927, Huber descreveu detalhadamente a história e o papel na preparação de vinho e vinagres na Babilônia. “Frutas doces” ou xaropes açucarados feitos de figo, damasco, uvas e tâmaras eram usados na culinária e no preparo de vinho. Dois tipos de vinho de tâmara eram preparados, um da seiva da palmeira de tâmaras e outro, da fruta madura. Quando o processo de fabricação do vinho era finalizado, o extrato de tâmara junto com seus caroços eram usados para fazer bebida composta de uma mistura de vinagre e limão. Vinagre era também o subproduto indesejável da fermentação de cerveja. Originalmente (4.000 – 3.000 a.C.), cerveja, vinho e vinagre eram manufaturados, mais tarde (3000 – 2000 a.C.) passaram a ser preparados em fermentadores. Para obter altos teores alcóolicos, os fermentadores babilônios e assírios misturavam cevada e tâmara para iniciar a fermentação. Vinho e vinagre de uvas passas também tornaram-se muito populares na Babilônia, aproximadamente em 1000 a.C..

Na culinária babilônica era comum acrescentar ervas e especiarias no vinagre, tais como estragão, lavanda, menta, aipo e açafrão. A dieta cotidiana era vegetariana e o vinagre usado como tempero, juntamente com sal, pimenta e óleo de gergelim, em saladas de vegetais crus e como molho em lentilhas, feijão, pêra ou mingau de milho. Com o clima quente, os babilônicos usavam também o vinagre como agente para conserva de peixe, carne e vegetais (como brotos de palma, funcho, estragão, erva-doce e pepino, além de frutas, como melão, pêssego, damasco, maçãs e pêras). Mel era também acrescentado. Na

antigüidade, vinagre era uma bebida para pessoas pobres: camponeses, soldados e viajantes. Vinho e cerveja eram bebidos em casa durante as refeições e nas festividades.

Existe bastante informação sobre processo de preparo do vinagre na antiga Roma, bem como sobre os usos desse produto como condimento e conservante, além de sua utilização na medicina. A formação do vinagre ocorre espontaneamente como defeito durante a fabricação do vinho. Na Grécia, a produção e o comércio tornaram-se importantes a partir do século 8 a.C.. Os romanos aprenderam com os gregos sobre o crescimento das videiras e fabricação de vinho, tópicos tratados por autores romanos no referente à agricultura, como Cato, Varro e Columella. As uvas eram colhidas em setembro, esmagadas com os pés descalços e em prensa. O suco (*mustum*) era fermentado em imensos jarros abertos por aproximadamente 10 dias, depois fechados hermeticamente. Os romanos tentavam manter o suco adocicado (*uinum lixiuum*) com provavelmente baixo teor de álcool. Os jarros eram imersos em água fria para retardar a fermentação até o verão seguinte. Uma segunda classe de vinho era obtida de *mustum circumcisiuum* (ou *mustum tortium*): a polpa da uva exaurida com uma faca pontiaguda era acrescentada a um volume de uvas já prensadas. O conjunto era prensado uma segunda vez (André, citado por Swings, 1992). O vinho destinado aos servos, *lora* (*iunum acinaticium*), podia ser armazenado por três meses. Seu preparo se dava com restos da polpa exaurida misturados com água, havendo então nova prensagem. Os vinhos altamente açucarados e alcóolicos eram bem conhecidos pelos romanos. Os principais eram o tipo moscatel (*passum*) e um outro preparado pela fervura, concentrado e conservado (*sapa, defrutum, caroenum*). Os melhores vinhos eram aqueles conservados entre 5 e 15 anos após a vindima. Os vinhos romanos eram caracterizados por seus aditivos, provavelmente usados para refinamento ou para impedir deterioração do aroma. De acordo com o escritor romano Plinius, os vinhos podem sofrer dois tipos de defeito: viscosidade e formação de vinagre (André, citado por Swings, 1992).

Em Roma, a boa cozinha era uma arte para os ricos, que avidamente aceitaram a culinária herdada dos gregos. Uma das principais características do sabor clássico latino é a preferência pela combinação azedo-adocicada (mel e vinagre) semelhante à encontrada nas especialidades chinesas (André, citado por Swings, 1992). Vegetais não cozidos eram comidos com uma variedade do molho francês (*vinaigrette*). Os seguintes tipos de vinagre eram conhecidos: *acetum piperatum*, contendo pimenta; *oximeli*, feito pela fervura do vinagre, mel, água e sal; e *oxisporium*, vinagre contendo especiarias (André, citado por Swings, 1992).

Plinius recomendava tomar vinagre para o tratamento de náusea, soluço, lepra, sardas, úlceras, mordida de cão, ferroadada de escorpião e centopéia, além de picadas de outros insetos venenosos. Receitava-se injeção retal do líquido para conter a diarreia (citado por Swings, 1992).

A manufatura e consumo de vinagre e de outros produtos derivados do ácido acético estão fartamente registrados em momentos mais recentes da História. Anotações feitas na Grã-Bretanha e na França, por exemplo, mostram atividade familiar sistemática e, mais tarde, industrial, desde o século XVII, embora indiquem que tal atividade é bastante anterior a isso na região. A popularização do vinagre chegava ao ponto de ser utilizado de maneiras e com propósitos diferentes de acordo com a região. Em receita familiar originária da França, um composto preparado com vinagre servia tanto para atenuar machucados provocados por mordida de cachorro como, sob a forma de banhos, para curar a melancolia (Mitchell, 1926).

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 alcóolica 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; e o da natureza biológica da produção do vinagre.

2.1.2 Métodos de produção de vinagre

Existem três principais processos de conversão microbiológica de uma solução diluída de etanol em vinagre.

2.1.2.1 Processo Lento, Orleans ou Francês

É o processo mais antigo, observado a partir do avinagramento do vinho colocado em barricas semi-cheias. Com o tempo, modificações passaram a ser feitas, com o objetivo de acetificar mais rapidamente e em maior quantidade o processo fermentativo. Percebeu-se a relação entre área e volume no processo. Daí o deitamento das barricas, que passaram a receber vinho ou cidra em quantidade inferior à capacidade dos recipientes, melhorando a relação de área-volume. Orifícios foram feitos nos recipientes, protegidos de insetos, facilitando e aumentando a circulação de ar. Tábuas foram utilizadas na superfície do mosto e, posteriormente, um quadriculado com ripa de madeira apropriada, com a finalidade de sustentar as bactérias oxidativas, juntamente com o polímero α -celulose que elas próprias produzem a partir de resíduos de açúcar contidos no vinho. Este polímero, tecnicamente denominado de zoogléia e chamado de “mãe do vinagre”, deve estar posicionado na superfície do meio em acetificação, pois, em caso de afundamento, atrasa o processo por dificultar o contato do oxigênio com o microrganismo e também a retirada do produto. Uma torneira ou sifão foi colocada abaixo da zoogléia, para tornar possível a retirada de vinagre e ainda a adição do mosto, sem perturbar a película bacteriana. Retiradas de vinagre e adição de vinho são realizadas em quantidades e períodos de tempo ajustados, a fim de que o processo se torne semi-contínuo (Aquarone & Zancanaro, 1990; Zancanaro, 1988; Moretto et al., 1988; Spinosa, 1996).

O vinagre produzido por este método tem qualidade considerada superior à do obtido por outros meios, isto porque ocorre o amadurecimento natural no vinagre, antes de sua retirada. Esse amadurecimento reduz o sabor picante, próprio dos vinagres recém produzidos, tornando o líquido mais suave e, conseqüentemente, mais agradável (Zancanaro, 1988; Spinosa, 1996).

O envelhecimento permite a lentidão das transformações químicas, transformando resíduos de acetaldeído, etanol, ácido acético e outros, produzindo ésteres e hemi-acetais, de sabores e odores mais agradáveis. Tem-se também um mascaramento da acidez em função do efeito tampão, devido às proteínas, aminoácidos e sais minerais (Aquarone & Zancanaro, 1990; Spinosa, 1996).

2.1.2.2 Processo rápido ou alemão

Também chamado de *Schützenback*, *Boerhave*, este método surgiu na Alemanha, no início do século XIX, tornando-se até meados do século XX o principal processo para a produção industrial de vinagre. Originou-se a partir da observação da importância da aeração no processo lento (Moretto et al., 1988; Spinosa, 1996).

O sistema de produção por meio de gerador é talvez o mais comum, em se falando do processo rápido. O gerador, sob a forma de um tanque cilíndrico, apresenta três partes: a seção superior; seção maior (a do meio), que é preenchida com aparas de madeira, sabugos de milho ou outro material propício à formação de grande área de exposição; e seção inferior (Moretto et al., 1988; Spinosa, 1996).

O líquido a passar pelo processo de avinagramento é colocado na parte superior, por meio de um alimentador ou por dispositivo borrifador. O líquido passa à parte central, por meio de gotejamento, onde ocorrerá a oxidação do álcool a ácido acético. O líquido depara-se com filme de bactérias acéticas, desenvolvido no material de suporte. Da

parte central, mais uma vez por gotejamento, o líquido passa à parte inferior, já como vinagre, de onde é coletado (Moretto et al., 1988; Spinosa, 1996).

O ar entra no gerador por meio de orifícios situados no fundo falso da seção mediana. Esquentando, esse ar sobe e é aspirado por cima. Uma vez que o processo de oxidação libera calor em quantidade considerável, há necessidade de controle de temperatura, para que ela não supere o limite de 30°C. Isso é conseguido por meio de serpentinas resfriadoras, pelo ajustamento do fluxo de ar e da entrada do líquido acetificado, e por resfriamento da matéria-prima antes da sua introdução no gerador. Outra possibilidade é a refrigeração do líquido parcialmente acetificado, que retorna do fundo para o topo do gerador, para acetificação complementar (Moretto et al., 1988).

Antes de entrar em atividade, um novo gerador deve receber vinagre, com bactérias acetificantes, em sua parte mediana. Estas serão responsáveis pela inoculação dos microrganismos desejados no material de suporte. As bactérias acetificantes podem ainda circular através do gerador (Moretto et al., 1988).

Alguns produtores acetificam todo o líquido alcóolico com vinagre antes de introduzi-lo no gerador. Podem ainda deixar certa quantidade do vinagre já localizado na parte inferior do gerador, acetificando o novo lote de matéria-prima por meio de sistema de re-circulação (Moretto et al., 1988; Spinosa, 1996).

Utilizado em escala industrial, o processo alemão é desenvolvido em dornas de até 100.000 litros. Desse volume, circula pelo gerador 10% de líquido a ser acetificado. Tal processo leva em geral 10 dias para que se possa retirar 10% do volume colocado inicialmente para avinagramento. Em outras palavras, em 10 dias é possível retirar, em vinagre, 1% do volume total do recipiente utilizado para o processo (Zancanaro, 1988; Spinosa, 1996).

O processo alemão apresenta inconvenientes. Está sujeito a gravíssimas infestações por insetos e moscas, como a *Drosophyla melanogaster*, ou por nematóides, como a *Anguilhulla aceti*. Isso acaba forçando a desativação total do recipiente, obrigando o produtor a esterilizar todo o meio de enchimento, por vapor ou assepsia com etanol. É também freqüente o entupimento total dos locais de passagem do mosto e do ar, em virtude do crescimento incontrolável de bactérias acéticas indesejáveis (*Acetobacter xilynum*), produzindo excessiva quantidade de zoogléia sobre a superfície do material. Neste caso, existe a necessidade anual de substituição de todo o material. O processo depende ainda de potentes bombas ácido-resistentes, de cuidados para se evitar ressecamento da madeira, entre outros. Exige-se também a utilização de enormes galpões. As dificuldades para a manutenção de tal processo fazem com que ele só esteja ainda em uso graças ao alto custo para se efetuar mudança de tecnologia (Zancanaro, 1988; Spinosa, 1996).

2.1.2.3 Processo submerso

Por este processo, 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 da administração contínua e adequada 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..., 1996; Spinosa, 1996).

O equipamento mais utilizado para a produção de vinagre em cultura submersa é conhecido como Acetador *Frings*, patenteado por Heinrich Frings, a partir de conclusões desenvolvidas por Otto Hromatka e Heinrich Ebner, em 1949, quando estes trabalhavam na referida empresa.

A matéria-prima diluída e corrigida em seus nutrientes é colocada no fermentador e inoculada com vinagre forte ou com uma suspensão de bactérias acéticas. O equipamento é automatizado, contendo um alcóografo responsável pelo registro contínuo do teor alcóolico 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 e deixado no tanque. A partir daí, a cada 24 horas, um volume de vinagre correspondente a $\frac{1}{4}$ do valor total do tanque é retirado, obtendo-se aumento de acidez da ordem de 4% ao dia (Aquarone & Zancanaro, 1990; Spinosa, 1996).

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 (Zancanaro, 1988; Spinosa, 1996).

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 alcóolica. 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 alcóolica em vinagre (Frings..., 1996; Spinosa, 1996).

Diversos métodos de acetificação submersa foram patenteados nos últimos tempos, mas o 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. Existem aproximadamente 560 aparelhos Acetadores operando com sistema de fermentação submersa⁵.

2.1.2.4 Comparação entre os processos

Existem ainda outros processos para a fabricação do vinagre, tais como o processo por gerador de mergulho, processo *Mackin*, processo *Bourgeois*, processo *Fardon* ou o de Gerador por sifonagem. Entretanto, os três processos básicos comentados anteriormente dão a dimensão histórica da produção do vinagre em escala semi-industrial e industrial. São também eles os processos que melhor confirmam a evolução da tecnologia a partir do componente fundamental para a produção do vinagre: a atuação do oxigênio como fator limitante do processo de acetificação (Aquarone & Zancanaro, 1990; Spinosa, 1996).

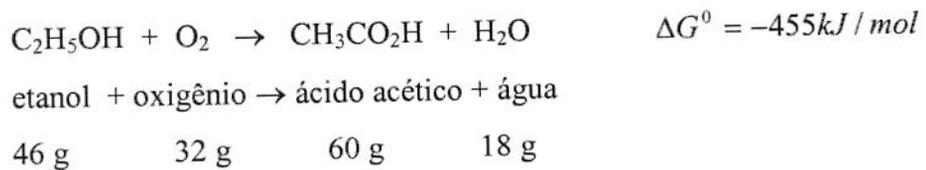
Os três processos descritos oferecem vinagres de boa qualidade, desde que a matéria-prima, os microrganismos e as condições de fermentação sejam adequados. Os fatores que podem definir a opção por um ou outro processo são, como já mencionamos, o custo de cada um, os potenciais problemas advindos com a utilização de um determinado processo e, por fim, a produtividade. Em uma área ocupada de 30 metros quadrados, os processos são responsáveis pela produção de 30.000 litros/dia (Submerso); 1.000 litros/dia (Rápido); e 50 litros/dia (Lento) (Aquarone & Zancanaro, 1990; Spinosa, 1996).

2.2 Fermentação Acética

⁵ Informação obtida junto a Frings Microdyn do Brasil, em dezembro de 2001.

Em microbiologia industrial, o termo *fermentação* se refere a qualquer processo microbiano em grande escala, seja ele ou não bioquimicamente uma fermentação. De fato, a maioria das fermentações industriais são aeróbicas. O tanque em que ocorre a fermentação é chamado de fermentador e o microrganismo utilizado é o agente de fermentação (Madigan et al., 1997).

A fermentação acética refere-se a um processo envolvendo a oxidação para formação do etanol pelo consumo de O₂, ocorrendo a liberação de grandes quantidades de energia. A oxidação segue de acordo com a equação básica:



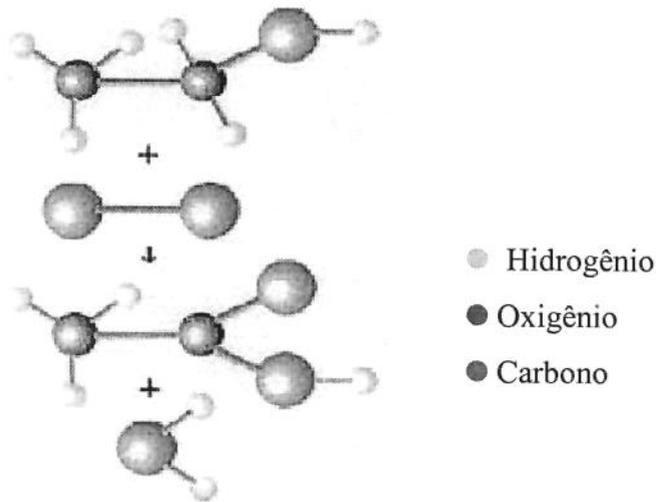


Figura 1. Representação de reação de oxidação do etanol a ácido acético

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, 1985).

A solução contendo álcool no processo industrial é chamada de calda. O quociente entre a "concentração total" do vinagre produzido e a "concentração total" da calda dá o rendimento da concentração (*Y*). Já o quociente entre a concentração de ácido acético do vinagre produzido e a "concentração total" da calda dá o rendimento em ácido (*Y* ácido) (Ebner, 1983; Ebner & Follmann, 1983).

A oxidação do etanol formando ácido acético é uma reação exotérmica que necessita de oxigênio e produz 117 kcal por mol de etanol oxidado e 0,56 kg de ácido acético por m³ de ar (Frings..., 1996).

Em fermentações para produção de vinagre consideradas satisfatórias, a oxidação do etanol atinge rendimento da concentração (*Y*) entre 95 e 98%, onde as perdas são provocadas por evaporação. A oxidação do etanol a ácido acético não depende inteiramente da multiplicação celular. Após o crescimento celular, quando uma alta concentração de ácido acético é alcançada, as células são capazes de oxidar etanol a ácido por certo tempo. Depois desse período as células morrem rapidamente e a oxidação cessa (Ebner & Follmann, 1983).

Na produção de vinagre com teores de 12 a 15% em ácido acético o processo mais usado é o chamado processo fermentativo semi-contínuo, operando em ciclos. Esse processo consiste em iniciar o ciclo com uma concentração total (CT) variando de 12 a 15%, isto é, de 7 a 10% em ácido acético e aproximadamente 5% em etanol. Quando a concentração de etanol atinge valor entre 0,05 a 0,3% retira-se certo volume de líquido fermentado e adiciona-se novo volume ao meio. A retirada do vinagre deve acontecer o mais rapidamente possível, para evitar diminuição significativa do álcool. A alimentação do fermentador deve ser lenta, em condições controladas e constantes de temperatura com rápida mistura (Adams, 1985; Borzani et al., 1988; Ebner et al., 1996).

O processo semi-contínuo em dois estágios foi usado inicialmente em 1978 na Alemanha para produção de vinagre com teor em ácido acético superior a 15%. Esse processo consiste em fermentação submersa por meio de cortes, que opera do seguinte modo: inicia-se o trabalho com um fermentador com concentração total menor que 15%. O álcool é então acrescentado até atingir concentração total próxima de 18,5%. Quando o teor de ácido atingir 15%, $\frac{1}{3}$ do volume total é transferido para um segundo fermentador. O primeiro é re-alimentado com nova calda de baixa concentração total. No segundo reator, a

fermentação é conduzida até o teor alcóolico quase se esgotar. A quantidade total de vinagre produzido é descarregada. É acrescentado álcool ao primeiro reator, controlando-se a velocidade de alimentação e novamente esse reator será cortado para outro fermentador (Borzani et al., 1988; Ebner et al., 1996).

Ghommidh et al. (1986) relataram que nenhuma outra técnica nos últimos 50 anos foi capaz de substituir a da fermentação submersa para a produção de vinagre. A fermentação acética submersa semi-contínua usando o sistema Frings oferece vantagens tais como taxas de rendimento de 90 a 95% do teórico e altas concentrações em ácido acético. A desvantagem é a produtividade baixa, em torno de 1,5 g de ácido acético/L * h, o que é explicado pela baixa taxa de oxigênio (0,8 g/L * h) obtida com a aeração (<0,1 vvm), limitada pela alta taxa de evaporação do etanol. Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com células imobilizadas tentando contornar esse problema. O resultado obtido leva à conclusão de que é possível projetar um sistema de produção contínua de vinagre. A eficiência na transferência de oxigênio pode ser contornada com altas taxas de aeração, enriquecendo o ar com oxigênio e reciclando o gás, aumentando assim a produtividade, porém o aumento da concentração em ácido acético não foi possível.

Outros estudos com células imobilizadas são encontrados na literatura. Osuga et al. (1984) imobilizaram *Acetobacter aceti* em gel de κ -carragena e em fermentação contínua. Obtiveram taxa máxima de 40 mg/mL * h de ácido acético. As partículas imobilizadas continham 10^7 UFC/mL. Atinou et al. (1988) compararam a performance de vários suportes para imobilização em reatores gotejantes e em contínuos obtendo aumento na produtividade do ácido acético com os reatores contínuos.

Moraes (1991) expôs as vantagens da utilização de células imobilizadas em processos fermentativos. Concluiu, em estudo da oxidação de etanol a ácido acético por células de *Acetobacter* livres e imobilizadas, que, no sistema avaliado envolvendo células imobilizadas, a produção foi resultante das contribuições do microrganismo tanto livre como

imobilizado. A matriz κ -carragena para imobilização de células de *Acetobacter aceti* CCT 1724 foi adequada. A fermentação acética com células imobilizadas em géis hidrofílicos pode ser conduzida em biorreator de leito fluidizado trifásico não convencional.

A evaporação de compostos voláteis durante a fermentação acética é uma das principais causas da redução no rendimento da concentração (Y) em escala industrial. A perda por evaporação de etanol na indústria chega a ser de 10 a 30% do rendimento estequiométrico, dependendo da temperatura de trabalho. As quantidades de ácido acético evaporado durante o processo de fermentação são mínimas em comparação aos teores presentes na fase líquida, porém, com o etanol, o fenômeno de evaporação é de real significação econômica. Em estudo de modelagem matemática do equilíbrio líquido-gás na fermentação acética em sistema aberto, semi-aberto e fechado, concluiu-se que esse último é mais apropriado para indústria, pois apresenta menor perda por evaporação (Romero & Cantero, 1998).

Ory et al. (1998) desenvolveram um sistema experimental para determinar a influência da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento de *Acetobacter*. Para tal, modelaram a cinética de crescimento de *Acetobacter aceti* em cultivo descontínuo e concluíram que próximo de 8°C não há nenhum crescimento. Ao redor de 35°C, o crescimento é totalmente inibido e a 30,9°C, de acordo com a equação obtida, a temperatura é ótima e maximiza a velocidade específica de crescimento.

Com o objetivo de produzir vinagre com alta concentração de ácido acético, Ito et al. (citados por Berraud, 2000) sugeriram operar uma batelada alimentada com dois fermentadores. No momento em que a população de viáveis atinge valor máximo, uma fração do meio é transferida para o segundo reator e os fermentadores são alimentados continuamente com calda de baixa concentração em etanol (20 a 30 gL⁻¹). Ambos os fermentadores continuam seus ciclos e os inóculos em cada um tem um máximo de células viáveis. Berraud (2000) apresentou os resultados do estudo em que produziu vinagre com

alta concentração em reator de batelada alimentada. O teor de ácido acético obtido foi de 170 g L⁻¹. A *Acetobacter* cresceu até o limite de 120 g de ácido acético L⁻¹.

2.3 Medição do Crescimento Celular

O crescimento celular é avaliado pelo monitoramento das modificações no número de células ou no peso da biomassa celular de uma população. Existem diversos métodos para contar o número de células ou para obter a massa celular e a escolha de um deles depende das características do microrganismo.

O desenvolvimento de técnicas rápidas na determinação de microrganismos presentes e viáveis na produção de alimentos é de suma importância para a indústria alimentícia. A detecção de microrganismos em tempo real possibilita monitorar a dinâmica microbiana de processos fermentativos.

Algumas considerações sobre os princípios básicos das técnicas usadas para enumeração ou medida de crescimento celular para as bactérias são descritas a seguir.

2.3.1 Contagem Total de Células

O número de células de uma população pode ser avaliado diretamente no microscópio, em processo conhecido como contagem direta. As amostras líquidas requerem câmaras especiais para contagem. De modo geral, essas câmaras têm sua superfície quadriculada e em cima coloca-se um volume conhecido de amostra. O número de células por unidade de área do quadriculado é contado diretamente no microscópio, sendo possível obter-se o número de células por unidade de volume de suspensão, conhecendo-se as dimensões da câmara (Madigan et al., 1997).

Diversas câmaras ou hemocitômetros são usados para a contagem. A Câmara de *Neubauer* é considerada um método razoável para avaliação do crescimento celular, podendo ser aplicado para leveduras, bactérias e até mesmo para contagem de esporos de fungos. O uso de câmaras de contagem especiais constituídas de uma lâmina com divisões e sub-divisões, provida de uma lamínula especial com peso, espessura e tamanho definido, possibilita que o volume de suspensão de células contido no espaço entre a lâmina e a lamínula seja conhecido (Rosales, s.d.).

A contagem direta em microscópio é uma maneira rápida para avaliar o número de células microbianas. No entanto, apresenta uma série de limitações, como, por exemplo, as células mortas não são distinguidas das células vivas, as células pequenas são de difícil visualização e algumas provavelmente não são contadas. É necessária habilidade e tempo para conseguir precisão por esse método e para amostras não coradas requer-se um microscópio de contraste de fase. A técnica não é adequada para suspensão de células pouco densas. Para suspensões bacterianas com concentração de células menor que 10^6 células/mL encontram-se poucas células no campo do microscópio (Madigan et al., 1997).

A vantagem com a contagem direta de bactérias é que a visualização pelo microscópio permite observar a morfologia das células estudadas, possibilitando-se observar morfologias não características ou aberrantes, indicadoras de condições de crescimento não ideais ou a presença de células com alterações fenotípicas ou genotípicas (Becker et al., 1990).

2.3.2 Contagem de Viáveis

No método de contagem total de células por microscópio, não se distinguem as vivas das mortas. Na prática, o interesse é somente nas células vivas e para quantificá-las desenvolveram-se métodos de contagem de viáveis. Uma célula viável define-se como a que é capaz de se dividir para dar lugar à descendência. A forma habitual de se proceder a

contagem desse tipo é determinar o número de células capazes de gerar colônias sobre a superfície de meio sólido. Esse método é chamado também de contagem em placa ou contagem de colônias. No método de semeadura em superfície, um volume de 0,1 mL da amostra, na diluição adequada, é espalhado por toda a superfície do meio na placa, utilizando-se um bastão de vidro dobrado conhecido como alça de *Drigalski*, estéril. É importante que a superfície esteja bem seca de modo que o líquido seja rapidamente aderido ao meio (Madigan et al., 1997). Esse método é usado para microrganismos aeróbicos.

2.3.3 Medidas de Turbidez

Um método rápido e útil para ter-se o número de células é a medida de turbidez. Uma suspensão celular aparece turva porque as células dispersam a luz através da suspensão. Quanto mais células, mais luz se dispersa e mais turva aparece a suspensão. A turbidez pode ser medida com um espectrofotômetro e o resultado é expresso em unidades de densidade ótica (DO). Para organismos unicelulares, as unidades fotométricas são proporcionais, dentro de certos limites, à massa celular e também ao número de células. Ao usar a turbidez como método de contagem, deve-se realizar uma curva padrão que relacione medidas diretas com a medida indireta da turbidez. Em elevadas concentrações celulares, perde-se a linearidade da correspondência do número das células. Porém, dentro de certos limites, as medidas de turbidez podem ser razoavelmente precisas e além disso são rápidas e fáceis. Permitem o monitoramento do crescimento de cultivos microbianos e a construção de gráficos semi-logarítmicos para calcular tempo de geração (Madigan et al., 1997).

Medidas de turbidez são usadas em análises preliminares de amostras de alimentos e bebidas fermentadas. A sensibilidade do método é dada em torno de 10^2 UFC/mL. Essa metodologia apresenta problemas ao ser usada em alimentos pelo fato de determinadas amostras já apresentarem alta turbidez, com a possibilidade de não se apresentarem homogêneas (Vanne et. al., 1996).

Dalgaard et al. (1994) calcularam a relação da velocidade específica de crescimento máximo (μ_{\max}) por medida de turbidez e contagem de viáveis, para diversas espécies bacterianas. Dois métodos para estimar o valor de μ_{\max} por medida de turbidez foram conduzidos, um por absorvância e outro por transmitância. Ambos os valores de μ_{\max} foram comparados com o obtido pelo método de contagem de viáveis. Concluíram que medidas de turbidez podem ser usadas com segurança para determinar o valor de μ_{\max} .

2.3.4 Número Mais Provável (NMP)

O número mais provável (NMP) tem sido usado como metodologia para enumeração de microrganismos há muitos anos. Desde meados do século XIX, quando a técnica foi desenvolvida, tem sido aplicada para enumerar coliformes em alimentos e em água potável. O método consiste em repicar a várias diluições a amostra no caldo de crescimento, depois incubar em condições de tempo e temperatura adequados. O intrincado cálculo usado para representar o NMP de organismos viáveis no inóculo é apresentado na forma de tabelas. Da combinação de resultados positivos e negativos e usando tabelas estatísticas com base na teoria da probabilidade, é possível calcular o número mais provável de células na alíquota da amostra original. A precisão da técnica assume duas hipóteses. A primeira, de que há uma distribuição homogênea das células na amostra; a segunda, que todas as células viáveis podem crescer nas condições em que são conduzidos os testes. A precisão da estimativa da presença bacteriana determinada pela técnica do NMP tem sido baixa. Alguns autores reportam que o NMP pode dar estimativa maior da população microbiana do que, por exemplo, a contagem em placas. Afirmam também que a ordem da precisão da técnica aumenta com o aumento do número de diluições e repetições por diluição (González, 1996; Harris et al., 1998).

Segundo o manual de bacteriologia do *Food and Drug Administration* - FDA (Food..., 1989), o NMP estima a densidade populacional de organismos viáveis em uma

amostra. Para se obter essa estimativa, a amostra deve ser diluída de modo tal que o resultado apresente poucos tubos positivos, o que é indicado pela formação de gás ou por crescimento microbiano. Para altas densidades populacionais, o NMP é menos preciso que a contagem direta em placas. O cálculo do valor do NMP é uma estimativa da população e não uma contagem dos organismos vivos.

2.3.5 Membrana Filtrante

O método de enumerar microrganismos pela técnica da filtração em membrana é considerado sensível e utilizado em análises de bebidas e água. A membrana é cultivada em ágar seletivo para a bactéria que se deseja avaliar. A análise microbiológica usando a técnica da membrana filtrante com grade hidrofóbica (*hydrophobic grid membrane filtration HGMF*), incluindo a etapa da filtração, vem sendo usada com frequência e já é aceita pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), para várias espécies de bactéria em alimentos. A superfície das membranas é separada por divisões conhecidas e de tamanhos iguais. A grade hidrofóbica impede o crescimento lateral das colônias, evitando assim o seu recobrimento (Chu et al., 1987; Food..., 1989; Besse & Lafarge, 2001).

Considerando a já comentada importância da medida do crescimento microbiano em processos fermentativos e que a indústria de vinagre necessita de linhagens para a produção que apresentem altas taxas de crescimento e conversão, é de suma importância dispor de técnicas e ferramentas que estimem corretamente a população presente, sabendo da sensibilidade da bactéria acética frente ao oxigênio, por exemplo. Testes conduzidos por Hromatka & Exner (citados por Ebner, 1983) mostraram que a extensão do estrago chega a 99,9% quando a acidez é de 8,05 g/100 mL, após a interrupção de oxigênio por 60 segundos. Logo, etapas de manipulação durante a execução da análise, como diluições, tempo de manipulação, composição do meio, corantes e técnica, devem interferir o mínimo possível no resultado final. A seguir são citadas algumas técnicas e

corantes encontrados na literatura e usados recorrentemente por pesquisadores da área para quantificar ou monitorar o crescimento de bactérias acéticas.

Células viáveis de bactérias acéticas foram contadas por plaqueamento do caldo fermentado em meio ágar contendo extrato de levedura 5 g/L, peptona 2 g/L, glicose 30 g/L e 3% (v/v) etanol e incubados por 3 dias a 30°C. A diluição da amostra ocorreu com o mesmo caldo, sem etanol. O total de células/mL estava na faixa de 10^4 a 10^9 (Ohmori et al., 1980).

Cirigliano (1982) observou que entre os inibidores seletivos de bactérias Gram positivas estudados, isto é, cristal violeta, verde brilhante e desoxicolato de sódio, o verde brilhante foi considerado o que menos inibiu bactérias acéticas. O desoxicolato de sódio reduziu o crescimento de todas as *Acetobacter* testadas e o cristal violeta inibiu completamente as subespécies de *A. aceti*.

No isolamento e classificação de bactéria acética de fermentadores de vinagre com alta acidez Kittelmann et al. (1989) monitoraram a concentração de células durante o processo pela medida da turbidez, isto é, densidade ótica (OD) em comprimento de onda de 420 nm e calcularam a taxa específica máxima de produção para cultura agitada em incubador rotatório. Procederam ainda as contagens de células viáveis em ágar com ácido acético, etanol, glicose, sais minerais e extrato de levedura (ágar w). Coletadas na fase exponencial do crescimento das culturas agitadas, as viabilidades apresentaram baixos resultados entre 0,1% e 0,01%, com desvios-padrão de até 70%. As células sobreviveram bem à diluição no meio líquido padrão, já que a produção de colônias permaneceu constante durante a incubação das suspensões por 3-4 h. Afirmaram que linhagens acetofílicas mostraram problemas quanto ao crescimento após transferência do meio líquido para sólido, similar ao das células retiradas de fermentador submerso com alta porcentagem de acidez. Os autores sugeriram que os organismos não teriam crescido nas concentrações de ácido acético porque a aeração tinha sido insuficiente nas culturas agitadas e

provavelmente as bactérias tinham perdido parte de sua resistência ao ácido acético durante o cultivo em meio sólido.

Saeki et al. (1997a, 1997b) monitoraram o crescimento bacteriano medindo a turbidez a 660nm com um fotômetro ou colorímetro fotoelétrico com filtro vermelho, em seus estudos com bactérias termotolerantes coletadas em diversas regiões da Tailândia.

No trabalho de preparo de culturas iniciadoras para fermentação de vinagre, a viabilidade foi determinada por meio do número mais provável (NMP) com três séries paralelas ou por plaqueamento em superfície. Para a determinação da contagem total foi usado um hemocitômetro de Thoma. O cálculo das células recuperadas (células viáveis/células totais) foi feito multiplicando a contagem de viáveis por um fator dois quando microscopicamente as células foram encontradas aos pares. A densidade ótica (DO) da cultura foi medida no comprimento de onda de 620 nm e o valores obtidos por eles no trabalho estavam na ordem de grandeza de 10^5 a 10^{10} UFC/mL (Sokollek & Hammes, 1997).

Sokollek et al. (1998a), no estudo do cultivo e preservação de bactérias produtoras de vinagre, determinaram a contagem total usando um hemocitômetro de Thoma. Para determinar a recuperação de células viáveis, fizeram diluições consecutivas das cultura com solução de *Ringer* (diluída 1:4). Amostras da linhagem de *A. europaeus* foram diluídas em meio líquido AE (4a/3e)⁶. Os isolados de fermentadores acéticos de cidra e vinho foram plaqueados por superfície em ágar RAE (1a/2e)⁷, *A. europaeus* em ágar RAE (4a/3e), *A. xylinum* em ágar RAE (0a/0e) e as linhagens tipo restantes em ágar extrato de levedura, peptona e manitol (MYP)⁸. As recuperações de células viáveis foram calculadas dividindo a contagem de viáveis pela contagem total. Para o cálculo de recuperações de células viáveis, o valor foi multiplicado por um fator dois porque microscopicamente as

⁶ AE meio Ácido/Etanol na proporção de 4a/3e, 4% ácido e 3% etanol, composição descrita na Tabela 4.

⁷ RAE meio Reforçado Ácido/Etanol (1a/2e, 1% de ácido e 2% de etanol), composição descrita na Tabela 4.

⁸ Composição descrita na Tabela 4.

células foram achadas aos pares. A recuperação dos isolados de vinagre de álcool foi determinada por plaqueamento em superfície com 10 µL das respectivas preparações em ágar AE (4a/3e). Este procedimento foi escolhido porque estas culturas não toleram diluição. O crescimento nas placas foi controlado uma vez por dia. Colônias distintas foram contadas quando as recuperações eram <0,001%. Considerou-se a formação de um grumo denso nas placas como indicador de valores > 1% de sobreviventes. Encontraram-se resultados na faixa de 10⁶ a 10¹⁰ UFC/mL.

O monitoramento do crescimento celular de bactéria termotolerante foi feito pela medida da absorvância a 600 nm usando espectrofotômetro (Lu et al., 1999).

2.4 Classificação das Bactérias Acéticas

Os microrganismos que oxidam o etanol a ácido acético são chamados de bactérias acéticas. Há informação de que a primeira tentativa para a classificação dessas bactérias foi feita por Hansen, em 1894. Beijerinck é considerado o autor do nome do gênero por ter proposto "*Acetobacter*", no ano de 1900. Visser't Hooft, em 1925, foi o primeiro cientista a levar em consideração as características bioquímicas para classificar essas bactérias, e também foi o primeiro a mencionar que as bactérias acéticas de coleções anteriores não tinham mantido suas propriedades. Asai, nos anos de 1934 e 1935, classificou-as em dois gêneros principais, *Acetobacter* e *Gluconobacter* (Ebner & Follmann, 1983).

Frateur, em 1950, publicou os resultados de um extenso estudo bioquímico envolvendo a maioria das espécies classificadas como *Acetobacter*, na época mais de 60, usando cinco critérios: presença de catalase; superoxidação do etanol a CO₂ e H₂O; oxidação do lactato a carbonato; oxidação do glicerol a dihidroxiacetona; produção de ácido glicônico a partir de glicose. Leifson afirmou, em 1954, que as bactérias acéticas compreendem dois diferentes tipos: *Acetobacter*, capaz de oxidar acetato e é possuidor de

flagelo peritríquio; e *Acetomonas*, que não oxida o lactato e possui flagelo polar. No mesmo ano, Schramm & Hestrin observaram que *Acetobacter xylinum* desenvolveu mutante que não produz celulose. Shimwell, em 1959, apresentou estudo dizendo que cada linhagem de *Acetobacter* dava origem a um tipo diferente na forma das colônias, diferindo nas reações bioquímicas da cultura originária e que a capacidade de oxidação do etanol podia ser perdida (Ebner & Follmann, 1983).

Nos anos seguintes, floresceram duas vertentes: uma em que os microbiologistas concordavam com a divisão em *Acetobacter* e *Acetomonas*; e outra em que duvidavam ou recusavam a subdivisão e mantinham a classificação *Acetobacter* e *Gluconobacter*. A situação foi sumarizada por Asai, em 1968. A oitava edição do manual *Bergey*, de 1974, compêndio de informações clássica e molecular sobre todas as espécies reconhecidas de procariotos, traz muitas chaves dicotômicas úteis para a identificação de microrganismos. Naquela edição, o postulado por De Ley foi aceito e a classificação da bactéria acética definiu-se como *Acetobacter* e *Gluconobacter*. *Gluconobacter* foi classificada como a que apresenta ou não flagelo polar, não oxida acetato e lactato, e oxida glicose a gluconato e 2 e 5 cetogluconato. *Acetobacter* possui ou não flagelo peritríquio, oxida acetato e lactato, e tem enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Levando-se em conta o flagelo, aquela edição do manual classificou *Gluconobacter* como gênero IV na família *Pseudomonadaceae*, e *Acetobacter* como um gênero indefinido alocado entre os aeróbios, Gram negativos, bastonetes e cocos. Gillis e De Ley, nos anos 1980, através do uso de técnicas genéticas, observaram que os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* estão mais próximos um do outro do que de qualquer outro gênero. Então, propuseram reunir *Acetobacter* e *Gluconobacter* na família *Acetobacteraceae* (Ebner & Follmann, 1983).

Yamada et al. (1997) descrevem uma relação filogenética das bactérias acéticas baseada na análise do sequenciamento do rRNA 16S e nas ubiquinonas. Propuseram elevar o subgênero *Gluconoacetobacter* do seguinte modo: do gênero *Acetobacter* para o gênero *Gluconoacetobacter* gen. nov. Em outra referência (Lisdiyanti et al., 2000), os mesmos

autores relataram o significativo crescimento em ágar *MYP*, contendo manitol e a presença de ubiquinona com 10 unidades de isopreno (Q_{10}) apresentado por essas bactérias. Esses critérios foram os considerados para caracterizar o gênero *Gluconoacetobacter*.

De acordo com o manual *Bergey*, as bactérias acéticas estão classificadas na Seção 4 (Bastonetes e cocos aeróbios Gram negativos), pertencentes à Família VI, como *Acetobacteraceae*, gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter* (Krieg & Holt, 1984; Holt et al., 1994; Madigan et al., 1997).

2.4.1 Família VI - *Acetobacteraceae*

Bactérias pertencentes a essa família são Gram negativas ou Gram variáveis. Têm formas elipsoidais ou em bastonetes, ocorrendo isoladas, em pares ou em cadeias. As formas involutivas podem ocorrer e são espirais, alongadas, dilatadas, agrupadas, curvas ou filamentosas. Apresentam-se móveis, com flagelo peritríquio ou polar (1-8), ou ainda, não móveis. Não formam endosporos (De Ley et al., 1984).

As bactérias da família *Acetobacteraceae* têm metabolismo típico respiratório em que o oxigênio é aceptor de elétron terminal, isto é, aeróbias quimiorganotróficas, catalase positiva e oxidase negativa. A temperatura e pH ótimos são de 25 a 30°C e 5 a 6, respectivamente. Não liqüefazem a gelatina, também não reduzem os nitratos e não formam indol. Oxidam o etanol a acético em meio neutro ou ácido em pH de 4,5. Para a maioria das linhagens, o pH final em meio D-glicose ou D-xilose está abaixo de 4,5 (De Ley et al., 1984). Ocorrem em nichos levemente ácidos açucarados e alcoolizados, como por exemplo, em flores, frutas, cerveja, vinho, cidra, vinagre, suco de frutas verdes, colmeias e mel. O mol % guanina mais citosina (G+C) do DNA é de 51-65 (De Ley et al., 1984).

2.4.2 Diferenciação de Gênero na Família *Acetobacteraceae*

A chave dos gêneros da família *Acetobacteraceae* compreendem: *Acetobacter* (Gênero I) e *Gluconobacter* (Gênero II). Nas bactérias do gênero I, o lactato ou ácido acético são oxidados para CO₂. Apresentam-se móveis por flagelos peritríquios ou não móveis. Já nas pertencentes ao gênero II, o lactato ou o ácido acético não são oxidados para CO₂. São móveis, por flagelos polares, ou não móveis (De Ley et al., 1984).

Frateur (citado por Swings, 1992) listou os critérios que justificam manter as bactérias do ácido acético em taxonomia separada: 1) não metabolizam proteínas e não crescem em ágar peptona; 2) não formam pigmentos aquo-solúveis esverdeados ou fluorescentes; 3) são capazes de oxidar etanol a ácido acético em meio ácido ou fracamente ácido a um pH inicial de 4,5; 4) são estritamente aeróbios; 5) não crescem em leite ou batata; 6) não hidrolisam a lactose, dextrina ou amido; 7) não são patogênicas.

Leifson (citado por Swings, 1992) observou dois tipos de flagelos em bactérias do ácido acético: *Acetobacter* tem flagelo peritríquio e oxida ácido acético e ácido láctico a CO₂ e H₂O, e um segundo grupo de bactérias do ácido acético, que tem flagelo multitríquio e não oxida ácidos acético e láctico a CO₂. Esta última corresponde ao grupo de “*suboxydans*”, de Frateur. Ao grupo dessas linhagens, Asai deu o nome genérico de *Gluconobacter* (Asai, 1968). O nome genérico de *Gluconobacter* foi exaustivamente discutido por De Ley e Frateur (citados por Swings, 1992).

Ao longo do tempo, a principal contribuição na taxonomia dessas bactérias foram os estudos relacionados com a hibridização DNA-rRNA. Apesar de Krieg et al. (1984) apresentarem um grupo com 32 características para diferenciar os gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Frateuria*, essas não são precisas para uma identificação satisfatória (Ebner et al., 1996).

A maior contribuição para uma exata taxonomia da bactéria acética provém do estudo de hibridização DNA-rRNA, de Gillis & De Ley (citados por Swings, 1992). A

primeira conclusão do trabalho foi que os grupos *Gluconobacter* e *Acetobacter* são rigorosamente parentes, justificando sua união na família *Acetobacteraceae*. Outra importante conclusão desse trabalho foi a de que as bactérias do ácido acético anteriormente classificadas como “intermediárias” foram, mais recentemente, retiradas da *Acetobacteraceae*. Um novo gênero, *Frateuria*, foi proposto por eles (Swings et al., citados por Swings 1992), situando-se na superfamília II, junto com *Xanthomonas*, *Moraxella*, *Oceanospirillum*, *Azomonas*, *Azotobacter*. Swings (1992) propõe o seguinte método na tentativa de uma rápida identificação:

2.4.3 Rápida Identificação Fenotípica da Família *Acetobacteraceae*

Bactérias Gram negativas ou Gram variáveis, aeróbicas, que oxidam etanol a ácido acético em meio ácido ou neutro, são candidatas a membro da família *Acetobacteraceae*, particularmente se as células forem elipsoidais, na forma de bastonetes, com um metabolismo típico respiratório, acidificando glicose no meio com pH abaixo de 4,5, não formando endosporo, com oxidase negativa, não liqüefazendo a gelatina, não reduzindo nitratos e não formando indol (Swings, 1992).

É importante lembrar que essas características fenotípicas dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*, também podem ser encontradas no gênero *Frateuria* e *Acidomonas*. A definição da família apenas pelas características fenotípicas tende ainda a apresentar problemas, como, por exemplo, no caso da bactéria do ácido acético, em que mutações espontâneas ocorrem muito freqüentemente nas características taxonômicas. Mutantes espontâneas de *Acetobacter aceti* deficientes na oxidação do etanol são exemplos bem conhecidos (Asai, 1968; Okumura et al, citado por Swings, 1992).

A Tabela 1 pode ser usada para diferenciar *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconobacter* e *Frateuria*. A diferenciação de *Acetobacter* de *Gluconobacter* é, em princípio, simples. *Acetobacter* é capaz de oxidar lactato ou ácido acético a CO₂ e H₂O e é

móvel por flagelo peritríquio ou não móvel, enquanto que *Gluconobacter* não é capaz de oxidar estes substratos e é móvel por flagelo polar ou não móvel (Swings, 1992; Holt et al., 1994).

Tabela 1. Diferenciação de bactérias *Gram* negativas que oxidam etanol a ácido acético em meio neutro ou acidificado (pH 4,5)

Características	<i>Acetobacter</i>	<i>Acidomonas</i>	<i>Frateuria</i>	<i>Gluconobacter</i>
Motilidade	+ ou - ^a	-	+ ou -	+ ou -
Arranjo do flagelo				
Polar	-		+	+
Peritríquio	+		-	-
Superoxidação do etanol	+		-	-
Oxidação de DL-Lactato a CO ₂ e H ₂ O	+	-	+	-
Oxidação de Acetato a CO ₂ e H ₂ O	+	+	-	-
Cetogênese	+ ou -		+	+
Formação de pigmentos marrons solúveis em água em meio <i>GYC</i>	-		+ ^b	-
Requerimento de fatores de crescimento	+ ou -		-	+
Produtos formados de glicose				
Ácido 2-cetoglicônico	+ ou -		+	+
Ácido 5-cetoglicônico	+ ou -		-	+
Ácido 2,5-cetoglicônico	+ ou -		-	+ ou -
Acetilmetilcarbinol (VP)	+ ou -	-	-	+ ou -
Crescimento em 30% de glicose	-		+ ^b	-
Crescimento em meio Manitol, Hoyer modificado por Frateur	-		+	-
Produção de ácido de				
D-Arabinose	-		+ ^b	+
<i>i</i> -Inositol	-	-	+	+ ou -
Maltose	-	-	-	+ ou -
Fontes de carbono para crescimento				
L-Arabinose	-	-	+	-
D-Manose, D-Lixose, L-Lixose	-		+	-
<i>n</i> -Propanol	+ ou -		-	-
Acetato	+ ou -	+	+	-
Glicerato	+ ou -		+	-
Lactato	+ ou -	-	+	-
D-Manitol	+	-	+	+
Metanol	-	+	-	-
Oxidase	-	+	-	-

a = + ou -, reação diferente entre as espécies ou entre linhagens dentro da espécie.

b = algumas linhagens são negativas.

Fonte: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994)

2.5 Gênero *Acetobacter*

Bactérias do gênero *Acetobacter* são células elipsoidais em forma de bastonetes, retos ou levemente curvados, com dimensões de 0,6-0,8 μm por 1,0-4,0 μm , ocorrendo isoladas, em pares ou em cadeias. Formas involutivas em algumas linhagens são freqüentes, podendo ser espirais, alongadas, dilatadas, associadas, curvadas ou filamentosas. As que apresentam motilidade possuem flagelos peritríquios ou laterais e outras são não-móveis. Não formam endosporos, de modo geral são Gram negativas, com poucos casos de Gram variáveis. O metabolismo dessas bactérias é respiratório, nunca fermentativo, portanto, são obrigatoriamente aeróbias. O oxigênio é acceptor de elétron terminal. As colônias são opacas e muitas linhagens não produzem pigmentos. As produtoras desenvolvem pigmento aquo-solúvel de coloração marrom ou colônias rosa. O mol % G+C do DNA está na faixa de 51-65% (T_m). A temperatura ótima está na faixa de 25-30°C e o pH ótimo de crescimento situa-se entre 5,4-6,3 (De Ley et al., 1984; Holt et al., 1994; Ebner et al., 1996).

Swings (1992) apresenta os seguintes critérios para uma rápida identificação fenotípica do gênero *Acetobacter*:

2.5.1 Rápida Identificação Fenotípica do Gênero *Acetobacter*

Células jovens desse gênero são bastonetes Gram negativos, algumas vezes Gram variáveis, medem 0,6-0,8 por 1,0-4,0 μm , sem endosporos, estritamente aeróbios, motilidade por flagelos peritríquios, ou não móveis. Crescem em pH 5,0, oxidam etanol a ácido acético em condições neutras e ácidas, e oxidam acetato e lactato para CO_2 e água. *Acetobacter* prefere etanol e lactato à glicose para crescimento. Lactose e amido não são usados como fonte de carbono. A oxidação de etanol para ácido acético, no caso de *Gluconobacter*, e de etanol, para CO_2 e H_2O , no caso de *Acetobacter*, pode ser detectada por vários métodos. Frateur (citado por Swings, 1992) usou um meio sólido de água de

levedura, 3% etanol, 2% CaCO₃ e 2% ágar, no qual a presença de ácido acético é revelada pela formação de uma zona clara ao redor da área inoculada. A superoxidação de ácido acético por linhagens de *Acetobacter* resulta na re-precipitação do CaCO₃ (“brilho nacarado”) na zona clara, começando da borda do inóculo. Outro método de avaliação foi descrito por Carr (1968). Ele usa um meio com 3% de extrato de levedura, 2% de etanol, 0,0022% de verde bromocresol e 2% de ágar. O ácido acético produzido por *Gluconobacter* muda o indicador de verde para amarelo. *Acetobacter* mostram a mesma mudança de cor, mas como o ácido acético é oxidado a CO₂ e H₂O, após uma longa incubação, o indicador reverte para o azul (Swings, 1992).

O ágar dextrose, sorbitol, manitol (DSM), apresentado como um meio seletivo para isolamento e diferenciação de *Acetobacter* e *Gluconobacter* baseia-se na oxidação preferencial da fonte de carbono. *Acetobacter* tem a habilidade para oxidar lactato e acetato assim como etanol, sendo esta utilização preferencial da fonte de carbono, também usada como critério para a diferenciação. *Gluconobacter* é incapaz de oxidar lactato e, preferencialmente, oxida os carboidratos menores produzindo ácido acético e mantendo o meio amarelo (Cirigliano, 1982).

O clássico estudo de Entani et al. (1985) indicou que as catorze bactérias acéticas isoladas de fermentadores submersos com alta acidez tinham grande tolerância ao ácido acético e habilidade de produzi-lo a partir de etanol. Mas os testes foram negativos para oxidação de etanol e lactato em CO₂ e H₂O, reação em acetato e lactato, e consumo de oxigênio por acetato, lactato e succinato. Assim, os isolados tinham características fenotípicas intermediárias entre os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Além disso, eles tiveram características distintas quanto ao meio de cultura, requerendo-o com pelo menos 4% de concentração ácida e pH 2,2 a 3,5 para crescimento.

Kittelman et al. (1989) afirmaram que na fermentação submersa de elevada porcentagem a superoxidação nunca havia sido encontrada. Porém, recentemente, esse

problema ocorreu nos fermentadores contínuos que continham somente de 8% a 11% de ácido acético e concentrações baixas do álcool, muito baixas, próximas de 0%.

A superoxidação do ácido acético foi usada para a diferenciação entre *Acetobacter* e *Gluconobacter*. *Acetobacter* spp podem superoxidar o ácido acético mas observou-se que esse critério depende da composição do meio. Isto só acontece na ausência de etanol. Com *A. europaeus*, a superoxidação acontece em meio AE somente quando a concentração de ácido acético está abaixo de um limite específico para a linhagem, no momento em que há o esgotamento de etanol. Sokollek et al. (1998 b) selecionaram seis linhagens e estudaram a concentração de ácido acético que suprime a superoxidação. Estes valores foram 7, 8, 9, 5, 5 e 6% para linhagens LTH 2460, 2463, 2455, 2458, 2459 e 4342, respectivamente. Assim, a supressão da superoxidação das linhagens em um limite específico parece ser uma propriedade comum com as acetobactérias.

2.5.2 Bioquímica

No processo de fermentação acética, o etanol é quase totalmente oxidado a ácido acético. É comum ser encontrada produtividade em torno de 95 a 98% e as perdas ocorrem por evaporação do etanol. Do mesmo modo, a fonte de carbono (C₆), de preferência a glicose, é oxidada e os produtos obtidos são gás carbônico e água (Ebner et al., 1996).

A Figura 2 apresenta o esquema de oxidação do etanol a ácido acético, que é o processo chave para a produção de vinagre (Madigan et al., 1997).

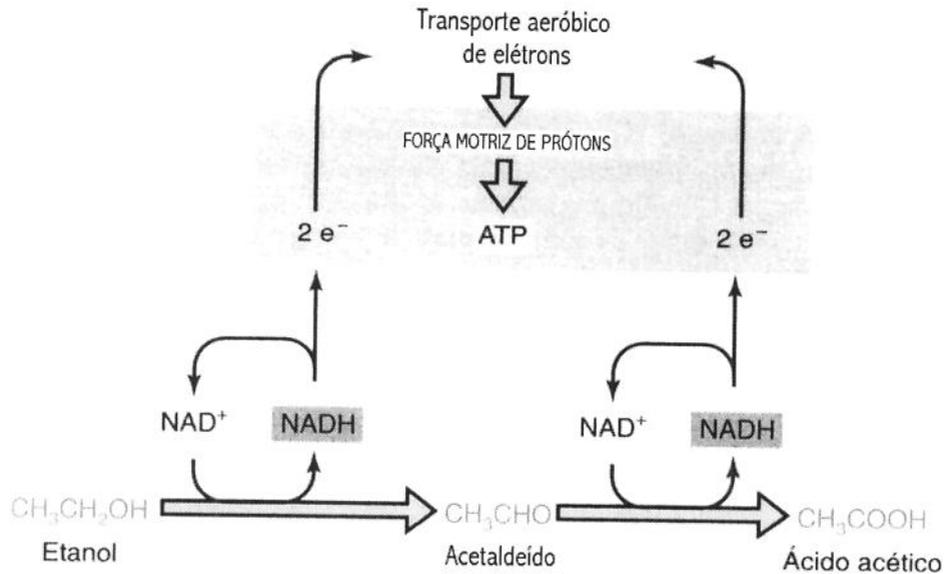


Figura 2. Oxidação do etanol a ácido acético

Fonte: Madigan et al. (1997)

O etanol é oxidado por duas reações sequenciais, catalisadas por enzimas ligadas à membrana, a álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). As duas enzimas são ligadas ao exterior da membrana periplasmática e catalisam reações de oxidação por estarem localizadas no espaço periplásmico. Tais reações de oxidação são chamadas "fermentação oxidativa", uma vez que envolvem oxidação incompleta do álcool, acompanhada pelo acúmulo do produto de oxidação correspondente em grande quantidade no meio de crescimento. Apesar da longa história do vinagre, a revelação da natureza da ADH e da ALDH ocorreu nos anos 1980, após a pirolquinolina quinona (PQQ), uma nova quinona do grupo prostético, ou um cofator quinona, ter demonstrado sua função em tais enzimas, ao lado de componentes do citocromo. A respeito do sistema de oxidação do álcool pela bactéria do ácido acético, a ADH e a ALDH têm sido extensivamente pesquisadas e bem caracterizadas (Ebner et al., 1996; Saeki et al., 1997 a; Lu et al., 1999).

Para hidrolisar açúcares, a *Acetobacter* faz a rota metabólica da hexose monofosfato e o ciclo dos ácidos tricarbóxicos. A glicólise está ausente ou fracamente executada, assim como a fosfofrutoquinase também está ausente. O ciclo de Entner-Doudoroff parece ocorrer somente nas linhagens de *Acetobacter* que sintetizam celulose, formalmente classificadas como *A. aceti* subsp. *xylinum*. Nestas, o citado ciclo é mais ativo do que o ciclo da hexose monofosfato. Linhagens capazes de crescer em meio Hoyer com etanol como única fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como única fonte de nitrogênio utilizam enzimas da rota secundária do glioxilato. *Acetobacter*, assim como *Gluconobacter*, têm notável capacidade oxidativa de açúcares, álcoois e esteróides (Asai, 1968; De Ley et al., 1984).

Yamada et al. (citados por De Ley et al., 1984) demonstraram a presença de ubiquinona-10 em *Gluconobacter* e ubiquinona 8 e 9 em gênero *Acetobacter*. A única exceção foi para *A. liquefaciens* e bactérias acéticas que sintetizam celulose e são possuidoras de ubiquinona 10. Os seguintes citocromos têm sido encontrados em *Acetobacter* mas não estão sempre presentes juntos em uma mesma linhagem: a_1 , a_2 , a_4 , b , c , c_1 e d . O citocromo a_1 parece ser típico de *Acetobacter*, já que não tem sido detectado em *Gluconobacter*.

Os seguintes testes são sempre negativos para todas as linhagens do gênero: oxidase, H_2S , formação indol, liquefação da gelatina e reação em *litmus milk*. Quanto à prova bioquímica da catalase são positivas (De Ley et al., 1984).

2.5.3 Nutrição e Fatores de Crescimento

Quanto à nutrição, as melhores fontes de carbono para o crescimento são 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. Os fatores de crescimento requeridos por estas bactérias dependem da fonte de carbono fornecida (Rao & Stokes,

citados por De Ley et al., 1984). Em meios sintéticos que contêm nove vitaminas e D-manitol como fonte de carbono, algumas linhagens requerem ácido p-aminobenzóico, niacina, tiamina ou ácido pantotênico como fatores de crescimento (Gosselé et al., citados por De Ley et al., 1984). Ameyama e Kondô (citados por De Ley et al., 1984), encontraram algumas linhagens de *Acetobacter* que não necessitavam de vitaminas para crescer em presença de D-glicose. Em meios sem a presença de fonte de carbono, por exemplo, caldo extrato de levedura, peptona ou caldo nutriente, não ocorre crescimento. Em ordem decrescente, as melhores fontes de carbono que promovem o crescimento das bactérias acéticas são etanol, glicerol e DL-lactato de sódio. Aminoácidos não podem ser usados como única fonte de carbono e nitrogênio (De Ley et al., 1984; Ebner et al., 1996).

2.5.4 Habitat

Ocorrência da *Acetobacter* se dá em flores, frutas, mel, saquê, tequila, vinho de palma, grapa, cidra, cerveja, kefir, cerveja Bantu sul-africana, leveduras fermentadas, vinagre, aparas de madeira usadas em acetador de produção de vinagre pelo processo rápido, acetificadores de vinagre, caldo de cana, tea fungus, solo de jardins e canal de água. *Acetobacter* causam doença rosa em abacaxi e podridão em maçãs e pêras. A bactéria acética é usada na fabricação de vinagre e é deteriorante em cervejas e vinhos (De Ley et al., 1984; Holt et al., 1994; Swings, 1992).

2.5.5 Diferenciação de Espécies no Gênero *Acetobacter*

A classificação do manual *Bergey* (Krieg et al. 1984) apresenta quatro espécies do gênero *Acetobacter*: *A.aceti*, *A.liquefaciens*, *A.pasteurianus* e *A.hansenii*.

Mais recentemente, Holt et al. (1994) incluíram as espécies *A. diazotrophicus*, *A. methanolicus*, *A.xylinum* para o gênero *Acetobacter*. A descrição dessas novas espécies foram publicadas no *International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB), nos anos de

1989, 1986, 1983, respectivamente. A Tabela 2 apresenta as características diferenciais dessas espécies do gênero *Acetobacter*.

Tabela 2. Características diferenciais das espécies do gênero *Acetobacter*

Características	<i>A. aceti</i>	<i>A. diazotrophicus</i>	<i>A. hanseni</i>	<i>A. liquefaciens</i>	<i>A. methanolicus</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. xylinum</i>
Formação de: Pigmentos marrons solúveis em água em meio <i>GYC</i>	-	+	-	+	-	-	-
γ -pironas de D-glicose	-	+	-	D	-	-	-
γ -pironas de D-frutose	-	+	-	+	-	-	-
Ácido 5,0-cetoglicônico de D-glicose	+	-	d	D	-	-	+
Ácido 2,5-dicetoglicônico de D-glicose	-	+	-	+	-	-	-
Cetogênese de glicerol	+	d	+	+	fraco	-	+
Fontes de carbono para crescimento							
Etanol	+	+	-	+	fraco	d	-
Ducitol	-	-	d	-	-	-	-
Acetato de sódio	+	+	-	D	fraco	d	-
Metanol	-	-	-	-	+	-	-
Crescimento em L-aminoácidos na presença de D-manitol como fonte de carbono							
L-glicina, L-treonina, L-triptofano	-	-	-	D	-	-	-
L-glutamina	d	-	+	+	-	-	-
L-asparagina	d	+	+	+	-	-	-
Crescimento em 10% de etanol	-	-	-	-	-	d	-
Crescimento em 30% de D-glicose	-	+	-	-	-	-	-
Fixação de N ₂ e crescimento com N ₂	-	+	-	-	-	-	-

d = 11 – 89% das linhagens são positivas.

Fonte: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994)

No Japão, Entani et al. (1985) publicaram a descrição da *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., uma nova espécie de bactéria acética hábil para produzir vinagre com alta acidez.

Descrição de *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov.

Acetobacter polyoxogenes sp. nov. (*po. ly. o. xo'. ge nes.* Gr. adj. *poli*, muito; Gr. n. *oxos* vinagre; Gr. v. *gennaio*, produzir, M. L. adj. *polyoxogenes*: que produz muito vinagre.)

Tais bactérias são bastonetes Gram-negativos, ocorrendo isoladamente ou em pares, de 0,4 a 0,6 μm de largura por 0,8 a 1,3 μm de comprimento, não móveis. Elas formam colônias lustrosas, lisas, cinza-claras para marrom claras e colônias pequenas, puntiformes. A bactéria cresce em ágar ácido-etanol (AE), em atmosfera com alta umidade relativa, de 95% a 100%, e em caldo AE com agitação. Cresce na faixa de pH 2,2 a 3,5, e na faixa de 15 a 35°C. Requer mais de 4% de ácido acético para se desenvolver. Não cresce em meio sem etanol ou glicose. Não cresce no meio de Frateur modificado por Hoyer (acrescentando vitamina). Produz ácido glicônico e ácido 2-cetoglicônico a partir de glicose, e ácido acético a partir de etanol. Não produz ácido 5-cetoglicônico, γ -pirona, pigmento marrom solúvel em água ou celulose a partir de glicose. Não produz nenhuma γ -pirona de frutose nem dihidroxiacetona de glicerol. Não oxida lactato, acetato, ou succinato. Utiliza D-glicose, D-frutose, sacarose, D-sorbitol, D-manitol, etanol e n-propanol. A utilização de iso-propanol é variável. Possui Q-10 como principal quinona de isoprenóide. A base de composição do DNA é de 57,6 a 58,1 mol % guanina mais citosina (G+C). Os ácidos graxos celulares são do tipo de cadeia linear contendo $\text{C}_{15:0}$ como o principal componente. O *habitat* são fermentadores de vinagre com alta acetificação. A linhagem tipo é NBI 1060 (JCM 3808).

Segundo Sievers et al. (1992) e Ebner et al. (1996), essa bactéria não foi disponibilizada pelo *Japan Collection of Microorganisms* e os resultados não publicados validamente devido aos problemas de preservação e de propagação dos microrganismos.

Estudos realizados com *Acetobacter polyoxogenes* são encontrados na literatura japonesa, indicando que com a bactéria tem-se atingido níveis de produção em torno de 15% (p/v) e o teor em fosfolipídeos dos componentes da membrana celular variam com o acréscimo na concentração de ácido acético do meio. A razão da fosfatidil colina aumenta e o fosfatidil glicerol diminui com o acréscimo de ácido acético. Já a proporção fosfatidil etanolamina foi pouco afetada. A relação de ácidos graxos insaturados nos lipídeos totais foi muito alta. Proteínas das células de *Acetobacter polyoxogenes* foram analisadas por eletroforese. Algumas diferenças foram observadas entre as frações de proteínas solúveis mas não entre as quantias presentes nas frações da membrana que contém as enzimas responsáveis pela fermentação acética. Em microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que as células coletadas em acidez de 8 a 12% mostraram-se contraídas e que a 19% estavam normais. Essas observações sugeriram que a parede celular também muda com a concentração de ácido acético. Concluíram então que componentes da membrana e a estrutura da parede celular de *A. polyoxogenes* mudam de acordo com a concentração de ácido acético no caldo (Higashide et al., 1994, 1996).

Novas espécies de *Acetobacter* têm sido descritas. Sievers et al. (1992) propuseram o nome de *Acetobacter europaeus* à linhagem que foi isolada e caracterizada em cultura pura de fermentações de vinagre com alta acidez, na Alemanha e Suíça. Todas as linhagens isoladas dos fermentadores submersos e geradores rápidos tinham pouca similaridade de DNA-DNA (0-22%) com linhagens de *Acetobacter* e *Gluconobacter*. A diferenciação fenotípica de espécie para *Acetobacter* é um tanto difícil, uma vez que diferentes linhagens de espécies não necessariamente utilizam a mesma fonte de carbono. Um critério útil para identificação da *Acetobacter europaeus* de outra espécie de

Acetobacter é a alta tolerância ao ácido acético contido no ágar AE, e a absoluta exigência de ácido acético para crescer (Ebner et al., 1996).

Descrição de *Acetobacter europaeus* (sp. nov.)

Acetobacter europaeus (sp. nov.) *eu.ropae'us* L. adj. m. *europaeus*: que ocorre ou vem da Europa.

Trata-se de células Gram negativas, elipsoidais ou em forma de bastonetes, retas ou levemente curvadas, com dimensões de 0,6 a 0,8 mm por 1,0 a 1,4 mm, ocorrendo sozinhas, em pares ou em cadeias. Não foram observados motilidade e flagelo. Endosporos não são formados. São células obrigatoriamente aeróbicas e morrem rapidamente com a interrupção de oxigênio. Apresentam colônias opacas, não produzem pigmentos, catalase positivas, oxidase negativas. Oxidam etanol a ácido acético. O acetato é oxidado a CO₂ e H₂O, somente em concentrações de acetato abaixo de 6% e o lactato é ou não oxidado. Glicose é oxidada a 2 ou 5-cetogluconato e a D-glicose e D-manitol podem ser usados como fontes de carbono. Em crescimento na presença de fontes de amônio, estes são assimilados. *Acetobacter europaeus* apareceram em todos os fermentadores submersos e rápidos usados na produção de vinagre coletado na Europa. A concentração de ácido acético máxima de trabalho nessas indústrias é de 10 a 14% e concentração de etanol máxima tolerada é de 5% (v/v). A composição básica de DNA é 56,2 a 57,3% e a hibridização de DNA-DNA é não significativa com as linhagens tipo de *Acetobacter aceti*, *Acetobater pasteurianus*, *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter hansenii*, *Acetobacter xylinum*, *A.methanolicus* e *Gluconobacter oxydans*. Os plasmídeos estão presentes em todas as linhagens pesquisadas que foram coletadas em fermentador industrial.

Linhagem tipo *Acetobacter europaeus* DES11 oxida lactato, produz 5-cetogluconato de D-glicose (DSM 6160). Está depositada na *German Collection of*

Microrganisms, tendo sido isolada de culturas submersas de vinagre em fábrica localizada em Esslingen, no sul da Alemanha.

Características taxonômicas de duas linhagens isoladas de fermentadores de vinagre de vinho tinto e de cidra descritas por Sokollek et al. (1998 b) e publicadas no *International Journal of Systematic Bacteriology* avaliam por análise comparativa as seqüências de rRNA 16S. Dessa maneira, revelou-se a similaridade (> 99%) entre linhagem LTH 2460^T e linhagem tipo das espécies relacionadas de *Acetobacter europaeus* e *Acetobacter xylinus* e, entre linhagem LTH 2458^T e *Acetobacter pasteurianus*. Por outro lado, baixos níveis na relação de DNA (< 34%) foram determinados nos estudos de similaridade de DNA-DNA. Esta baixa similaridade de nível de espécies era consistente com as características fisiológicas, permitindo uma clara identificação dessas linhagens dentre as espécies estabelecidas de bactérias do ácido acético. Com base nesses resultados, os nomes *Acetobacter oboediens* sp. nov. e *Acetobacter pomorum* sp. nov. foram propostos para linhagens LTH 2460^T e LTH 2458^T, respectivamente.

Descrição de *Acetobacter oboediens* sp. nov.

Acetobacter oboediens (*ob.oe'diens*. L. adj. *oboediens*: obediente).

A células têm dimensões de 0,8 a 1,2 µm por 1,3 a 1,6 µm, não móveis, ocorrendo principalmente em pares. As colônias são redondas, regulares, umbonadas, macias, brilhantes, com coloração lustrosa e bege, com um diâmetro de 1 a 2 mm em ágar RAE (meio ácido etanol reforçado 1 ácido:2 etanol). Crescem em etanol a 3% (v/v) na presença de até 8% (p/v) de ácido acético em caldo AE. Crescem na presença de glicose a 30% (p/v) com um forte acúmulo de ácido glicônico ($\geq 130\text{g.L}^{-1}$). Formam ácido 2 cetoglicônico a partir de glicose. Crescem bem em glicose, frutose, ribose, glicerol, lactato de sódio, glucanato de potássio e sacarose em ágar extrato de levedura e peptona. Formam

^T indica linhagens que são tipo da espécie e subespécie.

dihidroxiacetona a partir do glicerol. Não formam celulose e o sistema ubiquinona consiste em Q-10 como principal e Q-9 como menor componente. O teor no DNA de G+C é 59,9 mol %. As linhagens *LTH 2460^T* (=DSM 11826^T) passaram a representar uma linhagem tipo, isolada de fermentação submersa de vinagre de vinho tinto, no sudeste da Alemanha.

Descrição de *Acetobacter pomorum* sp. nov.

Acetobacter pomorum (*po.mo'rum*. L. neut. n. *pomum*: fruta; L. gen. pl. neut. n. *pomorum*: de frutas).

As células têm dimensões de 0,8 a 1,2 µm por 1,3 a 1,6 µm, não móveis, ocorrendo principalmente em pares. As colônias são redondas, regulares, convexas, moles para líquidas, brilhantes lustrosas e beges com um diâmetro de 0,8 a 1,5 mm em ágar de RAE (1a/2e). Crescem em etanol a 3% (v/v) na presença de até 4% (p/v) ácido acético em caldo AE. Crescem na presença de glicose a 30% (p/v) com um fraco acúmulo de ácido glicônico (< 10 g.L⁻¹). Não formam ácido 2 cetoglicônico a partir de glicose. Crescem bem com amônia como única fonte de nitrogênio em etanol, n-propanol, glicose, frutose, maltose, ribose, xilose, sorbitol, manitol e glicerol e têm crescimento reduzido com metanol em ágar sal. Formam dihidroxiacetona a partir de glicerol. Não formam celulose e o sistema ubiquinona consiste em Q-9 como principal e Q-8 como menor componente. O teor no DNA de G+C é 50,5 mol %. Linhagens *LTH 2458^T* (=DSM 11825^T) é uma linhagem tipo e foi isolada de fermentação submersa de vinagre de cidra no sudeste da Alemanha.

Linhagens de uma nova espécie do gênero *Acetobacter* foram isoladas e caracterizadas em cultura pura obtida de diversas fontes, como *Kombucha* e vinagre de cidra e de álcool, na Suíça e Eslovênia (Boesch et al., 1998).

Descrição de *Acetobacter intermedius* sp. nov.

Acetobacter intermedius (L.adj.m. *intermedius*, intermediário entre dois)

Esta acetobactéria apresenta propriedades fenotípicas intermediárias entre *Acetobacter europaeus* e *Acetobacter xylinus*. As bactérias dessa linhagem crescem em altas concentrações de ácido acético e em meio sem ácido acético. Células Gram negativas, em forma de bastonetes, retos, com 0,7 µm por 2 µm, ocorrem em pares. Motilidade e flagelo não foram observados. Não formam endosporos. São obrigatoriamente aeróbicas. As colônias são opacas e não produzem pigmentos.

São catalase positivas e oxidase negativas. Oxidam etanol a ácido acético. O acetato é oxidado a CO₂ mas somente a concentrações abaixo de 6%. Não oxidam glicose a 5 cetoglucanato ou 2 cetoglucanato. A composição básica do DNA é 61,55%.

Acetobacter intermedius ocorrem em *tea fungus*, vinagre de álcool e de cidra. Hibridização de DNA-DNA é não significativa com linhagens tipo de *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens*, *A. hansenii*, *A. xylinus*, *A. methanolicus* e *Gluconobacter oxydans*. Hibridização com linhagem tipo de *Acetobacter europaeus* foi < 60%. A linhagem tipo *Acetobacter intermedius* TF2 (DSM11804) foi isolada de bebida fermentada (*Kombucha*) na Suíça e está depositada no DSM.

Yamada (2000) propõe a transferência de *Acetobacter oboediens* (isolada por Sokollek et al., 1998 b) e *Acetobacter intermedius* (isolada por Boesch et al., 1998), para gênero *Gluconoacetobacter*, como *Gluconoacetobacter oboediens* comb. nov. e *Gluconoacetobacter intermedius* comb. nov., baseados em resultados do sequenciamento de seu gene 16S rRNA. Linhagens tipo dessas espécies são agrupadas na posição do gênero *Gluconoacetobacter* juntamente com as *Gluconoacetobacter xylinus*, *Gluconoacetobacter europaeus*, *Gluconoacetobacter hansenii*, *Gluconoacetobacter liquefaciens* (espécie-tipo) e *Gluconoacetobacter diazotrophicus*. O significativo crescimento em ágar manitol e a presença de isopreno ubiquinona formado de Q10 é discutido para caracterizar o gênero *Gluconoacetobacter*.

Estudo taxonômico foi realizado na Indonésia com 46 linhagens de bactéria acética isoladas de flores, frutas e alimentos fermentados. Essas eram bastonetes Gram negativas, produziam ácido acético a partir do etanol, oxidavam acetato e lactato a CO₂ e H₂O. Com base na similaridade de DNA-DNA, todas as linhagens estudadas, incluindo as linhagens tipo e referência do gênero *Acetobacter*, foram separadas em 11 grupos (Grupos de I a XI). Do total das 46 isoladas, duas foram incluídas no Grupo II e identificadas como *Acetobacter pasteurianus*, cinco no Grupo IV como *A. orleanensis*, 16 no Grupo V como *A. lovaniensis*, cinco no Grupo VII com *A. indonesiensis*, e três no Grupo VIII como *A. tropicalis*. Os 15 isolados restantes constituem três novos grupos baseados na similaridade de DNA-DNA; quatro isolados foram incluídos no Grupo IX, dois no Grupo X e nove no Grupo XI. Nenhum isolado foi identificado como *A. aceti* (Grupo I), *A. peroxydans* (Grupo III) e *A. estunensis* (Grupo VI). Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento de 16S rDNA linhagens representativas dos Grupos indicavam que pertenciam ao gênero *Acetobacter*. Com base na composição de base do DNA, similaridade DNA-DNA e no sequenciamento 16S rDNA, propuseram três novas espécies do gênero *Acetobacter*: *Acetobacter syzygii* sp. nov. no Grupo IX, *Acetobacter cibirongensis* sp. nov. no Grupo X e *Acetobacter orientalis* sp. nov. no Grupo XI (Lisdiyant et al., 2001).

2.6 Isolamento e Meios de Crescimento

O isolamento de bactérias acéticas é de suma importância pois a partir desses isolados pode-se conseguir linhagens que sejam de interesse industrial. É possível a obtenção de linhagens capazes de fermentar a temperaturas mais elevadas que 30°C, diminuindo-se custos de refrigeração, tolerantes a altas concentrações de ácido acético e concentração total, que requeiram menos nutrientes para produção, não superoxidem o etanol formado e sejam resistentes aos bacteriófagos. Na literatura, encontram-se diversas formas de isolamento e meios usados, selecionados e apresentados a seguir.

O meio composto por ágar, dextrose, sorbitol e manitol (*DSM*) foi recomendado como um meio seletivo para isolamento e diferenciação dos gêneros de *Acetobacter* e *Gluconobacter* (Cirigliano, 1982). O autor relata que, tradicionalmente, bactérias acéticas têm sido isoladas com os mesmos meios utilizados para separar as leveduras. A seletividade do *DSM* é conseguida pela acetificação, até um pH que favoreça o crescimento de bactérias acéticas e impeça o crescimento de *Pseudomonas*, e pela utilização de carboidratos específicos. *Acetobacter* cresce no meio provocando a mudança deste de amarelo para púrpura, ao mesmo tempo que produz um precipitado branco de carbonato de cálcio. O precipitado de carbonato de cálcio ao redor da célula crescida forma um halo translúcido. Segundo o mesmo autor, *Gluconobacter*, que é incapaz de oxidar lactato, preferencialmente oxidaria os menores carboidratos constituintes, produzindo ácido acético e mantendo o meio com cor amarela.

Ohmori et al. (1980, 1982) isolaram em torno de 1100 linhagens de bactérias acéticas para obter uma que fosse capaz de fermentar a alta temperatura (35°C). As linhagens foram isoladas de calda de vinagre, amostras de solo de indústrias vinagreiras e frutas podres, tais como maçã, pêssego, laranja, caqui e ameixa. Três tipos de meio foram usados: *YG*, que contém 0,5% de extrato de levedura, 2% de glicose, 0,026% (NH₄)₂HPO₄, 0,027% KH₂PO₄, 0,005% MgSO₄.7H₂O, 5% (v/v) etanol e 6% (p/v) de ácido acético; *YGM*, composto por 1% extrato de levedura, 2% glicose, 2% manitol, 2% etanol e 0,5% de ácido acético; e o meio *K*, preparado pela adição de 5% de etanol em 0,2 a 7% de ácido acético, em extrato de *Koji* a 10°B. O isolado *Acetobacter aceti* n.1023 foi observado como uma linhagem termofílica com forte resistência ao ácido acético e habilidade para oxidar o etanol. Cresceu em ágar contendo 1% de extrato de levedura, 0,4% peptona, 6% glicose, 1% CaCO₃ e 2% de ágar.

De Ley et al. (1984) relataram que muitas espécies e subespécies de *Acetobacter* crescem de moderada a abundantemente em meio padrão chamado *GYC*. Este contém em g/L: 10 g extrato de levedura, 50 g de D-glicose, 30 g de CaCO₃ e 25 g de ágar.

As colônias apresentam-se opacas, circulares, elevadas ou convexas e menores que 3 mm de diâmetro.

Observa-se crescimento de bactérias do ácido acético em meio Carr (1968) modificado, composto em g/L de: 30 g de extrato de levedura, 20 g de etanol e 20 g de ágar. Em meio manitol, denominado *MYP*, essas bactérias crescem de modo insuficiente. O meio *MYP* é formulado em g/L com: 5 g de extrato de levedura, 25 g de manitol, 3 g peptona e 25 g de ágar. Todas as linhagens de *Acetobacter* crescem em meio Frateur (citado por De Ley et al., 1984) cuja composição é 10 g de extrato de levedura, 20 g de CaCO₃, 20 ml de etanol e 20 g de ágar, ajustados a um pH entre 6-7. O ácido composto dissolve o carbonato de cálcio formando um halo de 12 mm ao redor da camada. O CaCO₃ é depositado como uma zona clara entre 3-10 dias pela superoxidação (De Ley et al., 1984).

Várias linhagens são capazes de crescer em meio quimicamente definido sem aminoácidos, usando íons NH₄⁺ como fonte única de nitrogênio e etanol como de carbono. Este é conhecido como meio Hoyer modificado por Frateur e cuja composição por litro de água destilada é: etanol, 38 ml; (NH₄)₂SO₄, 1,0g; K₂HPO₄, 0,1 g; KH₂PO₄, 0,9 g; MgSO₄.7H₂O, 0,25 g; FeCl₃, 0,005 g; d-biotina, pantofenato de cálcio, tiamina, ácido fólico, ácido *p*-aminobenzóico e vitamina B12 0,001 g cada; piridoxal-HCl, niacina e riboflavina, 0,0015 g cada (De Ley et al., 1984).

No passado, muitos meios de enriquecimento e isolamento foram descritos, os quais, na maioria, continham cerveja ou levedura. Esses ingredientes são difíceis para padronização. Um simples e apropriado meio de isolamento para a *Acetobacter* contém 0,5% extrato de levedura bacteriológico a 1,5% etanol e 2,5% ágar, sugerido por Suomalainen et al. (citado por De Ley et al., 1984).

Entani et al. (1985) relataram a dificuldade de isolamento de microrganismos produtores de vinagre com alta acidez, maior que 10%, em indústrias de fermentação

submersa. Tal dificuldade foi atribuída aos meios usados no isolamento. Os autores desenvolveram, a partir daí, estudo com o objetivo de isolar e caracterizar as bactérias acéticas que produzissem vinagre com alta acidez. O meio desenvolvido e empregado para o isolamento era um ágar ácido acético-etanol (AE) em placas. Partiu de um caldo AE, solidificado por meio de adição de ágar 0,5 %. A superfície foi coberta mais adiante com meio AE a 1% de ágar. O meio AE era composto de 1,5% glicose, 0,2% extrato de levedura, 0,3% peptona, 6,5% de ácido acético e 2% (v/v) etanol. O ácido acético e o etanol foram adicionados após a autoclavagem. O pH final do caldo de AE não foi ajustado mas era aproximadamente 2,9. Amostras para isolamento eram de vários tipos de vinagre coletadas de algumas vinagreiras. As amostras foram espalhadas em placas com ágar de AE e incubadas a 30°C durante 7 a 30 dias em estufa com 95 a 100% de umidade relativa. Os microrganismos que apareceram em ágar AE foram pinçados e purificados por culturas em estrias repetidas no mesmo meio. O total de linhagens isoladas foi catorze. Quando a concentração habitual de ágar (1,5 a 2,0%) foi usada para isolamento de caldo de vinagre fermentado com alta acidez, nenhum microrganismo era obtido. O cultivo no ágar de camada dupla sob alta umidade é necessário para o crescimento de colônias de bactérias produtoras de alta acidez. Aparentemente, o ágar menos denso da camada inferior fornece um ambiente úmido para a camada superficial. Além dos isolados mencionados, testou também as seguintes linhagens padrões: *Acetobacter liquefaciens* IAM 1834^T, *Acetobacter xylinum* NCIB 11664^T, IFO 3288, NBI 1002 e NBI 1003, *Acetobacter hansenii* NCIB 8746^T, *Gluconobacter cerinus* IFO 3267^T, *Gluconobacter oxydans* subsp. *oxydans* ATCC 19357^T, *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* IFO 3990, *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* IFO3260, *Gluconobacter oxydans* subsp. *melanogenes* IFO 3293, e *Gluconobacter oxydans* subsp. *sphaericus* IFO 12467^T. As linhagens padrão foram cultivadas em glicose-extrato de levedura-peptona (GYP).

Teuber et al. (1987) descreveram que o isolamento de microrganismos responsáveis pela oxidação eficiente de etanol para ácido acético em fermentações

^T Indica linhagens que são tipo da espécie e subespécie.

submersas de vinagre de alta acidez (12 a 13% de concentrações final de ácido acético) não era alcançado na Europa, embora isso tivesse sido descrito, para fermentadores semelhantes, no Japão, com desenvolvimento de técnica especial de ágar de camada dupla (Entani et al., 1985). O exame preliminar dessa técnica em seus laboratórios produziu resultados bastante variáveis. Somente alguns fermentadores investigados foram capazes de formar colônias no ágar proposto. Consideravam ser necessária outra abordagem para caracterizar a microflora de fermentações de vinagre submersas. Propuseram então avaliar os perfis de plasmídios dos fermentadores, extraindo estes, por procedimentos padrão dos microrganismos cultivados, por centrifugação. Concluíram com seus experimentos que perfis distintos de plasmídios são obtidos de fermentadores individuais, sugerindo a presença de uma microflora bastante uniforme em fermentações submersas em "alta acidez" de vinagre.

Com ágar de dupla camada, contendo ácido acético, foram isoladas culturas mistas em processo submerso de fermentação acética trabalhando bem (1), em processo que tinha falhado (2) e em acetador rápido. Os meios de isolamento e cultivo usados foram o ágar de Carr (Carr, 1968) e o ágar W (Wiame), de acordo com Wiame et al. (citado por Kittelmann et al., 1989). Os organismos de referência *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* (DSM 2002), *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* (DSM2004), *Acetobacter peroxydans* (DSM 2006) e *Gluconobacter oxidans* subsp. *suboxydans* (DSM 2003) foram fornecidos pelo *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen* (DSM). Desenvolveram o seguinte método para o crescimento das bactérias acéticas, depois que numerosos outros meios e métodos falharam. Na torneira de saída do vinagre fermentando no reator, rinsou em placas de ágar W, vertendo as placas imediatamente. Assim, uma camada fina de vinagre permaneceu na superfície do ágar. O plaqueamento de 0,1 mL ou de 1 mL de cultura líquida no ágar de W foi ineficiente; estrias com uma alça de inoculação nesse meio resultaram somente no crescimento das células do fermentador contínuo para baixa concentração de ácido acético. Quando o pH foi variado entre 2 e 4,7 no ágar W e a concentração de ácido acético foi aumentado por etapas de 0% a 5,25% (p/v) em pH 3, as circunstâncias usadas por Wiame

provaram ser muito apropriadas (3% p/v ácido acético, pH 3). O crescimento ocorreu somente em áreas das placas que estavam úmidas por muito tempo. Quando a concentração do ágar foi baixada a 6 g/L, camadas mais grossas de células e colônias maiores foram obtidas. Uma melhoria adicional foi conseguida aumentando a concentração de glicose a 30 g/L. Dois tipos de colônias podiam ser diferenciados macroscopicamente nos últimos meios. Os isolados não cresceram bem e algumas vezes não cresceram em ágar inclinado. O crescimento das linhagens acetofílicas foi conduzido em uma atmosfera umidificada, incubando as placas em sacos plásticos. A exigência quanto à umidade para o crescimento em meio sólido parece ser uma característica geral de bactérias do ácido acético isoladas nas instalações de produção do vinagre. Outros autores relataram também os métodos de cultivo similares. O crescimento do *A. acidophilum* (Wiame et al., citados por Kittelmann et al., 1989) e das diversas culturas de *Acetobacter* de fermentadores industriais (Hitschmann & Meyrath, citados por Kittelmann et al., 1989) foi possível por umidificação da superfície das placas com água ou álcool diluído. Hildebrandt et al. (citados por Kittelmann et al., 1989) descreveram que cultivos sólidos em superfície de organismos isolados de fermentação submersa foram mantidos em sacos selados de polietileno. Vinte e três linhagens de bactérias acéticas foram isoladas de cinco diferentes fermentadores de vinagre (Kittelmann et al., 1989).

Em estudo sobre a oxidação de etanol a ácido acético por bactérias do gênero *Acetobacter*, livres e imobilizadas em géis hidrofílicos, Moraes (1991) trabalhou com linhagens provenientes das coleções de cultura *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - DSM*, *National Collection of Industrial Bacteria - NCIB*, *Collection of the Institute Pasteur - CIP* e linhagem (CCT 2013) isolada de caqui em decomposição, pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello. Utilizou quatro diferentes meios de cultura com procedimentos distintos para obter pré-inóculos com densidade celular elevada.

Swings (1992), em uma importante revisão sobre bactérias acéticas, observou que na literatura antiga vários procedimentos são indicados para o isolamento de bactéria acética. Quando a expectativa é de um pequeno número de células indica-se um enriquecimento. Pela experiência do autor, em muitos tipos de cerveja e vinho não há o crescimento de bactéria acética, presumivelmente pela presença de conservantes. Descreve várias técnicas usadas para o isolamento de algumas espécies destas bactérias, entre elas, os meios usados por Vaughn (citado por Swings, 1992), os procedimentos de isolamento, segundo Frateur (citado por Swings, 1992), Frateur & Simonart (citados por Swings, 1992), Shimwell (citado por Swings, 1992), para culturas da "verdadeira bactéria de trabalho" do acetificador de vinagre. Indicou o seu procedimento para isolamento de bactéria acética de flores ou de frutas, o de fábrica de cidra descrito por Carr & Davies (citados por Swings, 1992) e Passmore & Carr (citados por Swings, 1992), o meio proposto por Maugent (citado por Swings, 1992) e por último o isolamento de *Acetobacter diazotrophicus*, de cana-de-açúcar, por Cavalcante & Döbereiner (1988).

Microrganismos originários de vinagre com alto teor de ácido acético não são capazes de crescer em meios usados para isolar bactérias acéticas já descritas. Essa desvantagem foi superada com a técnica da dupla camada proporcionada por Entani et al. (1985). E, fazendo uso dessa técnica, Sievers et al. (1992) compararam linhagens isoladas de fermentações de vinagre da Alemanha e Suíça com espécies de linhagens tipo de *Acetobacter* e *Gluconobacter* por hibridação DNA-DNA. As colônias foram obtidas de cultura submersa por estriamento, a partir de caldo de fermentação diluído assepticamente e de geradores rápidos tomando filme de bactéria diretamente sobre a placa com ágar AE modificado, de dupla camada, incubada a 30°C por 7 a 14 dias, entre 92 e 96% de umidade relativa. Foram obtidas 24 linhagens de *Acetobacter*.

Acetobacter diazotrophicus é isolada em meio LGI-P semi-sólido, com alta concentração de sacarose. Alíquotas de diluições seriadas de amostras de raízes, folhas e colmos das plantas testadas são inoculadas no meio e incubadas a 30°C. Após sete dias,

ocorre a formação de uma película de cor laranja, sendo que o meio abaixo da película fica incolor, devido à assimilação do azul de bromotimol pelas bactérias. A película é então riscada em placas, contendo meio LGI-P sólido, acrescido de extrato de levedura incubada a 30°C, por uma semana. As colônias formadas são pequenas e de cor laranja. Cultivo em meio líquido pode ser feito em LGI ou LGI-P, acrescido de extrato de levedura (Reis et al., 1994; Döbereiner et al., 1995).

Bactérias acéticas termotolerantes foram isoladas de diversas frutas da Tailândia sob diferentes condições. Cerca de 20 g de cada fruto foram cortados em pedaços pequenos e colocados em frascos cobertos com gaze esterilizada para prevenir contaminação por inseto. Em cada frasco, adicionou-se 40 mL de água destilada, contendo 2 ou 4% de ácido acético e 4 ou 6% de etanol ou água de coco esterilizada e emergiu-se a amostra de fruta. Os frascos foram incubados estaticamente a 30 ou 37°C. Após 3, 5 e 7 dias de incubação, várias alçadas da amostra foram estriadas em placas com ágar *YPG* (0,5 g de extrato de levedura, 0,5 g de peptona, 1,0 g de glicerol, 0,5 g de CaCO₃ e 1,5 g de ágar) suplementado com 4% de etanol ou em placas de ágar água de coco contendo etanol a 4% e 3 mg de purpura de bromocresol por 100 mL. As colônias que apresentavam halos em ágar *YPG* ou colônias amarelas em placas de ágar água de coco, ambas indicando produção de ácido, sendo então coletadas (Saeki et al., 1997a; Saeki et al., 1997b).

Bactérias acéticas foram isoladas também de usina de açúcar e álcool, em trabalho apresentado por Maeda (1997). Os pontos de coleta das amostras ocorreram na fase de moagem da cana-de-açúcar da unidade industrial. Nas etapas de isolamento, purificação e triagem de linhagens produtoras de ácidos, foram utilizados seis diferentes meios. Como resultado, foram isoladas 104 linhagens da usina e uma de indústria de vinagre.

Sokollek & Hammes (1997) descreveram o preparo de cultura iniciadora para fermentação de vinagre em comunicação para a comunidade acadêmica. Partiram de

linhagem isolada em acetador de vinagre em funcionamento. A linhagem foi isolada da indústria com uma estriagem direta feita nas placas com meio AE. As colônias foram purificadas por repetidas estrias da cultura em placas com meio AE. Da cultura do acetador e de diversas culturas puras obtidas, foram extraídos plasmídios para a determinação do perfil. Como o perfil do isolado era idêntico ao da cultura do acetador, ele foi considerado representante da linhagem predominante no acetador.

Outros dados apresentados no mesmo trabalho conduzido pelos autores Sokollek et al. (1998a) relatam dez linhagens de bactérias acéticas investigadas quanto às características de crescimento e metabolismo. As linhagens foram colhidas na produção de vinagre industrial no Sul da Alemanha. No momento do isolamento, no acetador industrial, as concentrações totais, isto é, ácido acético (p/v) mais etanol (v/v), dos vinagres em fermentação, estavam entre 6,1 e 14,9%. Uma estria direta era feita sobre placas com ágar AE (4a/3e). As culturas foram purificadas por repetidas estrias em placas com ágar AE (4a/3e).

No estudo da modelagem cinética do crescimento de *Acetobacter aceti* em cultura descontínua, o microrganismo usado nos experimentos foi isolado de uma unidade produtora de vinagre na região de Jerez (Espanha), classificado como *Acetobacter aceti* ATCC 15973. E um meio sintético complexo (6% YEPE⁹) foi usado para cultivar os microrganismos (Ory et al., 1998).

Bactéria termotolerante com alta produção de ácido acético foi isolada em Taiwan, a partir de banana em decomposição. A linhagem I14-2 foi identificada como *Acetobacter* sp., de acordo com suas características fenotípicas e quimiotaxonômicas. O procedimento do isolamento no experimento foi primeiramente enriquecimento em meio a 30°C com agitação em incubador rotatório a 150 rpm, por 3 a 5 dias. O meio continha(g/L) caldo dextrose batata, 110; peptona, 3; extrato de levedura, 5; etanol, 5; ácido acético, 0,3;

⁹ Composição do meio: 10 g.L⁻¹ de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona, 60 g.L⁻¹ etanol absoluto.

pH 4,2. O meio (meio AC), modificado de Yamada (citado por Lu et al., 1999) foi usado para isolar bactérias produtoras de ácido acético do meio de enriquecimento. O meio AC é constituído de todos os componentes do meio de enriquecimento, exceto ácido acético e acrescido de (g/L) CaCO₃, 5 e ágar, 20. Para a avaliação da produção de ácido acético, as linhagens foram crescidas em 10mL do meio por 2 dias e 1,5 mL de cultura líquida foi transferida para 50 mL de meio e incubadas a 30°C com agitação de 150 rpm por 2 dias. O meio de Saeki (citado por Lu et al., 1999) modificado foi usado como meio iniciador e continha (g/L): glicerol, 5; dextrose, 5; peptona, 5; extrato de levedura, 5; etanol, 20; ácido acético, 2 e pH 4,3. A cultura principal foi preparada inoculando-se 1mL do segundo meio num meio contendo (g/L): glicerol, 2; dextrose, 30; peptona, 2; extrato de levedura, 2; etanol, 50; ácido acético, 2 e pH 4,1, sendo agitado a 50 rpm por 3 dias. A cultura foi centrifugada a 4°C e 13000 g por 15 min, e no fluido sobrenadante coletado determinou-se a quantidade de ácido acético, etanol e ácido glicônico (Lu et al., 1999).

2.7 Preservação de Bactérias

A preservação de microrganismos é decorrente do fato de certas linhagens apresentarem características com significativa importância industrial e científica. É relevante que as linhagens preservadas não percam suas características fundamentais nem ganhem outras. Essas modificações podem ocorrer por mutação ou perda de plasmídios. Logo, o método de preservação deve minimizar esses possíveis problemas (Kirsop & Doyle, 1991).

Ainda durante o processo de preservação dos microrganismos, as células podem morrer na estocagem, resultando em baixos níveis de viabilidade. Mais uma vez, o método usado deve minimizar essa queda de viabilidade celular e manter a cultura viva por longo período (Kirsop & Doyle, 1991).

2.7.1 Preservação de microrganismos e estocagem em nitrogênio líquido

Podem-se utilizar várias técnicas para a preservação de microrganismos e cada uma delas guarda suas vantagens e desvantagens. A escolha para o uso de uma em particular é determinada pelas necessidades de cada procedimento. Os principais métodos são: 1) subcultura; 2) secagem, que pode utilizar sílica gel, *kieselguhr*, terra ou areia, discos de papel ou gelatina; 3) liofilização, 4) congelamento, em frascos a -70°C ou em nitrogênio líquido (Kirsop & Doyle, 1991).

Na preservação por congelamento, a água não está disponível para o microrganismo, e as células desidratadas são estocadas a baixas temperaturas. Danos nas células podem ocorrer durante o processo de congelamento ou descongelamento. Fatores como a concentração de eletrólitos da água removida como gelo ou pela formação de cristais afetam a integridade celular. Na tentativa de minimizar os danos causados pela taxa de resfriamento e aquecimento, adicionam-se líquidos solúveis em água, como dimetil sulfóxido ou glicerol na suspensão de células, na concentração de 10%, protegendo-a e prevenindo a formação de cristais de gelo. A adição de tais agentes, chamados de crioprotetores, é a forma habitual de conservar cultivos microbianos a baixas temperaturas (Kirsop & Doyle, 1991; Madigan et al., 1997).

Temperaturas de -20 , -30 , -40 , -70 , -140 e -196°C podem ser usadas. Em geral, as temperaturas acima de -30°C apresentam resultados ruins e podem ser explicadas pela formação de uma mistura eutética que expõe a célula a uma alta concentração de sal. Estocagem a -70°C tem sido usada para diferentes microrganismos, incluindo bactérias, fungo, micoplasma, protozoários e vírus. Estocagem a -140°C (em vapor de nitrogênio) e -196°C (em nitrogênio líquido) é usada com sucesso para preservação de microrganismos e culturas que não podem ser mantidas de outra forma (Becker, 1990; Kirsop & Doyle, 1991).

Estocagem em nitrogênio líquido ou a vapor é um método de preservação aplicado universalmente. Preservam-se com sucesso fungos, bacteriófagos, vírus, algas, protozoários, bactérias, leveduras, células animais e vegetais e cultura de tecidos. Em alguns microrganismos, incluindo as linhagens modificadas por engenharia genética, uma alta porcentagem de células na população pode sofrer modificação e morrer nos processos de aquecimento e resfriamento. Os prejuízos podem ser minimizados pelo uso de crioprotetores e ajuste nas condições de crescimento e taxa de aquecimento e resfriamento. Embora as características genéricas pareçam ser preservadas sem alterações, durante o período de estocagem, têm sido reportadas algumas mudanças nucleares e nos plasmídios. O conhecimento corrente sugere que a longevidade e a estabilidade de culturas por esse método é maior e melhor do que para células liofilizadas. Atualmente, a estocagem em nitrogênio líquido é o método selecionado para preservação e estocagem de culturas de alto valor (Becker, 1990; Kirsop & Doyle, 1991).

As principais desvantagens desse método são a evaporação do nitrogênio, devendo o mesmo ser repostado regularmente. Qualquer interrupção ou acidente com o recipiente pode causar a perda total da coleção. Mencione-se ainda o alto custo do nitrogênio (Kirsop & Doyle, 1991).

2.7.2 Preservação de bactéria acética

Todas as 33 culturas obtidas de bebidas destiladas e as linhagens obtidas da ATCC testadas por Cirigliano (1982) no desenvolvimento de um meio seletivo para isolamento e diferenciação foram mantidas em ágar manitol e repicadas semanalmente em caldo manitol.

Linhagens isoladas por Ohmori et al. (1982) foram mantidas em ágar inclinado e estocadas a 4°C, sendo transferidas para outro meio a cada dois meses.

Segundo De Ley et al. (1984), *Acetobacter* tem sido mantida a 4°C em meio padrão (GYC)¹⁰ e transferida mensalmente. Muitas linhagens permanecem viáveis por três meses quando mantidas em meio e tubos próprios. Algumas linhagens *A.pasteurianus* classificadas como *A. peroxydans*, *A.pasteurianus* subsp. *paradoxus* e subsp. *ascendens*, incapazes de crescer em GYC, são preservadas ou em MYP¹¹ ou em Carr modificado¹². O último não é desejável para manutenção, pois as células morrem rapidamente. Linhagens de *Acetobacter* sobrevivem liofilizadas por 10 anos. Outro método é o da preservação em nitrogênio líquido.

O meio usado por Nanba et al. (1984) para estocar *Acetobacter* sp. I-39 Mitsukan (Nakano Vinegar Co. Ltda., Aichi, Japão) era composto por glicose, extrato de levedura, peptona, ágar e carbonato de cálcio. As linhagens eram mantidas em tubo inclinado, a 28°C por dois dias e depois a 4°C, posteriormente, eram repicadas a cada três semanas.

As amostras coletadas por Teuber et al. (1987) em 19 fermentadores, em escala laboratorial e industrial, produzindo de 12 a 13% de concentrações finais de ácido acético, foram estocadas a 4°C.

Kittelman et al. (1989) não conseguiram preservar a 4°C culturas acetofílicas, designadas pelos autores como aquelas capazes de crescer em meio contendo ácido acético.

Swings (1992) reporta que bactérias do ácido acético podem ser conservadas por mais de 10 anos quando liofilizadas ou mantidas em determinados meios a 4°C, devendo ser transferidas mensalmente. Algumas linhagens vigorosas podem ser mantidas vivas por dois meses ou mais, a 4°C.

¹⁰ O meio GYC é composto por 5% D-glicose, 1% extrato de levedura, 3% CaCO₃ e 2,5% ágar.

¹¹ O meio MYP é formulado em g/L com: 5g de extrato de levedura, 25g de manitol, 3g peptona e 25g de ágar.

¹² O meio Carr modificado é composto em g/L por 30 g de extrato de levedura, 20 g de etanol e 20 g de ágar.

Acetobacter europaeus foi descrita como a principal bactéria presente em fermentadores industriais na Europa Central. É mencionada a dificuldade de manter culturas de bactérias acéticas em meios semi-sólidos e levá-los para meio líquido após preservação. Uma linhagem obtida do fermentador submerso foi mantida por congelamento a -70°C com glicerol 25% e depositada na DSM (Sievers et al., 1992). Os autores relataram ainda que poucas linhagens de sua coleção de cultura foram adequadamente preservadas (Sievers & Teuber, 1995, citados por Sokollek et al., 1998 a).

Acetobacter diazotrophicus não sobrevivem por muito tempo em meio ágar batata-P. Podem ser estocadas em glicerol 50%, mas antes devem crescer em meio específico até alcançarem o final da fase logarítmica, misturadas na proporção de 1:1 com glicerol estéril e transferidas para microtubos. Devem ser armazenadas, então, em temperatura entre -70° a -20°C. Essas bactérias podem também ser estocadas por muitos anos em nitrogênio líquido (Döbereiner et al., 1995).

Culturas coletadas de diversas frutas de várias regiões da Tailândia foram mantidas em tubo inclinado com ágar batata. Alternativamente, a cultura foi misturada com igual volume de glicerol esterilizado com uma concentração final de 50% e estocada em congelador a -80°C (Saeki et al., 1997a; Saeki et al., 1997b).

Sokollek & Hammes (1997) descreveram um meio e um método de preparo de cultura iniciadora usando *Acetobacter* sp LTH 2460. O crescimento desta linhagem em meio RAE (meio ácido acético-etanol reforçado) foi melhor que em meio AE (ácido acético-etanol). A recuperação de células congeladas foi de 100% quando usou extrato de malte como crioprotetor. Já para as células liofilizadas a porcentagem recuperada foi de 10%. Os liofilizados mantiveram a qualidade para atuar como iniciadoras por um período de 21 meses.

Sokollek et al. (1998a) reforçaram o uso de extrato de malte 20% como crioprotetor efetivo para a preservação de todas as dez linhagens isoladas de indústrias produtoras de vinagre do Sul da Alemanha. Após a revitalização, as culturas apresentavam-se apropriadas como inóculo de fermentações em acetadores piloto.

Ory et al. (1998), na etapa de inoculação para estudo da modelagem cinética de crescimento de *Acetobacter aceti* em cultivo descontínuo, conservou a cultura em glicerina, mantendo-a a -20°C.

Em estudo sobre a fermentação de ácido acético semi-contínua e em batelada, usando reator não comercial com coluna tipo bola equipado com um pulverizador gás-líquido, para teste em reator em batelada, usou-se *Acetobacter pasteurianus* (CECT 824, *Spanish National Collection of Standard Culture*). Esses organismos foram mantidos em meio sólido contendo glicose, extrato de levedura, peptona e repicados a cada dois meses. Fregapane et al. (1999) usaram, para fermentação semi-contínua, uma cultura microbiologicamente indefinida, da indústria de vinagre, mantida em meio líquido (vinho/vinagre na proporção de 30/70) e preservada a -50°C com glicerol 20% (p/p).

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Microrganismos

Foram utilizadas, para comparação com os isolados de unidades produtoras de vinagre que operavam em valores de "concentração total" variando de 6 a 11%, quatro linhagens liofilizadas de *Acetobacter* sp. e uma linhagem de *Gluconobacter* sp. obtidas na coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, sediada em Campinas-SP. Tais linhagens foram as seguintes:

1. *Acetobacter aceti* (Pasteur) Beijerinck CCT 0190, CIP 58.66 - Lab. Ident. Inst. Pasteur, Paris, França (1958)
2. *Acetobacter aceti* (Pasteur) Beijerinck CCT 1724, DSM 2002
3. *Acetobacter pasteurianus* (Hansen) Beijerinck CCT 1706
4. *Acetobacter* sp., CCT 0173
5. *Gluconobacter oxydans* subsp.. *suboxydans* CCT 0174

3.1.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nas diversas etapas do trabalho estão relacionados na Tabela 3 com seus respectivos números, siglas e usos.

Tabela 3. Relação de meios de cultura e os respectivos usos neste trabalho.

Meio	Nome e Sigla	Uso	Referência
1	<i>Yeast Glucose (YG)</i>	Isolamento e purificação	Ohmori et al. (1980)
2	<i>Yeast Glucose Manitol (YGM)</i>	Isolamento e purificação	Ohmori et al. (1980)
3	<i>Manitol Yeast Peptone (MYP)</i>	Isolamento, purificação, resistência ao etanol e ácido acético e crescimento	De Ley et al. (1984)
4	<i>Suomalainem</i>	Isolamento e purificação	Suomalainem et al. (citado por De Ley et al., 1984)
5	<i>Moraes</i>	Isolamento, purificação e produção	Moraes (1991)
6	<i>Dextrose Sorbitol Manitol (DSM)</i>	Diferenciação, crescimento e purificação.	Cirigliano (1982)
7	<i>Ácido acético/Etanol (AE)</i>	Isolamento e purificação	Entani et al. (1985)
8	<i>Reforçado Ácido acético/Etanol (RAE)</i>	Crescimento, purificação e produção	Sokollek & Hammes (1997)
9	<i>Carr</i>	Diferenciação	Carr (1968)

A Tabela 4 apresenta a composição dos meios usados. Tanto o etanol como o ácido acético foram esterilizados por filtração em membrana 0,22 μm e adicionados após autoclavagem nos meios 1, 2, 4, 5, 7, 8 e 9.

Tabela 4. Composição de meios de cultura.

Meio	Fonte de Carbono (g * L ⁻¹)	Fonte de Nitrogênio (g * L ⁻¹)	Etanol (mL * L ⁻¹)	Ácido Acético (mL * L ⁻¹)	Minerais (g * L ⁻¹)	Outros (g * L ⁻¹)
1	Glicose 20	Extrato de levedura 5	50	60	KH ₂ PO ₄ 0,27 MgSO ₄ 0,05 Na ₂ HPO ₄ 0,26	Ágar 10
2	Glicose 20 Manitol 20	Extrato de levedura 10	20	5		Ágar 10
3	Manitol 25	Extrato de levedura 5 Peptona 3				Ágar 10
4		Extrato de levedura 5	15			Ágar 10
5	Glicose 10	Extrato de levedura 10 Peptona 10	40	10		Ágar 10
6	Glicose 1 Lactato de cálcio 15 Manitol 2 Sorbitol 1	Extrato de levedura 3,3 Proteose peptona 10			KH ₂ PO ₄ 1 MnSO ₄ 0,02	Actidiona 0,1 Ágar 10 Púrpura de bromocresol 0,03 Verde brilhante 29µg
7	Glicose 5	Extrato de levedura 2 Peptona 3	20	10		Acetozin® DS 1,5 Ágar 10
8	Glicose 40	Extrato de levedura 10 Peptona 10	20	10	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 3,38	Ácido cítrico 1,5 Ágar 10
9		Extrato de levedura 30	20			Ágar 10 Verde bromocresol 22µg

3.1.3 Descrição do local e dos fermentadores onde foram isoladas bactérias acéticas

As bactérias acéticas foram coletadas de fermentadores de vinagre que operavam em concentração total variando de 6 a 11%. No total foram coletadas amostras em seis locais diferentes, sendo três unidades produtoras de vinagre, localizadas no estado de São Paulo. Uma é considerada de grande porte, com produção de aproximadamente 15.000 m³/ano e duas de médio porte, com 10.000 m³/ano. Essas produzem vinagre de vinho tinto, branco, maçã, laranja, álcool e Agrin, pelo processo submerso. Os três outros locais foram centros de pesquisa que trabalham com fabricação de vinagre. As amostras foram coletadas de fermentadores rápido e submerso. Nos fermentadores rápidos a CT variou na faixa de 6 a 8% e estavam instalados na Fundação de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, em Campinas, e no Centro de Pesquisa em Ciência, da Fundação Educacional do Município de Assis. Por último, note-se o fermentador submerso, pertencente à empresa Frings Microdyn do Brasil, com CT de trabalho na faixa de 10 a 14,5%.

Os isolados foram coletados nos equipamentos descritos a seguir e o método usado será apontado posteriormente.

3.1.3.1 Dorna de fermentação acética submersa das indústrias vinagreiras

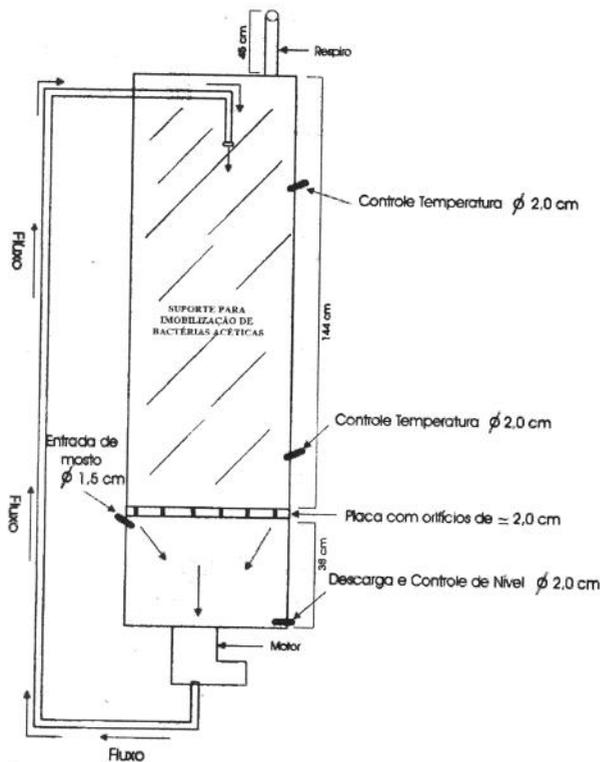
No processo de fermentação em estudo, as bactérias acéticas encontravam-se submersas no líquido a fermentar. Embora disponham de equipamentos com tamanhos diferentes, as indústrias vinagreiras utilizam modelos similares, trata-se de dornas, construídas em madeira de carvalho (*Quercus* sp.). Nesses equipamentos, opera-se da seguinte maneira: a cada período compreendido entre 10 e 20 horas, um volume correspondente a 1/3 do volume total é retirado do reator como vinagre. A concentração total (CT) média é de 11% e a acidez em ácido acético do vinagre produzido está em torno 10%.

3.1.3.2 Acetador rápido para fermentação acética em operação na Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA

O material de construção do acetificador é policloreto de vinila. Suas dimensões geométricas são altura 182 cm, diâmetro 44 cm e volume total de 276 litros. Dispõe de dois condensadores de vidro, tipo bola, ligados em série, que atuam como resfriadores para manter a temperatura de operação na faixa de 30 a 34° C. As figuras 3 e 4 mostram o acetador.

O reator tem instalado um medidor de vazão de área variável e válvula agulha, permitindo controle de vazão na faixa de 80 L/hora. Apresenta uma coluna preenchida por partículas de bambu (*Bambusa* sp.), de aproximadamente 2 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro, que servem de suporte para imobilização das bactérias acéticas.

O líquido recircula dentro do reator por bombeamento. A parte superior possui um dispositivo aspersor. O mosto em fermentação passa pela parte central do fermentador, onde ocorre a oxidação do álcool a ácido acético. Na parte inferior, coleta-se o vinagre quando pronto.



Volume Total = 290 litros

Figura 3. Esquema do acetificador rápido

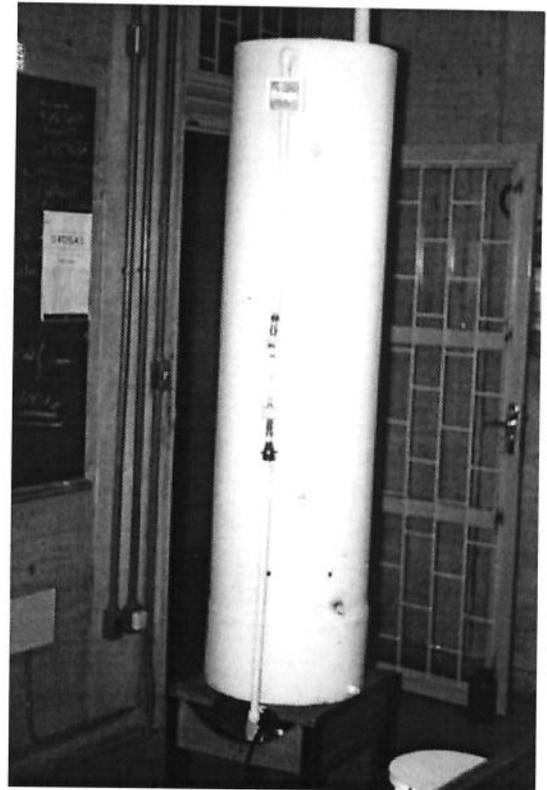


Figura 4. Acetificador rápido

3.1.3.3 Acetador submerso Frings

A Figura 5 apresenta um acetador submerso Frings. Foram coletadas amostras durante o desenvolvimento do trabalho em um fermentador desse tipo que operava na empresa Frings Microdyn do Brasil. O processo de fermentação acética conduzido com os isolados selecionados foi desenvolvido também em um acetador piloto desse tipo. A forma de operação do equipamento está descrita a seguir.

O mais importante componente desse reator é o sistema de aeração. Com a pressão exercida pela rotação da turbina, o aerador aspira o ar ambiente. Este, por sua vez, é previamente filtrado em carvão ativado antes de passar pelo tubo de aspiração e ser introduzido, em movimento descendente, até alcançar o estator, misturando-se então com o líquido contido dentro do fermentador.

O sistema de aeração produz microbolhas de ar, com diâmetro de 1 a 2 mm e vazões entre 0,3 e 0,4 volumes de ar por volumes de meio por minuto (vvm). As microbolhas são introduzidas no fundo do fermentador por meio das turbinas aeradoras, provocando uma agitação intensa no meio. O tempo de retenção é máximo pois as microbolhas têm tendência de subir mais lentamente que bolhas maiores. Ocorre, assim, uma excelente troca do oxigênio dissolvido em todo o perfil do fermentador. As microbolhas têm uma maior superfície de contato com o líquido, atingindo em situações de fermentação homogênea, sem turbulência e zonas mortas, um valor de até 80% de oxigênio dissolvido.

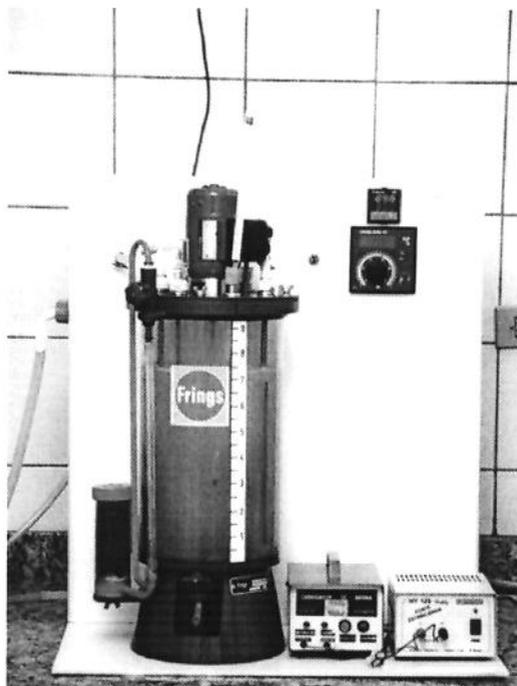


Figura 5. Acetificador submerso Frings

3.2 Métodos

3.2.1 Amostragem

Esta etapa do estudo consistiu em coletar amostras de suspensão de células de bactérias acéticas nas unidades produtoras de vinagre, objetivando-se estabelecer um procedimento padrão para isolamento de linhagens de bactérias acéticas de unidades produtoras de vinagre do Brasil. O procedimento de amostragem deve recuperar quantitativamente a população de microrganismos presentes, independentemente do tipo e das condições da fermentação. As primeiras etapas do estudo consistem em testar diferentes formas de amostragem, a saber:

- 1) Retirada de uma alíquota de aproximadamente 200 mL de suspensão a partir do ponto de amostragem da dorna de fermentação submersa em funcionamento e 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 vertidas nas placas com meio a 1,5% de ágar e espalhadas com alça de *Drigalski*. A incubação em estufa bacteriológica foi a 30° C, por 96 horas. Após o período de crescimento, efetuou-se o isolamento e purificação das colônias obtidas, de acordo com metodologia proposta por Pelczar et al. (1982).
- 2) A coleta da amostra foi como na etapa anterior, mudando a técnica de preparo do meio, que passou a ser 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 diluídas e a incubação em estufa bacteriológica foi a 30° C, por 96 horas. A umidade relativa no interior da estufa mostrou-se superior a 90%, medida através de termohigrômetro.
- 3) Para as coletas no reator rápido foram retiradas as partículas do suporte de enchimento da coluna, tratou-se a partícula com solução salina a 0,85%, inoculou-se 0,1 mL da

amostra diluída em placas e espalhou-se com alça de *Drigalski*, sempre em duplicatas, incubando-se em estufa bacteriológica a 30° C, por 96 horas e com umidade relativa >90%. O preparo do meio deu-se de acordo com a técnica da dupla camada.

Partindo-se dos resultados preliminares obtidos, que apontaram para o caminho a ser seguido, passou-se a realizar a tomada de material de forma sistematizada, levando em consideração os detalhes operacionais e estabelecendo protocolos a serem seguidos. Durante os anos de 1998 a 2001, realizaram-se nove coletas de amostras em diferentes locais de produção de vinagre. Cada coleta será descrita a seguir com detalhes operacionais.

1ª Coleta

Amostras foram coletadas de oito dornas de fermentação submersa, na indústria 1, localizada no oeste do Estado de São Paulo.

O substrato nas dornas de fermentação foi complementado em nutrientes com adição de Acetozim DS[®] (minerais e aminoácidos produzido pela Frings Co.) e sulfato de manganês.

A amostra coletada foi inoculada em placas, no próprio local, com os meios sólidos de 1 a 6 (Tabela 4) preparados 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 espalhadas nas placas com alça de *Drigalski*. A incubação em estufa bacteriológica foi a 30°C por 96 horas. A Tabela 5 apresenta dados operacionais da indústria na data da coleta.

Tabela 5. Dados referentes à 1ª Coleta.

Indústria 1		Data da coleta: 03.09.1999			
Dorna	Temperatura (°C)	Ácido acético % (p/v)	Etanol % (v/v)	Concentração total % (CT)	Substrato
1	33	10,26	0,54	10,80	Álcool
2	33	8,10	2,40	10,50	Álcool
3	33	8,46	2,14	10,60	Álcool
4	33	10,02	0,78	10,80	Álcool
6	33,5	8,94	1,66	10,60	Álcool
7	34	8,34	2,16	10,50	Álcool
8	34	9,48	1,14	10,60	Álcool
9	34	8,58	1,92	10,50	Álcool

2ª Coleta

Essa etapa teve por objetivo testar procedimento de amostragem em processo de fermentação rápida e observar o isolamento de bactérias acéticas frente a fatores como tempo e temperatura de incubação, nutrição, técnica de semeadura e preparo de meio de cultura.

Foram retiradas amostras do fermentador rápido que operava no Centro de Pesquisa em Ciência, da Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA (Figuras 3 e 4).

Os dados operacionais do acetador rápido foram temperatura de 32°C, concentração total (CT) de 6,35%, sendo 1,7% (v/v) de etanol e 4,65% (p/v) de ácido acético, com álcool como substrato.

As amostras coletadas no mês de janeiro de 2000, inoculadas na proporção de 5% nos meios líquidos 7 e 8 (Tabela 4), foram levadas para incubadora rotatória a 120 rpm, 30° C, por 12 dias. Acompanhou-se o crescimento microbiano usando-se câmara de *Neubauer* e azul de *trypan* como corante vital¹³ até atingir uma contagem global de 10¹⁰ células/mL. Uma contagem de células de 1,0 x 10⁹/mL foi considerada essencial para uma produção rentável de iniciadoras (Sokollek & Hammes, 1997). Depois, foram diluídas na faixa de 10⁻⁴ até 10⁻⁸, semeadas 0,1 mL em placas e espalhadas com alça de *Drigalski*, sempre em duplicatas. As placas com meio de cultura utilizadas na amostragem foram preparadas segundo a técnica da dupla camada (Entani et al., 1985) e mantidas em estufa bacteriológica a 30° C, por 168 horas. Foram testados os meios sólidos de cultura numerados 7 e 8. Em paralelo, na mesma faixa de diluição, estimou-se a população através do número mais provável (NMP), para comparar as duas técnicas.

3ª Coleta

Novamente, buscou-se material da indústria 1 e amostraram-se as nove dornas. As condições operacionais são apresentadas na Tabela 6.

Selecionaram-se os meios sólidos de 1 a 8 (Tabela 4) para o isolamento, preparados segundo a técnica da dupla camada, descrita por Entani et al. (1985). O procedimento adotado foi o mesmo da 1ª Coleta, porém, as amostras foram diluídas para serem plaqueadas. Esse procedimento foi conduzido na própria planta, sem levar em consideração as condições ideais para manipulação de microrganismos. As amostras foram incubadas em estufa bacteriológica com alta umidade relativa (≥ 90%) e mantidas a 30° C por 96 horas. A contagem da população das dornas foi realizada concomitantemente à coleta pela técnica de contagem direta com corante azul de *trypan*.

¹³ Técnica da contagem de viáveis com corante vital será descrita adiante (item 3.2.7.1).

Tabela 6. Dados referentes à 3ª Coleta.

Indústria 1		Data da coleta: 25.02.2000					
Dorna	Temperatur a(°C)	Ácido acético % (p/v)	Etanol % (v/v)	Concentração total CT (%)	População total UFC/mL	Substrato	
2	33	9,24	1,1	10,34	4,35 x 10 ⁹	Álcool	
3	33	7,86	2,7	10,56	7,06 x 10 ⁸	Álcool	
4	32	8,52	2,0	10,52	3,45 x 10 ⁸	Álcool	
5	32	7,80	2,8	10,60	2,67 x 10 ⁸	Álcool	
6	33	9,00	1,0	10,00	3,35 x 10 ⁹	Álcool	
7	33	7,80	2,8	10,60	7,35 x 10 ⁸	Álcool	
8	33	7,50	3,0	10,50	4,20 x 10 ⁷	Álcool	
9	33	9,84	0,7	10,54	1,22 x 10 ¹⁰	Álcool	
11	35	9,60	1,0	10,60	4,72 x 10 ⁹	Álcool	

4ª Coleta

Esta coleta foi realizada em fermentador piloto de 8 L, na subsidiária Frings Microdyn do Brasil, sediada em Piracicaba-SP, em 10 de maio de 2000. Como dissemos em outro momento, essa empresa está vinculada à empresa Frings, que tem sede em Bonn, Alemanha. A matriz, fundada em 1878, produz tecnologias, máquinas e instalações para fábricas de vinagre. A forma de condução da fermentação está descrita a seguir.

Ao substrato alcóólico de milho mais arroz que estava sendo processado na data da coleta, houve adição de 1,2 g/L de Acetozim DS[®] e 0,6 g/L de sais minerais produzidos pela Frings. A concentração total (%CT) foi de 10,3 e as concentrações de etanol foram de 0,5% (v/v) e 9,8% (p/v) de ácido acético. A temperatura de operação foi de 30°C e selecionaram-se os meios de 1 a 8 (Tabela 4).

5ª Coleta

O local de coleta foi a indústria 2, localizada na região sudeste do Estado de São Paulo. Os parâmetros de operação das dornas estão apresentados na Tabela 7. A coleta foi realizada em junho de 2000. No próprio local houve inoculação nos meios sólidos 2, 3, 4, 7 e 8 (Tabela 4) previamente preparados, em duplicatas.

Outra coleta foi realizada na indústria 3, distante 100 km da indústria 2. Os parâmetros de operação das dornas estão apresentados na Tabela 8. A coleta foi realizada no mesmo dia da indústria 2. As amostras foram inoculadas no próprio local, usando os meios sólidos 2, 3, 4, 7 e 8 (Tabela 4).

Tabela 7. Dados referentes à 5ª Coleta.

Indústria 2		Data da coleta: 13.06.2000				
Dorna	Temperatura (°C)	Ácido acético % (p/v)	Etanol % (v/v)	Concentração total CT (%)	Substrato	
1	33	6,5	1,0	7,5	Vinho branco	
2	33	7,2	1,2	8,4	Álcool	
3	31	8,9	1,6	10,5	Álcool	
5	33	8,6	1,2	9,8	Vinho tinto	

Tabela 8. Dados referentes à 5ª Coleta.

Indústria 3		Data da coleta: 13.06.2000				
Dorna	Temperatura (°C)	Ácido acético % (p/v)	Etanol % (v/v)	Concentração total CT (%)	Substrato	
39	32	8,3	2,5	10,8	Álcool	
38	32	9,0	1,0	10,0	Vinho tinto	
37	32	8,5	2,0	10,5	Vinho branco	

6ª Coleta

O local de coleta foi na indústria 1. Amostraram-se as duas dornas em operação. As condições de trabalho são apresentadas na Tabela 9. Selecionaram-se os meios sólidos 3, 4 e 7 (Tabela 4) para o isolamento. O procedimento adotado foi o mesmo da 3ª Coleta.

Tabela 9. Dados referentes à 6ª Coleta.

Indústria 1		Data da coleta: 16.08.2000				
Dorna	Temperatura (°C)	Ácido acético % (p/v)	Etanol % (v/v)	Concentração total CT (%)	Substrato	
1	33	5,7	0,7	6,40	Cidra	
9	34	8,22	0,8	9,02	Vinho tinto	

O reator número 1 tinha tido problemas de operação e já estava parado há duas horas quando foi feita a coleta.

7ª Coleta

Atividade realizada em agosto de 2000, na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, em Campinas, Estado de São Paulo. Operava-se com gerador rápido para produzir vinagre. Este é constituído por três colunas de vidro, ligados em série, em que o líquido é bombeado e recircula por elas. O material de enchimento das colunas é bambu (*Bambusa* sp.), com dimensões aproximadas de 2 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro e servindo de suporte para imobilização das bactérias acéticas.

Na data da coleta, o substrato que estava fermentando era álcool. Coletou-se a amostra seguindo os procedimentos indicados anteriormente. O meio de isolamento foi o 3 (Tabela 4).

8ª Coleta

A Figura 6 mostra reator de bancada que opera no laboratório da FEMA. Conduziu-se coleta de material nesse reator quando se operava com substrato alcóolico de cana-de-açúcar e laranja, seguindo-se as normas pré-estabelecidas anteriormente. O meio de cultura usado no isolamento foi o 3 (Tabela 4). Os dados de operação do reator de bancada constam na Tabela 10.

Tabela 10. Dados referentes à 8ª Coleta, reator de bancada.

Ano: 2000

Data	Temperatura (°C)	Ácido acético % (p/v)	Etanol % (v/v)	Concentração total CT (%)	Substrato
13/07	29	6,0	1,2	7,20	Álcool
24/10	36	5,7	0,6	6,3	Vinho de laranja

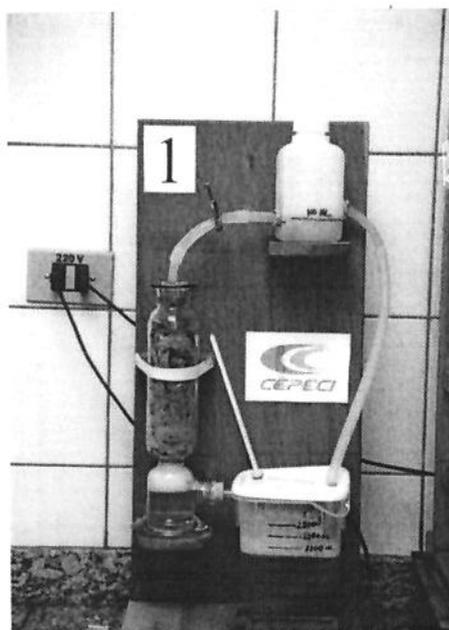


Figura 6. Acetificador rápido de bancada

9ª Coleta

Repetiu-se amostragem nas indústrias 2 e 3 conforme o procedimento padrão estabelecido para isolamento. Os dados de operação das indústrias no dia da coleta constam nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Dados referentes à 9ª Coleta.

Indústria 2		Data da coleta: 16.01.2001				
Dorna	Temperatura (°C)	Ácido acético % (p/v)	Etanol % (v/v)	Concentração total CT (%)	Substrato	
1	34	9,80	0,30	10,10	Vinho tinto	
2	34	9,80	0,60	10,40	Vinho branco	
3	34	9,90	0,30	10,20	Álcool	
4	34	6,50	0,80	7,30	Cidra	

Tabela 12. Dados referentes à 9ª Coleta.

Indústria 3		Data da coleta: 16.01.2001				
Dorna	Temperatura (°C)	Ácido acético % (p/v)	Etanol % (v/v)	Concentração total CT (%)	Substrato	
01	34	8,3	1,7	10,0	Vinho tinto	
02	35	7,7	1,5	9,2	Vinho branco	
03	34	8,9	2,0	10,9	Álcool	

3.2.2 Características morfológicas dos isolados

A observação das colônias em placas apontou as seguintes características: bordas, elevação, pigmentação, detalhes óticos, tamanho, forma e superfície (Pelczar et al., 1981; Maeda, 1997). Colônias crescidas no meio de isolamento foram observadas após 96 horas de incubação. Cada isolado obtido foi registrado com um número seqüencial seguido do número da coleta. Por exemplo, linhagem 011/01 significa que foi a décima primeira isolada na primeira coleta.

3.2.3 Purificação dos isolados

Procedeu-se à triagem dos microrganismos que se desenvolveram em cada tipo de meio. A partir das diferenças macroscópicas, as colônias foram separadas para a purificação. O critério de seleção do meio sólido de purificação da colônia foi aquele em que o microrganismo cresceu na etapa da coleta. Foi executada a técnica de esgotamento em ágar de dupla camada e incubados à temperatura de 30°C por 48 horas, como mínimo. Para a adequada purificação, repetiu-se este procedimento por no mínimo quatro vezes, acompanhando-se a pureza da cultura em microscópio ótico após a coloração de Gram (Ribeiro & Soares, 1993).

3.2.4 Triagem e identificação fenotípica ao nível de família e gênero das linhagens isoladas

A triagem foi iniciada com o teste de Coloração de Gram (Ribeiro & Soares, 1993). Posteriormente, as linhagens que apresentaram forma de bastonetes Gram negativos foram submetidas a uma rápida identificação fenotípica para diferenciar os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

Os métodos usados foram o proposto por Cirigliano (1982) com o meio de cultura *DSM* (meio 6, Tabela 4) e Carr (meio 9, Tabela 4) (Swings, 1992). A capacidade de superoxidação de 19 isolados foi observada conforme o descrito no item **3.2.10.1**.

Os testes foram acompanhados com linhagens referência de *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

3.2.5 Caracterização bioquímica das linhagens isoladas e identificadas como gênero *Acetobacter*

Os isolados identificados como *Acetobacter* foram submetidos aos testes bioquímicos citados a seguir e sua motilidade verificada pela técnica da gota pendente em lâmina escavada.

Os testes bioquímicos utilizados são descritos a seguir. Estes se deram a partir de culturas desenvolvidas em meio *MYP* (meio 3), com aproximadamente 48 horas de incubação, segundo procedimentos descritos por Carr (1968) e Entani et al. (1985).

3.2.5.1 Teste de produção de oxidase

Uma alçada da colônia crescida em ágar *MYP* (meio 3) 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.

3.2.5.2 Teste de produção de catalase

Gotas de água oxigenada (H_2O_2) a 3% foram colocadas sobre as colônias, diretamente nas placas de Petri com ágar *MYP* (meio 3). O borbulhamento indica a presença de catalase.

3.2.5.3 Teste de produção de indol do triptofano

Foram inoculados em tubos contendo 3 mL meio de cultura descrito no anexo I. Uma alíquota de 0,1 mL da cultura foi inoculada e incubada a 30°C, em agitador rotatório a 120 rpm, por 48 horas. Após esse período, foi adicionado 0,1mL do reativo de Kovacs em cada tubo, que, por sua vez, foi agitado. Após 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.

3.2.5.4 Teste de produção de proteases (gelatinases)

Os tubos foram preparados com ágar inclinado (anexo I), com inoculação de uma alçada da cultura, e incubados a 30°C, por 96 horas. Após o período de incubação, os tubos permaneceram por uma hora na geladeira e em seguida foi feita a avaliação, na qual o meio liqüefeito indica teste positivo. Os tubos foram reincubados até o 14º dia e novamente reavaliados.

3.2.5.5 Teste de redução de nitrato

Uma quantia de 0,1 mL foi inoculada em tubos contendo caldo nutriente (anexo I) com 0,1% de KNO_3 e incubados a 30°C em incubadora rotatória a 120 rpm por 6 dias. Após a incubação, foram adicionadas quantidades iguais dos reagentes A e B (anexo I). 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.

3.2.5.6 Teste de crescimento em meio de *Hoyer*

Ao meio de *Hoyer* (anexo I), 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 foi adicionada e a incubação pode chegar a 14 dias em agitador a 120 rpm, a 30°C.

3.2.5.7 Teste de produção de ácido a partir de glicose

Inoculou-se por estria a cultura no meio descrito no anexo I e incubou-se por 96 horas a 30°C em estufa com umidade relativa >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.

3.2.5.8 Teste de produção de dihidroxiacetona de glicerol

Inoculou-se por estria a cultura no meio descrito no anexo I e incubou-se a 30°C em estufa com umidade relativa >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.

3.2.5.9 Teste de produção de celulose

Um volume de 0,1 mL da cultura foi inoculado no meio descrito no anexo I 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 formação de coloração azul intensa.

3.2.5.10 Teste de produção de pigmento marrom

As placas inoculadas por estrias no meio descrito no anexo I foram incubadas a 30°C por 48 horas em estufa com umidade relativa >90%. O aparecimento de pigmentação marrom ao redor da colônia indica teste positivo.

3.2.6 Preservação das culturas purificadas

3.2.6.1 Estudo para escolha do crioprotetor

Para as linhagens isoladas, procedeu-se uma avaliação da melhor forma de armazenamento quanto ao crioprotetor. Foram selecionadas aleatoriamente 5 linhagens para a realização dos testes, usando-se dois tipos de crioprotetores e mantendo-se uma temperatura de -80°C.

O tratamento estatístico dos dados foi feito pelo Departamento de Matemática Aplicada da Universidade Estadual de Londrina, com o método da análise de variância (ANOVA), com dois fatores, tratamentos e blocos, sem interações entre tempo e linhagem.

Inoculou-se uma alçada de cada linhagem em tubos de 11x110 mm, contendo 3 mL de meio *MYP* (meio 3, Tabela 4). Incubaram-se os tubos em agitador rotatório, com agitação de 120 rpm, a uma temperatura de 30°C, por 72 horas.

Foram realizados testes com os crioprotetores extrato de malte a 20% (p/v) e glicerol a 10% (v/v). O extrato de malte a 20% é indicado na literatura como crioprotetor para congelamento de bactérias acéticas (Sokollek et al., 1997). Já o glicerol é um crioprotetor de uso corrente em laboratórios que manipulam microrganismos (Kirsop & Doyle, 1991).

Nos tubos incubados em agitador rotatório, que, após o tempo pré-estabelecido, apresentavam turbidez do meio, indicando crescimento das culturas, as suspensões foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 min, descartando-se os sobrenadantes. Adicionaram-se 3 mL de solução fisiológica para lavagem das células, repetindo-se a operação por mais duas vezes.

À massa celular resultante foi adicionado 1,5 mL do crioprotetor a 10°C e armazenado à temperatura de -80°C. Contagens da população total e viável no momento do armazenamento, após 15, 30, 60, 150, 365 e 730 dias foram feitas usando câmara de *Neubauer* e azul de *trypan* como corante vital.

A descrição da metodologia da determinação da viabilidade celular e a escolha do corante estão relatadas no item 3.2.7.1.

3.2.6.2 Armazenamento de linhagens isoladas

As culturas purificadas foram preservadas em microtubos contendo crioprotetor extrato de malte 20% (p/v) (Sokollek et al., 1998a, b). A temperatura de estocagem foi de -80°C e -196° C.

3.2.7 Comparação de métodos de quantificação da população

Quatro diferentes métodos para contagem na população viável de bactérias acéticas foram realizados e comparados entre si. Estes métodos ocorreram nas condições da

indústria produtora e com fermentação conduzida em laboratório, usando linhagem de *Acetobacter aceti* (CCT0190). Os métodos utilizados estão descritos a seguir.

3.2.7.1 Contagem de células

A primeira etapa considerada para o estabelecimento da metodologia de contagem de células viáveis de bactéria acética foi testar um corante capaz de colorir células inativas. Considerando-se a escassez de dados na literatura para essas bactérias, iniciou-se testando corantes usados rotineiramente na determinação da viabilidade celular de leveduras em processos industriais de produção de açúcar e álcool. Os dois corantes encontrados como os mais recomendados são azul de metileno e eritrosina. Foram testados esses corantes e também o azul de *trypan*.

A técnica consiste em misturar suspensão celular, adequadamente diluída, com a solução corante. As células viáveis, com alta atividade fisiológica, não colorem e as inativas (não viáveis) colorem.

Tomou-se uma alíquota da suspensão celular e induziu-se à morte das células, expondo-as a altas temperaturas e, em seguida, adicionou-se o corante e procedeu-se à observação, com o uso de hemocítômetro, ao microscópio.

Com a avaliação dos resultados, pôde-se determinar o corante adequado. Em todas as etapas posteriores, tal corante foi usado.

O procedimento para contagem de viáveis no desenvolvimento da fermentação acética foi conduzido conforme descrito a seguir.

Adicionaram-se três gotas do corante azul de *trypan* 0,2% e imediatamente iniciou-se a contagem em câmara de *Neubauer*. O corante azul de *trypan* em contato com

células após 3 minutos cora as viáveis. Agitou-se bastante a suspensão de células para uma perfeita homogeneização.

Dependendo do número de células por quadrado, foram contados os cinco quadrados, indicados por X na Figura 7. Incluíram-se as células que tocavam as linhas-limite mas não as sobrepostas em outras áreas. As células mortas foram identificadas pela coloração azul e as vivas por brilho característico.

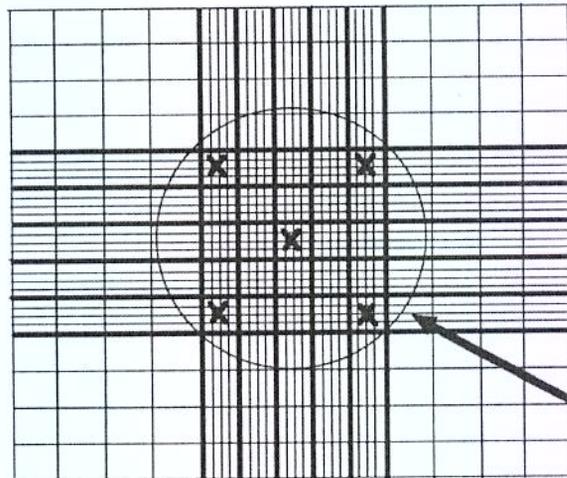


Figura 7. Hemocitômetro (câmara de *Neubauer*)

Em caso de número de células inferior a 200 no total de 5 quadrados contados, anotaram-se alguns adicionais e tirou-se a média. Para números superiores, a amostra foi novamente diluída.

Cada quadrículo tem um volume de $0,1 \text{ mm}^3$. O número de células do quadrículo multiplicado por 10 dá o número por $1,0 \text{ mm}^3$ da suspensão de bactérias. Este último multiplicado por 1000 dá o número de células por $1,0 \text{ cm}^3$ ou 1 mL.

3.2.7.2 Plaqueamento em superfície

O meio de cultura, ágar *MYP*, foi preparado segundo a técnica da dupla camada. Para adicionar a segunda camada, tornou-se importante que a inferior - cuja concentração de ágar era de 0,5%, estivesse solidificada.

Uma alíquota de 5 mL da suspensão foi coletada e diluída em 45 mL de H₂O peptonada 0,1%. A partir dessa, foram preparadas diluições sucessivas até 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} .

Pipetaram-se alíquotas de 0,1mL de cada diluição, passando-se para as placas de Petri, seguindo a técnica do espalhamento em superfície. Esse procedimento foi sempre feito em duplicata.

As placas foram incubadas em posição invertida a 30°C por 48 horas, em estufa com umidade relativa > 90%.

O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi obtido calculando a média entre as UFC das duplicatas e multiplicadas pelo inverso da diluição. Houve ainda multiplicação por 10, levando-se em conta que o volume inoculado foi 0,1 mL, com o resultado expresso em 1 mL.

O número de colônias para contagem por placa considerada ideal está na faixa de 25 a 250 (Food..., 1987).

3.2.7.3 Número Mais Provável (NMP)

O caldo usado foi o meio 3 modificado pela adição de corante ao meio, objetivando-se melhorar a visualização do crescimento. Sua composição foi de 5 gL⁻¹ extrato de levedura, 25 gL⁻¹ manitol, 3 g.L⁻¹ peptona bacteriológica, 0,022 g.L⁻¹ verde de bromocresol.

Retiraram-se 5 mL do vinagre em fermentação, diluídos em 45 mL de H₂O peptonada 0,1%, e prepararam-se diluições sucessivas até 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ e 10⁻¹¹.

Pipetaram-se alíquotas de 1mL de cada diluição escolhida para uma série de três tubos de caldo *MYP* modificado.

Homogeneizaram-se e incubaram-se os tubos a 30°C por 48 horas em agitador a 120 rpm.

Transcorrido o tempo, observou-se a produção de ácido acético, através da alteração da cor do meio de azul para amarelo. A acidificação é a resposta positiva para o teste.

A partir dos tubos positivos e com auxílio de tabelas próprias, estimou-se o número mais provável de bactérias acéticas NMP/mL. Levou-se em conta a diluição da amostra e da tabela de NMP usada.

Resultados confiáveis foram obtidos quando todos os tubos da mais baixa diluição foram positivos e todos os tubos da mais alta diluição foram negativos (Food..., 1987).

3.2.7.4 Membrana filtrante

Os discos testados na execução dessa técnica foram gentilmente cedidos pela empresa Millipore. O material de constituição desses eram fluoreto de polivinilideno (PVDF), com tamanho de 0,45 µm para os poros do filtro.

As membranas poliméricas fabricadas em fluoreto de polivinilideno (PVDF) têm importante propriedade de resistir a temperaturas elevadas e a agentes químicos. A

temperatura máxima de autoclavagem que suporta é de 126°C e tem capacidade de molhagem (hidrofílico).

O ágar foi *MYP* (meio 3) preparado segundo a técnica da dupla camada.

Para a realização desse teste é necessário um suporte de filtração ou vários suportes (*manifold*). A Figura 8 mostra uma unidade filtrante. Preparou-se o aparato de filtração, colocou-se a membrana estéril centralizada na base do suporte de filtração com pinça também estéril.



Figura 8. Unidade de filtração

Retiraram-se 5 mL da amostra, acrescentando-se 45 mL de H₂O peptonada 0,1% e prepararam-se diluições sucessivas até 10⁻¹⁰.

Filtraram-se, sob ação do vácuo, 10 mL da suspensão diluída e homogeneizada. Esse volume é conveniente para se obter uma contagem de no máximo 100 UFC para populações máximas de 10¹⁰ UFC de bactérias acéticas/mL. Os testes foram realizados em duplicata.

Para que ocorra abertura dos poros na membrana e homogeneização das células lava-se o filtro com água peptonada a 0,1% antes e após cada processo de filtragem.

Incubaram-se as placas em posição invertida a 30°C por 24 horas em estufa com umidade relativa > 90%.

Calculou-se o número de UFC/mL a partir do número médio de colônias contadas em cada diluição, multiplicado pelo inverso da diluição inoculada e dividindo-se pelo volume filtrado.

É recomendado um número de colônias variando entre 20 a 200 por filtro. Para facilitar o procedimento de contagem, prossegue-se de cima para baixo e da esquerda para direita (Vasquez, 2001).

A partir do resultado obtido na contagem de viáveis, pôde-se prever as diluições necessárias para os métodos subsequentes.

O tratamento estatístico dos dados foi feito pelo método da análise de variância (ANOVA), inteiramente casualizada, aplicando-se o teste de Tukey ($p < 0,05$). Para obtenção dos dados, foram conduzidas trinta repetições nas situações da indústria e da fermentação em escala de laboratório com linhagem referência.

3.2.8 Preparo de inóculo

Pretendeu-se obter um procedimento padrão para preparo de inóculo a partir de isolados de fermentação de vinagre industrial. Esse procedimento foi usado para preparar inóculo seja de cultura recém purificada e mantida em tubo com ágar inclinado e armazenada a 5°C, ou dos isolados purificados e estocados em microtubos a temperatura de -80°C ou -196°C.

Executaram-se os seguintes passos para a obtenção do inóculo, partindo-se de uma quantia de 0,1 mL da cultura purificada, armazenada a -196°C ou de uma alçada leve da cultura mantida a 5°C: descongelamento à temperatura ambiente, quando o caso; inoculação em um tubo de 22 x 250 mm, com 5 mL do caldo *MYP* (meio 3); encaminhamento para incubadora rotatória a 120 rpm por 48 horas, com volume total transferido para um Erlenmeyer de 250 mL, com 50 mL do mesmo caldo e incubado nas mesmas condições anteriores.

Acompanhou-se o crescimento da população pela contagem total em câmara de *Neubauer* até obtenção de inóculo com no mínimo 10^9 células/mL, utilizando-se um corante vital. Observou-se a morfologia e o arranjo através de esfregaços corados para reação de Gram. A população de 10^9 células/mL foi considerada como término da fase de crescimento logarítmico.

Com o estabelecimento de um procedimento padrão de preparo de inóculo, todas as etapas posteriores foram feitas como tal.

3.2.9 Seleção das linhagens com potencial para conversão de etanol a ácido acético

A partir das linhagens obtidas nas etapas de isolamento, purificação e armazenamento, procederam-se testes da capacidade de oxidação do etanol visando-se

selecionar as capazes de oxidar etanol em maior concentração no meio de cultura avaliado.

Iniciando com inóculo produzido com contagem $\geq 10^9$ células/mL, transferiu-se por punção uma alíquota da suspensão celular ao centro da placa de *Petri* em meio *MYP* (meio 3) modificado pela adição de 0,022 g/L de verde de bromocresol e concentrações de etanol variando de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20%.

O teste foi avaliado pela formação de halo ao redor do ponto da punção, que teve o diâmetro medido empiricamente com auxílio de paquímetro em intervalos de 24 horas num período total de 96 horas. A formação de halo se dá em função da mudança de pH do meio pela produção de ácido. As linhagens que apresentaram o maior halo em um menor intervalo de tempo foram selecionadas para estudos mais detalhados.

3.2.10 Caracterização das linhagens selecionadas com potencial para conversão de etanol a ácido acético

3.2.10.1 Características fisiológicas e bioquímicas

Procederam-se testes fisiológicos das linhagens selecionadas, observando-se a resistência ao ácido acético nas concentrações de 5, 10 e 15% em tubos com 5 mL do caldo *MYP* (meio 3), incubado a 30°C, por 96 h, em incubadora agitada. Transcorrido esse tempo, retirou-se 0,1 mL do caldo de cultivo e passou-se para placa com ágar *MYP*, levando-se à estufa com 30°C e umidade relativa de >90%, por 96 horas. Considerou-se resultado positivo para as linhagens que puderam crescer sob essas condições.

Acompanhou-se também a resistência aos seguintes valores de pH: 1,5; 2,5; 3,5 e 5,0 em caldo *MYP* modificado, pela adição de ácido para correção do pH do meio. Uma alíquota de 0,1 mL de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.8 foi incubada em 5 mL

do caldo e mantida a 30°C por 96 horas. Após esse período observou-se a presença de células vivas ao microscópio.

Avaliou-se a termotolerância dessas linhagens a temperaturas de 30, 35 e 40°C no caldo *MYP* em agitador rotatório. Partiu-se de 0,1 mL de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.8 em 5 mL de caldo. Observou-se a turvação do meio que indicava crescimento após um período de 96 horas.

Utilização de várias fontes de carbono foi observada pelo crescimento em placas. O manitol foi substituído no ágar *MYP* (meio 3) por glicose, sorbitol, manose, frutose, maltose, sacarose, rafinose, glicerol e amido. O etanol no meio *Suomalainem* (meio 4) foi substituído por metanol, n-propanol, iso-propanol, n-amílico, iso-amílico, n-butílico e iso-butílico. As fontes de carbono foram acrescentadas a uma concentração final de 2%. O tempo de incubação foi de 48 horas a 30°C, com umidade relativa >90%. E o meio preparado segundo técnica da dupla camada.

A motilidade dos isolados selecionados foi observada em lâmina escavada pela técnica da gota pendente.

A oxidação de lactato a CO₂ e H₂O foi observada em ágar *DSM* (meio 6). A superoxidação foi avaliada durante os experimentos do monitoramento no estudo de produção de ácido em escala de laboratório. A análise dos resultados permitiu determinar as concentrações de etanol e ácido no meio em que ocorria a superoxidação.

Os testes bioquímicos foram repetidos nas linhagens selecionadas utilizando as técnicas descritas nos itens 3.2.5.1 a 3.2.5.10. Esses testes ocorreram a partir de culturas desenvolvidas em meio *MYP* (meio 3), com aproximadamente 48 horas de incubação, segundo procedimentos descritos por Carr (1968) e Entani et al. (1985).

3.2.11 Estudo de produção de ácido acético das linhagens selecionadas

Com os isolados que tiveram maior formação de halo em menor tempo e em maior concentração de etanol, procedeu-se o estudo proposto.

Preparou-se um inóculo preparado de acordo com o item 3.2.8 e monitoraram-se os parâmetros citados. Esse foi conduzido em incubador agitado a 120 rpm e 30°C, na proporção de 5% de inóculo em 600 mL de meio RAE, em frasco *Fernbach*. O meio RAE foi escolhido como meio de produção de dados obtidos por Sokollek & Hammes (1997).

Acompanhou-se o crescimento, consumo de etanol e açúcar redutor, monitoramento da quantidade de oxigênio dissolvido, medidas do pH do meio e a produção de ácido acético. As concentrações testadas no meio de fermentação foram de 2% de ácido e 4% de etanol. Esses valores dão uma concentração total (CT) de 6%.

Avaliou-se a produtividade das linhagens a diferentes valores de concentração total em meio RAE e meio Moraes. Sendo essas CT de 3, 5 e 6 nas seguintes relações de ácido e etanol em %, respectivamente: 1a/2e, 1a/4e e 2a/4e. A produtividade foi avaliada conforme descrito no item 3.2.12.3.

Dois desses isolados foram avaliados a partir de escala piloto em que houve adição de 5% de inóculo em 6 L do meio de produção RAE (meio 8), em acetador Frings de 8 L. A temperatura de fermentação foi de $30 \pm 0,3^\circ\text{C}$, com vazão de oxigênio de 35 L/h.

Estabeleceu-se também comparação entre os valores de produção e parâmetros cinéticos obtidos na fermentação em escala piloto da linhagem isolada na indústria 1, usada como iniciadora, com cultura mista da mesma indústria.

A retirada de amostras para o monitoramento dos parâmetros avaliados respeitava a seguinte premissa: cada retirada ser mínima para no total não ser maior que 10% do volume.

Acompanhou-se o crescimento pela medida da absorvância em 600 nm e contagem de viáveis em câmara de *Neubauer*. O etanol foi medido em cromatógrafo a gás. Açúcar redutor foi mensurado pelo método de Somogyi & Nelson (Martelli & Panek, 1968). O pH foi medido eletrometricamente. Utilizou-se medidor de oxigênio YSI 95 para a determinação do oxigênio dissolvido (O.D.). A produção de ácido acético foi obtida pela medida da acidez por titulação com NaOH 0,1N.

Considerando que bactérias crescem exponencialmente, é útil delinear o logaritmo do tamanho da população relativa $\left[y = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) \right]$ contra o tempo. As três fases de uma curva de crescimento podem ser descritas através de três parâmetros a saber: velocidade específica máxima de crescimento, μ_m , definida como a tangente no ponto de inflexão; o tempo "lag", λ , é definido como o ponto que intercepta a tangente no eixo x; a assíntota $\left[A = \ln\left(\frac{N_\infty}{N_0}\right) \right]$ é o máximo valor alcançado. A partir desse modelo, calculou-se a taxa de crescimento máxima para os isolados estudados (Zwietering et al., 1990).

Os dados obtidos com monitoramento dos parâmetros permitiram determinar a velocidade específica de formação do produto, a taxa de consumo de oxigênio e de glicose para cada isolado selecionado (Borzani, 1988).

3.2.12 Cálculos de rendimento

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

3.2.12.1 Rendimento em ácido acético

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

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

$\%CT$ é concentração total da calda;

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

3.2.12.2 Rendimento da concentração total

$$Y = \frac{\%CT_{\text{final}}}{\%CT_{\text{inicial}}}$$

$\%CT_{\text{final}}$ é a concentração total do vinagre produzido (%);

$\%CT_{\text{inicial}}$ é concentração total da calda (%);

Y é o rendimento em concentração total.

3.2.12.3 Produtividade em ácido acético

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

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

$\%aa$ é a concentração de ácido acético (% ou g/100 mL p/v);

tempo é o intervalo de tempo considerado (h);

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

3.2.13 Caracterização molecular de bactérias acéticas

Optou-se pela análise molecular *RAPD-PCR* para comparar as linhagens isoladas purificadas e armazenadas a -196°C , com as conduzidas no teste piloto de fermentação. Tomaram-se as amostras das duas linhagens estocadas com crioprotetor extrato de malte 20% e comparou-se com as amostras de suspensão celular dos fermentadores piloto e de linhagem referência CCT0190.

A caracterização molecular se prestou também para comparar a população das bactérias acéticas da indústria com as linhagens isoladas e avaliadas neste trabalho.

A metodologia analítica está descrita no item 3.2.13.3, segundo Spada et al. (2002). Essa é usada rotineiramente no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP, para avaliar a variabilidade genética de vetores de esquistossomose. Testou-se a consistência da metodologia para estudo com as bactérias acéticas.

3.2.14 Métodos analíticos

3.2.14.1 Etanol

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa. As amostras foram previamente filtradas em membrana de $0,22\ \mu\text{m}$. As condições de operação adotadas estão a seguir.

Temperatura do detector: 150°C , do ionizador: 200°C e da coluna: 125°C

Vazão de oxigênio: 4 mL/s, de nitrogênio: 35 mL/s e de hidrogênio: 35 mL/s

Coluna empacotada *Porapak Q*, 2 metros e 0,8 mm de diâmetro.

3.2.14.2 Determinação da acidez total

Em Erlenmeyer de 100 mL, foram colocados 1 mL do meio a ser analisado e 2 gotas da solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Titulou-se com solução de hidróxido de

sódio a 0,1 N, até a viragem para vermelho. Cada mililitro da solução de hidróxido de sódio consumida corresponde a 0,6% de acidez, expressa em gramas de ácido acético ($H_3C-COOH$), por 100 mL de solução.

3.2.14.3 Massa Celular

Centrifugou-se 10 mL da suspensão celular retirada do fermentador piloto. O precipitado foi lavado com água destilada por três vezes. Após a ressuspensão em 10 mL água destilada, metade do volume é levado a estufa a 105°C por 4 horas. E com a outra porção preparou-se uma curva com diluições conhecidas com leitura em espectrofotômetro UV-Vis a 600 nm.

3.2.14.4 Técnica de polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (*Random Amplified Polymorphic DNA*), associada à reação de cadeia polimerase (*Polymerase Chain Reaction*), *RAPD-PCR*

3.2.14.4.1 Extração do DNA

A primeira etapa foi extrair o DNA das bactérias acéticas em estudo, utilizando o tampão CTAB 2% (Winnepenninckx et al., citados por Spada et al., 2002). O DNA foi extraído com fenol, fenol:clorofórmio (1:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação a 12000 rpm durante 12 minutos, a fase aquosa foi incubada com 7,5 µL de Ribonuclease A (350 µg/mL) por 1 hora, a 37° C, com adição de isopropanol (2:3 v/v) para precipitação por um período de uma noite. Depois, centrifugou-se novamente a 12000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado em etanol 76%, com 10 mM de acetato de amônio por 30 minutos e centrifugado nas mesmas condições, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco ao ar. O DNA foi diluído em tampão TE (10mM de Tris, 1mM de EDTA) e mantido a - 4°C (Spada et al., 2002). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro e a leitura de absorvância em 260nm.

3.2.14.4.2 Amplificação do DNA

A amplificação do DNA foi feita por meio da técnica de *RAPD-PCR*. As amostras de DNA foram amplificadas em termociclador, com concentração de 2 ng de DNA genômico. Cada reação foi realizada num volume final de 20 µL contendo 1 unidade de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR, 0,2 mM de cada dNTP e 7 pmol de cada iniciador aleatório com 10 bases. Foram utilizados cinco iniciadores, sendo eles: *primer 2* (5' CTGATGCTAC 3'); *primer 4* (5' AGTGCTACGT 3'); *primer 8* (5' CTCTCCGCCA 3'); *primer 9* (5' CAGGCCCTTC 3') e *primer 10* (5' GGTCCCTGAC 3'). As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos e 2 ciclos com três seqüências de 95°C por 30 segundos, 30°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto. Houve ainda 33 ciclos, durante os quais a temperatura de anelamento foi alterada para 40°C e o tempo da etapa de alongamento aumentado para 5 minutos no ciclo final. As amostras foram armazenadas a -20°C (Spada et al., 2002).

3.2.14.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com prata

Um volume de 4 µL de cada reação de amplificação do DNA foi acrescido a 2,5µL do tampão de carregamento (0,125% azul bromofenol, 0,125% cianol xileno e 15% glicerol) e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (acrilamida-bisacrilamida 9/1) em tampão TBE (2 mM Tris-borato, EDTA, pH 8), numa corrente de 80 volts. Os géis foram fixados em uma mistura de 10% de etanol e 0,5% de ácido acético (v/v), durante 15 minutos, depois corados com 0,2% de nitrato de prata, durante 15 minutos. Foram ainda lavados com água deionizada, por 5 minutos, e reduzidos numa solução contendo NaOH 0,75M e formaldeído 0,1 M, durante 15 minutos (Santos et al., citados por Spada et al., 2002). A análise dos perfis eletroforéticos se deu por meio da observação visual dos géis de poliacrilamida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de bactérias acéticas em fermentadores de vinagre com concentração total (CT) variando de 6 a 11%

A possibilidade de se obter bactérias isoladas de unidades produtoras de vinagre, passíveis de serem usadas no preparo de inóculo para a própria indústria, permite a constituição de uma coleção de culturas com linhagens que apresentem características apropriadas para as condições de trabalho no processo de fermentação. A técnica de preparo do meio em dupla camada mostrou um significativo avanço. Além de permitir o isolamento de bactérias acéticas capazes de produzir ácido em concentração de 10 a 15%, fomentou estudos de preservação e preparo de inóculo, que são a base para o desenvolvimento da microbiologia da fermentação acética. Desde sua utilização no Japão, em 1985, diversos outros trabalhos de isolamento e seleção de microrganismos são encontrados partindo dessa técnica e variando meios de cultivo e outras particularidades inerentes a cada estudo.

A Tabela 13 apresenta o local de origem e a técnica usada para o isolamento e identificação dos organismos. Com a técnica do ágar em dupla camada e a inoculação por espalhamento, no presente caso, obtiveram-se 94,6% das linhagens isoladas identificadas como *Acetobacter*. Essas cresceram em atmosfera com umidade relativa de 93 a 97%, e temperatura de $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em um tempo máximo de 96 horas. A necessidade de incubar-se em ambiente com alta umidade relativa, já citada na literatura, foi confirmada nos testes desenvolvidos neste estudo, como uma característica das bactérias acéticas. Quando se utilizou a técnica convencional de preparo do meio, camada simples e em atmosfera normal na estufa, obteve-se pouca ou nenhuma recuperação de microrganismos e o tempo para o crescimento foi longo. Isso provocava ressecamento da camada de ágar nas placas, levando-se a descartar as possíveis colônias crescidas.

Tabela 13. Local de origem, técnica de preparo de placas e quantidade de linhagens identificadas por coleta.

Coleta	Local/ Indústria	Técnica	Total	Identificação das linhagens		
				<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	Outra
1 ^a	1	Espalhamento em camada simples	13	10		1
2 ^a	FEMA	Espalhamento em dupla camada	1	1		0
3 ^a	1	Espalhamento em dupla camada	52	28		2
4 ^a	Frings	Espalhamento em dupla camada	2	1		1
5 ^a	2	Espalhamento em dupla camada	14	14		0
5 ^a	3	Espalhamento em dupla camada	0	0		0
6 ^a	1	Espalhamento em dupla camada	4	4		0
7 ^a	Fundação André Tosello	Espalhamento em dupla camada	2	2		0
8 ^a	FEMA	Espalhamento em dupla camada	3	3		0
9 ^a	2	Espalhamento em dupla camada	5	5		0
9 ^a	3	Espalhamento em dupla camada	2	2		0
			98	70		4

O desenvolvimento de métodos e procedimentos que permitam o isolamento e cultivo é um desafio em se tratando de fermentação acética em unidades produtoras de vinagre. É interessante frisar que, no estágio atual, trabalha-se com população não definida microbiologicamente. As possíveis soluções para os problemas de isolamento iniciam-se na escolha adequada do meio de cultivo, que deve ser seletivo para os microrganismos de interesse e contra-seletivo para os não desejados. A própria condição de trabalho dos fermentadores de vinagre, alta oxigenação, baixo pH, teor de ácido acético e etanol são limitantes para vários gêneros e espécies de microrganismos, mas não para todos. No presente estudo, testaram-se diferentes meios citados na literatura, com a intenção de reduzir as condições adversas para o isolamento das bactérias acéticas, tais como a

interrupção de aeração, que leva rapidamente à morte das células; a composição dos meios, de modo que se impedisse o crescimento de contaminantes, pela adição de compostos inibidores (actidiona, por exemplo); pelo acréscimo de estimulantes, para situação de oxigenação insuficiente, no caso o ácido cítrico, recomendado por Park & Toda (citados por Sokollek & Hammes, 1997); uso de nutrientes como Acetozym[®] DS, sais minerais, fontes de carbono e nitrogênio, álcool e ácido acético, promotores de crescimento e produção; e, por último, indicadores de pH de meio para observar-se a oxidação do álcool, lactato e manitol.

A Tabela 14 apresenta informações sobre o número de linhagens colhidas por amostragem realizada, o número de dornas coletadas e o substrato que estava fermentando quando da coleta. Dos meios de cultura testados, os dois principais em termos de recuperação de colônias foram o *MYP* (meio 3 recuperou 44,3% do total de *Acetobacter* sp.) e o *Suomalainem* (meio 4 recuperou 25,7% do total de *Acetobacter* sp.). Os demais meios usados nas diversas coletas recuperaram poucas colônias. Não foi possível recuperar nenhuma linhagem em ágar *YG* em nenhuma das vezes em que tal meio foi usado na fase de isolamento. Quanto ao meio de crescimento manitol (meio 3 *MYP*), este também propiciou significativo crescimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 14. Número de linhagens isoladas por meio de cultura utilizado em cada coleta nas unidades produtoras de vinagre.

Meio de cultura	Coleta /n.º de Dornas (/ Substrato)									Total por meio de cultura	Total de <i>Acetobacter</i> por meio de cultura
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
(8)	(1)	(1)	(9)	(1)	(4)	(2)	(2)	(2)	(7)		
Álcool	Álcool	Álcool	Álcool	Arroz+Milho	Álcool (2) Vinho tinto	Vinho tinto	Álcool	Álcool (1) Vinho laranja (1)	Álcool (2) Vinho tinto(2) Vinho branco (2) Cidra (1)		
1	0	(-) ^a	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0	0
2	0	(-)	1	0	3	(-)	(-)	(-)	(-)	4	4
3	11	(-)	22	1	4	2	(-)	3	3	46	31
4	2	(-)	17	0	3	2	2	(-)	4	30	18
5	0	(-)	0	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1	1
6	0	(-)	10	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	6
7	(-)	0	1	0	2	0	(-)	(-)	0	3	7
8	(-)	1	1	0	2	(-)	(-)	(-)	(-)	4	3
Total	13	1	52	2	14	4	2	3	7	98	70

Meio de cultura formulação anexo I - 1 YG, 2 YGM, 3 MYP, 4 Soumalainen, 5 Moraes, 6 DSM, 7 AE e 8 RAE

^a meio não testado

Para avaliar os resultados da Tabela 14, deve-se acrescentar que na 1ª Coleta, em que se utilizou a técnica de plaqueamento por superfície em ágar a 1,5%, não foi possível recuperar a população presente nas dornas de fermentação. Apenas nos meios 3 e 4 obteve-se o crescimento de poucas colônias, não representando a realidade, pois nas dornas a população presente estava em torno de 10^9 células/mL e nas placas recuperavam-se no máximo 2 UFC/mL por dorna. A partir da 2ª Coleta, em que se utilizou a técnica da dupla camada, foi possível recuperar quantitativamente a população presente, isto é, diluições na faixa de 10^{-7} até 10^{-9} foram necessárias para obter-se de 20 a 200 UFC/mL por dorna. Isso possibilita afirmar que a técnica da dupla camada recupera quantitativamente a população presente na dorna de fermentação submersa. O número apresentado a partir da 2ª Coleta refere-se a linhagens com características morfológicas diferentes e recuperadas, e não ao número de UFC/mL crescidas por placa de cada dorna.

A partir da avaliação das diversas coletas, dos meios de cultura, das técnicas de inoculação e condições de cultivo em que os microrganismos tiveram melhor crescimento, ou seja, recuperação da população na mesma proporção presente nos reatores de fermentação, propôs-se um procedimento padrão de amostragem para coletas de bactérias em unidades produtoras de vinagre (Quadro 1). As referências encontradas citaram que o plaqueamento de 0,1 mL ou de 1 mL de cultura líquida no ágar W (de Wiame) havia sido ineficiente. Recomendou-se então coletar amostra na torneira de saída do fermentador e rinçar em placas e logo depois vertê-la (Kittelman et al., 1989). Esse procedimento foi testado no presente estudo, assim como o indicado por Sokollek et al. (1998a), que consistia em uma estria em placa com ágar AE. Entretanto, essas técnicas não se mostraram eficiente para o isolamento. Outras referências dão conta ainda de que a técnica de isolamento pela dupla camada produziu resultados bastante variáveis, mas tal fato também não foi observado. A recuperação sempre se mostrou positiva, em todos os procedimentos de isolamento em que se usou a técnica de preparo do meio em dupla camada, 0,1 mL de amostra diluída e incubação com alta umidade relativa.

Quadro 1. Procedimento padrão de coleta de bactérias acéticas em unidades produtoras de vinagre.

1. A partir do ponto de amostragem do acetador, coleta de aproximadamente 200 mL, em Erlenmeyer previamente esterilizado, do material em fermentação.
2. Inóculo por espalhamento de 0,1 mL devidamente diluído do material coletado em placa que contenha meio de cultura.
3. A técnica de preparo do meio deve ser a da dupla camada, proposta por Entani et al. (1985). Adição de uma camada inferior com 0,5% em ágar, com espera de cerca de 15 minutos até adquirir consistência; então deve-se verter uma sobrecamada com 1,0% de ágar.
4. Os meios de cultura recomendados são o <i>MYP</i> (meio 3) e o <i>Suomalainem</i> (meio 4).
5. O procedimento de inoculação é executado na indústria e deve ocorrer no máximo em 60 segundos, respeitando-se as mínimas condições de assepsia.
6. Incubação em estufa bacteriológica à temperatura de $30\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa maior ou igual a 90%, controlada com Termohigrômetro, por 96 horas.

4.2 Caracterização das bactérias acéticas isoladas em fermentadores de vinagre com concentração total (CT) variando de 6 a 11%

4.2.1 Características morfológicas

Apesar do objetivo final desse trabalho não estar envolvido com a sistemática das bactérias acéticas, considerou-se importante a etapa de caracterização dos microrganismos isolados nas unidades produtoras e de fermentadores de vinagre, uma vez que a caracterização é um pré-requisito na identificação e representa uma das bases da sistemática. Para obter-se uma identificação aperfeiçoada desses microrganismos, trabalhou-se com culturas purificadas e foram descritas qualitativamente as propriedades relativas à morfologia, cultivo, nutrição e bioquímica. Esses procedimentos foram checados

com linhagens-referência. É sabido que os métodos clássicos de testes bioquímicos e fisiológicos podem ser influenciados por fatores de crescimento e às vezes os testes fornecem resultados variáveis e instáveis (Yano & Valarini, 1998). Objetivando-se diminuir efeitos negativos e obter resultados adequados, levou-se em conta fatores como temperatura, tempo e umidade relativa de incubação, requerimento de oxigênio e técnica de preparo dos meios de cultura.

Nas nove amostragens realizadas em fermentadores de vinagre, obtiveram-se 98 linhagens. A Tabela A1 (anexo) apresenta detalhadamente as características macroscópicas dos isolados por coleta realizada. A Tabela 15 mostra os resultados agrupados segundo as características das linhagens obtidas por isolamento. As Figuras 9, 10, 11 e 12 ilustram características de alguns desses isolados. Verificou-se que do total de colônias isoladas, 57,1% apresentaram-se em forma circular e 42,9%, de forma irregular. Quanto à superfície, 84,7% mostraram-se lisas e 15,3%, rugosas. Do total, 54,1% tinham bordas irregulares, 34,7% perfeitas e os 11,2% restantes apresentaram-se serrilhadas ou onduladas. As colônias desenvolvidas foram 84,6% planas e sem pigmentação. As opacas foram 61,2% do total de colônias isoladas. As transparentes foram 38,7%. E quanto à consistência, 88,8% mostraram-se viscosas.

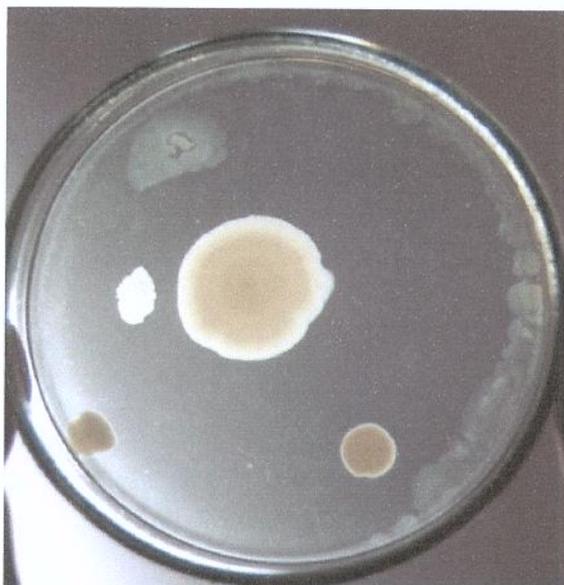


Figura 09. Bactéria acética isolada em meio ágar dupla camada, após 96 h de incubação a 30°C. No centro, colônia com forma e borda irregulares, superfície lisa e pigmentação amarela.



Figura 10. Bactéria acética isolada em meio ágar dupla camada, após 96 h de incubação a 30°C. Colônia com característica de crescimento espalhado.





Figura 11. Bactéria acética isolada em meio ágar dupla camada, após 96 h de incubação a 30°C com característica de crescimento espalhado.



Figura 12. Bactéria acética isolada em meio ágar dupla camada, após 96 h de incubação a 30°C. Na parte superior esquerda, colônia com forma circular, superfície lisa, borda perfeita e pigmentação ausente.

Tabela 15. Resumo das características macroscópicas das linhagens isoladas de unidades produtoras de vinagre.

Características	Coleta									Total	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Forma											
Circular	(9/13) ^a	(1/1)	(32/52)	(0/2)	(7/14)	(3/4)	(0/2)	(0/1)	(4/7)	(56/98)	
Irregular	(4/13)	(0/1)	(20/52)	(2/2)	(7/14)	(1/4)	(2/2)	(3/3)	(3/7)	(42/98)	
Superfície											
Lisa	(7/13)	(1/1)	(49/52)	(2/2)	(11/14)	(3/4)	(2/2)	(2/3)	(6/7)	(83/98)	
Rugosa	(6/13)	(0/1)	(3/52)	(0/2)	(3/14)	(1/4)	(0/2)	(1/3)	(1/7)	(15/98)	
Borda											
Perfeita	(8/13)	(1/1)	(13/52)	(1/2)	(4/14)	(3/4)	(0/2)	(0/3)	(4/7)	(34/98)	
Serrilhada	(4/13)	(0/1)	(3/52)	(0/2)	(0/14)	(0/4)	(0/2)	(0/3)	(0/7)	(7/98)	
Irregular	(0/13)	(0/1)	(33/52)	(1/2)	(10/14)	(1/4)	(2/2)	(3/3)	(3/7)	(53/98)	
Ondulada	(1/13)	(0/1)	(3/52)	(0/2)	(0/14)	(0/4)	(0/2)	(0/3)	(0/7)	(4/98)	
Elevação											
Plana	(11/13)	(1/1)	(47/52)	(2/2)	(11/14)	(2/2)	(2/2)	(2/3)	(5/7)	(83/98)	
Elevada	(2/13)	(0/1)	(5/52)	(0/2)	(3/14)	(2/2)	(0/2)	(1/3)	(2/7)	(15/98)	
Pigmentação											
Ausente	(12/13)	(1/1)	(38/52)	(2/2)	(14/14)	(4/4)	(2/2)	(3/3)	(7/7)	(83/98)	
Presente	(1/13)	(0/1)	(14/52)	(0/2)	(0/14)	(0/4)	(0/2)	(0/3)	(0/7)	(15/98)	
Detalhes Ópticos											
Opaca	(8/13)	(1/1)	(24/52)	(2/2)	(13/14)	(3/4)	(2/2)	(3/3)	(4/7)	(60/98)	
Transparente	(5/13)	(0/1)	(28/52)	(0/2)	(1/14)	(1/4)	(0/2)	(0/3)	(3/7)	(38/98)	
Consistência											
Viscosa	(10/13)	(1/1)	(51/52)	(2/2)	(11/14)	(2/2)	(2/2)	(2/3)	(6/7)	(87/98)	
Membranosa	(3/13)	(0/1)	(1/52)	(0/2)	(3/14)	(2/2)	(0/2)	(1/3)	(1/7)	(11/98)	

^a(/) número de linhagem positiva/número de linhagem testada

4.2.2 Rápida identificação fenotípica das linhagens isoladas

Do total de 98 isolados, 74 linhagens foram classificadas inicialmente, por teste da coloração de Gram, como negativas e em forma de bastonetes (Tabela 17). A taxonomia bacteriana convencional ainda usa características morfológicas e coloração de Gram como critério para agrupar procariotos, embora hoje em dia muitos desses procedimentos estejam sendo substituídos por métodos moleculares, considerados mais específicos e sensíveis. A Figura 13 representa fotomicrografia ótica de linhagem recuperada de fermentação de vinagre fixada e corada pela técnica de Gram.

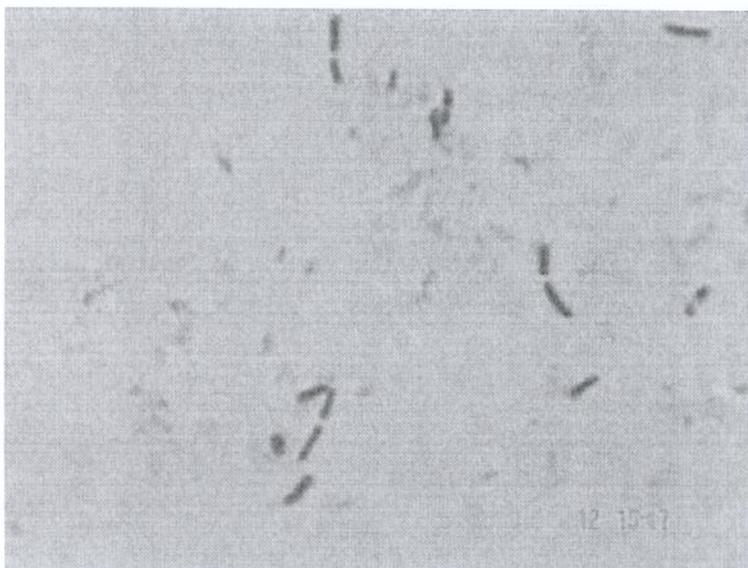


Figura 13. Fotomicrografia ótica de linhagem recuperada de fermentação de vinagre fixada e corada pela técnica de Gram

4.2.3 Rápida identificação fenotípica do gênero *Acetobacter*

Na literatura sobre bactérias acéticas, é corrente encontrar a superoxidação como critério taxonômico para diferenciação entre *Acetobacter* e *Gluconobacter* e alguns métodos são recomendados para tal. O utilizado por Carr (1968) leva em consideração a capacidade de *Acetobacter* superoxidar etanol a CO₂ e água. A mudança de cor do meio de verde azulado para amarelo é característica das bactérias de ambos os gêneros. As *Acetobacter* com uma incubação prolongada superoxidam o ácido acético e o indicador reverte para o verde azulado.

A superoxidação depende da composição do meio. *Acetobacter* sp. superoxida somente na ausência de etanol (Ebner, citado por Sokollek & Hammes, 1997). Com *Acetobacter pasteurianus*, a superoxidação ocorreu em meio com etanol e ácido acético somente quando a concentração de ácido estava na faixa de 6 a 7% e não se tinha mais álcool (Sievers et al., 1992). Linhagens obtidas da indústria de produção de vinagre apresentam superoxidação em uma determinada faixa de teor de ácido e com concentrações de etanol no meio bem baixas, próximas de zero. Seis linhagens isoladas da indústria foram avaliadas por Sokollek & Hammes (1997). Variando a concentração de ácido acético, obtiveram a faixa de 5 a 9%, a partir do que os isolados perderam a capacidade de superoxidar.

Observou-se em 19 linhagens de *Acetobacter* sp. isoladas durante o período deste trabalho, que a superoxidação ocorria quando o etanol no meio era zero ou próximo de zero e a concentração de ácido acético estava na faixa de 5% (Tabela 16).

Tabela 16. Teores de ácido acético e etanol em que ocorreram a superoxidação de linhagens isoladas em unidades produtoras de vinagre, com concentração total (CT) variando de 6 a 11%.

Linhagem	Superoxidação	
	Etanol (%)	Ácido acético (%)
003/01	0,00	4,89
004/01	0,11	5,68
005/01	0,41	5,19
006/01	0,09	5,00
007/01	0,23	5,95
008/01	0,23	5,04
009/01	0,23	5,01
011/01	0,73	5,17
012/01	0,12	5,17
013/01	0,00	5,31
014/02	0,21	5,26
015/03	0,46	5,01
016/03	0,45	5,31
055/03	0,46	5,11
067/04	0,05	4,92
068/04	0,45	5,57
078/05	0,00	5,21
082/05	0,00	5,00
086/04	0,24	5,71

Outro método testado para a diferenciação entre gêneros foi com o ágar dextrose, sorbitol e manitol (*DSM*) e este possibilitou verificar a capacidade de oxidação do

lactato apresentado somente pelas *Acetobacter* sp., permitindo-se então classificar as linhagens isoladas de vinagreiras de acordo com esse critério.

Acetobacter cresce em *DSM* mudando a coloração do meio de amarela para púrpura e *Gluconobacter*, incapaz de oxidar lactato, oxida preferencialmente carboidratos secundários mantendo a cor amarela do meio.

O meio *DSM* preconizado por Cirigliano (1982) mostrou-se mais satisfatório do que o proposto por Carr (1968) para uma rápida identificação fenotípica, na diferenciação dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Quando conduziram-se os testes com o método de Carr (1968), os resultados foram duvidosos e pouco conclusivos quanto à cor obtida, tanto para linhagens-referência, como para as linhagens isoladas das indústrias e de fermentadores de vinagre. Além disso, o tempo de incubação foi superior a 96 horas, tornando o método ainda mais desvantajoso. Já com o *DSM*, em 72 h, obtiveram-se os resultados da rápida identificação fenotípica dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

Das 74 linhagens isoladas e identificadas como pertencentes à família *Acetobacteraceae*, 70 delas foram tidas como *Acetobacter*, de acordo com a técnica proposta por Cirigliano (1982), e quatro como *Gluconobacter*. Os isolados identificados como *Acetobacter*, ao serem observados em microscópio, ocorriam como bastonetes preferencialmente em pares ou isolados, havendo móveis e não móveis. Na Figura 14, tem-se uma mesma linhagem nos meios *DSM* e Carr. As Figuras 15 e 16 mostram linhagens-referência de *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

As 24 linhagens restantes ou tinham forma de cocos ou eram classificadas como bastonetes Gram positivos, consideradas contaminantes do processo fermentativo. Serão estudadas posteriormente, pois seus resultados não são objeto desse trabalho.

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos por coleta e no total da identificação fenotípica da família e gênero.

Dos 98 isolados de fermentadores de vinagre em CT variando de 6 a 11%, 92,9% foram identificados como bactérias em forma de bastonetes (91 linhagens). Os Gram negativos foram 84,6% (77 bastonetes Gram negativos) e os identificados como pertencentes à família *Acetobacteraceae* 81,3% (74 linhagens).

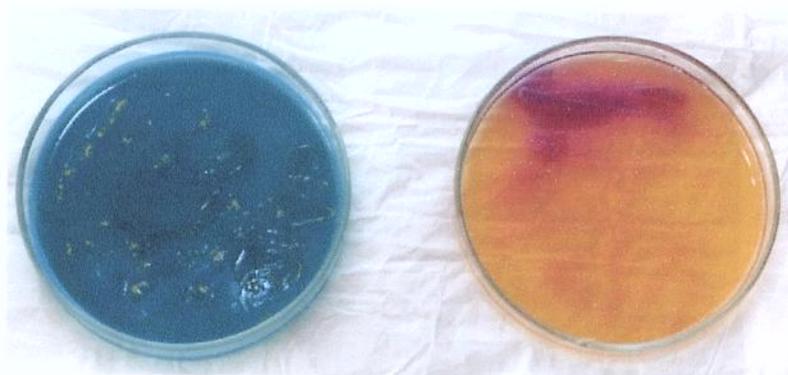


Figura 14. Linhagem 086/07 incubado a 30° C após 96 h em meio Carr (esquerda) e 72 h em meio DSM (direita)



Figura 15. Linhagem de *Acetobacter aceti* incubada a 30° C após 96 h em meio Carr (esquerda) e 72 h em meio DSM (direita)



Figura 16. Linhagem de *Gluconobacter oxydans* incubada a 30° C após 96 h em meio Carr (esquerda) e 72 h em meio DSM (direita)

Tabela 17. Rápida identificação fenotípica da família *Acetobacteraceae*, segundo *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994) e *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg et al., 1984), e identificação de gênero pela capacidade de oxidação do lactato em meio dextrose, sorbitol e manitol - *DSM*, segundo Cirigliano (1982).

Características	Coleta										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Forma											
Bastonetes	(12/13) ^a	(1/1)	(46/52)	(2/2)	(14/14)	(4/4)	(2/2)	(3/3)	(7/7)	(91/98)	
Cocos	(1/13)	(0/1)	(6/52)	(0/20)	(0/14)	(0/4)	(0/2)	(0/3)	(0/7)	(7/98)	
Gram											
Bastonetes +	(1/13)	(0/1)	(16/52)	(0/2)	(0/14)	(0/4)	(0/2)	(0/3)	(0/7)	(14/98)	
Bastonetes -	(11/13)	(1/1)	(30/52)	(2/2)	(14/14)	(4/4)	(2/2)	(3/3)	(7/7)	(77/98)	
Cocos +	(1/13)	(0/1)	(5/52)	(0/2)	(0/14)	(0/4)	(0/2)	(0/3)	(0/7)	(6/98)	
Cocos -	(0/13)	(0/1)	(1/52)	(0/2)	(0/14)	(0/4)	(0/2)	(0/3)	(0/7)	(1/98)	
Família											
<i>Acetobacteraceae</i>	(11/13)	(1/0)	(30/52)	(2/2)	(14/14)	(4/4)	(2/2)	(3/3)	(7/7)	(74/98)	
Não Identificadas	(2/13)	(0/1)	(22/52)	(0/2)	(0/14)	(0/4)	(0/2)	(0/3)	(0/7)	(24/98)	
Gênero											
<i>Acetobacter</i>	(10/11)	(1/1)	(28/30)	(1/2)	(14/14)	(4/4)	(2/2)	(3/3)	(7/7)	(70/74)	
<i>Gluconobacter</i>	(1/11)	(0/1)	(2/30)	(1/2)	(0/14)	(0/4)	(0/2)	(0/3)	(0/7)	(4/74)	

^a(/) número de linhagem positiva/número de linhagem testada

4.2.4 Caracterização fisiológica e bioquímica dos isolados identificados como *Acetobacter* sp.

As características diferenciais dos 70 isolados, identificados como *Acetobacter* sp. com linhagens-referência das espécies do gênero estão apresentadas na Tabela 18.

Todos os 70 isolados oxidaram o etanol e cresceram em diferentes meios: com pH 5, sem ácido acético, sem etanol, na presença de lactato de cálcio. Motilidade foi observada em 88,6% dos isolados. Nenhuma linhagem foi capaz de produzir celulose, dihidroxiacetona a partir do glicerol, indol do triptofano, oxidase, pigmentos marrons e protease. A capacidade de produção de ácido a partir de glicose foi observada em 15,7% e a produção de catalase em 98,6% das linhagens. Todas as linhagens reduziram o nitrato.

Tabela 18. Comparação das características das 70 linhagens isoladas, purificadas e identificadas como *Acetobacter* sp. com linhagens-referência.

Características	Isolados	<i>A. aceti</i> CCT0190	<i>A. aceti</i> CCT1724	<i>A. aceti</i> CCT0173	<i>A. pastorianus</i> CCT1706	<i>G. oxydans</i> CCT0174
Crescimento em meio com pH 5	(70/70) ^b	(+) ^a	(+)	(+)	(+)	(+)
Crescimento em meio sem ácido acético	(70/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Crescimento em meio sem etanol	(70/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Crescimento meio Frateur modificado por Hoyer	(70/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Crescimento na presença de lactato de cálcio	(70/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Morfologia celular após 2 dias de crescimento	(70/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Gram negativos	(70/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Bastonetes	(62/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Motilidade						
Oxidação do etanol	(70/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Produção de ácido a partir de glicose	(11/70)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
Produção de catalase	(69/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Produção de celulose	(0/70)	(-) ^c	(-)	(-)	(-)	(-)
Produção de dihidroxiacetona a partir glicerol	(0/70)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Produção de indol do triptofano	(0/70)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Produção de oxidase	(0/70)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Produção de pigmentos marrons	(0/70)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Produção de proteases (gelatinase)	(0/70)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Redução de nitrato	(70/70)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

^a (+) positivo; ^b (/) número de linhagem positiva/número de linhagem testada, (-)^c negativo

4.3 Preservação das linhagens purificadas

A preservação de linhagens isoladas é de fundamental importância no preparo de inóculo e na montagem de uma coleção de culturas com linhagens de interesse para a indústria. Diversos autores afirmaram terem perdido muitas linhagens isoladas devido à má preservação. Outros relatam ser possível preservar os microrganismos usando crioprotetores: o mais comumente encontrado é o glicerol nas mais variadas concentrações e baixas temperaturas, que podem variar de -70°C até -196°C . O risco de se preservar microrganismos de difícil manipulação como as bactérias acéticas foi considerado durante o desenvolvimento desse trabalho e, para tanto, tomaram-se os cuidados inerentes ao manuseio desse material, uma vez que a variabilidade de linhagens é passível de ocorrer em culturas puras, mantidas sob condições artificiais de laboratório por um período longo. Tomou-se o cuidado de preservar as linhagens purificadas em microtubos individuais com várias cópias, evitando-se o processo de repique de colônias. Sempre que necessário, preparou-se inóculo e a partir desse levou-se para o armazenamento.

Os resultados do acompanhamento da contagem de população com dois diferentes crioprotetores armazenados a -80°C ao longo de dois anos estão colocados nas Tabelas 19, 20, 21, 22 e 23.

Tabela 19. Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 017/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C .

Crio-protetor	Tempo (dias)	Contagem população total (n.º células/mL)	Contagem de viáveis (n.º células/mL)	Viabilidade ¹ (%)	% de viabilidade recuperada ²
EXTRATO DE MALTE 20%	0	$4,4 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	95,5	
	15	$3,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	63,3	66,3
	30	$2,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	76,9	80,5
	60	$4,1 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	73,2	76,6
	150	$3,5 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	65,7	68,8
	365	$2,6 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	73,1	76,5
	730	$2,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	71,4	74,8
GLICEROL 10%	0	$3,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	93,5	
	15	$3,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	66,7	71,3
	30	$2,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	74,1	79,3
	60	$3,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	78,9	84,4
	150	$3,9 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	71,8	76,8
	365	$3,5 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	68,6	73,4
	730	$2,3 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	69,6	74,4

¹ Viabilidade das amostras descongeladas, obtida por coloração celular com azul de *Trypan*.

² Em relação à viabilidade no tempo zero.

Tabela 20. Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 024/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C .

Crio-Protetor	Tempo (dias)	Contagem população total (n.º células/mL)	Contagem de viáveis (n.º células/mL)	Viabilidade (%)	% de viabilidade recuperada
EXTRATO DE MALTE 20%	0	$3,7 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	94,6	
	15	$4,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	73,3	77,5
	30	$3,7 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	75,7	80,0
	60	$4,1 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	75,6	79,9
	150	$4,8 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	75,0	79,3
	365	$2,2 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	72,7	76,8
	730	$5,7 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	64,9	68,6
GLICEROL 10%	0	$1,9 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	89,5	
	15	$1,8 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	66,7	74,5
	30	$1,1 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	72,7	81,2
	60	$1,5 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	69,4	76,3
	150	$1,3 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	63,1	70,5
	365	$1,3 \times 10^8$	$8,4 \times 10^7$	64,6	72,2
	730	$2,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	60,0	67,0

Tabela 21. Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 052/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C.

Crio-Protetor	Tempo (dias)	Contagem população total (n.º células/mL)	Contagem de viáveis (n.º células/mL)	Viabilidade (%)	% de viabilidade recuperada
EXTRATO DE MALTE 20%	0	4,5 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁸	95,5	
	15	4,4 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁸	88,6	92,8
	30	3,9 x 10 ⁸	3,1 x 10 ⁸	79,5	83,2
	60	4,1 x 10 ⁸	3,1 x 10 ⁸	75,6	79,2
	150	3,6 x 10 ⁸	2,3 x 10 ⁸	63,9	66,9
	365	3,2 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁸	75,0	83,5
	730	1,1 x 10 ⁸	8,1 x 10 ⁷	73,6	81,2
GLICEROL 10%	0	4,9 x 10 ⁸	4,7 x 10 ⁸	95,9	
	15	3,3 x 10 ⁸	2,9 x 10 ⁸	87,9	91,7
	30	1,6 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸	81,2	84,7
	60	1,9 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸	78,9	82,3
	150	1,9 x 10 ⁸	1,4 x 10 ⁸	73,7	76,8
	365	1,9 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸	68,4	71,3
	730	2,8 x 10 ⁸	1,8 x 10 ⁸	64,3	67,0

Tabela 22. Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 056/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C .

Crio-Protetor	Tempo (dias)	Contagem população total (n.º células/mL)	Contagem de viáveis (n.º células/mL)	Viabilidade (%)	% de viabilidade recuperada
EXTORATO DE MALTE 20%	0	$7,6 \times 10^8$	$7,1 \times 10^8$	93,4	
	15	$4,9 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	87,8	94,0
	30	$4,0 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	77,5	83,0
	60	$4,5 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	75,6	80,9
	150	$4,4 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	70,5	75,5
	365	$2,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	76,2	81,6
	730	$1,1 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	72,7	80,8
GLICEROL 10%	0	$3,6 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	94,4	
	15	$3,3 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	87,9	93,1
	30	$1,7 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	76,5	81,0
	60	$1,7 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	76,5	81,0
	150	$1,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	62,5	66,0
	365	$1,5 \times 10^8$	$9,6 \times 10^7$	64,0	67,8
	730	$1,1 \times 10^8$	$6,6 \times 10^7$	60,0	63,5

Tabela 23. Monitoramento da viabilidade celular e da recuperação de viabilidade ao longo de 2 anos, no estudo da preservação da linhagem purificada 057/03, com crioprotetor na temperatura de -80°C .

Crio-protetor	Tempo (dias)	Contagem população total (n.º células/mL)	Contagem de viáveis (n.º células/mL)	Viabilidade (%)	% de viabilidade recuperada
EXTRATO DE MALTE 20%	0	$4,9 \times 10^8$	$4,7 \times 10^8$	95,9	
	15	$3,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	57,9	60,4
	30	$4,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	68,3	71,2
	60	$3,7 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	78,3	81,6
	150	$2,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	66,7	69,6
	365	$2,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	74,1	77,3
	730	$8,4 \times 10^7$	$5,7 \times 10^7$	67,8	70,7
GLICEROL 10%	0	$5,1 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$	96,1	
	15	$3,8 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	73,7	76,7
	30	$3,2 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	71,9	74,8
	60	$3,3 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	72,7	75,6
	150	$3,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	71,0	73,9
	365	$1,9 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	73,7	76,7
	730	$2,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	63,7	69,4

Através da análise de variância pode-se verificar que existe diferença entre os tempos mas não entre as linhagens para o crioprotetor extrato de malte 20%. Quanto ao tempo inicial, chamado tempo zero, este difere significativamente dos demais, enquanto o tempo 15 não difere do 30, 60 e 365 dias. A Tabela A2 (anexo) apresenta o resumo dos resultados estatísticos obtidos.

Quanto ao crioprotetor glicerol 10%, a análise de variância com dois fatores, tratamento e blocos, sem interação entre tempo e linhagem, observa-se que há diferença entre as linhagens, isso pode ser observado pelo teste de Tukey. A análise de variância para o tempo e linhagens é significativa, o tempo zero difere significativamente dos demais. A Tabela A3 (anexo) apresenta o resumo dos resultados estatísticos obtidos.

Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios para os dois crioprotetores. Com ambos foi possível recuperar a viabilidade de bactérias acéticas em níveis sempre maiores que 60%. Ao se efetuar a comparação entre os crioprotetores, percebe-se que o extrato de malte teve melhor desempenho em relação ao glicerol na temperatura de -80°C . Como já foi dito, não houve variação entre as linhagens, como ocorreu com o crioprotetor glicerol a 10%.

Os dados de preservação de bactérias acéticas resultaram em um procedimento padrão usado no trabalho e recomendado para estocagem de bactérias isoladas de indústrias produtoras de vinagre por um período de 2 anos, na temperatura de -80°C ou -196°C .

4.4 Enumeração de bactérias acéticas

4.4.1 Escolha de corante para uso na contagem de células viáveis e não viáveis

Na enumeração de bactérias acéticas, o primeiro estudo efetuado foi quanto ao uso de um corante que possibilitasse a contagem de células viáveis e não viáveis ao microscópio. Corantes orgânicos são usados para facilitar isolamento e diferenciação de microrganismos em vários meios de cultura. Os corantes azul de metileno e eritrosina, testados para a contagem total de viáveis, não apresentaram resultados satisfatórios quando usados para corar células mortas de bactérias acéticas. O corante azul de *trypan* produziu resposta positiva, células inativas coloriram-se de azul. A partir do resultado, adotou-se esse corante para uso rotineiro para a técnica da contagem direta no microscópio. Na

literatura, encontra-se também o uso de azul de *trypan* como corante para enumerar leveduras e fungos em amostras de produtos lácteos, cereais, carne, frutas, verduras, condimentos e bebidas fermentadas. Os resultados obtidos são positivos, indicando crescimento satisfatório desses microrganismos quando usado o corante em meios de cultura sólidos (Hart et al., 1991).

Apesar das limitações inerentes ao método de contagem total de células ao microscópico, têm-se algumas vantagens que permitem o seu uso rotineiramente na indústria de produção de vinagre. Em primeiro lugar, cabe ressaltar que há um salto de qualidade na resposta da técnica à medida que se pode usar um corante que possibilite distinguir células vivas e mortas (posto que o objetivo é que se tenha população de viáveis em um número alto durante o processo fermentativo, igual ou superior a 10^9 células/mL). Além disso, é uma técnica relativamente simples e barata para ser usada, necessitando apenas de treinamento de um técnico. Como desvantagem pode-se citar que o corante azul de *trypan* em contato com células cora as viáveis após 3 minutos. Esse detalhe deve ser lembrado e superado sempre que possível. Portanto, na indústria de fermentação acética, a contagem de viáveis com o corante azul de *trypan* é recomendada.

4.4.2 Comparação entre técnicas de contagem para uso com bactérias acéticas

As vantagens, desvantagens e resultados obtidos quando se compararam as técnicas da contagem de células, plaqueamento em superfície, número mais provável e membrana filtrante, para enumeração de bactérias acéticas após, duas repetições (uma em amostras provenientes de dornas de fermentação em escala industrial e uma em inóculo preparado em laboratório com linhagem-referência), estão apresentados a seguir.

Os resultados obtidos na primeira repetição, realizada na indústria 1, comparados entre os quatro métodos apresentados para enumeração de bactérias acéticas estão na Tabela 24.

Tabela 24. Comparação entre técnicas da contagem de células, plaqueamento em superfície, número mais provável e membrana filtrante para enumeração de bactérias acéticas, 1ª repetição realizada na indústria 1.

Repetição	Contagem Direta (células / mL)	Plaqueamento (UFC / mL)	NMP (NMP / mL)	Membrana (UFC / mL)
1	$1,83 \times 10^9$	$1,29 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,11 \times 10^9$
2	$3,42 \times 10^9$	$1,19 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,21 \times 10^9$
3	$3,39 \times 10^9$	$6,65 \times 10^9$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,37 \times 10^9$
4	$3,66 \times 10^9$	$6,40 \times 10^9$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$8,90 \times 10^8$
5	$4,32 \times 10^9$	$7,30 \times 10^9$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,24 \times 10^9$
6	$3,00 \times 10^9$	$1,37 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,05 \times 10^9$
7	$3,63 \times 10^9$	$1,01 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,40 \times 10^9$
8	$3,60 \times 10^9$	$1,73 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,59 \times 10^9$
9	$4,47 \times 10^9$	$1,50 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,49 \times 10^9$
10	$4,35 \times 10^9$	$1,15 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,21 \times 10^9$
11	$4,71 \times 10^9$	$1,18 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,27 \times 10^9$
12	$2,64 \times 10^9$	$1,35 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,11 \times 10^9$
13	$4,23 \times 10^9$	$9,50 \times 10^9$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,11 \times 10^9$
14	$3,15 \times 10^9$	$1,41 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,34 \times 10^9$
15	$2,79 \times 10^9$	$1,09 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,68 \times 10^9$
16	$2,31 \times 10^9$	$1,45 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$9,20 \times 10^8$
17	$2,82 \times 10^9$	$1,11 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$9,80 \times 10^8$
18	$2,94 \times 10^9$	$1,21 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$8,90 \times 10^8$
19	$4,11 \times 10^9$	$1,75 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,37 \times 10^9$
20	$1,86 \times 10^9$	$1,50 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,18 \times 10^9$
21	$2,31 \times 10^9$	$1,63 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,24 \times 10^9$
22	$3,84 \times 10^9$	$1,21 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,30 \times 10^9$
23	$2,13 \times 10^9$	$1,15 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,68 \times 10^9$
24	$3,21 \times 10^9$	$1,62 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$8,60 \times 10^8$
25	$2,97 \times 10^9$	$1,33 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$7,90 \times 10^8$
26	$3,15 \times 10^9$	$1,81 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,11 \times 10^9$
27	$3,72 \times 10^9$	$1,30 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,18 \times 10^9$
28	$2,61 \times 10^9$	$1,11 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$1,34 \times 10^9$
29	$3,06 \times 10^9$	$1,48 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$9,90 \times 10^8$
30	$2,97 \times 10^9$	$1,14 \times 10^{10}$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$8,60 \times 10^8$

Nesse caso, a diluição da amostra para a condução da determinação do número mais provável e da membrana filtrante não foram ideais. Com a diluição usada não se

conseguiu obter o recomendado para contagem do NMP (todos os tubos da mais baixa diluição positivos e todos os tubos da mais alta diluição negativos). E quanto à contagem na membrana filtrante, em todas as 30 repetições o número obtido foi superior a 800 colônias na área total da membrana.

A análise de variância aplicada foi inteiramente casualizada usando-se o teste de Tukey, verificando-se que não existia diferença entre o resultado da técnica dos tubos múltiplos e da membrana filtrante. As Tabelas A4 e A5 (no Anexo) apresentam os resultados estatísticos obtidos.

A média dos resultados obtidos na contagem direta, comparada com o plaqueamento em superfície e membrana filtrante, difere na ordem de grandeza de 10 vezes menor para a primeira. O menor desvio padrão encontrado entre as médias dos três métodos foi para a técnica da membrana filtrante.

A 2ª repetição, conduzida com linhagem CCT0190, apresentou para a técnica dos tubos múltiplos o mesmo problema de diluição na amostra da repetição. A Tabela 25 mostra o resultado das contagens e as Tabelas A6 e A7 (anexo), as análises estatísticas. É possível inferir que a técnica da contagem direta e da membrana filtrante são as que não apresentam diferença. Pode-se considerar que as diluições da amostra na condução desse teste foram adequadas.

Nessa repetição, a média dos resultados obtidos no plaqueamento em superfície comparada com a contagem direta e membrana filtrante difere na ordem de grandeza de 10 vezes mais para a primeira. O menor desvio padrão encontrado entre as médias foi para a técnica da contagem direta de células.

Tabela 25. Comparação entre técnicas da contagem de células, plaqueamento em superfície, número mais provável e membrana filtrante para enumeração de bactérias acéticas, 2ª repetição realizada em laboratório com linhagem-referência *Acetobacter aceti* CCT0190.

Repetição	Contagem Direta (células / mL)	Plaqueamento (UFC / mL)	NMP (NMP / mL)	Membrana (UFC / mL)
1	1,41 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	6,1 x 10 ⁹
2	2,43 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁹
3	2,79 x 10 ⁹	6,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	6,8 x 10 ⁹
4	2,91 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	3,1 x 10 ⁹
5	2,13 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	6,8 x 10 ⁹
6	2,28 x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁹
7	2,40 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁹
8	2,13 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	4,4 x 10 ⁹
9	1,56 x 10 ⁹	6,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁹
10	2,37 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	1,6 x 10 ⁹
11	2,28 x 10 ⁹	8,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	1,9 x 10 ⁹
12	2,07 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁹
13	2,31 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	9,0 x 10 ⁸
14	1,86 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁹
15	2,34 x 10 ⁹	6,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	1,9 x 10 ⁹
16	2,52 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	6,8 x 10 ⁹
17	2,49 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁹
18	3,27 x 10 ⁹	4,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	8,0 x 10 ⁸
19	3,15 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	3,4 x 10 ⁹
20	2,94 x 10 ⁹	4,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	2,1 x 10 ⁹
21	2,40 x 10 ⁹	7,5 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁹
22	3,30 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	2,7 x 10 ⁹
23	2,76 x 10 ⁹	6,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁹
24	3,33 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁹
25	2,19 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	6,2 x 10 ⁹
26	2,73 x 10 ⁹	8,5 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁹
27	2,61 x 10 ⁹	8,0 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	7,6 x 10 ⁹
28	2,58 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	2,6 x 10 ⁹
29	1,89 x 10 ⁹	2,4 x 10 ⁹	≥ 2,4 x 10 ⁸	3,1 x 10 ⁹
30	1,53 x 10 ⁹	*	≥ 2,4 x 10 ⁸	2,7 x 10 ⁹

* não foi possível a contagem pois o crescimento foi espalhado.

Os resultados obtidos para os valores de desvio padrão e coeficiente de variação mostram a dispersão encontrada. A média e o desvio padrão, bem como o número de repetições usado para seus cálculos, podem ser vistos nas Tabelas A4 e A6 (anexos). No método de contagem direta, o coeficiente de variação foi de 23,8% (1ª repetição), 12,9% (2ª repetição). Para o plaqueamento em superfície os valores do coeficiente de variação foram para as 2 repetições, respectivamente, 23,5% e 24,2%. E para a técnica da membrana filtrante os coeficientes de variação foram 2,0% (1ª repetição), 22,6% (2ª repetição). A técnica do número mais provável, como já citado neste trabalho, é apenas uma probabilidade do resultado, portanto o seu uso é pouco consistente.

As Figuras 17 e 18 ilustram os resultados obtidos na contagem de bactérias acéticas pela técnica do plaqueamento em superfície com ágar em dupla camada. A primeira mostra placas com crescimento de colônias possíveis de serem contadas. A Figura 18 apresenta uma forma de crescimento bastante comum em se tratando de bactérias acéticas, porém impossível de ser quantificada.

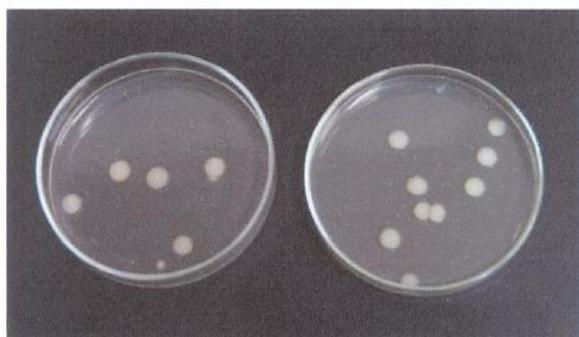


Figura 17. Plaqueamento possível de quantificar



Figura 18. Plaqueamento impossível de quantificar

As Figuras 19 e 20 são referentes ao teste de tubos múltiplos realizado com linhagem-referência de *Acetobacter aceti* CCT 0190. A Figura 19 compara um tubo branco (Tubo A) e outro em que houve crescimento (tubo B), notado pela mudança de cor do meio. Na Figura 20, não há mudança de cor do meio, porém existe a formação de um anel superior indicando crescimento, confirmando a dificuldade de interpretação do método.

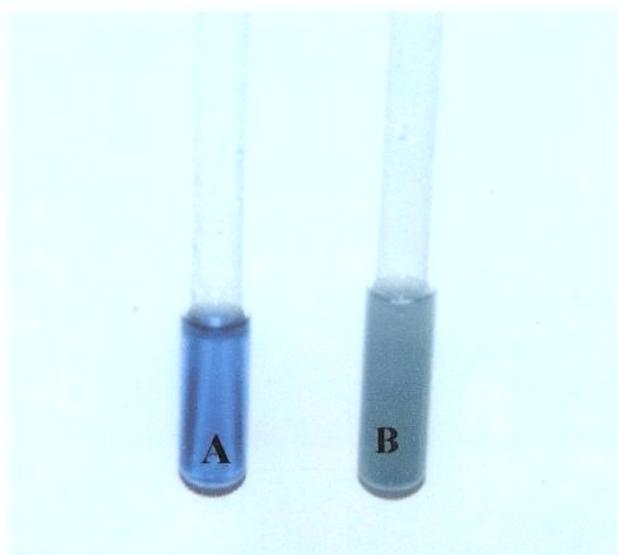


Figura 19. Tubo A com prova negativa e Tubo B com prova positiva

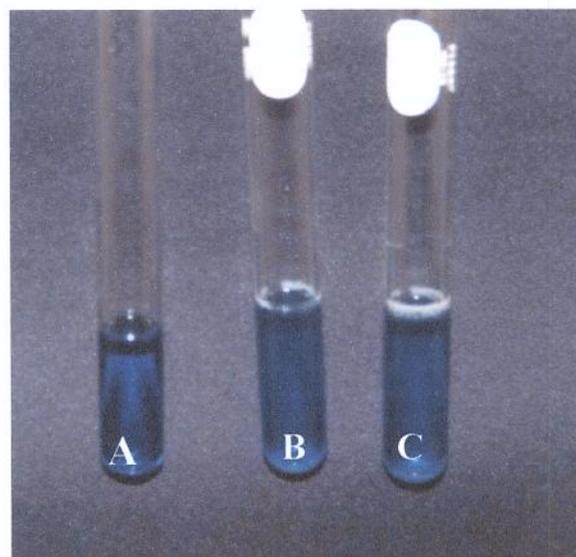


Figura 20. Tubo A com prova negativa e Tubos B e C com respostas dúbias



As Figuras 21 e 22 mostram os resultados obtidos na contagem de bactérias acéticas pela membrana filtrante, em duas repetições diferentes (1ª e 2ª repetições).

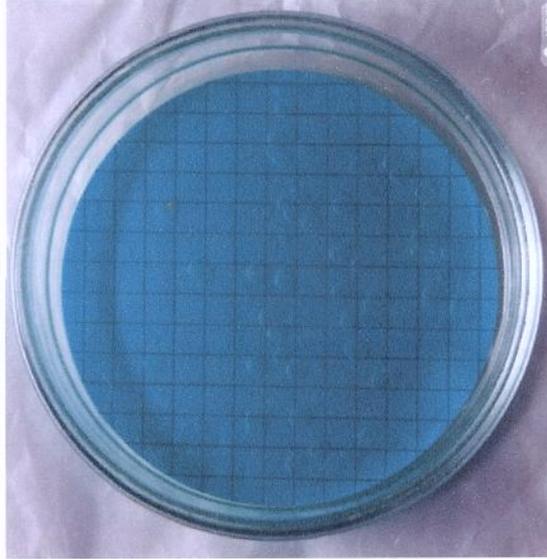


Figura 21. Contagem de bactérias acéticas pela membrana filtrante, meio *MYP* dupla camada, após 24 h de incubação a 30°C e umidade relativa de 96% - 1ª Repetição

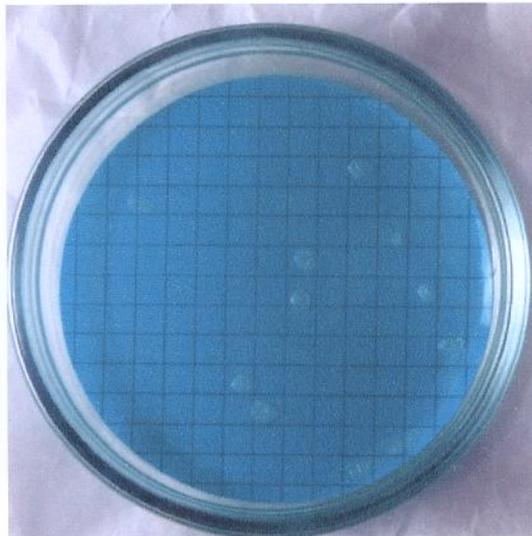


Figura 22. Contagem de bactérias acéticas pela membrana filtrante, meio *MYP* dupla camada, após 24 h de incubação a 30°C e umidade relativa de 96% - 2ª Repetição

Métodos rápidos e automação em microbiologia são importantes não só para a saúde pública, detectando microrganismos patogênicos, como também para monitorar processos industriais. No estudo realizado, a enumeração de bactérias acéticas pela técnica da membrana filtrante apresentou fatores positivos: (1) impediu o crescimento espalhado da bactéria aprisionando-a na grade hidrofóbica com a qual a membrana filtrante é constituída, possibilitando assim a sua contagem (o crescimento de forma espalhada é um fato comum de ocorrência quando se usa o plaqueamento em superfície); (2) o tempo de incubação foi menor do que para as técnicas de plaqueamento em superfície e número mais provável; (3) não produz dúvidas quanto ao crescimento, algo que ocorre com a técnica do número mais provável. Logo, em relação às técnicas do plaqueamento em superfície e do número mais provável, apresenta vantagens. Poderá ainda ser usada no isolamento de linhagens de bactérias acéticas da indústria.

Para uso rotineiro em laboratório, a membrana filtrante apresenta algumas vantagens em relação ao método de tubos múltiplos, como, por exemplo, no controle microbiológico de águas e bebidas. O volume de meio de cultura para a membrana é menor do que no método de tubos múltiplos, 2 mL contra 50 a 150 mL/amostra. O tempo de análise está entre 18 a 24 horas para o primeiro; o tempo para o segundo é de 48 a 96 horas. A possibilidade de resultado falso-positivo é rara para a membrana. Possíveis inibidores são arrastados por lavagens sucessivas. No método dos tubos múltiplos, pode-se ter a presença desses inibidores. A interpretação dos resultados se dá por contagem direta na membrana filtrante; já nos tubos múltiplos é uma estimativa estatística. O custo aproximado para determinação por membrana é de US\$ 1,1/amostra e para o método dos tubos múltiplos US\$ 2,1/amostra¹⁴.

Quanto à comparação entre a técnica da membrana filtrante e a contagem de células, ambas apresentam vantagens e desvantagens quanto ao uso em indústrias produtoras de vinagre. A decisão fica por conta do custo e da aplicação que se deseja. Para

¹⁴ Informações obtidas pela BRAZILFILTER Comercial Ltda. - Osmonics Advantec MFS Inc.

a aplicação em indústrias de bebidas, a técnica da membrana filtrante mostra-se superior à contagem de células. A contagem direta não é adequada para suspensões pouco densas de células, menores que 10^6 células/mL, pois encontram-se poucas no campo do microscópio. As bactérias acéticas têm sido citadas, freqüentemente, como deteriorantes nas indústrias de bebidas.

Sokollek & Hammes (1997) avaliaram que a técnica do NMP e a determinação das unidades formadoras de colônia com meio RAE (1a/2e) se mostraram como métodos confiáveis para determinar a recuperação de preparações congeladas e liofilizadas. Os dados obtidos neste estudo demonstraram que o método do NMP não se apresentou confiável para enumerar bactérias acéticas.

Outra observação apresentada por Sokollek et al. (1998a) foi que no plaqueamento em superfície ocorria a formação de um grumo denso nas placas e os investigadores consideravam como resultado de sobreviventes >1%. Isso também foi encontrado neste estudo, o que se chamou de crescimento impossível de enumeração, demonstrando assim a fragilidade da técnica.

4.5 Estudo de linhagens isoladas de unidades produtoras de vinagre capazes de oxidar etanol

4.5.1 Triagem dos isolados identificados como *Acetobacter* sp. quanto à capacidade para oxidar etanol

Usou-se o critério da oxidação do etanol em ágar *MYP* modificado com concentrações crescentes de etanol para selecionar algumas linhagens purificadas e selecionadas como *Acetobacter* sp., para uma maior caracterização.

Do total de 70 linhagens identificadas como *Acetobacter* sp., apenas nove foram capazes de oxidar o etanol sem a presença de ácido acético. Essa oxidação foi avaliada pela medida empírica do halo (mm) formado em ágar *MYP* modificado pelo acréscimo de etanol em concentrações variadas de 2 a 20%. Ao ágar *MYP* usado acrescentou-se o indicador verde de bromocresol, que, em meio ácido, apresenta a cor amarela.

As linhagens selecionadas foram 006/01, 011/01, 016/03, 055/03, 067/04, 068/04, 078/05, 082/05 e 086/06. Essas apresentaram a capacidade de crescer e oxidar etanol no meio testado. A Tabela 26 mostra as medidas empíricas, em milímetros, obtidas dos halos formados para as nove linhagens e para linhagem-referência de *Acetobacter pasteurianus* (CCT1706). Já as linhagens CCT0173, CCT0174, CCT0190 e CCT1724 não apresentaram essa característica. As Figuras 23 e 24 apresentam o resultado dos testes.

As nove linhagens selecionadas foram capazes de crescer sem a presença de ácido acético no meio. Sievers et al. (1992) relatam que *Acetobacter europaeus* é tolerante a concentrações de ácido acético de 4 a 8% no ágar AE e exige ácido acético para crescer. As linhagens de *Acetobacter oboediens*, que têm capacidade de crescer em caldo AE na presença de ácido até 8%, e *Acetobacter pomorum* apresentaram a característica de crescer sem a presença de ácido acético (Sokollek et al., 1998b).

É pertinente avaliar o material isolado no presente estudo, identificado como *Acetobacter* sp., quanto à capacidade de oxidar o etanol na presença de ácido acético. Pode ser possível que nesse material isolado haja linhagens com capacidade para oxidar o etanol somente na presença de ácido acético.

Tabela 26. Capacidade de oxidação do etanol, medida pelo formação de halo (mm), a 30°C em ágar *MYP* modificado, após 48 horas de incubação

Linhagem	Medida do halo formado (mm)										
	% etanol (v/v) no ágar <i>MYP</i> modificado										
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
006/01	-*	7,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
011/01	30,3	28,2	25,4	17,8	8,1	-	-	-	-	-	-
016/03	-	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
055/03	12,1	10,1	6,1	2,0	-	-	-	-	-	-	-
067/04	-	27,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
068/04	-	9,4	7,3	1,2	-	-	-	-	-	-	-
078/05	-	14,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
082/05	27,0	21,3	12,0	3,1	-	-	-	-	-	-	-
086/06	73,0	54,0	51,0	48,1	38,9	24,0	-	-	-	-	-
CCT0173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCT0174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCT0190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCT1706	-	50,7	43,5	34,4	31,1	20,0	-	-	-	-	-
CCT1724	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* - não houve formação de halo

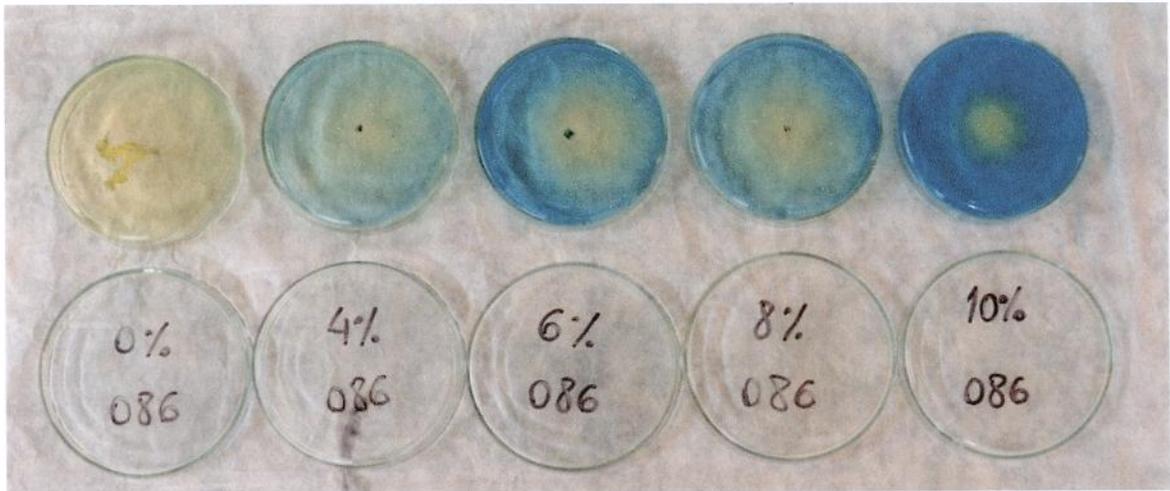


Figura 23. Capacidade de oxidação do etanol pela linhagem 086/06 em ágar *MYP* modificado após 48 horas de incubação a 30°C.

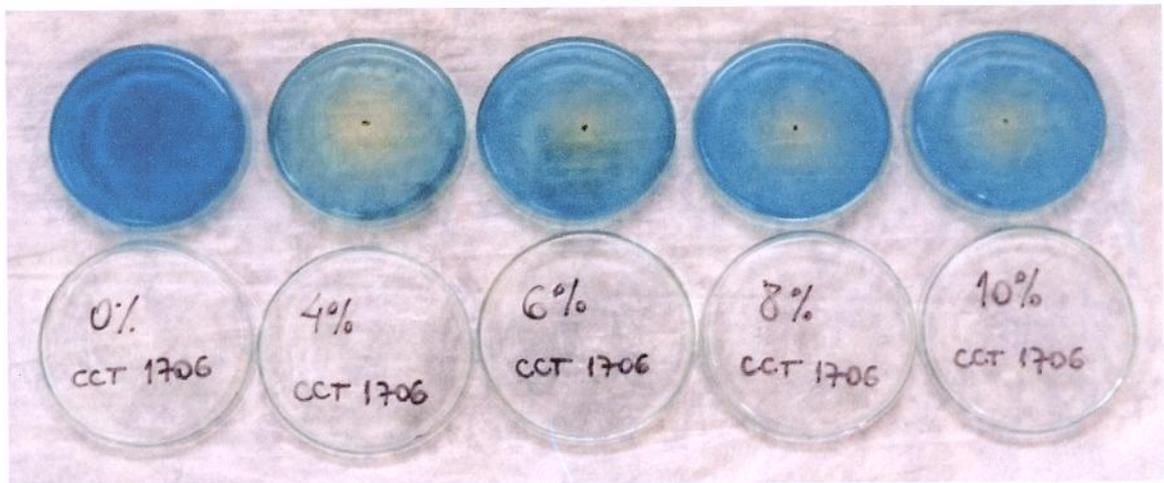


Figura 24 Capacidade de oxidação do etanol pela linhagem-referência *Acetobacter aceti* CCT1706 em ágar *MYP* modificado após 48 horas de incubação a 30°C.

Os isolados 011/01, 055/03, 082/05 e 086/07 apresentaram também habilidade para oxidar o manitol do ágar *MYP* sem a presença de etanol, formando halo e mudando a cor do meio de cultura de azul para amarelo (Figura 23). Lisdiyanti et al. (2000) afirmaram que linhagens de *Acetobacter* não são capazes de utilizar D-manitol como fonte de carbono. As linhagens por eles estudadas cresciam mal em caldo e ágar *MYP* com e sem manitol. O pouco crescimento observado pôde ser explicado pelo fato de que linhagens de *Acetobacter* estariam usando extrato de levedura e peptona como fonte de carbono. Em contraste, linhagens de *Gluconobacter oxydans* IFO 14819^T, *Gluconobacter frateurii* NRIC 0228^T, *Gluconobacter cerinus* NRIC 0229^T, *Gluconoacetobacter liquefaciens* IFO 12388^T, *Gluconoacetobacter hansenii* LMG 1527^T, *Gluconoacetobacter xylinus* IFO 15327^T e *Asaia bogorensis* JCM 10569^T cresceram bem tanto em caldo como em ágar *MYP*, porém não cresceram sem D-manitol. Segundo os mesmos autores, Asai foi o primeiro a sugerir, em 1964, o uso do ágar *MYP* para diferenciação de bactéria acética. Yamada et al. (1997) relataram o não crescimento do gênero *Acetobacter* em ágar *MYP* e reforçaram o uso desse para identificar bactérias do gênero *Gluconobacter* ou *Gluconoacetobacter*. Boesch et al. (1998) rejeitaram essa colocação argumentando que diferenciar gênero pelo crescimento em ágar manitol era definitivamente errado. Disseram ainda que, nos catálogos de linhagens de bactérias, o ágar *MYP* era indicado como meio tanto para *Acetobacter* como para *Gluconobacter* pelo *Laboratorium Microbiologie Rijksuniversiteit Gent*, BCCM no *Catalogue*, do ano de 1989.

Estas nove linhagens e a referência CCT1706, após incubação prolongada (21 dias), superoxidaram o ácido produzido. Isso foi observado pela mudança de cor do halo do meio *MYP*, de amarelo para azul.

4.5.2 Caracterização das linhagens isoladas e selecionadas pela capacidade de oxidação de etanol em meio *MYP* modificado

Informações sobre dados relativos ao lugar onde foram coletadas as linhagens

006/01, 011/01, 016/03, 055/03, 067/04, 068/04, 078/05, 082/05 e 086/06 estão apresentadas na Tabela 27.

Tabela 27. Local e dados de onde as linhagens selecionadas foram coletadas.

Linhagem	Indústria	Dorna	Substrato	Temperatura (° C)	%ácido acético	% etanol	Concentração Total (%CT)
006/01	1	2	Álcool	33	8,10	2,40	10,50
011/01	1	1	Álcool	33	10,26	0,54	10,80
016/03	1	6	Álcool	33	9,00	1,00	10,00
055/03	1	9	Álcool	33	9,84	0,70	10,54
067/04	Frings	1	Milho/Arroz	30	9,80	0,50	10,30
068/04	Frings	1	Milho/Arroz	30	9,80	0,50	10,30
078/05	2	2	Álcool	33	7,20	1,20	8,40
082/05	2	5	Vinho Tinto	33	8,60	1,20	9,80
086/06	1	1	Maçã	33	5,70	0,70	6,40

A morfologia das colônias e das células desse grupo de isolados selecionados estão apresentadas na Tabela A1 (anexo).

4.5.3 Crescimento das linhagens isoladas e selecionadas pela capacidade de oxidação de etanol nas temperaturas de 30, 35 e 40°C

O crescimento, em incubadora agitada (120 rpm), no meio *MYP*, por 72 horas, das nove linhagens isoladas das unidades produtoras de vinagre e selecionadas como formadoras de halo, foi positivo para as temperaturas de 30, 35 e 40°C. Cabe lembrar que os locais de isolamento dessas linhagens operavam em temperaturas variando de 30 a 33°C.

É interessante do ponto de vista industrial trabalhar com linhagens termotolerantes. O uso de linhagens mesofílicas, com temperatura ótima em torno de 30°C, para a produção de vinagre, obriga muitas indústrias a controlarem rigorosamente essa temperatura. O custo para manter a temperatura nesse patamar torna-se alto para a unidade produtora. Vários fatores contribuem para aumentar a temperatura durante o processo de

oxidação do etanol a ácido acético. Entre eles, pode-se citar que a fermentação submersa é exotérmica, além das condições climáticas do país mostrarem altas temperaturas durante a maior parte do ano. Portanto, estudos posteriores serão necessários para avaliar a capacidade de produção dessas linhagens a temperaturas maiores que 30°C, com diferentes concentrações de etanol e ácido acético.

4.5.4 Crescimento das linhagens isoladas e selecionadas pela capacidade de oxidação de etanol nas concentrações em ácido acético de 5, 10 e 15%

De todos os isolados que foram inoculados em caldo *MYP* modificado pela adição de 5, 10 e 15% de ácido acético, por 96 horas de incubação a 30°C, somente os 082/05, 011/01 e a linhagem-referência CCT1706 foram capazes de crescer na mais alta concentração. Para a concentração de 10% além dessas, as linhagens de números 006/01, 055/03, 067/04, 068/04, 072/05 e referência CCT173 também foram capazes de crescer. E na menor concentração (5% de ácido acético no meio *MYP*) todos os isolados e linhagens-referências testados cresceram.

4.5.5 Características bioquímicas e fisiológicas das linhagens isoladas e selecionadas pela capacidade de oxidação de etanol

O efeito do pH sobre a resistência dos isolados foi avaliado em valores de 1,5; 2,5; 3,5 e 5. Todos os nove isolados mostraram-se resistentes, isto é, houve a presença de células vivas quando observadas ao microscópio, após um período de 72 horas de incubação a 30°C em meio *MYP* corrigido nos valores de pH experimentados. Foi observado ao microscópio o aparecimento de formas involutivas em meio com valores de pH de 1,5 e 2,5.

A caracterização fisiológica e bioquímica testada em cada uma das nove linhagens estudadas detalhadamente, mais as linhagens-referência, estão na Tabela 28.

Os nove isolados não formaram endosporos, não produziram indol a partir do triptofano, eram oxidase e gelatinase negativa. Todos esses critérios estavam de acordo com o proposto por Swings (1992), para uma rápida identificação fenotípica da família *Acetobacteraceae*, além de serem Gram negativos, com capacidade de oxidar etanol a ácido acético e apresentarem metabolismo estritamente aeróbio. Esperava-se também que estes isolados não reduzissem o nitrato, conforme apontamento daquele autor, porém isso não ocorreu. Além disso, nenhuma dessas linhagens produziu celulose e dihidroxiacetona a partir de glicerol. Não houve formação de pigmentos marrons. Todas foram capazes de crescer em meio Hoyer e em meio com pH 5, sendo produtoras de catalase. Apenas 5 produziram ácido a partir de glicose.

A utilização de várias fontes de carbono pelas linhagens selecionadas está apresentada na Tabela 29. As Figuras 25, 26, 27 e 28 apresentam o crescimento dos isolados e linhagens-referência nessas diferentes fontes de carbono.

As linhagens 006/01, 011/01, 016/03 e 086/06, isoladas da indústria 1, podem ser agrupadas por apresentarem crescimento nas mesmas fontes de carbono. Da mesma forma, as linhagens 078/05 e 082/05, isoladas da indústria 2, também cresceram nas mesmas fontes de carbono.

A literatura indica que as melhores fontes de carbono para *Acetobacter* são, em ordem decrescente, etanol, glicerol e lactato de sódio (De Ley et al., 1984). Assim como é relatado por Swings (1992) que lactose e amido não são usados como fonte de carbono. Porém todos os isolados e linhagens-referência testados foram capazes de usar amido como fonte de carbono. Como *Acetobacter methanolicus*, todos os isolados e linhagens-referência foram capazes de crescer com metanol.

Tabela 28. Reações bioquímicas das linhagens isoladas e selecionadas como capazes de oxidar etanol e de linhagens-referência, preparadas conforme procedimento padrão de inóculo.

Reações Bioquímicas	Linhagem													
	006/01	011/01	016/03	055/03	067/04	068/04	078/05	082/05	086/06	CCT 173	CCT 174	CCT 190	CCT 1706	CCT 1724
Crescimento meio Hoyer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento pH 5,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formação de pigmentos marrons	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidação etanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção ácido a partir de glicose	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Produção celulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Produção de dihidroxiacetona a partir de glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de gelatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de indol do triptofano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Redução de nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 29. Crescimento após 96 horas de incubação a 30°C em diferentes fontes de carbono de linhagens isoladas e selecionadas como capazes de oxidar etanol e linhagens-referência.

Prova	Linhagem													
	006/01	011/01	016/03	055/03	067/04	068/04	078/05	082/05	086/06	CCT 173	CCT 174	CCT 190	CCT 1706	CCT 1724
Amido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Butanol	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Iso-Amílico	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Iso-propanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
n-Amílico	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



Figura 25. Crescimento de linhagem 086/06 em diferentes fontes de carbono, em meio *MYP* modificado, após 72 h de incubação a 30°C



Figura 26. Crescimento de linhagem-referência CCT1706 em diferentes fontes de carbono, em meio *MYP* modificado, após 72 h de incubação a 30°C

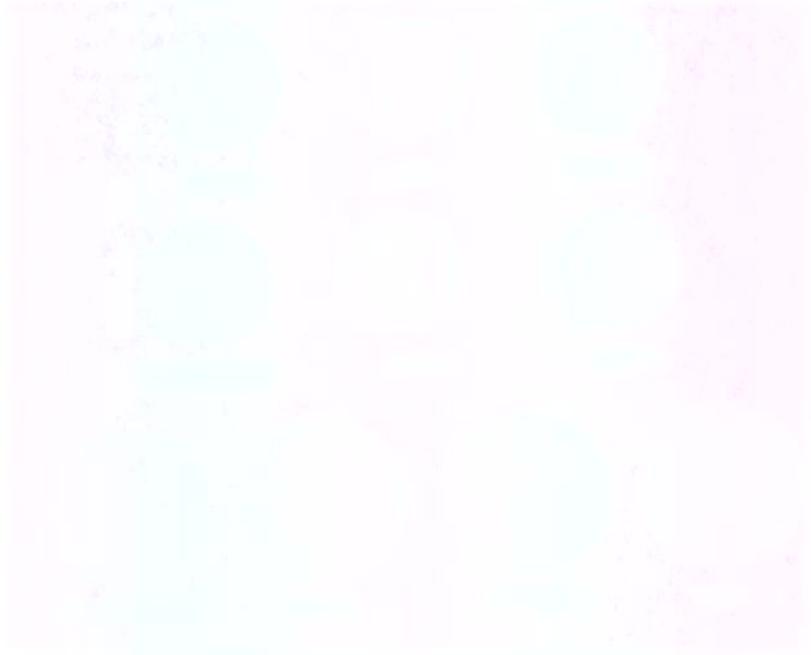




Figura 27. Crescimento de linhagem isolada em diferentes fontes de carbono em meio *Suomalainem*, modificado após 72 h de incubação a 30°C



Figura 28. Crescimento de linhagem-referência CCT 1706 em diferentes fontes de carbono em meio *Suomalainem*, modificado após 72 h de incubação a 30°C



4.6 Estudo cinético das linhagens isoladas e selecionadas como capazes de oxidar o etanol

4.6.1 Monitoramento de parâmetros cinéticos em escala laboratorial

As Figuras F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9 (anexo) mostram o monitoramento em escala laboratorial dos parâmetros de crescimento, consumo de etanol e glicose, oxigênio dissolvido e medidas de pH no meio, e a produção de ácido acético para cada linhagem selecionada do grupo. As Tabelas A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15 e A16 apresentam os resultados obtidos no monitoramento dos parâmetros medidos em escala de laboratório. A Tabela A17 apresenta parâmetros cinéticos e rendimentos calculados a partir do monitoramento da produção de ácido, partindo de uma concentração total de 6%, com 2% de ácido e 4% de etanol (meio RAE), frasco *Fernbach*, a 30°C com agitação de 120 rotações por minuto.

Os resultados permitem observar a tendência dos parâmetros cinéticos, uma vez que o experimento é conduzido em incubadora agitada, não se tem uma oxigenação adequada no processo e o tempo dos experimentos é muito longo. Porém, pode-se notar que, à medida que se desenvolve o processo e tem-se produção de ácido, o teor de oxigênio dissolvido no meio diminui substancialmente em relação ao valor inicial e permanece constante em torno de 1 mg de O₂ dissolvido por litro. O teor de açúcar redutor expresso como glicose em todas as linhagens do grupo estudado atingiu a metade do seu valor inicial ao final do processo. E pareceu não depender da taxa de consumo de etanol. O valor médio do pH para todas as linhagens estudadas foi de 3,39 (d.p.¹⁵ 0,08; c.v.¹⁶ 2,33%). Os níveis de ácido acético no meio conferem um valor de pH próximo de 3, dado esse observado e encontrado na literatura (Spinosa, 1996; Adams, 1985).

¹⁵ d.p. desvio padrão

¹⁶ c.v. coeficiente de variação

Em todas as linhagens selecionadas, observou-se a superoxidação do ácido acético em concentração de etanol próxima de zero e teores de ácido acético em torno de 5% (dados apresentados na Tabela 16).

Nas curvas de crescimento obtidas, tem-se um crescimento bacteriano típico. Ao plotar o logaritmo do número de organismos contra o tempo, as mudanças na velocidade de crescimento resultam em uma curva sigmóide, com fase lag após o tempo igual a zero, seguida por uma fase exponencial e então por uma fase estacionária.

A produtividade em gramas por 100 mL em 24 horas é dada na Tabela A18 nas diferentes concentrações de etanol e ácido acético para as linhagens selecionadas.

4.6.2 Monitoramento dos parâmetros cinéticos em escala piloto para um ciclo fermentativo

Caracterizou-se um ciclo de fermentação semi-contínua de vinagre que foi inoculada com cultura pura dos isolados 086/06 e 082/05 em reatores piloto *Frings*. Os dados obtidos e as curvas estão nas Tabela 30, Tabela 31, Figura 29 e Figura 30 para ambos fermentadores.

Tabela 30. Monitoramento do ciclo fermentativo da linhagem 086/06 em meio RAE com CT de 7,5% em reator *Frings* com volume total de 8 L.

t (h)	T °C	Turbidez	ln N/N ₀	O.D ¹⁷ .mg/ L	PH	%A.R ¹⁸	%acidez	%álcool	%CT
0	30,0	1,080	0,000	1,07	3,36	2,33	4,21	3,37	7,58
1	29,7	1,101	0,019	1,05	3,32	2,21	4,28	3,31	7,59
2	29,9	1,097	0,016	0,96	3,29	2,47	4,37	3,23	7,60
3	30,0	1,097	0,016	0,88	3,28	2,49	4,41	3,02	7,43
4	29,9	1,103	0,021	0,86	3,29	2,30	4,49	2,89	7,38
5	30,0	1,155	0,067	0,86	3,30	2,35	4,53	2,76	7,29
6	30,0	1,178	0,087	0,81	3,28	2,34	4,56	2,68	7,24
7	30,1	1,204	0,109	0,77	3,24	2,55	4,63	2,60	7,23
8	30,1	1,248	0,145	0,78	3,12	2,53	4,91	2,52	7,43
9	30,4	1,262	0,156	0,81	3,27	2,64	5,08	2,37	7,45
10	30,4	1,302	0,187	0,84	3,22	2,60	5,27	2,17	7,44
11	30,1	1,340	0,216	1,19	3,21	2,49	5,34	2,08	7,42
12	30,2	1,354	0,226	0,76	3,19	2,60	5,40	2,03	7,43
13	30,1	1,384	0,248	0,82	3,18	2,56	5,54	2,00	7,54
14	30,0	1,399	0,259	0,76	3,17	2,53	5,64	1,97	7,61
15	29,9	1,421	0,274	0,79	3,18	2,30	5,73	1,42	7,15
16	30,0	1,439	0,287	0,75	3,16	2,08	5,98	1,36	7,34
17	29,9	1,437	0,286	0,66	3,15	2,10	6,03	1,24	7,27
18	30,1	1,443	0,290	0,78	3,16	2,19	6,09	1,16	7,25
19	30,2	1,444	0,290	0,76	3,14	2,14	6,21	1,01	7,22
20	30,0	1,651	0,424	0,75	2,96	2,11	6,24	0,93	7,17
21	30,1	1,810	0,516	0,77	3,14	1,98	6,55	0,81	7,36
22	30,0	1,830	0,527	0,82	3,13	1,95	6,68	0,63	7,31

¹⁷ O.D. oxigênio dissolvido

¹⁸ A.R. açúcar redutor expresso em mg de glicose/mL

Tabela 31. Monitoramento do ciclo fermentativo da linhagem 082/05 em meio RAE com CT de 7,5% em reator *Frings* com volume total de 8 L.

t (h)	T °C	Turbidez	ln N/N ₀	O.D.mg/L	PH	%A.R.	%acidez	%álcool	%CT
0	29,7	3,15	0,000	0,84	3,26	2,3	3,14	4,40	7,54
1	29,8	3,28	0,039	1,09	3,25	2,0	3,23	4,06	7,29
2	29,8	3,04	-0,037	0,77	3,20	2,5	3,24	4,01	7,25
3	29,8	3,01	-0,047	0,74	3,18	2,4	3,31	3,91	7,22
4	30,6	2,95	-0,067	0,76	3,17	2,3	3,34	3,60	6,94
5	30,3	3,00	-0,049	0,73	3,19	2,2	3,61	3,46	7,07
6	30,3	3,06	-0,029	0,73	3,17	2,1	3,77	3,35	7,12
7	30,2	3,13	-0,008	0,71	3,18	2,4	3,92	3,28	7,20
8	30,0	3,26	0,034	0,70	3,14	2,1	4,16	3,21	7,37
9	30,0	3,23	0,024	0,79	3,13	2,2	4,25	3,12	7,37
10	30,1	3,14	-0,003	0,68	3,12	2,0	4,34	3,00	7,34
11	30,0	3,16	0,003	0,72	3,09	2,0	4,45	2,81	7,26
12	30,0	2,99	-0,052	0,74	3,07	1,9	4,67	2,47	7,14
13	29,9	3,11	-0,014	0,72	3,03	1,9	5,14	2,13	7,27
14	30,1	3,13	-0,006	0,75	3,00	2,0	5,56	1,65	7,21
15	29,9	3,64	0,145	0,80	2,98	2,0	6,08	1,03	7,11
16	30,0	3,75	0,174	0,76	2,96	2,0	6,47	0,52	6,99
17	30,1	3,77	0,180	0,72	2,95	1,9	6,72	0,41	7,13

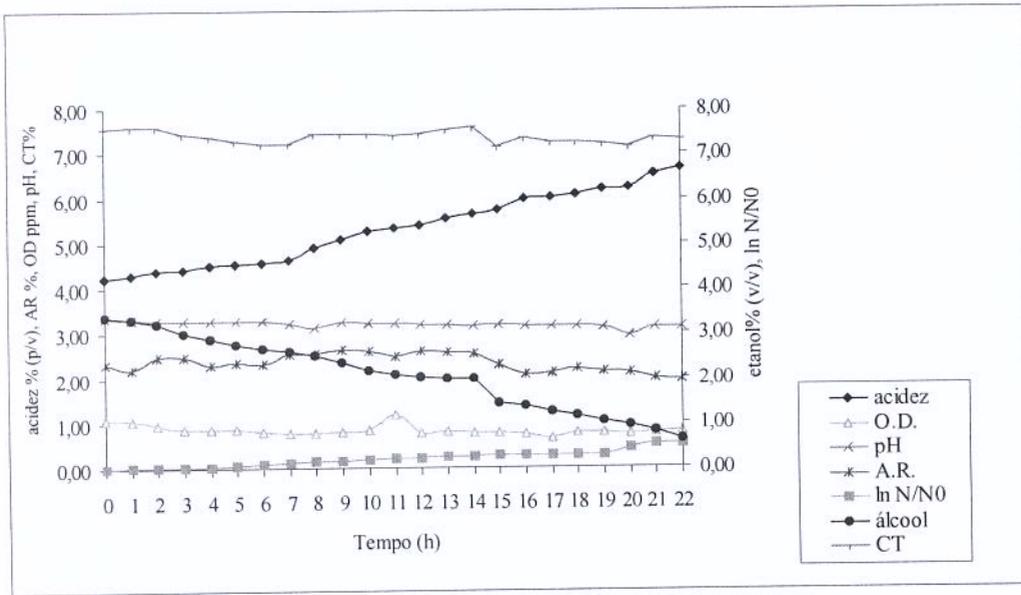


Figura 29. Curvas dos parâmetros medidos para a linhagem 086/06 em um ciclo fermentativo com CT 7,5%

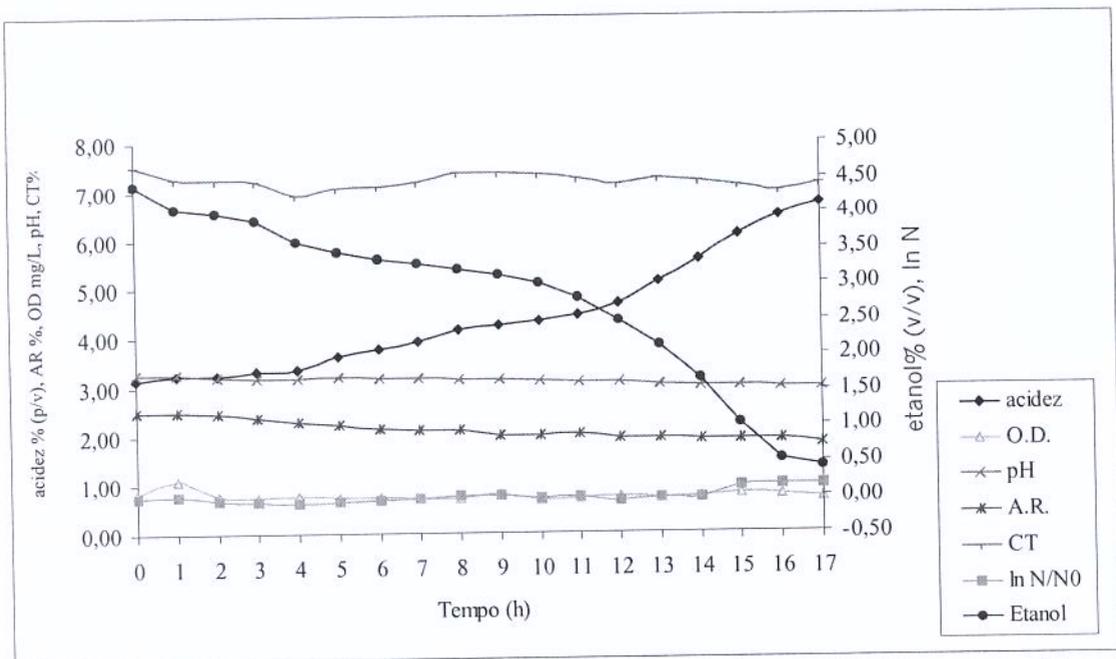


Figura 30. Curvas dos parâmetros medidos para a linhagem 082/05 em um ciclo fermentativo com CT 7,5%.

Como mostram as tabelas (Tabelas 30 e 31), o ciclo para as linhagens 086/06 e 082/05 tinha uma duração de 22 e 17 horas, respectivamente. Os valores médios de pH no meio foram de 3,21 (d.p. 0,09, c.v. 2,73%) e 3,12 (d.p. 0,10, c.v. 3,11%) para as respectivas linhagens. Os teores de oxigênio dissolvido no meio em mg de O₂/mL foram 0,8 (d.p. 0,12, c.v. 14,51%) e 0,76 (d.p. 0,09, c.v. 11,78%) para as linhagens 086/06 e 082/05, respectivamente. O teor de açúcar redutor expresso como g de glicose/100mL foi de 2,3 (d.p. 0,21, c.v. 9,08%) para a linhagem 086/06 e 2,11 (d.p. 0,23, c.v. 10,66%) para linhagem 082/05.

A concentração total estudada foi de 7,5% com a relação de etanol e ácido acético em porcentagem de aproximadamente 3,25e/4,25a, no início do processo, para os dois reatores estudados. O valor da concentração total, que é a soma do teor de etanol e de ácido, permanece praticamente constante durante o ciclo. Isso pode ser observado nas curvas de CT apresentadas nas Figuras 31 e 32. Nos ciclos de fermentação com as linhagens 086/06 e 082/05, desvio padrão de 0,15 e coeficiente de variação de 2% foram obtidos para a dada CT.

O caldo RAE foi inoculado com 79 mg de massa celular/L da linhagem 086/06 no reator Frings. O tamanho máximo foi alcançado com uma concentração de etanol de 0,63% (117,1 mg de massa celular/L). No caso da linhagem 082/05, o tamanho do inóculo foi de 1,00 g/L e o valor máximo atingido foi de 1,12 g de massa celular/L na concentração de etanol de 0,41%. As Figuras F11 e F12, apresentadas no anexo I, mostram a curva de massa celular seca.

No estudo da linhagem 086/06, as velocidades médias de produção, de consumo de etanol, de crescimento e de consumo de oxigênio, foram de 0,1147 h⁻¹ (R² 0,9858), -0,1157 h⁻¹ (R² 0,9823), 0,0227 h⁻¹ (R² 0,9864) e -0,0431 h⁻¹ (R² 0,9381), respectivamente. O tempo de duplicação foi de 30 horas. As curvas da Figura F13 (anexo) representam as variações, com o tempo, de taxas específicas para essa linhagem. Observa-

se uma estreita correlação entre as taxas específicas de produção e crescimento; a taxa específica de consumo de etanol acompanha, aproximadamente, a de consumo de oxigênio. Os cálculos de rendimentos em ácido acético e em concentração total foram respectivamente: $Y_{\text{ácido}}$ igual a 88,13% e Y de 96,44%.

Já com a linhagem 082/05, pode-se observar que a formação de ácido acético seguiu uma cinética de produção em que a velocidade média foi de $0,454 \text{ h}^{-1}$ (R^2 0,9914). A velocidade média de consumo do etanol, crescimento e consumo de oxigênio foram de $-0,5 \text{ h}^{-1}$ (R^2 0,9906), $0,0244 \text{ h}^{-1}$ (R^2 0,9650) e $-0,175 \text{ h}^{-1}$ (R^2 0,8138), respectivamente. O tempo de duplicação foi de 28 horas. A Figura F14 (anexo) mostra as curvas das taxas específicas para essa linhagem. Tem-se que a taxa específica de produção é superior à de crescimento. A taxa específica de consumo de etanol é inferior à de consumo de oxigênio. Os cálculos de rendimento em ácido acético e em concentração total foram, respectivamente: $Y_{\text{ácido}}$ igual a 89,1% e Y de 94,6%.

Em processos de fermentação semi-contínuos, mudanças nas contagens celulares durante o ciclo são geralmente baixas, não podendo ser detectadas fases distintas do crescimento. Visto que o processo se dá pelo carregamento do fermentador com meio, adição do inóculo, aguardo do término da fermentação e retirada de 1/3 do volume de líquido fermentado e acréscimo da mesma quantia, pode-se confirmar essa pequena mudança no crescimento celular pelas Figuras 29 e 30.

Os resultados de produtividade em gramas de ácido acético por 100 mL em 24 horas, obtidos para as linhagens 086/06 e 082/05, na CT de 7,5%, foram, respectivamente, de 2,9 e 4,2.

As Tabelas 32 e 33 e as Figuras 30 e 31 apresentam resultados de rendimento em ácido, rendimento em concentração total e produtividades para diferentes concentrações totais estudadas das linhagens 086/06 e 082/05.

Tabela 32. Ciclos fermentativos com linhagem 086/06 nas concentrações totais (%CT) de 5,0; 6,5; 7,5; 9,0 e 9,5.

Ciclo	tempo (h)	%CT	$Y_{\text{ácido}}$ (%)	Y (%)	P g/100mL*24 h
1	96	5,0	92	98,2	0,7
2	24	6,5	89	98,0	1,9
3	21,5	7,5	88	96,3	2,9
4	43	9,0	82	83,7	2,0
5	47	9,5	79	85,7	1,5

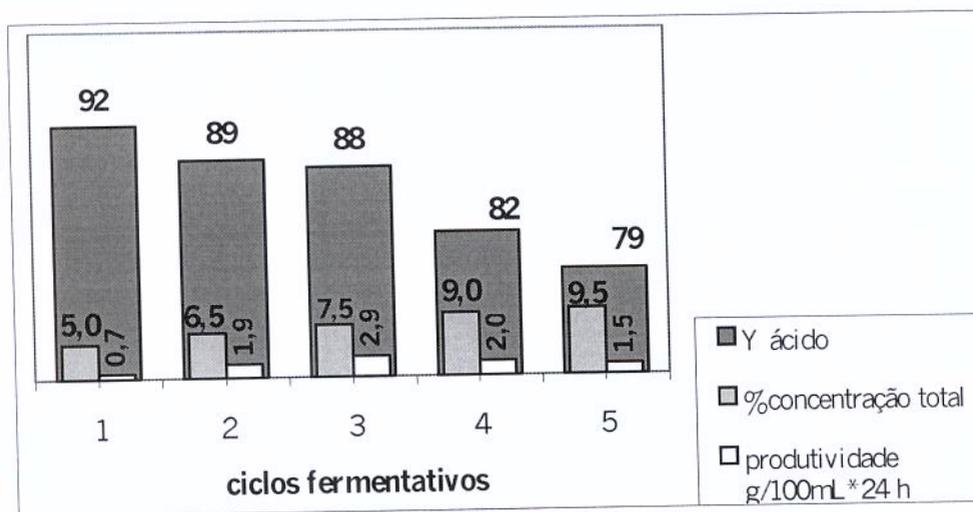


Figura 31. Comparativo entre produtividade e rendimento em ácido acético para linhagem 086/06 em CT de 5; 6,5; 7,5; 9,0 e 9,5%.

Tabela 33. Ciclos fermentativos com linhagem 082/05 nas concentrações totais (%CT) de 5,0; 6,5; 7,5; 9,0 e 9,5.

Ciclo	tempo (h)	%CT	$Y_{\text{ácido}}$ (%)	\bar{Y} (%)	P g/100mL*24 h
1	20	4,0	81,9	92,97	2,1
2	22	6,0	92,6	93,14	4,0
3	21,5	7,5	88,7	93,68	4,2
4	31	9,0	82,0	84,55	2,6
5	63,3	9,5	80,2	84,32	1,3

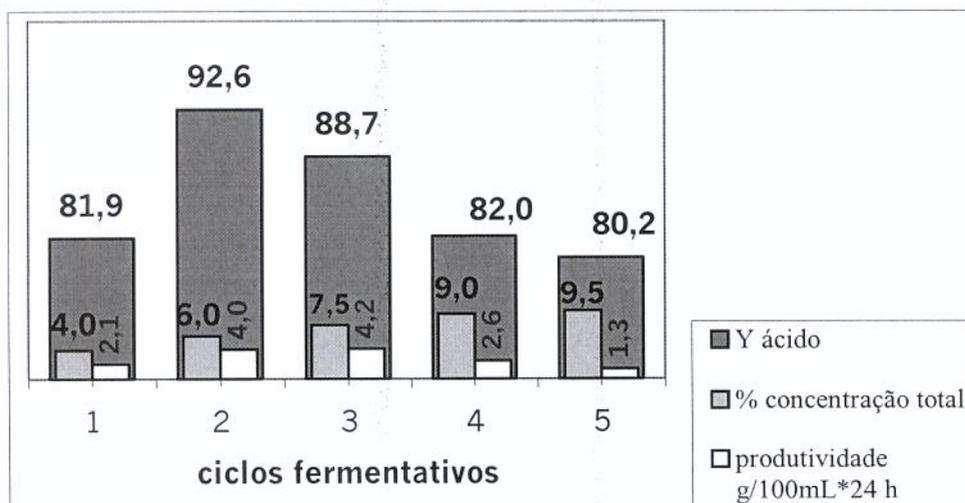


Figura 32. Comparativo entre produtividade e rendimento em ácido acético para linhagem 082/05 em CT de 5; 6,5; 7,5; 9,0 e 9,5%.

Esses dados permitem observar o efeito da concentração total e das concentrações de etanol e ácido acético para cada linhagem estudada. Para a linhagem 086/06, tem-se que, tanto para baixas concentrações de etanol e ácido acético (3e/2a) como para altas concentrações (5e/4,5a), reduzem-se os valores de produtividade; 0,7 e 1,5 g de ácido acético/100 mL em 24 horas. Os tempos para um ciclo de fermentação são altos; 96

e 47 horas, respectivamente. Valores de produtividade ótimos são conseguidos para uma CT de 7,5% (3,5e/4a) e o tempo de fermentação é o menor conseguido, 21,5 horas.

A linhagem 082/05 apresenta o mesmo comportamento, porém, com valores melhores que a linhagem 086/06. O menor valor de produtividade e maior tempo de fermentação foram com alta CT, 9,5% (5,5e/4a), sendo 1,3 g de ácido acético/100 mL em 24 horas, para duração de 63,3 horas de um ciclo. Valores ótimos foram obtidos com CT de 7,5% (4,5e/3a), 4,2 g de ácido acético/100 mL por 24 horas e levando o tempo de fermentação a 21,5 horas. Baixa concentração total, 4% (2,5e/1,5a), também leva a baixo valor de produtividade, 2,1 g de ácido acético/100 mL por 24 horas, porém, o tempo de fermentação não é afetado negativamente.

Ao estabelecer comparação entre os resultados do estudo conduzido com as duas linhagens, 086/06 e 082/05, pode-se inferir que essa última apresenta dados mais interessantes para o processo industrial. Isto é, melhor produtividade em 24 horas, menor tempo de fermentação, maior resistência ao etanol e ao ácido acético. Além de velocidade média de produção maior. Cabe lembrar também que o isolamento da linhagem 086/06 foi efetuado após duas horas em que a dorna de fermentação estava parada na indústria e a linhagem 082/05 foi isolada após 10 horas do início da fermentação. Pode-se ter que a fase em que a linhagem é isolada dos fermentadores influencia na resistência e produtividade quando usada como inóculo.

4.6.3 Comparação entre parâmetros de produção de fermentação acética em escala piloto e industrial

Levantaram-se dados de produção em escala industrial, dornas de 20.000 L, para estabelecer comparação com linhagens isoladas e estudadas em reator piloto. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 34 e Figura 33.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 34. Monitoramento do ciclo fermentativo de cultura mista na indústria 1, substrato álcool em dornas de fermentação, com volume total de 20 m³.

T (h)	T °C	Turbidez	ln N/N ₀	O.D.mg/L	pH	%A.R.	%acidez	%álcool	%CT
0:00	33	0,83	0,000	3,56	2,64	0,0460	9,28	0,39	9,67
3:30	33	0,44	0,000	5,60	2,6	0,0130	7,54	2,06	9,60
5:50	33	0,41	-0,075	4,40	2,6	0,0160	7,19	2,74	9,93
9:50	33,5	0,47	0,059	3,62	2,61	0,0200	7,78	2,02	9,80
13:50	30	0,59	0,284	4,25	2,55	0,024	8,58	1,81	10,39
15:50	31	0,67	0,405	4,77	2,54	0,0260	9,05	0,85	9,90
19:10	36	0,68	0,429	5,20	2,5	0,0220	9,54	0,47	10,01

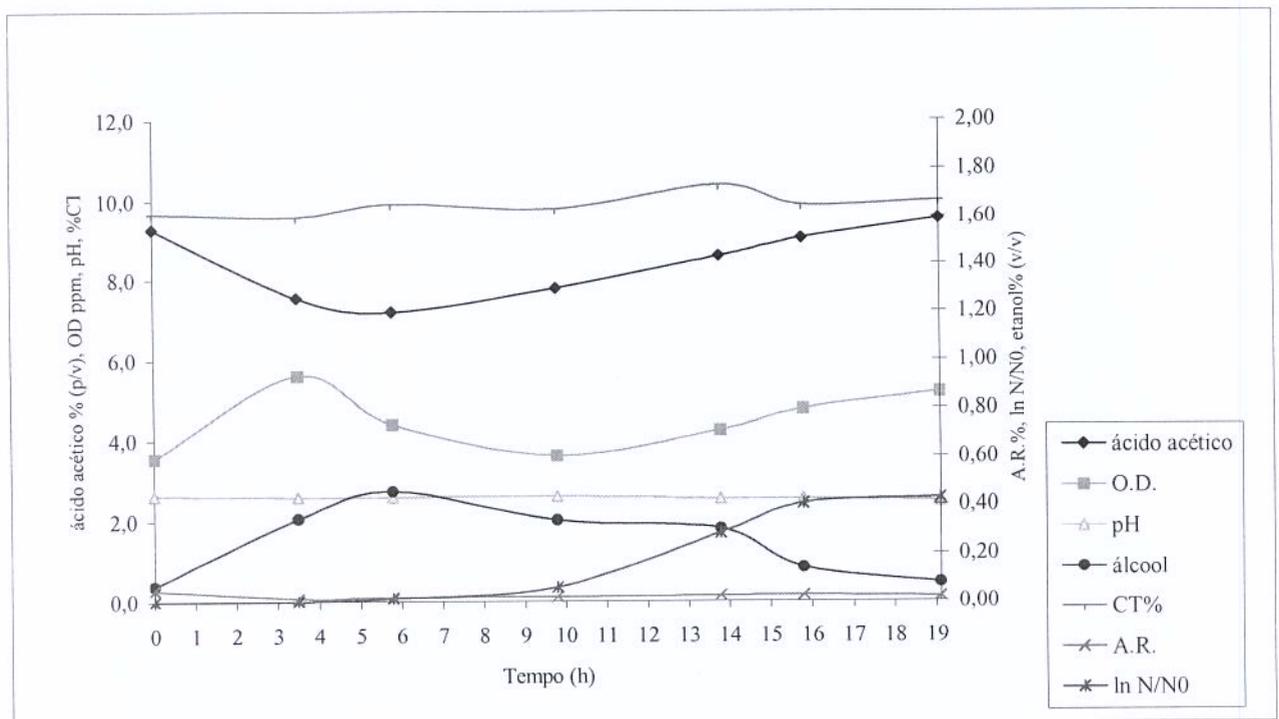


Figura 33. Curvas dos parâmetros medidos para cultura mista na indústria 1 em um ciclo fermentativo com CT 10%.

Para a concentração total média de 9,9% (d.p. 0,26, c.v. 2,63), obteve-se um tempo de fermentação de 20 horas, com uma velocidade média de produção de $0,1823 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 0,9947$), velocidade de consumo de etanol de $-0,1708 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 0,9359$), e de consumo de oxigênio de $0,1742 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 0,9878$). A produtividade obtida foi de 2,4 g de ácido acético/100 mL em 24 horas e o rendimento em ácido foi de $Y_{\text{ácido}}$ 98,6%. O teor de oxigênio dissolvido no meio apresentou valor médio de 4,58 mg de O_2/L (d.p. 0,75; c.v. 16,42%). O pH médio foi de 2,58 (d.p. 0,05; c.v. 1,88%) e o teor médio de açúcar redutor 0,02 g de glicose/100 mL (d.p. 0,01; c.v. 45,04%).

Na indústria, o processo semi-contínuo de fermentação foi conduzido pelo carregamento do fermentador com substrato por um período de 5 horas, isto significa 1/4 do período total do ciclo fermentativo. Nas condições em que se processa não é possível também observar mudanças nas contagens celulares, não podendo distinguir as diferentes fases do crescimento. A velocidade média de crescimento é de $0,0402 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 0,9208$).

Os resultados obtidos para o ciclo de fermentação em escala piloto com a linhagem isolada da indústria 1 (086/06) estão na Tabela 35 e Figura 34. A concentração média estudada foi de 10,1% (d.p. 0,19, c.v. 1,9).

Taxas específicas obtidas com a cultura mista da indústria é apresentada na Figura F15 (anexo). As taxas específicas de crescimento e consumo de etanol foram praticamente iguais.

Tabela 35. Monitoramento do ciclo fermentativo da linhagem 086/06, isolada da indústria 1, em meio RAE com CT de 10% em reator *Frings* com volume total de 8 L.

t (h)	T °C	Turbidez	ln N/N ₀	O.D.mg/L	pH	%A.R.	%acidez	%álcool	%CT
0	30	0,839	0,0000	0,61	3,17	1,65	6,18	4,36	10,54
3	30	0,893	0,0624	0,61	3,23	1,41	6,18	4,28	10,46
6	30	0,919	0,0911	0,57	3,24	1,62	6,18	4,19	10,37
9	30	0,929	0,1019	1,17	3,25	1,67	6,59	3,60	10,19
12	30	0,943	0,1169	1,28	3,22	1,21	6,65	3,50	10,15
15	29,8	0,953	0,1274	0,99	3,22	1,42	6,70	3,47	10,17
18	29,8	0,941	0,1147	0,93	3,06	1,51	6,76	3,25	10,01
21	30	0,947	0,1211	0,95	3,06	1,32	6,83	3,17	10,00
24	30	0,978	0,1533	0,99	3,05	0,98	7,03	2,99	10,02
27	29,9	1,007	0,1825	1,00	3,08	0,98	7,41	2,57	9,98
30	29,9	1,034	0,2090	1,05	3,05	1,06	7,85	2,14	9,99
33	30,1	1,089	0,2608	0,96	3,07	0,97	7,87	2,13	10,00
36	30	1,081	0,2534	0,51	3,01	0,97	7,99	1,96	9,95
39	30,1	1,084	0,2681	0,61	3,01	0,99	8,37	1,58	9,95
42	30	1,087	0,2590	0,57	3,01	0,98	8,57	1,56	10,13
45	30	1,088	0,2599	1,24	2,95	1,00	8,84	1,07	9,91
48	29,9	1,078	0,2507	0,96	2,94	0,97	8,94	0,96	9,90
51	29,7	1,079	0,2516	1,00	2,93	0,97	9,04	0,86	9,90
52	30,1	1,081	0,2534	0,83	2,93	0,96	9,35	0,54	9,89

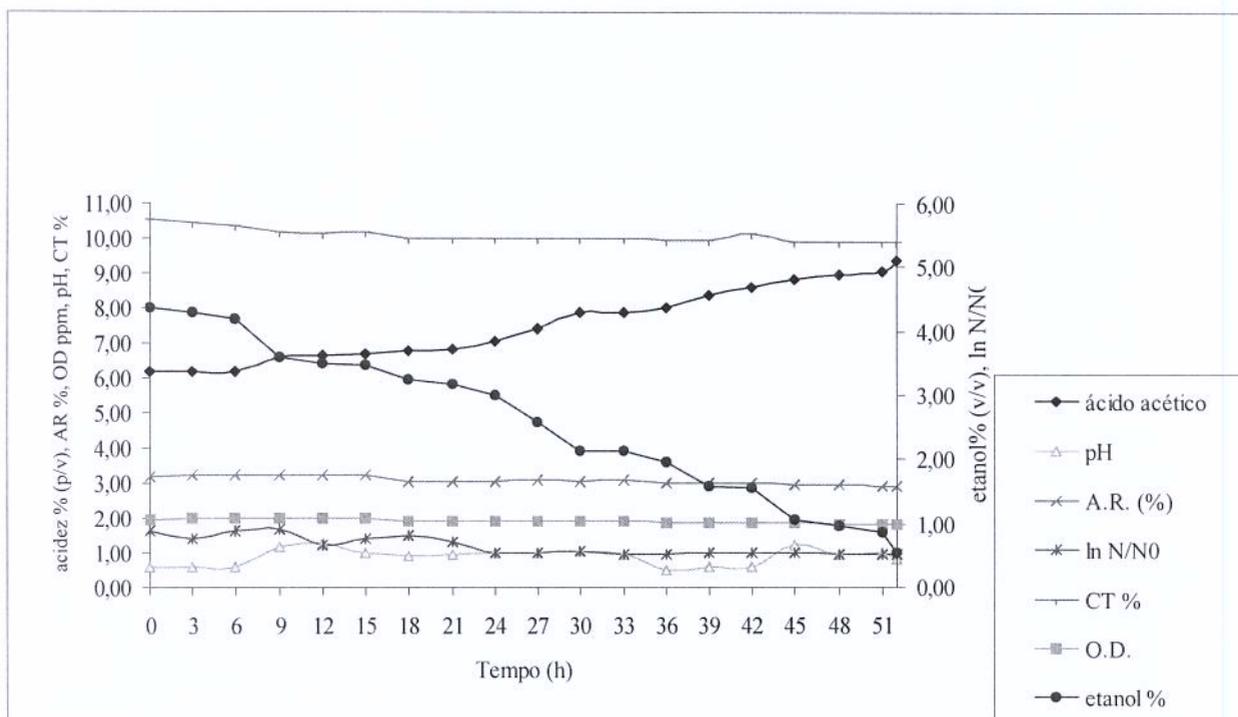


Figura 34. Curvas dos parâmetros medidos para a linhagem 086/06, isolada da indústria 1, em um ciclo fermentativo com CT 10%.

O tempo de fermentação foi de 52 horas e a produtividade obtida foi de 1,5 g de ácido acético/100 mL, em 24 horas. O rendimento em ácido foi de $Y_{ácido}$ 88,7% e o rendimento em concentração total Y 93,8%. O teor de oxigênio dissolvido no meio apresentou valor médio de 0,9 mg de O_2/L (d.p. 0,24; c.v. 26,95%). O pH médio foi de 3,1 (d.p. 0,11; c.v. 3,62%) e teores de açúcar redutor 1,2 g de glicose/100 mL (d.p. 0,27; c.v. 22,72 %).

Pode-se observar que a produção de ácido acético ocorreu em uma velocidade média de $0,0678 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,9730$). As velocidades média de consumo de etanol e oxigênio foram $-0,0739 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,9868$) e $-0,0583 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,8742$), respectivamente.

O ciclo iniciou com um inóculo de 66,8 mg de massa celular/L e atingiu um valor máximo de 79,4 mg de massa celular/L em uma concentração de etanol de 1,07% e 8,84% de ácido acético. A velocidade média de crescimento é de 0,0097 h⁻¹ (R² 0,9606) e o tempo de duplicação foi de 71 horas.

Ao estabelecer a comparação dos resultados em escala piloto e de indústria observa-se uma diminuição na produtividade e um aumento no tempo de fermentação. Pode-se observar a influência negativa da concentração do etanol durante o processo. Na indústria, durante o transcorrer do processo fermentativo, o máximo valor de etanol medido foi de 2,7 % (v/v). Já em escala piloto, esse valor foi de 4,36 % (v/v). Isso acarreta, provavelmente, o baixo valor de produtividade e o aumento no tempo de fermentação.

Na linhagem 086/06, pode-se observar que quanto maior as concentrações de etanol e ácido acético no início, maior o tempo de fermentação e menor a produtividade obtida para uma dada temperatura (30°C) e oxigenação do meio (35 L/h).

Tabela 36. Influência das concentrações de ácido acético e etanol na produtividade e tempo de fermentação para a linhagem 086/06.

Ciclo	tempo (h)	CT (%)	ácido/etanol (%) início	ácido/etanol (%) final	<i>P</i> g/100mL*24 h
2	24	6,5	3,8/2,7	5,8/0,6	1,9
3	21,5	7,5	4/3,5	6,6/0,6	2,9
5	47	9,5	4,5/5	7,6/0,6	1,5
6	54	10,5	6,25/4,25	9,3/0,6	1,4

Ao avaliar os dados da Tabela 36, tem-se a CT de 7,5% (4a/3,5e) como ótima para a produtividade e tempo. Quando a concentração de etanol é aumentada em 1,5% no meio (ciclo 5), consegue-se metade da produtividade e o dobro do tempo de fermentação. No ciclo 6, o aumento da concentração de ácido no meio foi de 1,75% em relação ao ciclo

5, os resultados conseguidos foram os mesmos para produtividade e um pequeno aumento no tempo de fermentação.

A concentração total exerce influência no metabolismo das bactérias acéticas. À medida que essa foi aumentada de 7,5 para 10,0%, teve-se um aumento no tempo de duplicação de 30 para 71 horas.

A temperatura pareceu não ter influenciado demasiadamente, uma vez que na indústria, houve variação entre 30 a 36°C, com valor médio de 33,2°C (d.p. 2,10 e c.v. 6,34). Em escala piloto, a média de trabalho foi de 30°C (d.p.0,11 e c.v. 0,36).

A Figura F16 (anexo) apresenta as taxas específicas de produção, crescimento, e consumo de etanol e oxigênio. Comportamento das curvas para linhagem 086/06 foram bem próximos na CT de 7,5% e 10,0% estudadas.

4.6.4 Estudo comparativo de população de bactérias acéticas

Esse estudo comparativo objetivava saber se a população isolada da indústria, purificada e preservada a -196°C, e usada no preparo de iniciadora em fermentador piloto, permanecia a mesma durante as diferentes etapas. A opção pela técnica de RAPD-PCR foi baseada em estudos que demonstram a eficiência desta para determinação de populações (Welsh & McClelland, 1990; Willians et al., 1990). Dos 5 iniciadores testados, dois não foram eficientes para a amplificação do DNA das amostras em estudo.

As Figuras 35, 36 e 37 mostram a amplificação do DNA genômico com os iniciadores 2, 4 e 8, respectivamente, para as amostras do inóculo da linhagem 082/05, que estava preservada em crioprotetor extrato de malte 20% a -196°C e do fermentador piloto Frings inoculado. Ocorreu o mesmo para a linhagem 086/06.

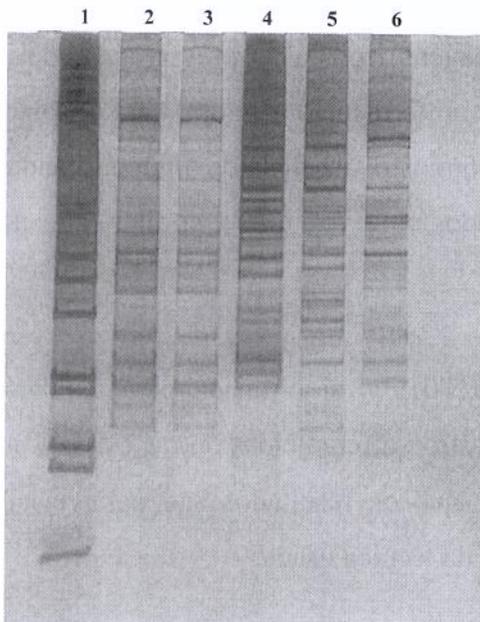


Figura 35: *Primer 2* (CTGATGCTAC); 1- Padrão de peso molecular (1Kb); 2- Linhagem 082/05 estocada; 3- Fermentador com inóculo da linhagem 082/05; 4- Linhagem 086/06; 5- Fermentador com inóculo da linhagem 086/06; 6- Linhagem-referência CCT 0190

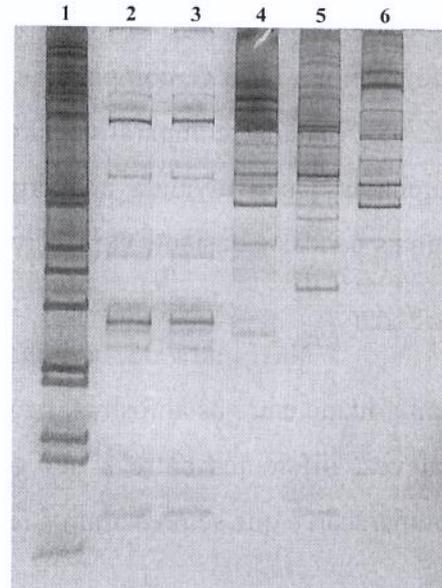


Figura 36: *Primer4* (AGTGCTACGT); 1-Padrão de peso molecular (1 Kb); 2- Linhagem 082/05 estocada; 3- Fermentador com inóculo da linhagem 082/05; 4- Linhagem 086/06; 5- Fermentador com inóculo da linhagem 086/06; 6- Linhagem-referência CCT 0190

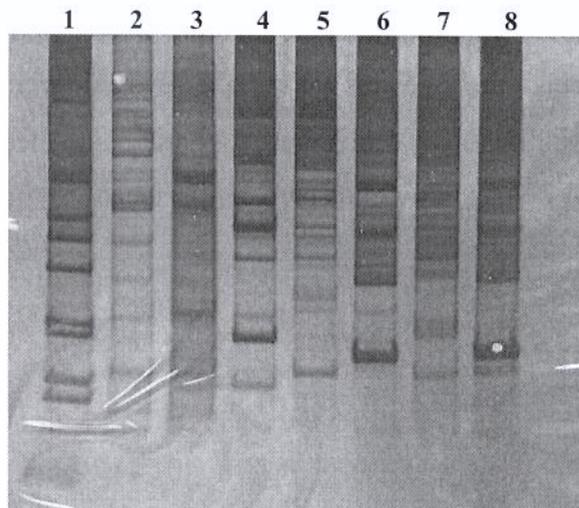


Figura 37 *Primer 8* (CTCTCCGCCA) 1- Padrão de peso molecular (1 Kb); 2- Linhagem 082/05 estocada; 3- Fermentador com inóculo da linhagem 082/05; 4- Linhagem 086/06; 5- Fermentador com inóculo da linhagem 086/06; 6- Linhagem-referência CCT 0190; 7- Cultura mista (indústria 1); 8- Cultura mista (Frings)

Os perfis eletroforéticos obtidos nos géis (Figuras 34, 35 e 36) apontam para uma similaridade nas bandas das amostras das linhagens isoladas e preservadas com o crioprotetor a -196°C , comparados com as inoculadas no fermentador piloto, para o isolado 082/05. A análise comparativa para a linhagem 086/06 mostra ausência de algumas bandas, porém, isso não invalida a interpretação do resultado, uma vez que a similaridade das demais bandas é bastante expressiva.

Na Figura 35, a linhagem-referência CCT0190 foi utilizada para validar a similaridade entre as amostras. Isto é, como ela se mostrou diferente das outras e essas, por sua vez, diferentes entre si no gel, pode-se inferir que os resultados são passíveis de comparação e que se prestaram a reforçar a eficiência da técnica usada.

Na Figura 36, tem-se o perfil da população de cultura mista da indústria 1 e Frings. A diferença entre elas é notável permitindo-se dizer que locais distintos apresentam distintos perfis de população.

Nota-se também a similaridade de algumas bandas, por exemplo, as de maior peso molecular, localizadas no topo dos géis. Sabe-se da diferença da população geral, porém, pode-se ter indivíduos semelhantes. Para tal, necessita-se proceder o sequenciamento do DNA de tais indivíduos para confirmação.

5 CONCLUSÕES

A técnica do ágar em dupla camada, a inoculação por espalhamento e incubação com umidade relativa na faixa de 93 a 97%, a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em um tempo máximo de 96 horas, possibilitam isolar bactérias acéticas de fermentadores operando em uma CT variando de 6 a 11%. Essas bactérias isoladas podem ser utilizadas como iniciadoras de processos fermentativos.

Os meios *MYP* (manitol, extrato de levedura e peptona) e *Suomalainem* (extrato de levedura e etanol) são eficientes para o isolamento de microrganismos produtores de ácido acético em unidades operando a uma CT na faixa de 6 a 11%.

O meio *DSM* (dextrose, sorbitol, manitol) preconizado por Cirigliano (1982) é satisfatório para rápida identificação fenotípica, na diferenciação dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*.

Bactérias acéticas podem ser preservadas por um período de no mínimo 2 anos com crioprotetor glicerol 10% ou extrato de malte 20% a uma temperatura de -80°C .

O corante azul de *trypan* é adequado como corante vital para bactérias acéticas (Gram negativas) e pode ser usado na técnica de contagem de células ao microscópio para uso rotineiro no acompanhamento do ciclo de fermentação.

Membrana filtrante inoculada em ágar de dupla camada e incubada a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com umidade relativa mínima de 93%, por 24 horas pode ser usada para determinar população de bactérias acéticas em fermentadores de vinagre.

Linhagens distintas de bactérias acéticas trabalhando nas mesmas condições operacionais dos fermentadores apresentam diferentes valores de produtividade, velocidade média de produção e consumo de etanol.

Valores de concentração total (CT) acima de 7,5% levam à diminuição na produtividade e na velocidade média de produção e aumento no tempo de fermentação e de duplicação para as linhagens estudadas.

O teor de etanol inicial exerce inibição na produtividade e aumento no tempo de fermentação.

A técnica do *RAPD-PCR* é adequada para comparar populações de bactérias acéticas.

Unidades produtoras de vinagres distintas apresentam perfis de população diferentes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.R. Vinegar. In: WOOD, B.J.B. **Microbiology of fermented foods**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1, p. 1-47.
- AQUARONE, E.; ZANCANARO JR., O. Vinagres. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (ed.). **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1990. p.105-123.
- ASAI, T. **Acetic acid bacteria classification and biochemical activities**. Tokyo: University of Tokyo, 1968. 343 p.
- ATINO, A.; PATTERSON, J.D.E.; TODD, J.R.; WOOD, B.J.B. Production of acetic acid in packed bed fermenters. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 10, n. 9, p. 671-676, 1988.
- BECKER, J. M.; CALDWELL, G. A.; ZACHGO, E. A. **Biotechnology: a laboratory course**. San Diego: Academic Press, 1990. 232 p.
- BERRAUD, C. Production of highly concentrated vinegar in fed-batch culture. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 22, n. 6, p. 451-454, 2000.
- BESSE, G.N.; LAFARGE, V. Development of a membrane filtration method for enumeration of listeria monocytogenes front soft cheese. **Food Microbiology**, London, v.18, n. 6, p. 669-676, 2001.
- BOESCH, C; TRCEK, J; SIEVERS, M.; TEUBER, M. *Acetobacter intermedius*, sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 21, n. 2, p. 220-229, 1998.
- BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1988. 300 p. (Biotecnologia, v.3)
- CANHOS, V.P. **Estudo das características de espécies de *Acetobacter***. Campinas, 1975. 39 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- 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.
- CAVALCANTE, V.A.; DOBEREINER, J.A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, n. 1, p. 23-31, 1988.

- CHU, J.L.; ELO, A. MAISSIN, R.; DECALLONNE, J.R. La quantification des populations de bacteries lactiques par la methode hgmf. **Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology**, Bruxelles, v. 42, n. 3, p. 65-74, 1987.
- 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.
- DALGAARD, P.; ROSS, T.; KAMPERMAN, L.; NEUMEYER, K.; MCMEEKIN, T. A. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 3/4, p. 391-404, 1994.
- DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J. Family VI. *Acetobacteraceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p.267-277, 1984.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 60 p.
- EBNER, H. Vinegar: production of vinegar. In: PRESCOTT, S.C.; DUNN, C.G. **Industrial microbiology**. Westport: AVI, 1983. p. 803-833.
- EBNER, H.; FOLLMANN, H. Acetic Acid. In: REHM, H.-J; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: VCH, 1983. v. 3, p. 389-407.
- EBNER, H.; FOLLMANN, H.; SELLMER, S.; FRINGS, H. Vinegar. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim: VCH, 1996, v. A 27, p. 403-418.
- 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.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 6.ed. Arlington: AOAC, 1989. Paginação irregular. Supplement, September 1987.
- FREGAPANE, G.; RUBIO-FERNANDEZ, H.; NIETO, J.; SALVADOR, M.D. Wine vinegar production using a noncommercial 100-litre bubble column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 63, n. 2, p. 141-146, 1999.
- FRINGS MICRODYN DO BRASIL. **Arquivos técnicos em fermentação submersa**. Piracicaba, 1996. (mimeogr.).

GHOMMIDH, C.; CUTAYAR, J.M.; NAVARRO, J.M. Continuous production of vinegar. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 13-18, 1986.

GONZÁLEZ, J. M. A general purpose program for obtaining Most Probable Number tables. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 215-218, 1996.

HARRIS, A.S.D.; JONES, K.J.; LEWIS, J. Na assessment of the accuracy and reproductibility of the most probable number (MPN) technique in estimating numbers of nutrient stressed diatoms in sediment samples. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, n. 231, p. 21-30, 1998.

HART, R.A.; BORJUS, O.M.F.; FUNG, D.Y.C. Comparative analysis of trypan blue agar and congo red agar for the enumeration of yeast and mold using the HGMF System. **Journal of Food Safety**, Trumbull, n. 11, p. 227-230, 1991.

HIGASHIDE, T.; OKUMURA, H.; KAWAMURA, Y.; HISAMATSU, M.; YAMADA, T. Production of vinegar with high acidity by modified submerged culture. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Tokyo, v. 41, n.12, p.913-920, 1994.

HIGASHIDE, T.; OKUMURA, H.; KAWAMURA, Y.; HISAMATSU, M.; YAMADA, T. Membrane components and cell form of *Acetobacter polyoxogenes* (vinegar producing strain) under high acidic conditions. **Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**, Tokyo, v. 43, n. 2, p. 117-123, 1996.

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.

KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. **Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods**. 2.ed. San Diego: Academic, 1991. 308 p.

KITTELMANN, M.; STAMM, W. W.; FOLLMANN, H.; TRÜPER, H. G. Isolation and classification of acetic acid bacteria from high percentage vinegar fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 47-52, 1989.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. vol.1, p.267-277.

LISDIYANT, P.; KAWASAKI, H.; SEKI, T.; YAMADA, Y.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonesiensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, p. 147-165, 2000.

- LISDIYANT, P.; KAWASAKI, H.; SEKI, T.; YAMADA, Y.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals os *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibirongensis* sp. nov., *Acetobacter orientalis* sp. nov.. **Journal of General and Applied Microbiology**. Tokyo, v. 47, n. 3, p. 119-131, 2001.
- LU, S.F.; LEE, F.L.; CHEN, H.K.A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp. 114-2. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p.55-62, 1999.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock: biología de los microorganismos**. 8.ed. Madrid: Prentice Hall Iberia, 1997.
- 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.
- MARTELLI, H.L.; PANEK, A.D. **Bioquímica experimental**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1968. 122 p.
- MITCHELL, C.A. **Vinegar: its manufacture and examination**. 2.ed. London: Charles Griffin & Company, 1926. 211 p.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.
- MORAES, A.M. **Estudo da oxidação de etanol a ácido acético por células do gênero acetobacter livres e imobilizadas em géis hidrofílicos**. Campinas, 1991. 156 p. Tese (Mestre em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- MORETTO, E.; ALVES, R.F.; CAMPOS, C.M.T.; ARCHER, R.M.B.; PRUDENCIO, A. **Vinhos e vinagres: processamento e análises**. Florianópolis: Ed. UFSC, 1988. 168 p.
- NANBA, A.; TAMURA, A.; NAGAI, S. Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. **Journal of Fermentation and Technology**, Osaka, v. 62, n. 6, p. 501-505, 1984.
- OHMORI, S.; MASAI, H.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Isolation and Identification of acetic acid bacteria submerged acetic fermentation at high temperature. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 44, n.12, p. 2901-2906, 1980.

- OHMORI, S.; UOZUMI, T.; BEPPU, T. Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability in an *Acetobacter* strain. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 46, n. 2, p. 381-389, 1982.
- ORY, I.; ROMERO, L.E.; CANTERO, D. Modelling the Kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 189-193, 1998.
- OSUGA, J.; MORI, A.; KATO, J. Acetic acid production by immobilized *Acetobacter aceti* cells entrapped in a κ -Carrageenan Gel. **Journal of Fermentation and Technology**, Osaka, v. 62, n. 2, p. 139-149, 1984.
- PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAIN, E.C.S. **Microbiologia**. Trad. Manuel Adolpho May Pereira. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981. v.1.
- REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology & Bacteriology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 401-405, 1994.
- RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. **Microbiologia prática: roteiro e manual - bactérias e fungos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. 112 p.
- ROMERO, L.E.; CANTERO, D. Mathematical model for Liquid-Gas equilibrium in acetic acid fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 59, n. 3, p. 310-317, 1998.
- ROSALES, S.Y.R. Controle microbiológico nas usinas de açúcar e álcool. In: Seminário: Microrganismos da Fermentação Etanólica e Possibilidades de Utilização da Vinhaça. Piracicaba: UNIMEP & Instituto de Biociências de Rio Claro. s.d.
- SAEKI, A.; TANIGUCHI, M.; MATSUSHITA, K.; TOYAMA, H.; THEERAGOOL, G.; LOTONG, N.; ADACHI, O. Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 2, p. 317-323, 1997a.
- SAEKI, A.; THEERAGOOL, G.; MATSUSHITA, K.; TOYAMA, H.; LOTONG, N.; ADACHI, O. Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 1, p. 138-145, 1997b.
- SIEVERS, M.; SELLMER, S.; TEUBER, M. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 15, n.3, p. 386-392, 1992.

- SOKOLLEK, S.J.; HAMMES, W.P. Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 481-491, 1997.
- SOKOLLEK, S.J.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. **Journal of Biotechnology**, Stuttgart, v. 60, n. 3, p.195-206, 1998a.
- SOKOLLEK, S.J.; HERTEL, C.; HAMMES, W. P. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Readings, v. 48, part 3, p. 935-940, 1998b.
- SPADA, R.G.M.; SILVA, D.; ABDEL-HAMID, A-H. Z.; SOBRAL-HAMAGUCHI, S.S.; ZUIM, N.R.B.; ZANOTTI, E.M.; MAGALHÃES, L.A.; PAES, J.T.R. Genetic markers between *Biomphalaria glabrata* snails susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. 2002. (mimeo.)
- SPINOSA, W.A. **Utilização do amido da quirera de arroz na produção de vinagre**. Londrina, 1996. 93 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina.
- SUN, Y.; FURUSAKI, S. Continuous production of acetic acid using immobilized *Acetobacter aceti* in a three-phase fluidized bed bioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 69, n. 2, p. 102-110, 1990.
- SWINGS, J. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M; HARDER, W.; SCHLEIFER K.-H. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York: Springer Verlag, 1992. p. 2.268-2.286.
- TEUBER, M.; SIEVERS, M.; ANDRESEN, A. Characterization of the microflora of high acid submerged vinegar fermenters by distinct plasmid profiles. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 9, n. 4, p. 265-268, 1987.
- VANNE, L.; KARWOSKI, M.; KARPPINEN, S.; SJÖBERG, A. M. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. **Food Control**, Surrey, v. 7, n. 6, p. 263-276, 1996.
- VASQUEZ, J.C. Análise Microbiológica de Águas. In: **Curso Teórico-Prático de Análise Microbiológica de Águas**, 2001, Assis. (mimeo.)
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, n. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, n. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOOD, B. J. B. **Microbiology of fermented foods**. New York: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1.

YAMADA, Y., NUNODA, M.; ISHIKAWA, T.; TAHARA, Y. The cellular fatty acid composition in acetic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 27, n. 5, p. 405-417, 1981.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T.; The phylogeny of acetic bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997.

YAMADA, Y. Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. (1998) and *Acetobacter iontermedius* Boesch et al. (1998) to the genus *Gluconoacetobacter* as *Gluconoacetobacter oboediens* comb. nov and *Gluconoacetobacter intermedium* comb. nov. **International Journal of Systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 50, part 6, p. 2.225-2.227, 2000.

YANO, D.M.Y.; VALARINI, P.J. Métodos de Identificação de Bactérias. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 369-390.

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.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; RIET, K. Van't. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 56, n. 6, p. 1.875-1.881, 1990.

7 ANEXO

7.1 Anexo I - Composição dos meios de cultura e soluções usados nos testes bioquímicos

Teste de produção de indol do triptofano

O meio a ser utilizado é composto de:

Triptona	10 g
Água destilada e deionizada	1000 mL

Teste de produção de proteases (gelatinases)

O meio 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

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	6g
---------------------------	----

Ácido acético (5N)	1000 mL
Reagente (B)	
Ácido sulfanílico	8 g
Ácido acético	1000 mL

Teste de crescimento em meio de *Hoyer*

Composição do meio:

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

Teste de produção de ácido a partir de glicose

Composição do meio de cultura:

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

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.

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

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

Tabela A1. Características macroscópicas das colônias após 96 h de crescimento, coletadas em unidades produtoras de vinagre e incubadas a 30°C com umidade relativa >90%.

Linha	Meio	Dorna	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	Detalhes óticos	Consistência	Tamanho¹
001/01	3	3	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	12,8
002/01	3	3	circular	rugosa	perfeita	plana	ausente	transparente	membranosa	3,8
003/01	3	3	circular	rugosa	perfeita	plana	ausente	transparente	membranosa	1,4
004/01	3	3	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	transparente	viscosa	0,6
005/01	3	3	irregular	rugosa	serrilhada	plana	ausente	opaca	membranosa	17,9x14,1
006/01	3	2	circular	lisa	serrilhada	elevada	ausente	opaca	viscosa	9,3
007/01	3	4	irregular	rugosa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	23,5x16,0
008/01	3	4	circular	lisa	serrilhada	plana	amarela	opaca	viscosa	6,5
009/01	3	7	irregular	rugosa	serrilhada	plana	ausente	transparente	viscosa	17,6x27,3
010/01	3	9	irregular	rugosa	ondulada	plana	amarela	opaca	viscosa	8,4x4,3
011/01	4	1	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	18,9x14,2
012/01	4	2	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	transparente	viscosa	3,6
013/01	4	7	circular	lisa	perfeita	elevada	amarela	opaca	viscosa	3,2
014/02	8	1	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	12,0
015/03	3	7	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
016/03	3	6	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
017/03	3	2	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	4,0
018/03	3	2	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*

¹ Tamanho em mm; (*) não foi possível dimensionar pois o crescimento foi espalhado.

Tabela A1. - continuação

Linha gem	Meio	Dorna	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	Detalhes óticos	Consistência	Tamanho ²
019/03	3	2	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
020/03	3	4	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
021/03	3	9	circular	lisa	irregular	elevada	ausente	transparente	viscosa	1,9
022/03	3	9	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
023/03	3	5	irregular	lisa	ondulada	plana	ausente	transparente	viscosa	*
024/03	3	5	circular	lisa	serrilhada	plana	ausente	opaca	viscosa	13,0
025/03	3	5	circular	lisa	serrilhada	plana	ausente	transparente	viscosa	3,0
026/03	3	8	irregular	lisa	ondulada	plana	ausente	transparente	viscosa	*
027/03	3	8	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
028/03	3	11	circular	lisa	perfeita	plana	laranja	opaca	viscosa	2,0
029/03	3	11	circular	lisa	perfeita	plana	amarela	opaca	viscosa	4,0
030/03	3	11	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
031/03	3	11	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
032/03	3	11	irregular	lisa	irregular	plana	amarelo	opaca	viscosa	12 x 14
033/03	3	11	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
034/03	3	3	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	22 x 10
035/03	3	3	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
036/03	3	3	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*

² Tamanho em mm; (*) não foi possível dimensionar pois o crescimento foi espalhado.

Tabela A.1. - continuação

Linha gem	Meio	Dorna	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	Detalhes óticos	Consistência	Tamanho ³
037/03	4	11	circular	lisa	perfeita	plana	laranja	opaca	viscosa	9
038/03	4	11	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
039/03	4	9	circular	lisa	perfeita	plana	laranja	opaca	viscosa	2
040/03	4	9	circular	lisa	perfeita	plana	rosa	opaca	viscosa	2
041/03	4	7	irregular	rugosa	irregular	elevada	ausente	transparente	membranosa	*
042/03	4	7	irregular	lisa	ondulada	plana	ausente	opaca	viscosa	4 x 5
043/03	4	7	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
044/03	4	3	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
045/03	4	2	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
046/03	4	6	circular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	9
047/03	4	6	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
048/03	4	11	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	transparente	viscosa	21
049/03	4	11	irregular	lisa	serrilhada	plana	ausente	transparente	viscosa	*
050/03	4	11	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	3
051/03	4	11	circular	lisa	perfeita	plana	rosa	opaca	viscosa	2
052/03	4	8	circular	lisa	irregular	plana	amarelo	opaca	viscosa	5
053/03	4	4	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	4
054/03	4	4	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*

³ Tamanho em mm; (*) não foi possível dimensionar pois o crescimento foi espalhado.

Tabela A.1. - continuação

Linha	Meio	Dorna	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	Detalhes óticos	Consistência	Tamanho ⁴
055/03	6	9	circular	lisa	perfeita	plana	azul	opaca	viscosa	6
056/03	6	9	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
057/03	6	6	irregular	rugosa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
058/03	6	5	circular	lisa	perfeita	plana	amarelo	opaca	viscosa	7
059/03	6	5	circular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	2
060/03	6	5	circular	lisa	perfeita	plana	azul	opaca	viscosa	4
061/03	6	5	circular	lisa	perfeita	plana	laranja	opaca	viscosa	5
062/03	6	7	irregular	rugosa	irregular	elevada	ausente	opaca	viscosa	*
063/03	6	7	irregular	lisa	irregular	elevada	laranja	transparente	viscosa	*
064/03	6	7	circular	lisa	irregular	elevada	azul	opaca	viscosa	4
065/03	7	8	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
066/03	8	2	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
067/04	2 e 4	1	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
068/04	5	1	irregular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	6
069/05	2	1	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
070/05	3	1	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
071/05	3	1	circular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	0,5 x 0,2
072/05	7	1	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	0,1

⁴ Tamanho em mm; (*) não foi possível dimensionar pois o crescimento foi espalhado.

Tabela A1. - continuação

Linha	Meio	Dorna	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	Detalhes óticos	Consistência	Tamanho⁵
073/05	8	1	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
074/05	2	2	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	0,5
075/05	2	2	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
076/05	4	2	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
077/05	7	2	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	1,7
078/05	8	2	irregular	rugosa	irregular	elevada	ausente	transparente	membranosa	*
079/05	2	5	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
080/05	4	5	circular	rugosa	irregular	elevada	ausente	opaca	membranosa	16,5 x 9,2
081/05	3	5	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	1,2
082/05	3	5	circular	rugosa	irregular	elevada	ausente	opaca	membranosa	3,1
083/06	4 e 7	9	circular	lisa	perfeita	elevada	ausente	transparente	membranosa	2,2
084/06	3	9	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	0,9
085/06	4 e 3	1	circular	lisa	perfeita	elevada	ausente	opaca	viscosa	4,2
086/06	7	1	irregular	rugosa	irregular	plana	ausente	opaca	membranosa	*
087/07	3	G01	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
088/07	3	G03	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
089/08	3	1	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	opaca	viscosa	*
090/09	3	1	irregular	lisa	irregular	elevada	ausente	opaca	viscosa	*

⁵ Tamanho em mm; (*) não foi possível dimensionar pois o crescimento foi espalhado.

Tabela A1. - continuação

Linha gem	Meio	Dorna	Forma	Superfície	Borda	Elevação	Pigmentação	Detalhes óticos	Consistência	Tamanho⁶
091/09	3	1	irregular	rugosa	irregular	plana	ausente	opaca	membranosa	*
092/09	3 e 4	1, 2 e 3	circular	lisa	perfeita	elevada	ausente	opaca	viscosa	10
093/09	3	4	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	transparente	viscosa	3
094/09	4	4	irregular	rugosa	irregular	elevada	ausente	opaca	membranosa	20x18
095/09	4	4	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	1
096/09	4	4	irregular	lisa	irregular	plana	ausente	transparente	viscosa	*
097/09	3	2 e 3	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	1
098/09	8	3	circular	lisa	perfeita	plana	ausente	opaca	viscosa	2

⁶ Tamanho em mm; (*) não foi possível dimensionar pois o crescimento foi espalhado.

Tabela A2. Análise de variância para resposta crioprotetor extrato de malte 20%.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor F	Pr>F
Linhagem	4	182,67	45,67	1,57	0,2153*
Tempo	6	2289,99	381,67	13,09	<0,0001*
Resíduo	24	699,54	29,15		
Total	34	3172,20			

Tabela A3. Análise de variância para resposta crioprotetor glicerol 10%.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor F	Pr>F
Linhagem	4	327,69	81,92	3,02	0,0378*
Tempo	6	3308,61	551,43	20,31	<0,0001*
Resíduo	24	651,78	27,16		
Total	34	4288,08			

Tabela A4. Comparação entre as médias dos resultados (Teste de Tukey) obtidos para contagem de bactérias acéticas pelas técnicas da Contagem Direta, Plaqueamento em Superfície, Número Mais Provável e Membrana Filtrante, na repetição 1, indústria 1, admitindo-se 5% de diferença entre os resultados comparados.

Tratamento	Média (10⁷)*
Contagem direta células/mL	324 ± 77,11 ^a
Plaqueamento em superfície UFC/mL	1269 ± 298,52 ^b
Número mais provável NMP/mL	24 ± 0 ^c
Membrana filtrante UFC/mL	1192 ± 23,99 ^c

*Média de 30 repetições

Tabela A5. Análise de variância da comparação entre os resultados obtidos na enumeração de bactérias acéticas pela técnica do Número Mais Provável e Membrana Filtrante para repetição 1, na indústria 1, para $p < 0,05$.

	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Número mais provável x Membrana filtrante	3	29271 x 10 ¹⁷	97569 x 10 ¹⁶	408,07	0,00
Erro	116	27735 x 10 ¹⁶	23909 x 10 ¹⁴		

Tabela A6. Comparação entre as médias dos resultados (Teste de Tukey) obtidos para contagem de bactérias acéticas pelas técnicas da Contagem Direta, Plaqueamento em Superfície, Número Mais Provável e Membrana Filtrante, na repetição 2, em laboratório para linhagem CCT 0190, admitindo-se 5% de diferença entre os resultados comparados.

Tratamento	Média (10⁸)*
Contagem direta células/mL	25,25 ± 3,26 ^a
Plaqueamento em superfície UFC/mL	64,00 ± 15,51 ^b
Número mais provável NMP/mL	2,4 ± 0 ^c
Membrana filtrante UFC/mL	22,42 ± 5,08 ^a

*Média de 15 repetições

Tabela A7. Análise de variância da comparação entre os resultados obtidos na enumeração de bactérias acéticas pela técnica da Contagem Direta e Membrana Filtrante para repetição 2, em laboratório, com linhagem CCT 0190 para $p < 0,05$.

	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Contagem Direta x Membrana filtrante	3	91,62658 x 10 ⁹	212,2598	0,00
Erro	66	0,43167 x 10 ⁹		

Tabela A8. Monitoramento das medidas da linhagem 006/01 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C.

tempo (h)	%acidez	ln N/N ₀	O.D. (mg/L)	pH	%A.R.	%álcool
0	2,12	0,0000	5,18	3,45	3,96	4,00
24	2,14	0,0511	4,67	3,42	3,88	3,80
48	2,19	0,0722	4,96	3,41	3,72	3,51
72	2,39	0,2388	0,57	3,41	3,76	3,30
96	3,95	0,4289	0,47	3,40	3,70	2,94
120	3,08	0,5018	0,41	3,40	3,63	2,66
144	3,23	0,5824	0,45	3,36	3,61	2,70
168	3,65	0,5928	0,41	3,28	3,58	2,08
192	4,04	0,6092	0,43	3,27	3,57	1,80
216	4,46	0,5612	0,38	3,29	3,33	1,30
240	4,52	0,4695	0,61	3,19	3,19	1,23
264	4,68	0,4904	0,67	3,25	3,00	0,94
288	4,81	0,5928	0,52	3,22	2,86	0,70
312	5,01	0,6589	0,54	3,12	2,53	0,37
336	5,00	0,6913	1,22	3,10	2,42	0,09
360	4,96	0,7335	0,89	3,05	2,29	0,00

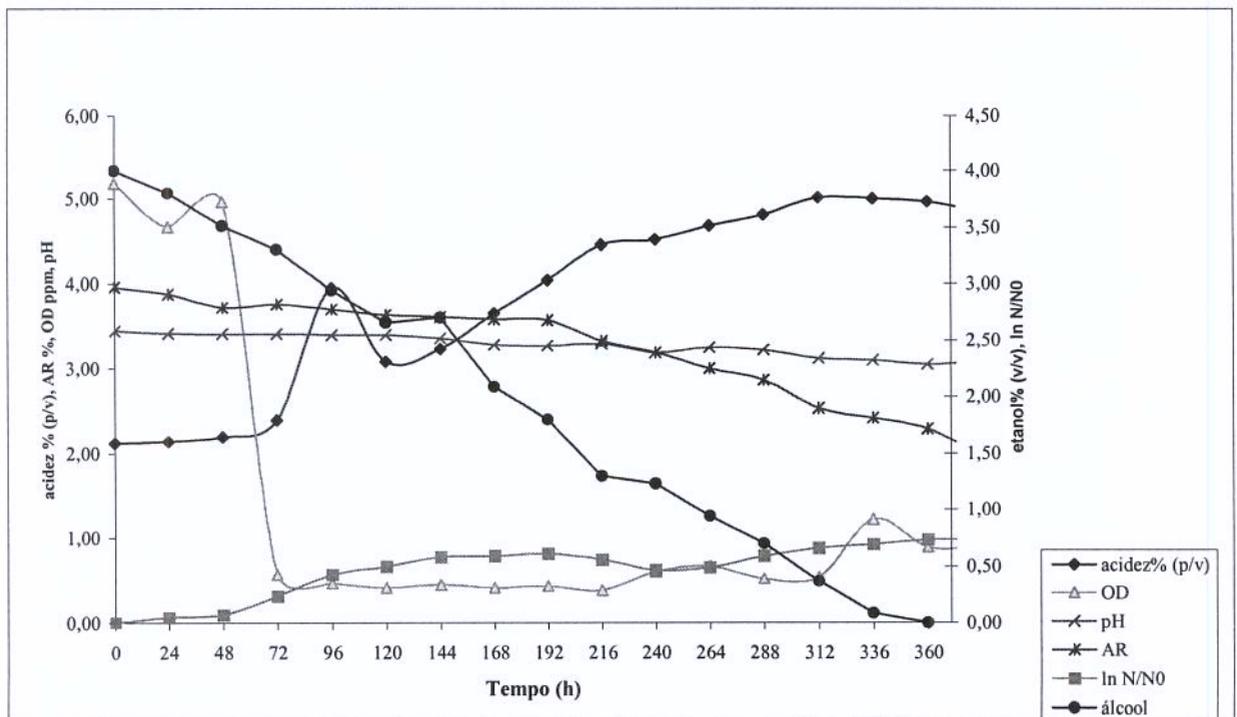


Figura F1. Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 006/01

Tabela A9. Monitoramento das medidas da linhagem 011/01 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C

tempo (h)	%acidez	ln N/N ₀	O.D. (mg/L)	pH	%A.R.	%álcool
0	2,11	0,0000	4,78	3,63	3,96	4,00
24	2,16	0,0238	3,48	3,68	3,84	3,91
48	2,18	0,0424	3,48	3,69	3,77	3,55
72	2,35	0,1555	1,24	3,64	3,66	3,30
96	2,77	0,2534	1,40	3,57	3,56	2,85
120	3,27	0,3696	1,75	3,55	3,43	2,50
144	3,94	0,4401	1,65	3,53	3,25	2,70
168	4,24	0,4825	1,60	3,50	3,12	1,79
192	4,71	0,5402	1,63	3,47	2,98	1,44
216	4,97	0,5760	1,58	3,45	2,99	0,70
240	5,17	0,6105	1,53	3,44	2,76	0,73
264	5,06	0,6464	1,45	3,43	2,53	0,38
288	4,84	0,6663	0,93	3,44	2,47	0,00

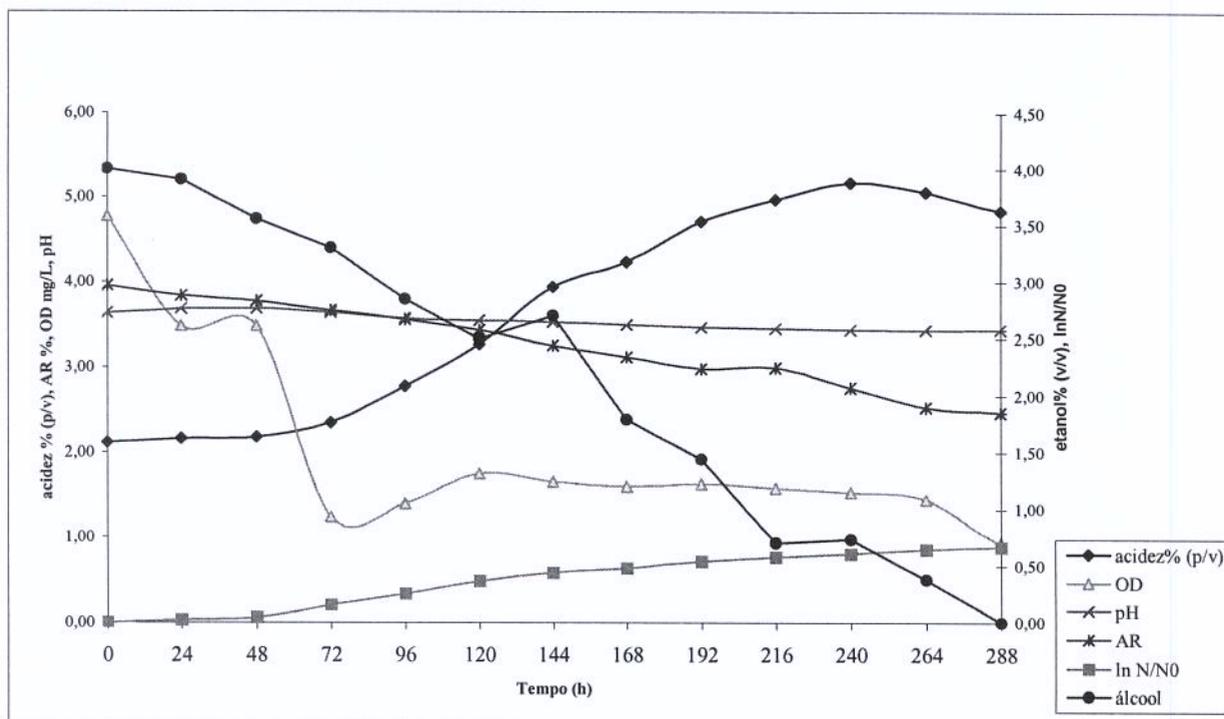


Figura F2. Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 011/01

Tabela A10. Monitoramento das medidas da linhagem 016/03 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C

tempo (h)	%acidez	ln N/N ₀	O.D. (mg/L)	pH	%A.R.	%álcool
0	2,11	0,0000	4,33	3,64	3,80	4,00
24	2,13	0,0057	3,37	3,66	3,75	3,63
48	2,15	0,0225	2,88	3,70	3,61	3,27
72	2,32	0,0606	1,26	3,68	3,60	3,30
96	2,65	0,2763	1,49	3,55	3,57	2,57
120	3,27	0,3470	1,80	3,50	3,40	2,22
144	3,63	0,4092	1,85	3,47	3,42	1,30
168	4,33	0,4643	1,75	3,44	3,35	1,51
192	4,65	0,5097	1,61	3,39	3,23	1,16
216	5,10	0,5564	1,53	3,35	3,16	0,70
240	5,31	0,5947	1,40	3,30	3,09	0,45
264	5,07	0,6436	1,28	3,29	2,94	0,10
288	4,61	0,6846	1,12	3,29	2,83	0,00

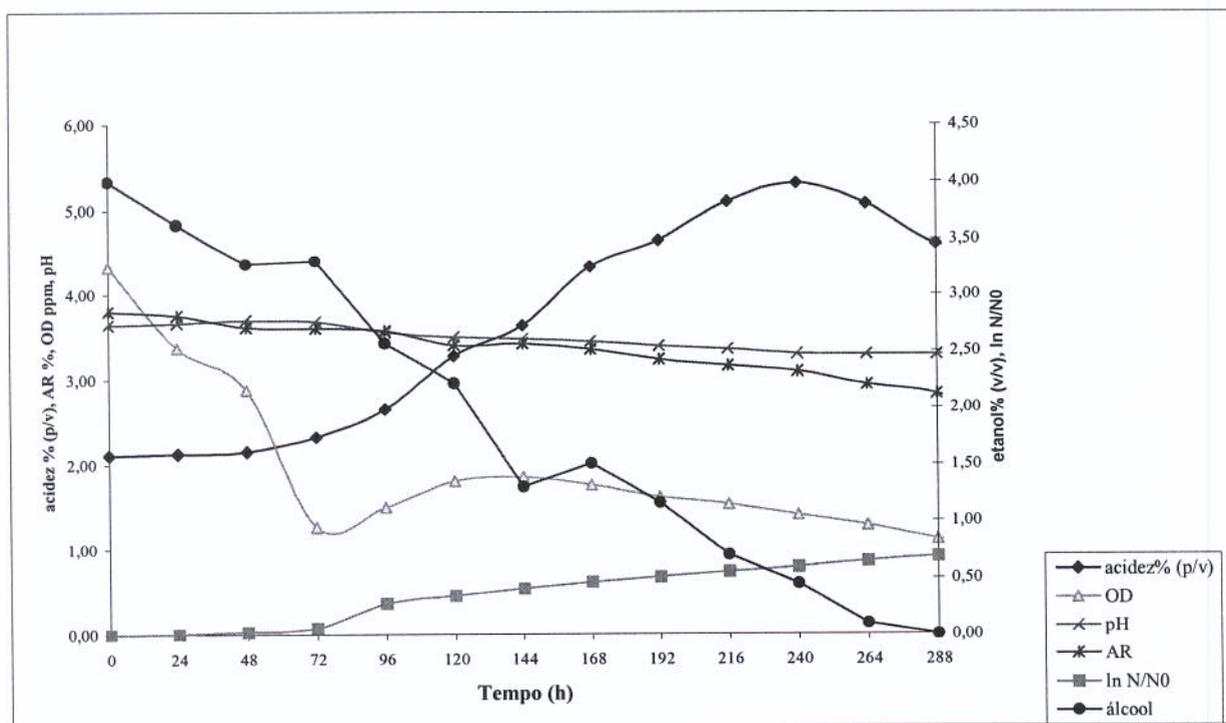


Figura F3. Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 016/03

Tabela A11. Monitoramento das medidas da linhagem 055/03 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C

tempo (h)	%acidez	ln N/N ₀	O.D. (mg/L)	pH	%A.R.	%álcool
0	2,12	0,0000	4,05	3,63	3,80	3,30
24	2,18	0,0202	3,49	3,65	3,73	3,03
48	2,19	0,0400	3,28	3,70	3,65	2,75
72	2,22	0,0530	1,13	3,67	3,63	2,70
96	2,72	0,3277	1,29	3,54	3,51	2,18
120	3,40	0,4692	1,53	3,51	3,48	1,89
144	3,77	0,5625	1,73	3,46	3,28	1,30
168	4,53	0,7233	1,80	3,42	3,19	1,32
192	4,80	0,8237	1,91	3,40	3,02	1,04
216	4,94	0,8531	1,70	3,35	2,93	0,70
240	5,26	0,9231	1,65	3,30	2,84	0,46
264	5,11	0,9783	1,53	3,29	2,65	0,18
288	4,98	1,0184	1,37	3,28	2,53	0,00

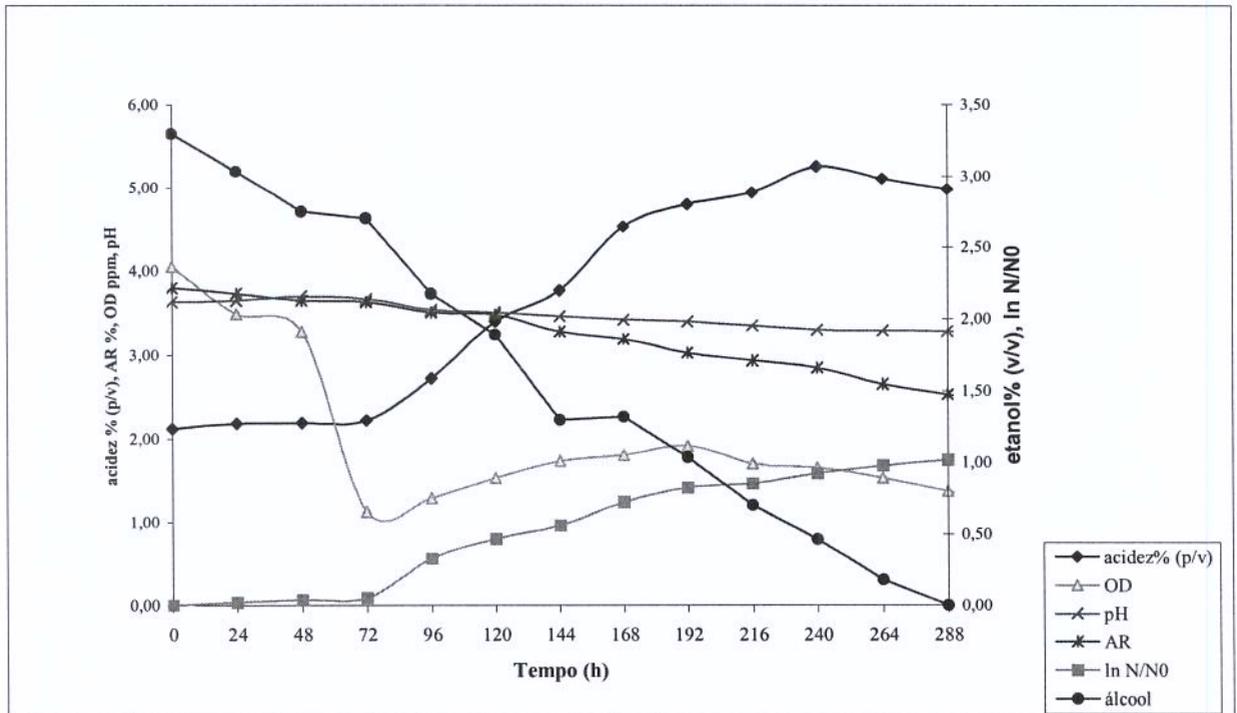


Figura F4. Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 055/03

Tabela A12. Monitoramento das medidas da linhagem 067/04 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C

Tempo (h)	%acidez	ln N/N ₀	O.D. (mg/L)	PH	%A.R.	%álcool
0	2,23	0,0000	5,55	3,48	3,40	3,30
24	2,20	0,1369	6,72	3,52	3,33	3,17
48	2,27	0,1823	5,40	3,47	3,18	2,88
72	2,33	0,2258	4,84	3,43	3,07	2,70
96	2,20	0,2877	4,82	3,79	3,00	2,32
120	2,76	0,7701	0,80	3,58	2,85	2,03
144	4,54	1,1463	0,75	3,40	2,77	2,00
168	4,87	1,2393	2,20	3,37	2,75	1,47
192	5,41	1,4028	4,87	3,28	2,74	1,18
216	5,24	1,5546	5,38	3,29	2,70	0,70
240	5,15	1,5658	2,81	3,21	2,60	0,62
264	5,08	1,6094	1,64	3,19	2,58	0,33
288	4,92	1,9535	1,50	3,14	2,43	0,05

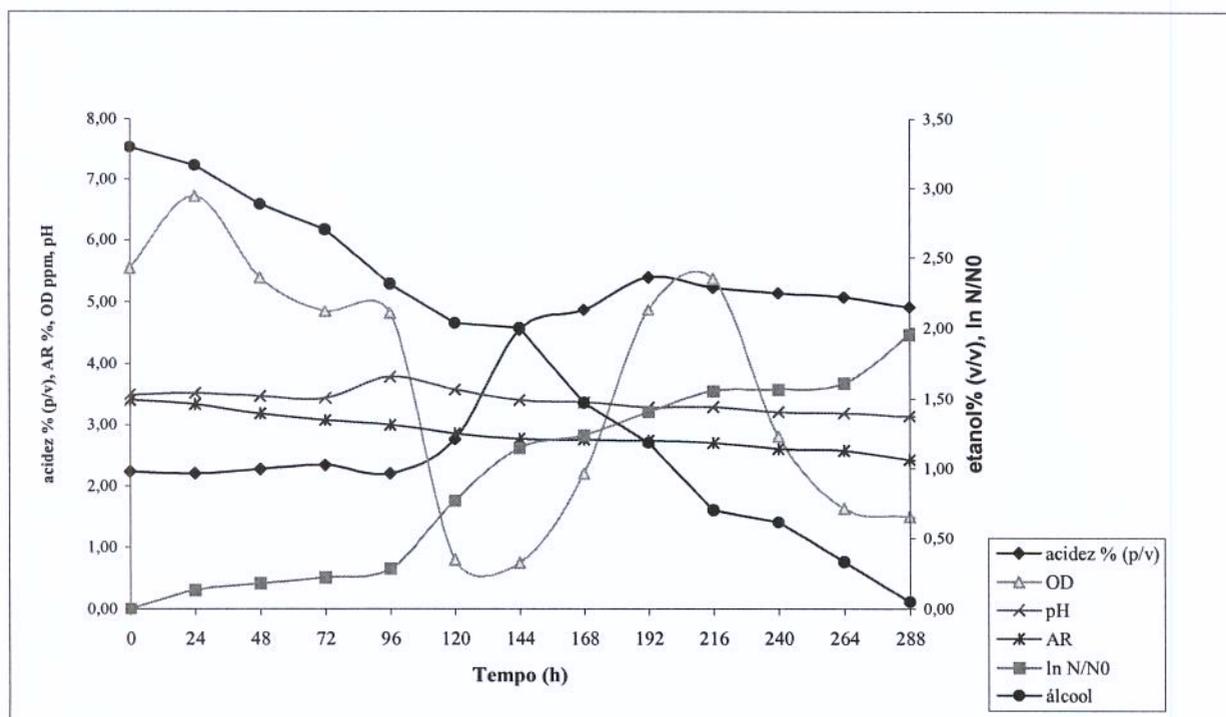


Figura F5. Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 067/04

Tabela A13. Monitoramento das medidas da linhagem 068/04 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C

tempo (h)	%acidez	ln N/N ₀	O.D. (mg/L)	pH	%A.R.	%álcool
0	2,06	0,0000	5,42	3,52	3,39	4,00
24	2,03	0,1226	6,67	3,57	3,18	3,55
48	2,19	0,5842	2,15	3,48	3,00	3,21
72	2,40	0,9378	0,81	3,37	2,68	2,70
96	2,87	1,3042	0,76	3,32	2,42	2,55
120	3,22	1,4105	0,69	3,30	2,31	2,21
144	4,00	1,3418	0,62	3,28	2,20	2,00
168	4,28	1,4051	0,76	3,28	2,19	1,54
192	4,69	1,4944	0,80	3,25	2,15	1,21
216	4,92	1,3559	1,12	3,21	2,13	0,70
240	4,95	1,3917	1,14	3,25	2,09	0,54
264	4,90	1,4672	1,15	3,32	2,03	0,21
288	5,00	1,4870	1,04	3,30	2,00	0,00

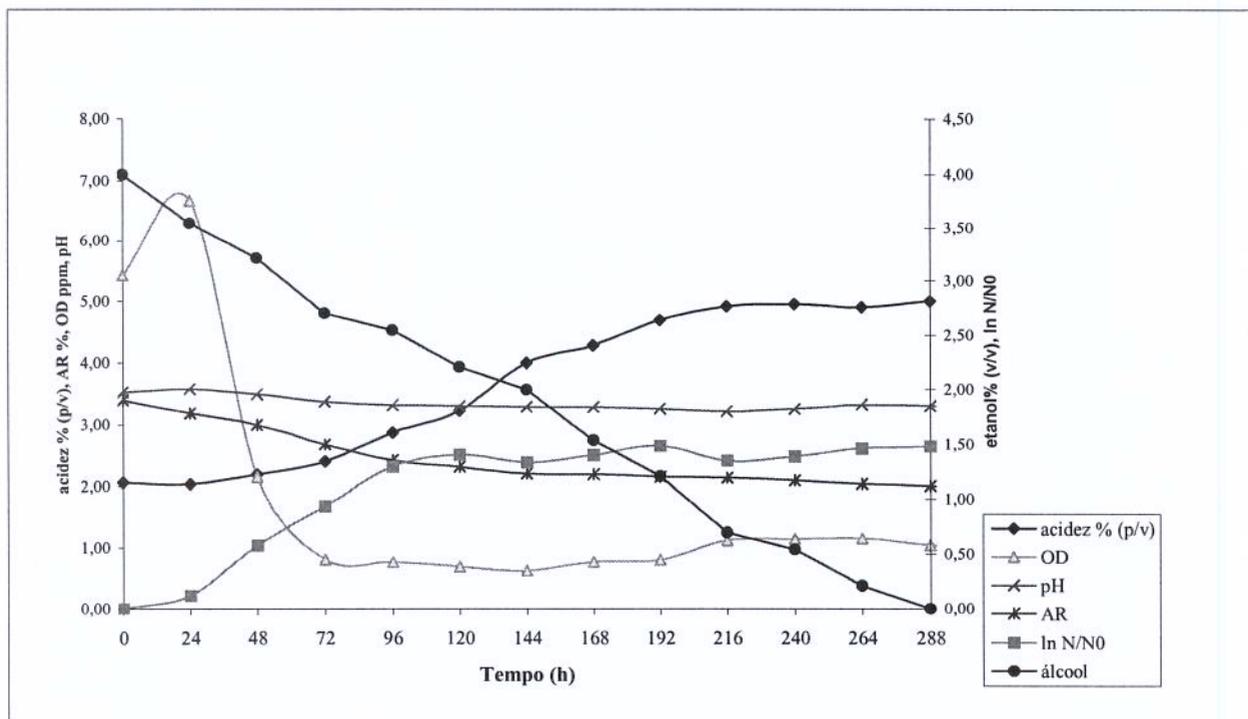


Figura F6. Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 068/04

Tabela A14. Monitoramento das medidas da linhagem 078/05 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C

tempo (h)	%acidez	ln N/N ₀	O.D. (mg/L)	pH	%A.R.	%álcool
0	2,23	0,0000	5,19	3,49	3,18	4,00
24	2,07	0,1226	6,71	3,55	3,17	3,77
48	2,16	0,1417	5,31	3,50	2,98	3,55
72	2,24	0,1603	4,76	3,42	2,72	3,30
96	2,20	0,1696	4,71	3,77	2,63	3,11
120	2,19	0,1967	4,56	3,75	2,50	2,89
144	2,92	0,8718	1,76	3,57	2,47	2,70
168	3,14	0,8987	1,18	3,53	2,45	2,45
192	3,60	0,9335	0,94	3,43	2,40	2,23
216	4,05	1,3189	0,86	3,40	2,39	2,00
240	4,39	1,3304	1,00	3,37	2,35	1,78
264	4,97	1,3643	1,27	3,34	2,33	1,56
288	5,00	1,3863	1,20	3,30	2,31	1,30
312	5,01	1,4157	1,09	3,27	2,30	1,12
336	5,03	1,4340	1,03	3,24	2,30	0,90
360	5,06	1,5581	0,91	3,23	2,28	0,70
384	5,07	1,5763	0,83	3,23	2,25	0,46
408	5,09	1,5897	0,70	3,20	2,23	0,24
432	5,12	1,6373	0,50	3,16	2,20	0,00

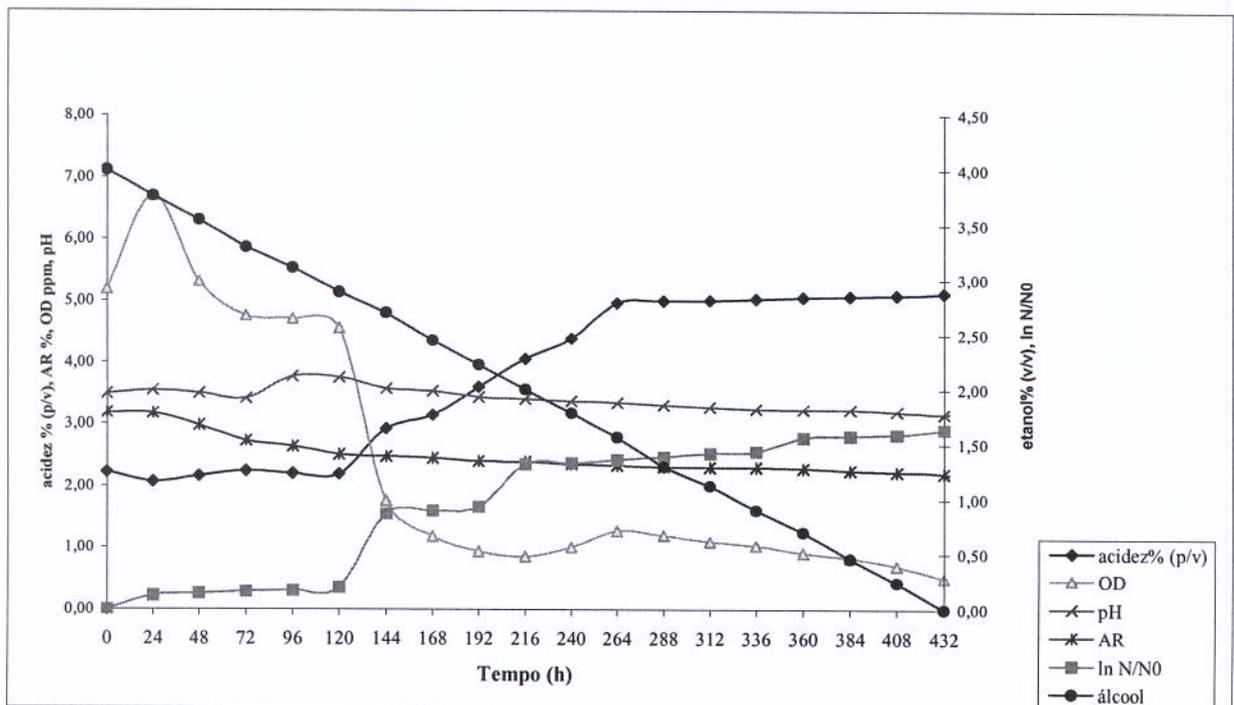


Figura F7. Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 078/05

Tabela A15. Monitoramento das medidas da linhagem 082/05 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C

tempo (h)	%acidez	ln N/N ₀	O.D. (mg/L)	pH	%A.R.	%álcool
0	2,18	0,0000	5,32	3,63	3,94	4,00
24	2,16	0,0335	3,05	3,65	3,90	3,63
48	2,18	0,0660	3,21	3,69	3,84	3,27
72	2,21	0,0974	1,19	3,67	3,73	3,30
96	2,72	0,1278	1,32	3,55	3,76	2,57
120	3,08	0,2186	1,73	3,51	3,64	2,22
144	3,49	0,2367	1,90	3,45	3,50	1,30
168	4,03	0,2891	1,97	3,40	3,46	1,51
192	4,56	0,3143	1,80	3,38	3,28	1,16
216	5,13	0,4205	1,70	3,32	3,06	0,70
240	5,57	0,5432	1,60	3,29	2,96	0,45
264	5,30	0,6555	1,53	3,25	2,81	0,10
288	5,16	0,7349	1,25	3,23	2,70	0,00

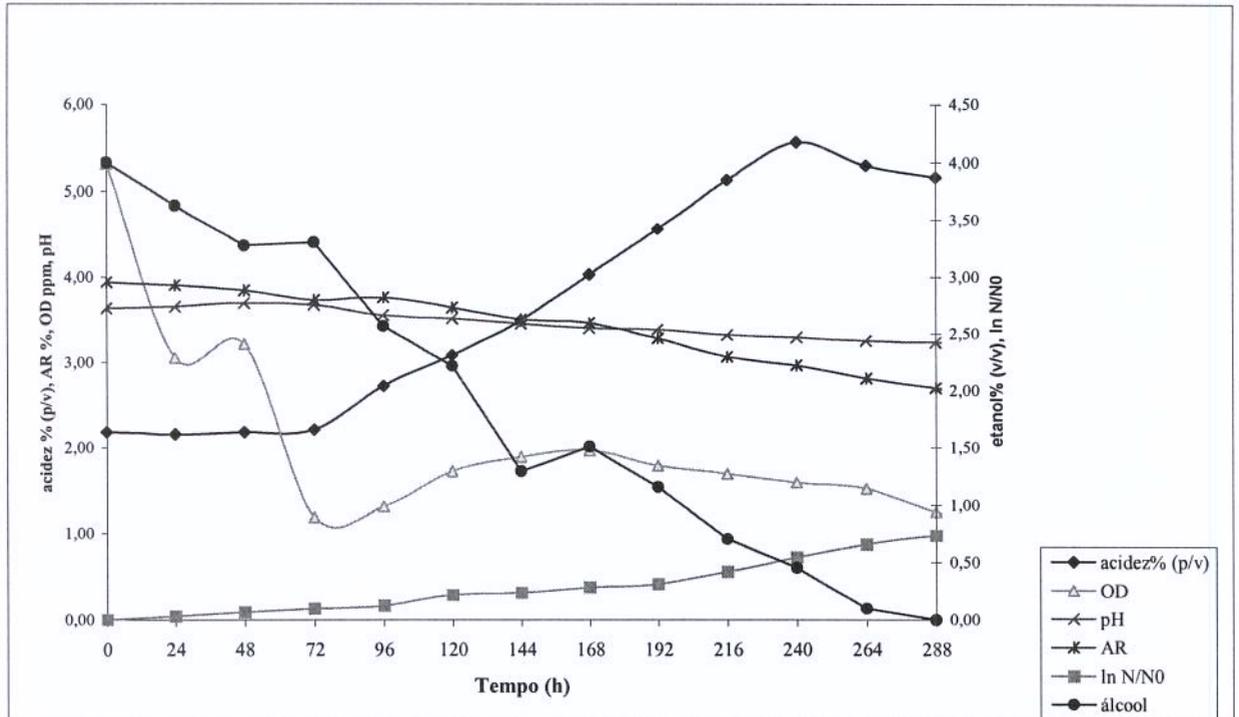


Figura F8. Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 082/05

Tabela A16. Monitoramento das medidas da linhagem 086/06 em meio RAE (2a/4e) incubada com agitação de 120 rpm a 30°C

Tempo (h)	%acidez	ln N/N ₀	O.D. (mg/L)	pH	%A.R.	%álcool
0	2,10	0,0000	4,07	3,64	3,99	4,00
24	2,14	0,0330	4,11	3,65	3,84	3,77
48	2,16	0,1140	2,80	3,71	3,72	3,41
72	2,25	0,1377	1,11	3,68	3,54	3,30
96	2,93	0,4767	1,23	3,53	3,43	2,71
120	4,01	0,6694	1,30	3,40	3,23	2,36
144	4,65	0,7799	1,00	3,31	3,06	2,00
168	5,16	0,9283	0,91	3,25	2,94	1,65
192	5,68	1,0098	0,87	3,19	2,76	1,30
216	5,83	1,0806	0,83	3,15	2,49	0,70
240	5,89	1,1273	0,80	3,12	2,51	0,59
264	5,71	1,1594	0,85	3,10	2,40	0,24
288	5,24	1,1761	0,86	3,11	2,22	0,00

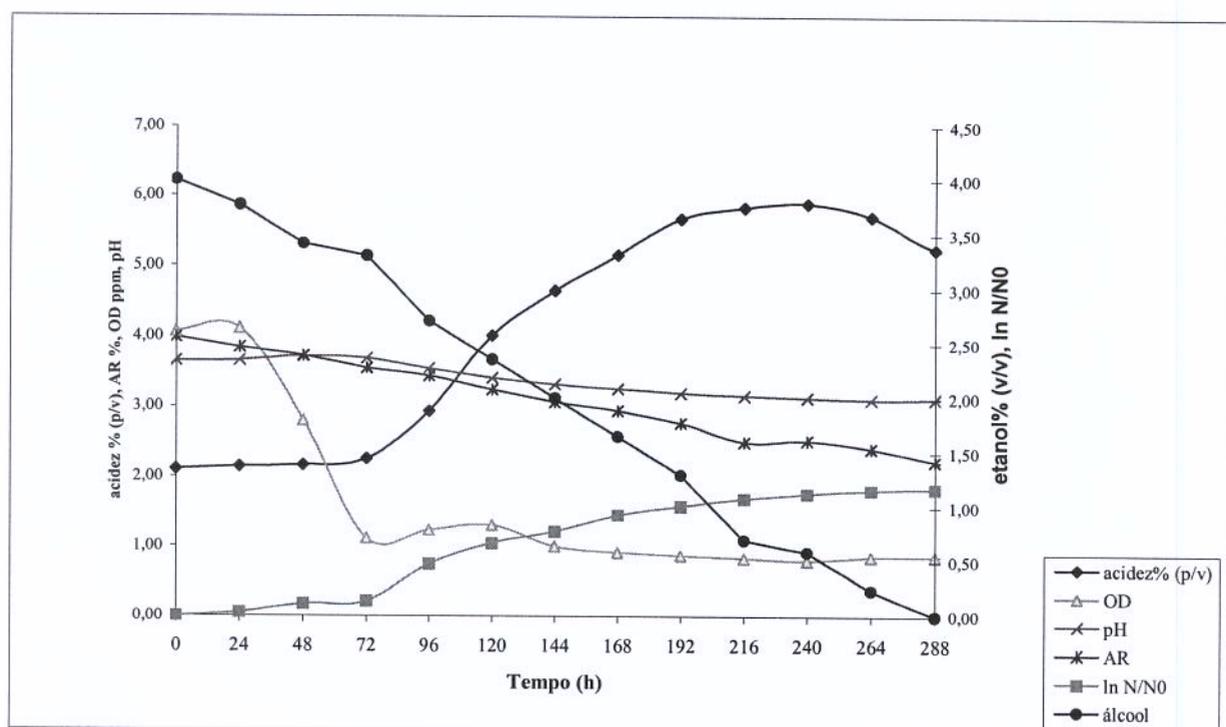


Figura F9. Curvas do monitoramento das medidas da linhagem 806/06

Tabela A17. Parâmetros cinéticos e rendimentos calculados a partir do monitoramento da produção de ácido, partindo de CT 6%(2a/4e), meio RAE, 30°C, 120rpm

Linagem	Velocidade média de produção	R ²	Velocidade média de consumo de etanol	R ²	Y	Y _{ácido}
006/01	0,0175	0,9791	-0,1470	0,9769	87,9	81,9
011/01	0,0149	0,9799	-0,0118	0,9928	96,6	84,6
016/03	0,0189	0,9886	-0,0147	0,9769	94,3	86,9
055/03	0,0185	0,9655	-0,0119	0,9891	97,6	97,1
067/04	0,0201	0,8530	-0,0118	0,9908	97,8	97,8
068/04	0,0196	0,9862	-0,0139	0,9947	84,3	80,9
078/05	0,0181	0,9892	-0,0092	0,9998	82,2	82,2
082/05	0,0201	0,9965	-0,0147	0,9769	83,5	83,5
086/06	0,0259	0,9603	-0,0147	0,9937	97,5	93,6

Tabela A18. Produtividade a 30°C em g de ácido acético /100 mL em 24 horas

Linagem	Produtividade de ácido acético em g/100 mL em 24 horas		
	%CT=6 (2a/4e)	%CT = 5 (1a/4e)	%CT = 3 (1a/2e)
	Meio RAE	Meio Moraes	Meio RAE
006/01	0,23	0,25	0,28
011/01	0,32	0,32	0,31
016/03	0,33	0,33	0,35
055/03	0,33	0,29	0,33
067/04	0,43	0,40	0,40
068/04	0,25	0,27	0,26
078/05	0,17	0,23	0,30
082/05	0,36	0,30	0,29
086/06	0,39	0,38	0,38

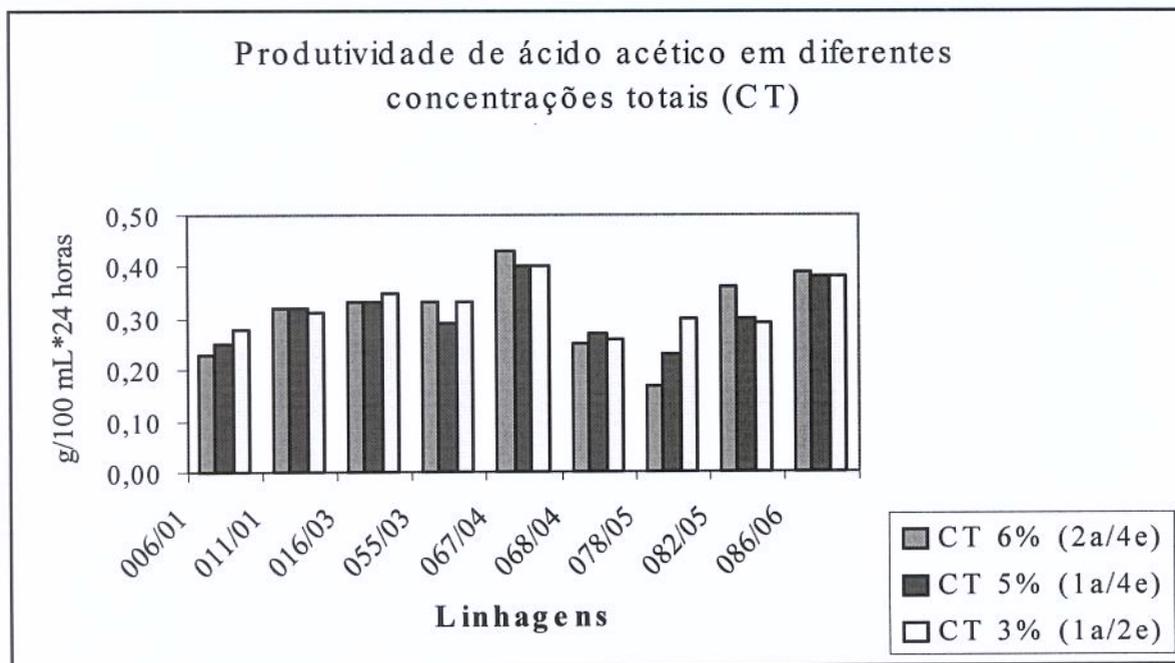


Figura F10. Produtividade em g de ácido acético por 100 mL em 24 horas para diferentes valores de concentração total (%CT).

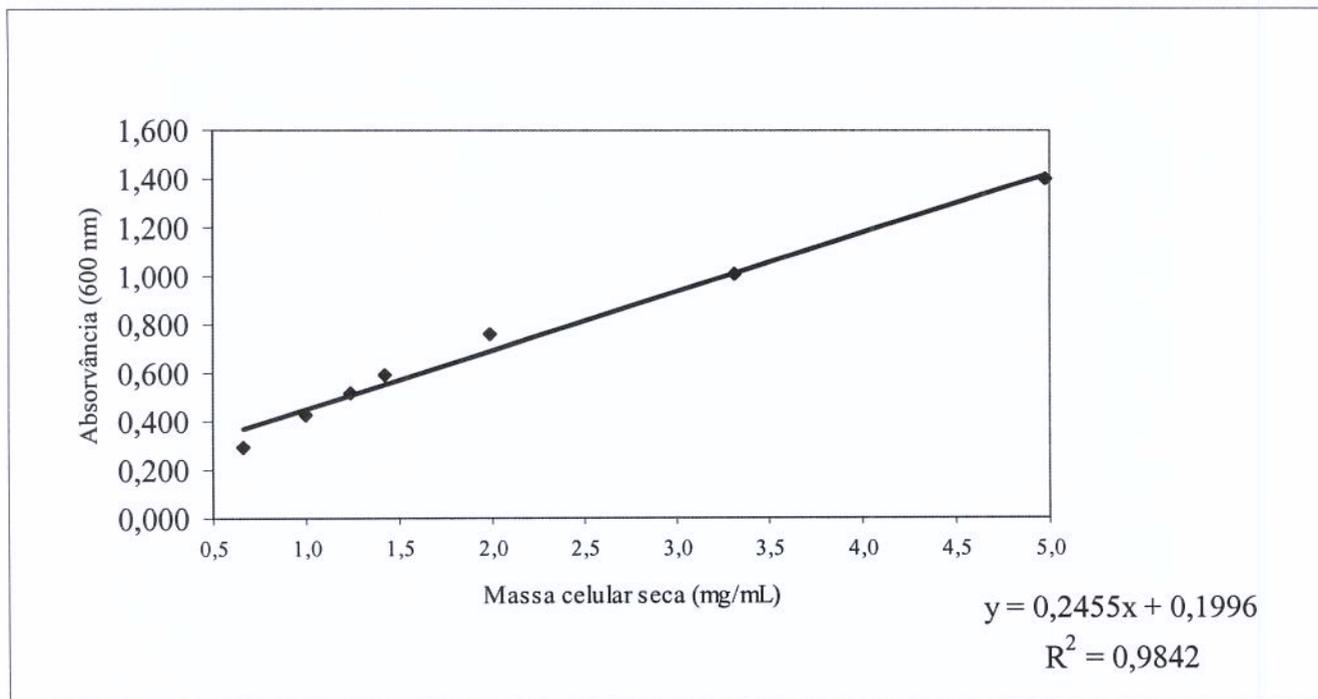


Figura F11. Curva de massa celular seca da Linhagem 082/06

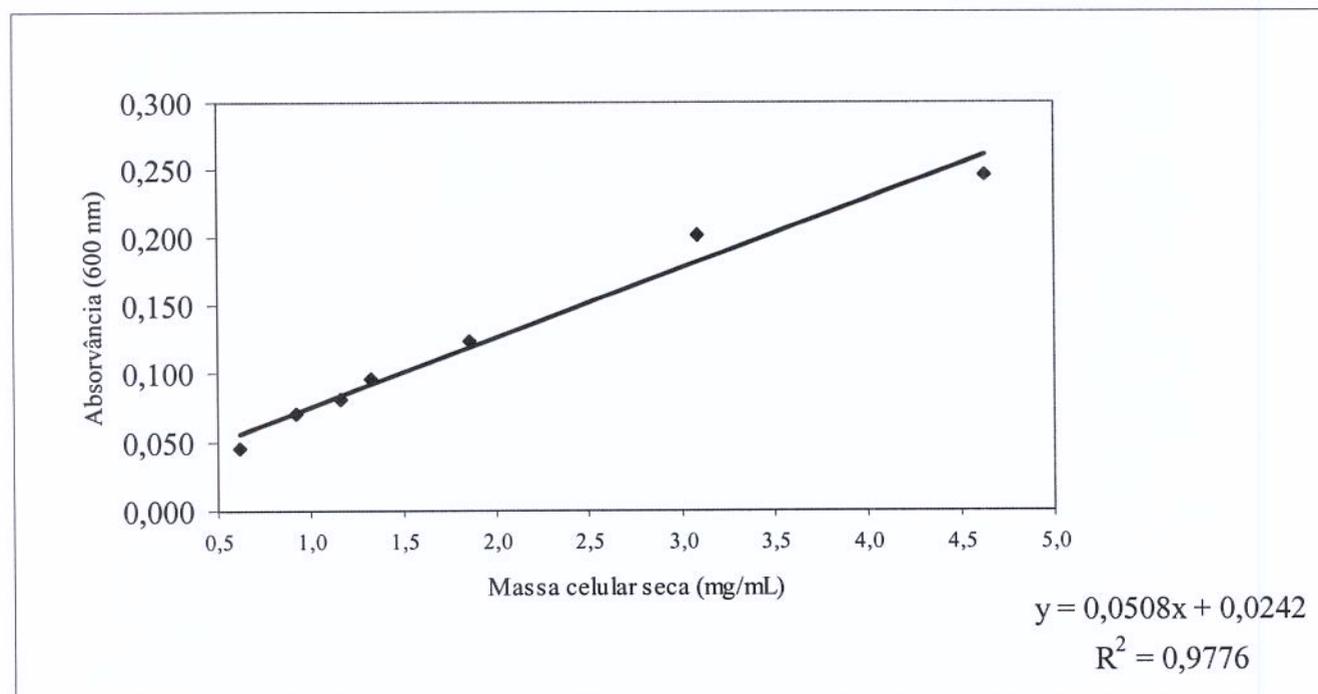


Figura F12. Curva de massa celular seca da Linhagem 086/06

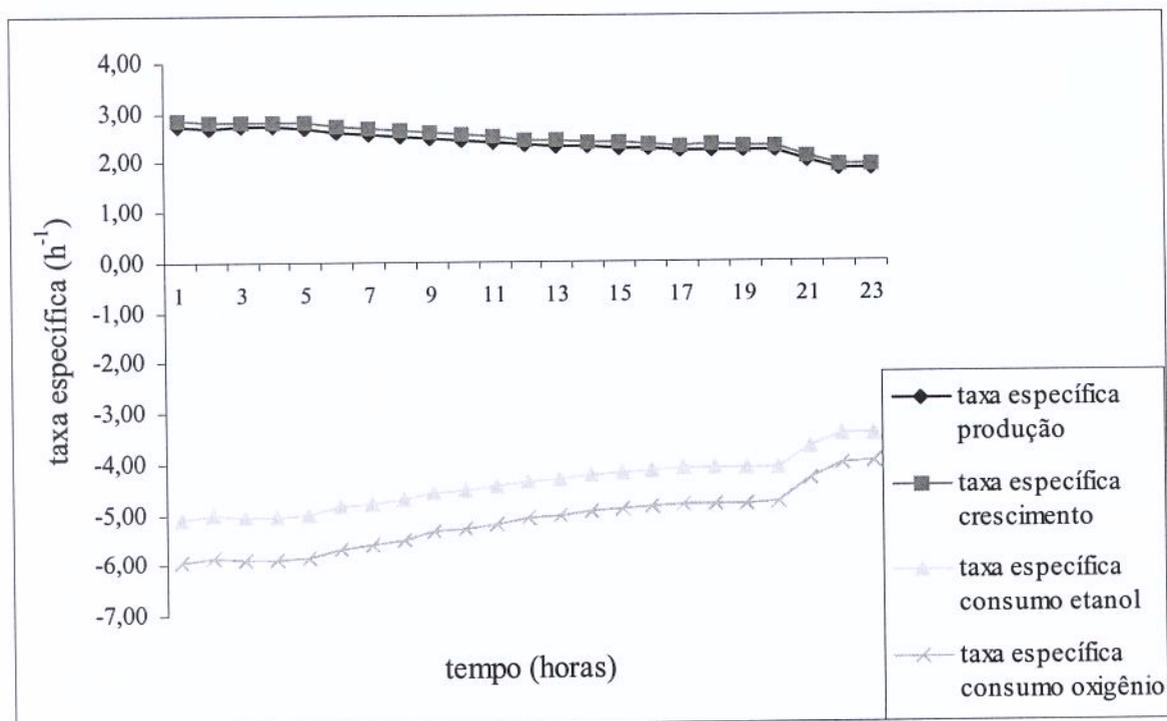


Figura F13 Variação das taxas específicas para a linhagem 086/06 com CT de 7,5%

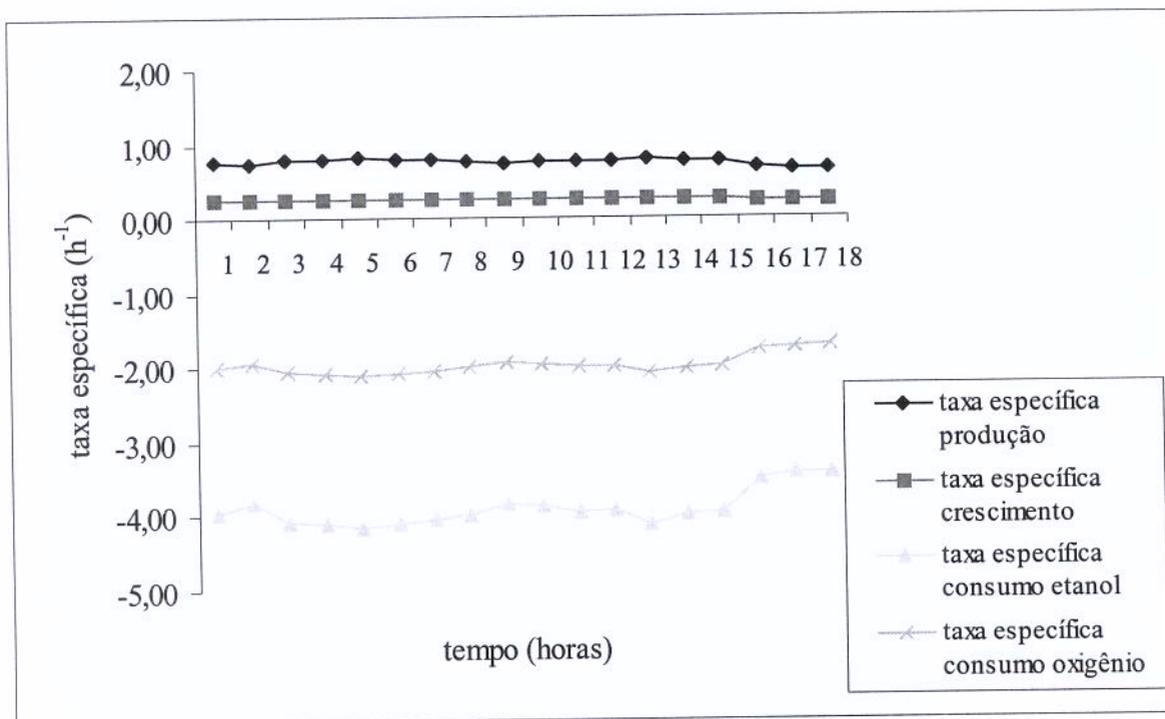


Figura F14 Variação das taxas específicas para a linhagem 082/05 com CT de 7,5%

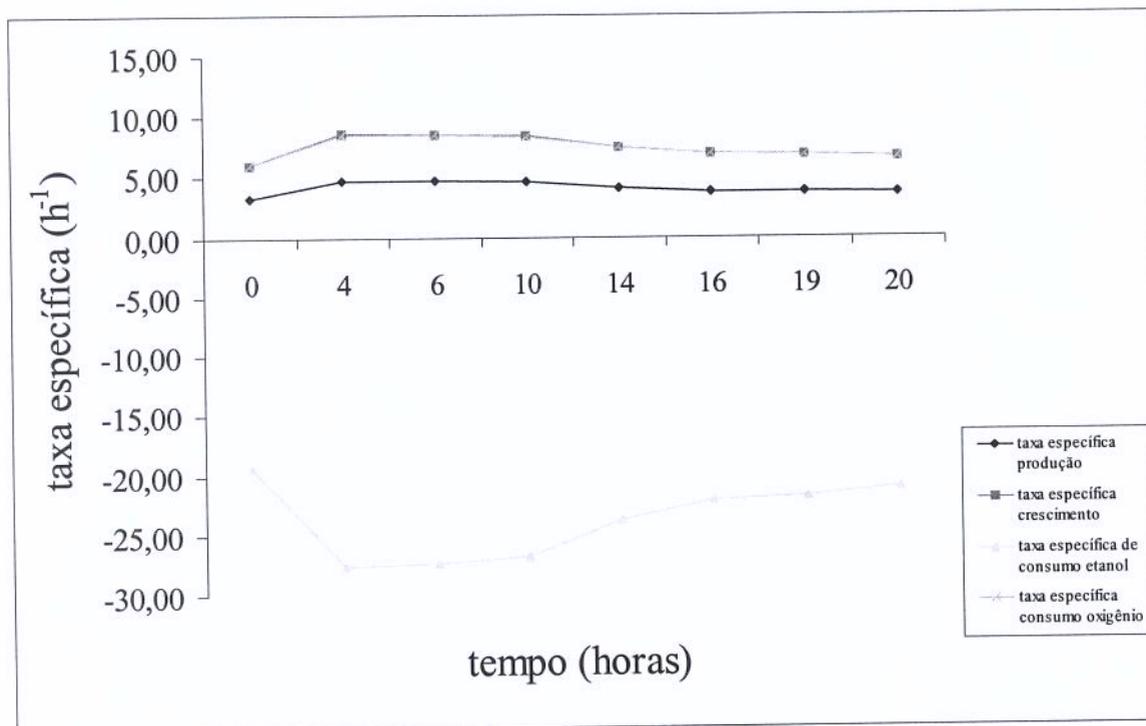


Figura 15 Variação das taxas específicas para a cultura mista da indústria 1 com CT 10%

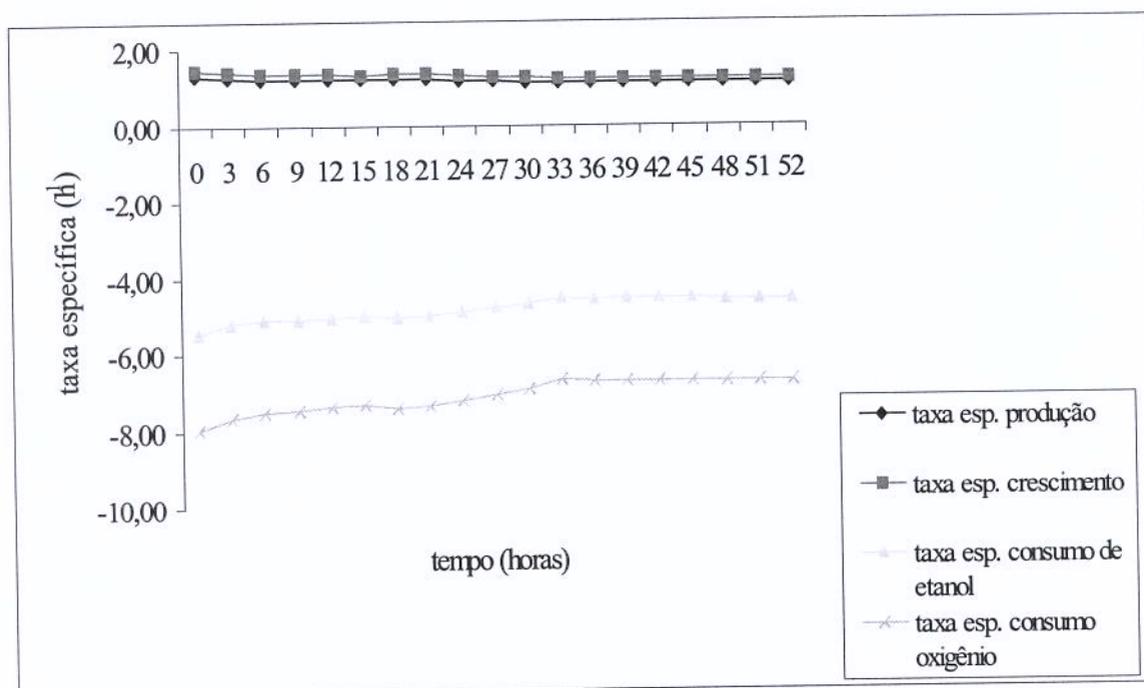


Figura F16 Variação das taxas específicas para a linhagem 086/06 com CT de 10%

