

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

**CONSTRUÇÃO E OPERAÇÃO DE UM GERADOR DE  
VINAGRE**

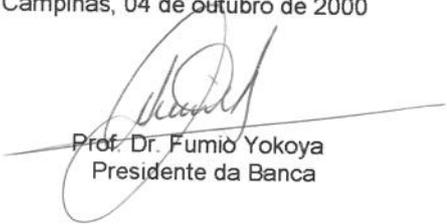
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Fúlvia Arantes Zardini, aprovada pela Comissão Julgadora em 04 de outubro de 2000.

**FÚLVIA ARANTES ZARDINI**  
Bióloga

Campinas, 04 de outubro de 2000

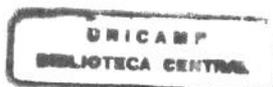
**Prof. Dr. FUMIO YOKOYA**  
Orientador

  
Prof. Dr. Fumio Yokoya  
Presidente da Banca

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.**

Campinas – São Paulo  
Setembro/2000

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



2000 18/196

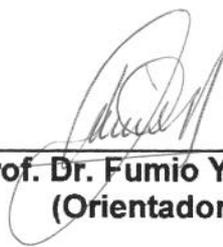
UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	Z18C
TITULO	UNICAMP
V.	Ex.
TOMBO BC	43118
PROC.	16.278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	29/11/00
N.º CPD	

CM-00147235-4

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

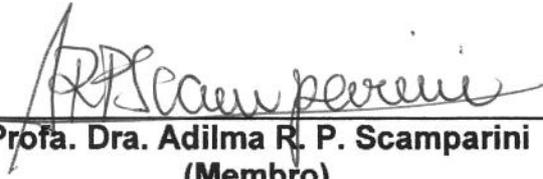
Z18c	<p>Zardini, Fúlvia Arantes          Construção e operação de um gerador de vinagre / Fúlvia Arantes Zardini. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.</p> <p>Orientador: Fumio Yokoya          Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. <i>Acetobacter</i>. 2. Ácido acético. 3. Vinagre. I. Yokoya, Fumio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.</p>
------	---

## BANCA EXAMINADORA



---

**Prof. Dr. Fumio Yokoya**  
(Orientador)



---

**Profa. Dra. Adilma R. P. Scamparini**  
(Membro)



---

**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre**  
(Membro)

---

**Profa. Dra. Lucia R Durrant**  
(Suplente)

Campinas, de setembro de 2000.

**Aos meus pais  
José e Cleuza,  
pelo carinho e apoio  
em todos os momentos.**

**Ao Prof. Fumio,  
pela orientação sempre amigã,  
confiança e dedicação**

**DEDICO**

## AGRADEÇO

A Deus por estar sempre ao meu lado dando-me forças para chegar até aqui.

Aos meus pais por acreditarem na minha capacidade, pelo constante apoio e incentivo nesta caminhada.

À minha irmã Fernanda, que mesmo distante sempre esteve ao meu lado. Eu te amo!!!

À minha família que é simplesmente maravilhosa.

As minhas amigas irmãs Gi, Lule e Mayna (por ordem de entrada na minha vida) que sempre estiveram ao meu lado, ouvindo as minhas chatices, os meus desabafos, tendo que suportar o meu mal e bom humor, por compartilharem os momentos bons e ruins, pelas "baladas", pelas "cervas"... por existirem. Agradeço a Deus por ter colocado vocês no meu caminho.

À minha família campineira, Kill, Vera e Kely, por ter aberto as portas da sua casa para me acolher por tanto tempo. Obrigada por tudo.

Ao meu amigo Hamilton por ter passado noites em claro me ajudando na correção dos relatórios e me dando total apoio em tudo que precisei.

Ao Professor Fumio que confiou em mim e mais do que um Orientador foi sempre um amigo, me dando apoio para que este trabalho fosse realizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo suporte financeiro através do Auxílio a pesquisa Processo: 98/04777-8.

À minha amiga muito especial, Wilma Spinosa que foi a grande incentivadora deste trabalho.

À Helena Godoy pela amizade e paciência durante estes anos.

À Aline Coelho Rosa pelas coletas fora de hora. Sem você este trabalho com certeza ficaria mais difícil. Obrigada!

Aos amigos da Fundação André Tosello que sempre me ajudaram principalmente nos momentos de correria quando tinha que estar em 2 lugares ao mesmo tempo. Principalmente ao Dani que pra mim é uma pessoa muito especial.

À Fundação Tropical André Tosello que cedeu espaço para a realização deste trabalho.

À FEMA (Fundação Educacional do Município de Assis) pelo vinho de laranja principalmente ao Vítório pela ajuda.

À Debora Garutti que juntamente com o Centro Nacional de Pesquisa de Agroindustria Tropical –CNPAT/EMBRAPA- Fortaleza Ceará cederam o vinho de caju.

Ao Laboratório de Sistemática Microbiana e em especial aos amigos que fiz por lá.

À Lú Londe por ter me ajudado, na leitura dos papers e por ter escrito o abstract deste trabalho.

À Silene Paulino por ter ajudado na análise do teor alcóolico dos vinhos.

À Anita J. Marsaioli por ter cedido o Laboratório de Produtos Naturais e em especial ao André Porto por ter me ajudado nas análises cromatográficas.

À banca examinadora, pelas correções e sugestões apresentadas.

Aos funcionários e a todos que contribuíam direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Histórico.....	3
2.2. Vinagre.....	4
2.1 Produção de vinagre.....	5
2.3 Acetificação.....	8
2.4. Microrganismos.....	9
2.5. Efeito da temperatura no metabolismo das bactérias responsáveis pela produção de ácido acético.....	13
2.6 Métodos de produção de vinagre.....	13
2.6 1 Processo Lento, Orleans ou Francês.....	13
2.6 2 Processo rápido ou Alemão.....	14
2.6 3 Processo submerso.....	17
2.7 Variáveis estudadas para elaboração de um modelo cinético para produção de ácido acético.....	20
2.8 Comparação entre os processos de fermentação para fabricação de vinagre.....	21
2.9 Inibição do crescimento de <i>Acetobacter aceti</i> .....	22
2.10 Fermentação com ciclos de células.....	24
2.11 Rendimento e produtividade.....	25
2.11.1 Acetador de Frings.....	25
2.11.2 Geardor de vinagre.....	26
2.11.3 Método Orleans.....	27

2.12 Compostos secundários presentes no vinagre através dos compostos menores produtividade.....	27
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1. Material.....	28
3.1.1. Matéria prima.....	28
3.1.2 Nutrientes.....	28
3.1.3 Microrganismos.....	29
3.1.4 Equipamentos.....	29
3.1.4.1 Construção do gerador piloto.....	29
3.1.4.2 Demais equipamentos.....	30
3.1.4.3 Reagentes.....	31
3.1.4.4 Solvente.....	31
3.1.4.5 Gás de arraste.....	31
3.1.5. Material suporte.....	31
3.2. Métodos.....	32
3.2.1. Operação do gerador de vinagre.....	32
3.2.2. Acompanhamento do processo de fermentação acética.....	32
3.2.3 Cálculo da quantidade em % de álcool.....	32
3.2.4 Determinação do álcool residual presente no vinagre de laranja e caju.....	33
3.2.5 Determinação da acidez total.....	33
3.2.6 Cálculo do rendimento do ácido acético .....	33
3.2.7 Cálculo da produtividade do ácido acético.....	34
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
4.1. Construção do gerador de vinagre.....	35
4.2 Operação do gerador de vinagre.....	38
4.3. Formação do ácido no gerador.....	39
4.4. Aumento da acidez no gerador durante o ciclo fermentativo.....	39
4.4.1. Operação com mosto contendo 10% de álcool.....	39
4.4.2. Operação com mosto contendo 12% de álcool.....	41

4.4.3 Gerador com mosto contendo 14% de álcool.....	43
4.5 Variação do volume do mosto adicionado.....	45
4.6 Operação do gerador com vinho de frutas.....	49
4.7 Rendimento e produtividade do gerador.....	51
4.8 Acidez inicial e final de cada ciclo com soluções alcólicas.....	57
4.9 Concentração de álcool residual presente no vinagre de frutas.....	60
<b>V. CONCLUSÕES</b> .....	<b>62</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema de produção de vinagre	6
<b>Figura 2</b>	Mecanismo de formação de ácido acético	8
<b>Figura 3</b>	Fermentador piloto	30
<b>Figura 4</b>	Fase de coleta do vinagre obtido	35
<b>Figura 5</b>	Visão lateral dos geradores de vinagre, destacando principalmente as bombas pulsadoras	36
<b>Figura 6</b>	Parte superior das colunas dos geradores	37
<b>Figura 7</b>	Coluna com material de preenchimento	37
<b>Figura 8</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 10% de etanol	40
<b>Figura 9</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 10% de etanol	40
<b>Figura 10</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 10% de etanol	41
<b>Figura 11</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 12% de etanol	42
<b>Figura 12</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 12% de etanol	42
<b>Figura 13</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 12% de etanol	43
<b>Figura 14</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 14% de etanol	44

<b>Figura 15</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no inicio da operação 2 litros de mosto, com 14% de etanol	44
<b>Figura 16</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3, adicionando no inicio da operação 2 litros de mosto, com 14% de etanol.	45
<b>Figura 17</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no inicio da operação 3 litros de mosto, com 10% de etanol.	46
<b>Figura 18</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no inicio da operação 3 litros de mosto, com 10% de etanol.	46
<b>Figura 19</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3, adicionando no inicio da operação 3 litros de mosto, com 10% de etanol	47
<b>Figura 20</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no inicio da operação 1litros de mosto, com 10% de etanol	48
<b>Figura 21</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no inicio da operação 1 litros de mosto, com 10% de etanol	48
<b>Figura 22</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3, adicionando no inicio da operação 1 litros de mosto, com 10% de etanol.	49
<b>Figura 23</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador adicionando no inicio da operação 2 litros de vinho de caju	50
<b>Figura 24</b>	Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador adicionando no inicio da operação 2 litros de vinho de laranja	51
<b>Figura 25</b>	Acidez inicial e final dos três geradores contendo 10% de etanol e trocando 2 litros de mosto	57
<b>Figura 26</b>	Acidez inicial e final dos três geradores contendo 12% de etanol e trocando 2 litros de mosto	58

<b>Figura 27</b>	Acidez inicial e final dos três geradores contendo 14% de etanol e trocando 2 litros de mosto	59
<b>Figura 28</b>	Acidez inicial e final dos três geradores contendo 10% de etanol e trocando 3 litros de mosto	59
<b>Figura 29</b>	Acidez inicial e final dos três geradores contendo 10% de etanol e trocando 1 litros de mosto	60
<b>Figura 30</b>	Gráfico de regressão linear e equação da reta	68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Classificação das bactérias e produção de ácido acético	10
<b>Tabela 2</b>	Composição de nutrientes adicionados à soluções alcóolicas testadas	29
<b>Tabela 3</b>	Fermentação acética dos três geradores que receberam 2 litros de mosto com 10% de etanol	52
<b>Tabela 4.</b>	Fermentação acética dos três geradores que receberam 2 litros de mosto com 12% de etanol	52
<b>Tabela 5.</b>	Fermentação acética dos três geradores que receberam 2 litros de mosto com 14% de etanol	53
<b>Tabela 6</b>	Fermentação acética dos três geradores que receberam 3 litros de mosto com 10% de etanol	54
<b>Tabela 7.</b>	Fermentação acética dos três geradores que receberam 1 litros de mosto com 10% de etanol	55
<b>Tabela 8</b>	Fermentação acética de um gerador que recebeu 2 litros de vinho de caju com 8% de etanol	56
<b>Tabela 9</b>	Fermentação acética de um gerador que recebeu 2 litros de vinho de laranja com 12% de etanol	56
<b>Tabela 10</b>	Concentração de álcool residual presente nos ciclos de caju	61
<b>Tabela 11</b>	Concentração de álcool residual presente nos ciclos de laranja	61
<b>Tabela 12</b>	Dados utilizados para confecção da curva de calibração	68

## RESUMO

A literatura científica é bastante limitada no que diz respeito ao processo rápido de fabricação de vinagre (gerador de vinagre). Espera-se que os dados obtidos contribuam não apenas para o desenvolvimento da tecnologia como também na ampliação do uso de vinagre no Brasil através do barateamento e diversificação dos tipos (como vinagre de diferentes tipos de frutas tropicais) para melhor atender os requisitos do consumidor. Este trabalho teve como objetivo: 1-desenvolver um gerador piloto, 2- analisar o desempenho deste gerador com algumas matérias primas: a-) solução alcóolica enriquecida com minerais (meio artificial para comparação) b-) vinhos obtidos pela fermentação alcóolica de caju e laranja. Utilizou-se para a construção cilindros de vidro que são sustentados por discos de nylon (os geradores são três, independentes entre si). Também foram utilizadas bombas pulsadoras com capacidade média de 1 a 6 litros/hora. Foram utilizadas para análise mosto contendo concentrações alcóolicas de 10% (v/v); 12% (v/v) e 14% (v/v) e volume adicionado de 1, 2 e 3 litros. Os geradores foram testados com soluções alcóolicas diluídas acrescidas de nutrientes. Com adição de 2 litros de mosto contendo 10% (v/v) de etanol a cada troca, obtivemos produtividade aparente 0,29 g/L/hora, e rendimento de 0,92 g/g. Com adição de 2 litros de mosto contendo 12% (v/v) de etanol a cada troca, tivemos a produtividade aparente de 0,16g/L/h e rendimento de 0,77 g/g, com 2 litros de mosto contendo 14% (v/v) de etanol, os resultados foram respectivamente produtividade aparente 0,05 g/L/h e rendimento de 0,58 g/g. Fixando o teor alcóolico de mosto a 10% (v/v) e variando a quantidade do volume de 3 litros e 1 litro, obtivemos respectivamente os seguintes dados: produtividade 0,14 g/L/h e rendimento 0,88 g/g; produtividade 0,01g/L/h e rendimento 0,88 g/g. para 1 litro. Isso mostra que o desempenho do gerador foi melhor quando se opera com mosto de 10% (v/v) de álcool, do que, com 12% (v/v) ou 14% (v/v) e a substituição de 2 litros no reservatório (2/5 do volume). Nos teste com vinhos de frutas (caju e laranja) sem adição de nutrientes, a produtividade aparente e rendimento do gerador operando com vinho de caju foram: 0,12 g/L/h e 0,72 g/g respectivamente, e com vinho de laranja 0,11 g/L/h e rendimento: 0,51 g/g. Este gerador é mais apropriado para condições encontradas em muitas cidades brasileiras principalmente as situadas fora de grandes centros industriais incentivando a criação de microempresas no setor, por requerer menos atenção quanto ao seu controle e manutenção, permitindo interrupções por alguns dias sem danos as bactérias acetificadoras e ao processo.

**ABSTRACT**

Actual data about rapid process for vinegar production (vinegar generator) is limited. It is expected the obtained results to contribute both to technological development and ampliation of vinegar use in Brazil, by the production of cheap and diverse types (tropical, fruits vinegar, e.g.) in order to satisfy consumers. This paper had the following objectives: 1. to develop a vinegar generator 2. to analyse this generator performance with some raw materials: a) alcoholic solution added with minerals artificial medium for comparation b) wine obtained by alcoholic fermentation of orange and cashew nut. For the generator construction it was utilized glass cylinder sustained by nylon discs (there are three independent generators). It was utilized pulsating pumps with capacity on average from 1 to 6 l/h. It was utilized for analyses must with alcoholic concentration of 10% (v/v) 12% (v/v) and 14% (v/v) and added volume of 1,2 and 3 l. The generators were tested with alcoholic solutions added with nutrients. For 2 l of must with 10% of ethanol at each exchange, it was obtained apparent productivity of 0,29 g/l/h and apparent income of 0,92 g/g. With add of 2 l of must with 12% of ethanol at each exchange, the apparent productivity was 0,16 g/l/h and income of 0,77 g/g. With 2 L of must with 14% of ethanol, the results were, respectively, apparent productivity 0,05 g/L/h and income of 0,58 g/g. Fixing alcoholic tenor of must at 10% and varying the quantity of volume of 3 L and 1 L, it was obtained, respectively: productivity 0,14 g/L/h and income 0,88 g/g; productivity 0,01 g/L/h and income 0,88 g/g for 1L. These results show that generator performance was better with must of 10% of alcohol, than 12% or 14% and substitution of 2 L in reservatory (2/5 of volume). In tests with fruits wine (cashew nut and orange) without nutrients addition, the apparent productivity and generator income with cashew nut wine were, respectively, 0,12 g/L/h and 0,72 g/g, and , with orange wine, 0,11 g/L/h and income 0,51 g/g. This generator is appropriated for many brazilian cities, mainly that out fo big industrial centers, what is an incentive for the creation of small firms, because it asks for less attention to control and maintenance and permitt interruptions for some days without damage to the process.

## CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

O vinagre é um produto utilizado em grande parte do mundo. Curiosamente, nem mesmo os mais abrangentes compêndios identificaram com precisão a sua origem. Vários autores, entretanto, são unânimes em citar que obras clássicas da Antigüidade já faziam menções ao produto, como são os casos do Antigo e do Novo testamento (AQUARONE & ZANCANARO 1990).

O vinagre é definido como sendo um produto obtido pela oxidação de soluções alcoólicas diluídas. Pode ter várias finalidades tais como, uso medicinal onde na Antigüidade serviu como anti-séptico, também utilizado como agente desinfetante, e aplicado como solvente e cosméticos, além do uso alimentício.

São conhecidos três processos para a produção de vinagre: o método Orleans, o submerso e o método rápido.

O método Orleans é um método pouco adaptado a aplicações comerciais devido à baixa rentabilidade e lentidão; é, entretanto, indicado para produção caseira de vinagre fino (SPINOSA, 1996).

O método submerso, embora rápido, eficiente, e com rendimento e produtividade alta, tem seus inconvenientes por causa do seu elevado custo de instalação, além da necessidade de fonte de energia constante e mão de obra qualificada para sua manutenção (SPINOSA 1996).

---

O método rápido por gerador, mesmo com alguma deficiência no que diz respeito ao rendimento e produtividade, tem a grande vantagem de apresentar custo de instalação reduzido e não requerer mão de obra especializada podendo operar com grandes ou pequenas quantidades. É adequado para ser utilizado em regiões com poucos recursos técnicos, e infra-estrutura industrial incompleta. Acreditamos que o método seja mais apropriado para as condições encontradas em muitas cidades brasileiras, principalmente aquelas situadas fora dos grandes centros industriais.

## CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico

Alguns pesquisadores afirmam que o vinagre tenha surgido há pelo menos 10.000 anos, época em que houve o aparecimento do vinho. Tem-se registrado que durante a migração de judeus da Palestina para Babilônia, houve uma perda de grande quantidade de vinho e cerveja por causa da acetificação. Há também registros sobre a importância do vinagre na civilização antiga, sendo a Babilônia uma das mais antigas, datada de 5.000 anos A.C. (CONNER E ALLGEIER, 1976).

Os povos da Babilônia, nessa época, já usavam vinagre como condimento e como agente conservador de alimento. O vinagre era produzido do suco e vinho de tamareira, de uva e de cerveja. Outro tipo de vinagre era obtido do “mel de tâmara”, extraído da fruta parcialmente desidratada ao sol. A sua fermentação resultava no vinho com teor mais elevado de álcool e, por conseguinte, um vinagre com teor mais elevado de ácido que o do suco da tamareira. Um terceiro tipo de vinagre era preparado adicionando água ao resíduo de preparação do vinho de tâmara, resultando um caldo diluído da fruta, que se transformava rapidamente em vinagre. O vinagre era também produzido a partir da cerveja preparada de cevada, ou mistura de cevada e Tâmara. A cerveja, a partir da cevada, era reservada para festividades, e usada para o consumo diário. (CONNER E ALLGEIER, 1976).

As carnes, peixes, frutas e hortaliças eram conservadas em vinagre, geralmente com adição de condimentos e pimenta. As hortaliças e frutas eram. Portanto, o vinagre era muito importante na Babilônia permitindo a conservação de

alimentos frescos para serem consumidos na época de pouca fartura. (CONNER E ALLGEIER, 1976).

A cidra que corresponde à cidra fermentada era o vinho ou a bebida "Shekkar" dos fenícios e era conhecido pelos arianos do norte da Europa antes dos registros históricos. A acetificação da cidra de maçã para obtenção de vinagre é uma técnica muito antiga. No período bíblico, o vinagre era preparado do vinho de uva ou cidra. (CONNER E ALLGEIER, 1976).

No tempo medieval, há muitos livros de culinária onde o vinagre é citado como um dos ingredientes, como nos de Paltina em 1475 e Digbie em 1669. O vinagre preparado em Modena, na Itália, era famoso desde a era da Renascença e era preparado pelo método de Orleans. Como usuários desse vinagre incluem-se os compositores Rossini e Winston Churchill (CONNER E ALLGEIER 1976).

## 2.2 Vinagre

Várias frutas originam o vinagre tais como a laranja, limão, maçã, pêra, figo, ameixa, caqui, abacaxi, pêssego, banana, amora, melancia, mexerica, jabuticaba, caju, morango e uva. Podem também sofrer fermentação acética para a produção de vinagre algumas matérias - primas ricas em amido, como batata, batata-doce e mandioca, que produzem os chamados vinagres de tubérculos amiláceos. Há também vinagres obtidos de materiais açucarados, como mel, melaço, xarope de açúcar, glicose, de efluentes da fabricação de leveduras e de aguardentes em geral. Tem-se ainda o vinagre obtido a partir de cereais como cevada (existe vinagre de cerveja), centeio, trigo, milho e arroz (MORETTO, 1988, ADAMS, 1985).

A matéria prima utilizada para fabricação do vinagre é variável em função da disponibilidade de cada país. Assim, na Itália, Espanha, França e Grécia, países de grande tradição vinícola, o vinagre é feito, sobretudo de vinho. No Brasil, os vinagres são elaborados principalmente a partir do álcool de cana-de-açúcar e do vinho. Na China e no Japão, o vinagre é produzido a partir do arroz,

enquanto nos Estados Unidos e Inglaterra, a partir da sidra e malte. Na Alemanha é mais utilizado o vinagre de álcool. Além dessas matérias – primas, foram também experimentados os sucos fermentados de abacaxi, de manga, de banana e de caqui (ZANCANARO, 1988; SPINOSA, 1996; ADAMS, 1985).

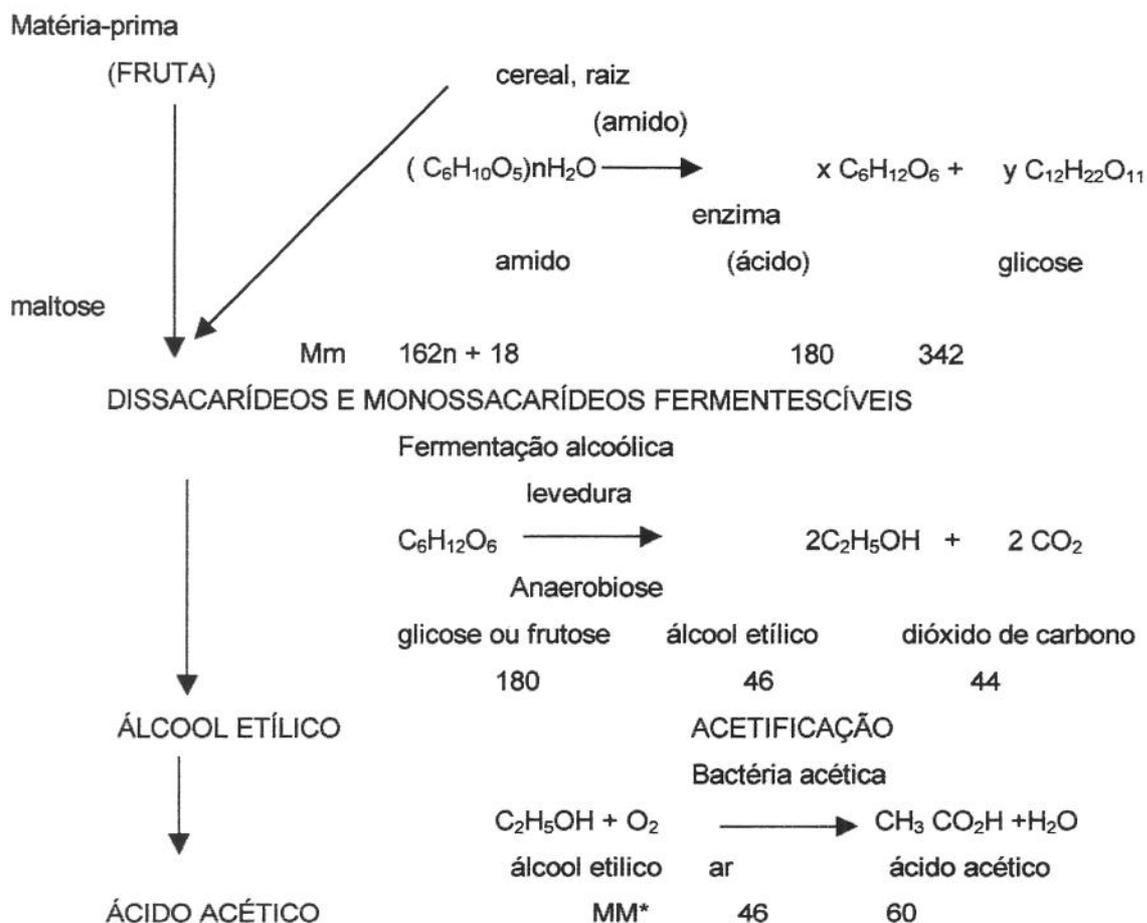
O álcool de cana, utilizado por razões econômicas pela grande maioria dos fabricantes brasileiros, é considerado uma das piores composições conhecidas. Muitos vinagres rotulados como provenientes do vinho, na verdade, originam-se de álcool ou de açúcar. Durante a produção, e apenas neste momento, eles recebem pequenas porcentagens de melado de cana fermentado ou de vinagre de vinho, adquirindo então características que aproximam do vinagre produzido com vinho de uvas (SPINOSA, 1996).

### **2.2.1 Produção de vinagre**

Vinagre é uma solução diluída de ácido acético, elaborada em duas etapas; a fermentação alcoólica, quando o açúcar é convertido em etanol e a acetificação, transformando o álcool em ácido acético (Figura 01).

Mosto com concentração de 10% p/v ou mais de açúcar e pH ácido favorece a produção de etanol. A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico, conduzido por leveduras presentes na matéria-prima ou adicionadas na forma de culturas puras. A seguir, no processo denominada acetificação, em condições aeróbias, ocorre a oxidação do álcool, obtendo-se ácido acético pela ação das bactérias acéticas (ADAMS, 1985).

Qualquer substrato que contenha carboidratos fermentescíveis (ou amido) e certos nutrientes (vitaminas do complexo B, minerais) é passível de fornecer vinagre mediante fermentação alcoólica e acética. O substrato deve apresentar níveis suficientes de elementos fermentescíveis para que o vinagre produzido tenha um teor de ácido acético de acordo com padrões exigidos por lei. (ADAMS, 1985; SPINOSA, 1996).



\*Massa molecular Conversão estequiométrica: 1g de glicose 0,51g de álcool etílico 0,67g de ácido acético

**Figura 01:** Esquema de produção do vinagre (ADAMS, 1985).

O vinagre na legislação Brasileira é definido de acordo com a matéria prima utilizada para a sua fabricação. O vinagre de álcool é definido como um produto proveniente da fermentação acética de uma mistura constituída de álcool etílico, convenientemente diluído e adicionado de elementos nutritivos para os fermentos acéticos. A designação deste produto é "vinagre de álcool". O vinagre de álcool deve ser preparado de álcool etílico retificado, limpo, isento de matéria terrosa e de detritos animais e vegetais. O vinagre de álcool não deverá conter substâncias estranhas à sua composição normal, exceto as previstas na norma da legislação. É tolerada adição de sais nutritivos e açúcares para nutrição dos microrganismos acidificantes. No vinagre de álcool não é permitido o uso de

conservadores e como corantes é tolerada a adição de caramelo. Não é permitido conter ácidos orgânicos estranhos e nem ácidos minerais livres. As características microbiológicas também são dadas nesta legislação e deverão ser efetuadas determinações de microrganismos e / ou de substâncias tóxicas de origem microbiana, sempre que se tornar necessária à obtenção de dados sobre o estado higiênico sanitário dessa classe de alimento, ou quando ocorrerem tóxi-infecção alimentares. Existe outra definição nesta mesma legislação que define da seguinte forma o vinagre: “Os vinagres poderão ser oriundos da fermentação acética de outros líquidos alcoólicos e o produto será designado como vinagre ou vinagre de vinho. Quando proveniente da fermentação acética de outros líquidos alcoólicos, o produto será designado” vinagre “segundo do nome do vegetal de origem. Ex:” vinagre de laranja, vinagre de cidra “. As características microbiológicas desta é similar a anterior (SÃO PAULO, 1978)”.

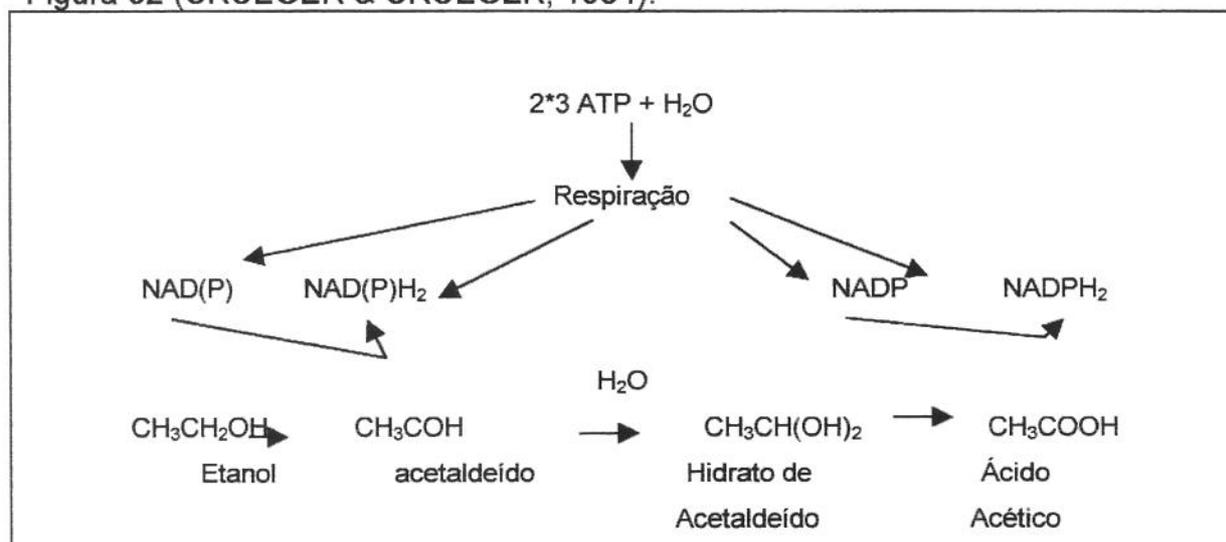
O vinagre é consumido em quase toda parte do mundo. O consumo per capita nos países industrializados é superior a 2 litros de vinagre com 5% de acidez por ano (ADAMS, 1985). Na Europa esse valor pode chegar a 4 litros/ano. Acredita-se que no Brasil o consumo seja menos de 1 litro (SPINOSA, 1996). Este produto é usado principalmente no tempero de saladas, molhos e curtimentos de legumes e hortaliças. Outra aplicação utilizável é como agente desinfetante de uso doméstico, o que é possível e interessante desde que o seu custo seja comparável com outros compostos usados para o mesmo fim. Nesse aspecto o vinagre tem vantagem de ser um produto não prejudicial a saúde do consumidor nas concentrações normais de uso (SPINOSA 1996).

Atualmente a produção do vinagre no Brasil está concentrada em poucas empresas que utilizam unidades fabris de médio a grande porte. Devido ao seu baixo valor comercial, o custo de embalagem, transporte e distribuição constituem um componente importante no preço final. Unidades menores distribuídas mais amplamente nas diversas partes do território poderão contribuir para atenuar esse custo (SPINOSA, 1996).

### 2.3 Acetificação

A fermentação acética apresenta caráter oxidativo, onde soluções diluídas de etanol são oxidadas a ácido e água utilizando-se o oxigênio do ar (MAEDA, 1997).

Esta reação ocorre em duas etapas. No primeiro passo, o etanol é transformado em acetaldeído ao nível da membrana citoplasmática através da enzima álcool-desidrogenase, ligada ao NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) ou ao NADP que agem como aceptores intermediários de hidrogênio, formados durante o processo de respiração, o que torna indispensável a viabilidade celular para que ocorra o processo fermentativo. O acetaldeído formado é, então, hidratado e sofre uma nova oxidação, pela ação da enzima acetaldeído-desidrogenase ligada ao NADP, que leva a formação do ácido acético. Este mecanismo pode ser visualizado no esquema apresentado na Figura 02 (CRUEGER & CRUEGER, 1984).



**Figura 02:** Mecanismo de formação de ácido acético.

Assim, durante a fermentação acética, uma outra fonte de carbono e energia, além do etanol, é também oxidada. Esta fonte é, normalmente, a glicose,

e os produtos desta oxidação são ATP, dióxido de carbono e água (EBNER & FOLLMANN 1983).

EBNER & FOLLMANN, 1983, observaram, também, que a oxidação do etanol a ácido acético não é inteiramente dependente da multiplicação celular e que, mesmo depois de cessado o crescimento microbiano, após se alcançar elevadas concentrações de ácido acético no meio fermentativo, as células são capazes de promover esta oxidação por um certo período de tempo, ao final do qual ocorre a morte acelerada dos microrganismos e o término do processo oxidativo.

Estequiometricamente tem-se que 1 litro de etanol; produz 1,036 Kg de ácido acético e 0, 313 Kg de água. Durante o processo fermentativo, ocorre um aumento de volume 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 cálculos de rendimento e para a previsão da acidez do produto. Considerando-se a perda por evaporação e por sobreoxidação como nula, tem-se que a soma da concentração do etanol (% v/v) e do ácido acético (%p/v) é igual á concentração global ou GK, do alemão "Gesammte Konzentration".A GK é constante durante todo o processo de acetificação (ADAMS, 1985).

#### **2.4 Microorganismos:**

A formação de ácido acético a partir do etanol é efetivada por bactérias do ácido acético (*Acetobacter*); detectada pela primeira vez por Pausteur. HENNEBERG citado por ASAI, (1968) classificou, do seguinte modo, várias espécies de *Acetobacter* quanto à produção de ácido acético:

**Tabela 01:** Classificação das bactérias e produção de ácido acético segundo ASAI, 1968.

Bactérias produtoras de ácido acético	% de ácido produzida
<i>A. oxydans</i>	2,0%
<i>A. acetigenus</i>	2,7%
<i>A. xylinum</i>	4,5%
<i>A. pasteurianus</i>	6,2%
<i>A. aceti</i>	6,6%
<i>A. kueningianus</i>	6,6%
<i>A. ascendens</i>	9,0%
<i>A. schutzenbavhii</i>	10,9%

Bioquimicamente, as linhagens de *Acetobacter* realizam processos catabólicos por aerobiose e anaerobiose e também a síntese de polissacarídeos. É de interesse industrial o catabolismo oxidante aeróbico de álcoois e açúcares, usado na fabricação de ácido acético ou de vinagre. Apesar da facilidade de obtenção por via microbiana, uma grande quantidade, de ácido acético é obtida por via química. No entanto a via fermentativa é a única forma usada na fabricação do vinagre (BARUFFALDI, 1975).

Dois tipos de bactérias são responsáveis pela produção do ácido acético, as bactérias superoxidativas, como exemplo, o *Acetobacter* e suboxidativas e o *Gluconobacter*. A primeira se destingue pela oxidação do etanol em ácido acético e subsequente transformar este em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A *Gluconobacter* apenas realiza a oxidação do etanol a ácido acético (RODRIGUEZ MASSAGUER, 1997).

A fermentação industrial de maior importância conduzida pelas bactérias acéticas superoxidativas, de maior importância, é a produção de vinagre. O tipo de flora atuante é obtido pela seleção natural, sem estar sob o controle do homem. A falta de interesse em um maior controle microbiológico da fermentação é devido ao alto teor de ácido e álcool do substrato, o que evita o crescimento de outros microrganismos que não os do gênero *Acetobacter* (CANHOS, 1975).

As culturas puras de bactéria do ácido acético não são usadas na prática para a produção de vinagre, pois têm mostrado serem menos eficientes do que culturas mistas. Os processos industriais também seguem esse procedimento. As próprias condições do meio, tais como pH baixo, presença de etanol, aeração e temperatura, selecionam naturalmente as espécies mais adaptadas (ZANCANARO, 1988; SPINOSA, 1996).

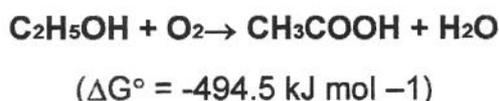
As principais características das *Acetobacter* são: formato de bastonetes na juventude; gram-negativas; mobilidade; aeróbias; e ocorrência isoladas, aos pares ou em cadeias. (AQUARONE & ZANCANARO, 1990). Nas culturas velhas a reação de gram torna-se variável. São encontradas em frutas e vegetais e estão envolvidas na acetificação bacteriana de sucos de frutas, bebidas alcoólicas, cerveja, vinho, produção de vinagre e fermentação de sementes de cacau. A espécie representativa do gênero é a *Acetobacter aceti*. (RODRIGUEZ MASSAGUER, 1997).

Na nona edição do "Bergey's Manual" BREED *et al.* (1994) classificam o gênero *Acetobacter* separadamente. O gênero era formado por três espécies: *A.aceti* subdividido em quatro subespécies: *aceti*, *orleanensis*, *xylinum* e *liquefaciens*; *A.pasteurianus* subdividido em cinco subespécies: *pasteurianus*, *lovaniensis*, *estunensis*, *ascendens* e *paradoxus*; e a espécie *A.peroxydans*.

As *Acetobacter* fermentam açúcares, formando o ácido como fonte de carbono, produzindo gás carbônico e água. Aqueles que oxidam ácido acético estão subdivididos em dois grupos: microrganismos com capacidade de utilizar sais de amônio como fonte única de nitrogênio e um outro grupo, sem essa capacidade. A *Acetobacter aceti* é capaz de utilizar os sais de amônio. Já a

*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter rancens*, *Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter kuentzingianus* não tem tal característica. *Acetobacter xylinum* forma, sobre a superfície do meio, uma capa de celulose em forma de zooglia. São conhecidas mais de dez espécies diferentes sendo, uma delas, flagelada (BARUFFALDI, 1975).

A fermentação acética pode ser definida como um processo aeróbico de oxidação biológica (favorável termodinamicamente), durante o qual um substrato com uma concentração de etanol de 50 a 100 g/L é parcialmente oxidado pela ação da bactéria do ácido acético, para produzir ácido acético e água. Essa oxidação acontece de acordo com a equação básica (SUÁREZ - LEP 1990) mostrada abaixo:



O resultado é uma solução com um alto teor de ácido acético e uma pequena quantidade de etanol residual não convertido, junto com um bom número de produtos secundários. A maioria das variáveis que influenciam no metabolismo da bactéria do ácido acético é concentração de etanol e ácido acético (DE LEY AND GILLIS 1984 citado por ORY *et al.*, 1998), concentração de oxigênio dissolvido e concentração de SO<sub>2</sub>, densidade da população (PARK *et al.*, 1989) e temperatura de cultivo (ORY *et al.*, 1998).

Em termos de pH, a bactéria acética pode mostrar crescimento ótimo em pH entre 5 e 6,5, embora mostre grande capacidade de sobreviver em pH entre 3 e 4 (ROMERO *et al.*, 1994).

Alguns dos fatores mais freqüentemente estudados neste metabolismo são os efeitos das concentrações do substrato do produto. Embora a habilidade para metabolizar etanol a ácido acético seja uma característica distintiva da bactéria do ácido acético, ambos tem influências complexas em seu crescimento (ORY *et al.*, 1998).

## **2.5 Efeito da temperatura no metabolismo das bactérias responsáveis pela produção de ácido acético:**

Alguns autores (LAFON-LAFOURCADE *et al.* 1981 citado por ORY *et al.*, 1998) colocam a temperatura ótima entre 30 e 35 °C, embora uma grande capacidade de adaptação a condições mais severas tenha sido relatada. Não existem referências específicas a nenhuma temperatura mínima para viabilidade, mas é considerado que um crescimento abaixo de 10°C dificilmente seja possível. Similarmente, não existem dados confiáveis sobre a temperatura máxima, mas supõe-se que seja por volta de 35°C (ORY *et al.*, 1998).

ASAI, (1968), mostra em seus estudos que a temperatura ótima para a produção do ácido acético está na faixa de 20 a 30<sup>o</sup> C, e o tempo de fermentação é extremamente aumentado se a temperatura estiver abaixo de 10<sup>o</sup> C ou acima de 46<sup>o</sup>C.

Em 1998 foi feito um estudo por ORY *et al.*, (1998) sobre o efeito da temperatura na taxa específica de crescimento do microrganismo (M). Foi desenvolvido um modelo matemático deste processo com o propósito de desenvolver uma relação matemática entre M de *A. acetí* e a concentração de substrato (etanol), produto (ácido acético) e oxigênio dissolvido. Muitas tentativas têm sido realizadas no sentido de se procurar interpretar resultados experimentais com auxílio de modelos matemáticos, visando colaborar na elucidação de mecanismos envolvidos no processo que possibilitem o adequado controle do sistema e sua otimização.

## **2.6 Métodos de produção de vinagre:**

### **2.6.1 Processo Lento, Orleans ou Francês:**

É o processo mais antigo, observado a partir do avinagramento do vinho colocado em barricas semicheias.

Ao longo da história, foram introduzidas algumas modificações com o objetivo de acetificar mais rapidamente e em maior quantidade. Neste método foi observado que com o deitamento das barricas, e a menor quantidade de vinho ou sidra nos recipientes, melhorava o rendimento graças à relação área volume. Orifícios foram feitos nos recipientes, protegido de insetos, aumentando a circulação de ar. Tábuas foram utilizadas na superfície do mosto e, posteriormente, um quadriculado com ripas de madeira apropriada, com a finalidade de sustentar as bactérias oxidativas, juntamente com o polímero  $\alpha$ -celulose que elas próprias produzem a partir de resíduos de açúcar contido no vinho. Este polímero tecnicamente denominado de zoogleia é 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 microorganismo e também a retirada do produto. Uma torneira ou sifão foi colocado abaixo da zoogleia, tornando possível retirar o vinagre e adicionar o mosto, sem perturbar a película bacteriana. Retirada de vinagre e adição de vinho devem ser realizadas em quantidades e períodos de tempo perfeitamente adequados a fim de que o processo se torne semicontínuo. (AQUARONE & ZANCANARO, 1990, ZANCANARO, 1988, MORETTO, 1988).

O envelhecimento permite as lentas reações químicas, transformando resíduos de acetaldeído, etanol, ácido acético e outros em ésteres e hemiacetais, de sabores e odores mais agradáveis. A acidez é mascarada em função do efeito tampão das proteínas, aminoácidos, e sais minerais (AQUARONE & ZANCANARO, 1990).

#### 2.6.2 Processo rápido ou alemão:

Também chamado de Schuetzenbach ou Boerhave, este método surgiu na Alemanha, no início do século XIX (MORETTO, 1988, SPINOSA, 1996). O método consiste em uma série de barris empilhados, cada um dos dois com fundo duplo perfurado e cheio de cavaco de madeira, onde são colocadas as bactérias

acéticas. As bases dos tonéis são perfuradas por debaixo dos dois fundos, permitindo que o ar entre e se difunda através dos cavacos. Pela parte superior do barril alimenta-se lentamente com a solução de álcool. Este produto vai percolando através do cavaco e ao chegar na parte inferior do barril, escoar pelos orifícios e cai no barril seguinte. Em cada passo há o aumento do teor de ácido de 1 a 2% <sup>1</sup>.

O processo rápido é bastante utilizado atualmente. Foi idealizado por Boerhave, ao descobrir que a transformação do vinho de maçã em vinagre era bastante rápida, quando deixava passar o vinho, através de um recipiente cheio de bagaços de maçã. Algumas modificações foram introduzidas posteriormente, atualmente usam-se recipientes geradores, empacotados com material de enchimento dos mais diversos (BORZANI *et al.*, 1975).

O sistema de produção por meio de geradores 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; a seção maior (mediana), 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, 1988).

O líquido a ser acetificado é colocado na parte superior, por meio de um alimentador ou por dispositivo borrifador. A seguir, este passa à seção mediana, por meio de gotejamento, onde ocorrerá a oxidação do álcool a ácido acético, promovido por bactérias acéticas, desenvolvido no material de suporte. Dessa seção, mais uma vez por gotejamento, o líquido passa à parte inferior, já como vinagre, onde é coletado (MORETTO, 1988).

Por meio de orifícios que se encontram no fundo falso da seção mediana o ar entra no gerador. 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

---

<sup>1</sup>Citação referente a documento eletrônico. Disponível na Internet: <http://ourworld.compuserve.com>

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 (SPINOSA 1996).

Antes de entrar em atividade, um novo gerador deve receber vinagre, com bactérias acetificantes, em sua parte mediana. Estas serão responsáveis pela introdução dos microrganismos desejáveis no material de suporte. As bactérias acetificantes podem ainda circular através do gerador. Alguns produtores acetificam todo o líquido alcoólico 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 recirculação (MORETTO, 1988).

Utilizando em escala industrial, o processo alemão é desenvolvido em dornas de até 100.000 litros. Desse volume, circula-se 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).

O processo alemão tem inconvenientes. Pode ocorrer a infestações por insetos e moscas, como a *Drosophyla melanogaster*, ou por nematóides como a *Anguilulla 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. Por esse motivo, normalmente há necessidade de substituição anual de todo o material de suporte. O processo depende ainda de bombas ácido-resistentes, de cuidados para se evitar ressecamento da madeira, entre outros (ZANCANARO, 1988).

### 2.6.3 Processo submerso:

As pesquisas sobre a produção de vinagre por meio de cultura submersa iniciaram-se por volta de 1950. O aumento da produção de ácido em relação ao tempo dá-se em função exponencial. O substrato alcoólico, por esse processo, pode ser fermentado trinta vezes mais rapidamente que pelo processo alemão. Nesse processo, o ar deve ser controlado cuidadosamente, pois um decréscimo da pressão parcial de oxigênio, ao redor de 4,5, altera o metabolismo bacteriano (SPINOSA 1996).

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 esta reação que lhes fornece energia, as bactérias acéticas necessitam da administração contínua e adequada de oxigênio em todos os pontos do tanque. Interrupção de minutos no fornecimento de oxigênio, sobretudo nas fases finais de fermentação, afetam quase que definitivamente o rendimento (FRINGS, 1996).

Sugere-se na literatura que a concentração de oxigênio dissolvido tem efeito significativo na taxa de produção de ácido acético (PARK *et al.*, 1989, ORY *et al.*, 1998). A concentração de oxigênio dissolvido é um parâmetro metabólico que tem sido estudado por diversos autores (ORY *et al.*, 1998). Por outro lado, muitos pesquisadores têm indicado que células são inativadas por deficiência de oxigênio e por altas concentrações de ácido acético acumulado na cultura de crescimento. Danos às células de bactérias por deficiência de oxigênio parece ser a principal causa da deficiência na produção de ácido acético na fermentação do vinagre submerso. (PARK *et al.*, 1989, ORY *et al.*, 1998). Quando a concentração de O<sub>2</sub> é muito baixa, o processo cai e certas reações secundárias, como as formações de etil acetato pela esterificação do etanol e ácido acético são favorecidas (ORY *et al.*, 1998). Embora a fermentação acética seja um processo aeróbico, o oxigênio é também visto como tendo um efeito inibitório para

concentrações aproximadamente acima de cinco ppm de oxigênio dissolvido, consideravelmente menor que o valor de saturação (ROMERO *et al.*, 1994).

Entretanto, é necessário alcançar uma boa transferência de oxigênio no fermentador, usualmente através de aeração intensiva e mistura das fases líquida e gasosa (ORY *et al.*, 1998).

Mudança morfológica em células bacterianas por deficiência de oxigênio em várias fases de crescimento tem sido observada por microscopia eletrônica. A taxa de crescimento do oxigênio com etanol e a atividade da alcooldesidrogenase das células diminuem entre 20 e 50% , respectivamente, depois de danos pela deficiência de oxigênio (PARK *et al.*, 1989).

Recentemente, culturas de alta densidade celulares têm atraído a atenção dos pesquisadores, por causa da possibilidade de elevar a produtividade e reduzir custos do reator na fermentação do ácido acético. Para conduzir culturas de alta densidade celular com sucesso, é necessário suprir uma grande quantidade de oxigênio dissolvido para oxidar o etanol. Entretanto, o etanol como substrato, é tão volátil que uma alta taxa de aeração é indesejável. É recomendado que o ar rico em oxigênio seja suprido com uma taxa de fluxo tão baixa quanto o possível. Os efeitos da concentração de oxigênio dissolvido em vários parâmetros da cultura, por exemplo, viabilidade celular, taxa de crescimento celular e taxa de produção de ácido acético não tem sido claramente mostrados quando o ar rico em oxigênio é usado. (PARK *et al.*, 1989).

PARK *et al.* (1989) realizaram um estudo cujo objetivo era exatamente examinar os efeitos de concentrações de oxigênio dissolvido, incluindo valores hiperbólicos na produção de ácido acético, e para obter o nível ótimo de concentração de oxigênio dissolvido para oxidação do etanol, viabilidade celular e taxa de crescimento específica. Os efeitos da concentração do produto e taxa de diluição na produção de ácido acético pela bactéria do ácido acético foram pesquisados em adição ao efeito do oxigênio dissolvido. Os efeitos inibitórios do ácido acético na viabilidade celular são discutidos quantitativamente usando alguns modelos.

O equipamento mais utilizado para a produção de vinagre em cultura submersa é conhecido como acetificador de Frings, patenteado por Heinrich Frings, a partir de pesquisas desenvolvidas por Otto Hromatka e Heinrich Ebner, em 1949, quando estes trabalhavam na referida empresa (SPINOSA, 1996).

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 alcoógrafo responsável pelo registro contínuo do teor alcoólico do meio e também pelo descarregamento automático do vinagre pronto. O produto final contém ainda cerca de 0,2% de álcool. 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 do vinagre feito anteriormente e deixado no tanque. A partir daí, a cada 24 horas, um volume de vinagre correspondente a 1/4 do volume total do tanque é retirado, obtendo-se aumento de acidez da ordem de 4% ao dia (AQUARONE & ZANCANARO, 1990).

O acetador destaca-se pela produtividade, superior aos demais processos adequando-se assim aos moldes industriais modernos. Este método tem também os seus inconvenientes tais como o alto custo de investimento inicial; necessidade de técnicos especializados para manutenção; e 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 tratamento por filtração para se obter limpidez adequada (ZANCANARO, 1988).

A expressão "fermentação acética submersa" demonstra a analogia dos procedimentos usuais da produção de antibióticos e cultivo de leveduras. Neste caso, as bactérias executam o trabalho fermentativo em um líquido, que é a solução alcoólica. Esta se realiza sem matéria de contato, como cavacos de madeiras e carvão, que são utilizadas nos processos como os geradores. As

bactérias sempre estão submersas no líquido a fermentar, onde se multiplicam e oxidam a mistura alcoólica em vinagre (FRINGS, 1996).

### **2.7 Variáveis estudadas para elaboração de um modelo cinético para produção de ácido acético:**

Na literatura, é descrito um grande número de modelos cinéticos para crescimento microbiano aplicável a muitos processos de fermentação. Estes analisam o efeito de vários parâmetros na taxa de crescimento específico da bactéria do ácido acético (PARK *et al.*, 1991a, ORY *et al.*, 1998) Alguns dos modelos são de características altamente gerais (exponencial, logístico etc.), enquanto outros são de aplicação mais particular. Em um número considerável de processos industriais, modelos de crescimento geral podem ser aplicados com precisão suficiente, mas por causa do comportamento particular da fermentação acética, esse processo requer um modelo muito especial (ROMERO *et al.*, 1994).

As características gerais dos processos da fermentação acética industrial são as seguintes: existe uma diversidade de sistema que pode ser descontínuo (método de Frings, Luxembourg, Orleans) ou contínuo (método Schutzenbach, torre ventilada ou coluna de bolhas). Cada sistema oferece muitos valores diferentes para os coeficientes de transferência de massa de oxigênio. Geralmente, meios naturais complexos que formam a base fermentativa, contendo etanol como principal fonte de carbono e energia. (Entre 50 e 120 gL<sup>-1</sup>) e inóculo bacteriano (Usualmente do gênero *Acetobacter*) são selecionados de acordo com suas propriedades de fermentação (ROMERO *et al.*, 1994).

O meio deve ser oxigenado continuamente, interrupções de mais de 30 segundos podem ser suficientes para inativar a maioria da população bacteriana. (SPINOSA 1996).

O pH também é importante para montar modelos devendo ficar entre 5 e 6,5, embora estudos mostrem que em pH entre 3 e 4 as bactérias também continuam produzindo ácido acético. No caso da espécie *Acetobacter aceti*, a

temperatura máxima de trabalho é entre 30 e 35°C. Entretanto as temperaturas são usualmente inferiores na indústria para evitar custos de aquecimento e limitar a perda de componentes voláteis pela evaporação durante a aeração. (ROMERO *et al.*, 1994).

A maioria dos ácidos orgânicos e inorgânicos pode ter um efeito inibitório no processo. Sabe-se geralmente que, neste tipo de fermentação, a concentração de oxigênio dissolvido é um fator decisivo na taxa total do processo. Entretanto, lidando com modelo cinético de fermentação acética, a presença de parâmetros relacionados a oxigênio são usualmente evitadas. Modelos que incluem essa variável não têm sido propostos, na forma quantitativa, usando equações cinéticas (ROMERO *et al.*, 1994).

## **2.8 Comparação entre os processos de fermentação para fabricação do vinagre**

Um grande número de processos de fermentação de vinagre tem sido descrito (ADAMS 1985). Entretanto é desejável que apenas três sejam geralmente usados. O método de cultura de superfície, o primeiro a ser desenvolvido, ainda é empregado para produzir o vinagre de melhor qualidade (CONNER E ALLGEIER 1976). Embora na literatura, encontre citações comerciais de produções de vinagre por método Orleans com capacidade de até cinco toneladas/dia (ADAMS, 1985), esse processo é usado normalmente para produção caseira, devido a sua lentidão (SPINOSA, 1996). Isso se deve primariamente a limitações no fornecimento de oxigênio. Fermentação de superfície contínua, que provoca acetificação rápida tem sido adotada comercialmente no Japão (YASUI *et al.*, 1973 citado por LOTONG *et al.*, 1989). O processo gerador, que emprega um reator de filme microbiano em cama fixa, produz vinagre com acidez tão alta quanto 120g/L. A produtividade deste método, baseada no material de enchimento, é usualmente 2 a 5 kg de ácido por m<sup>3</sup> de enchimento, a cada 24 horas (ADAMS, 1985).

O método submerso, embora seja o mais rápido e eficiente, tanto na produtividade como no rendimento, tem um grande inconveniente de requerer um controle eficiente no processo, principalmente na aeração e temperatura. Isso faz com que a aplicação do processo torne-se muito difícil, principalmente em unidades menores e nas regiões onde a dificuldade de obter boa fonte de energia (eletricidade) e mão-de-obra qualificada é mais marcante (SPINOSA, 1996).

Métodos para fermentação submersa promovendo taxas rápidas de acetificação têm sido desenvolvidos. Entre vários modelos, o acetador de Frings tem elevado sua popularidade (ALLGEIER & HILDERBRANDT, 1960; ADAMS, 1985).

Existem ainda outros processos para fabricação do vinagre, tais como o processo por gerador de mergulho, processo Mackin, processo Bourgenois, processo Fardon ou o de gerador por sifonagem. Entretanto, os três processos básicos comentados anteriormente dão a dimensão histórica da produção do vinagre. 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).

Recentemente, tem se dado atenção diversificada à aplicação do reator de disco de rotação, inicialmente desenhado para o tratamento de efluentes de esgoto; em escala experimental, o sistema tem sido aplicável para a produção de ácido cítrico por fungos de micélio fixado e para fermentação do etanol usando filmes fixados (ANTONIE 1975 citado por LOTONG *et al.*, 1989).

### **2.9 Inibição do crescimento de *Acetocacter aceti***

Na produção de vinagre o etanol é fornecido como o principal substrato, e o ácido acético é produzido como o principal produto metabólico. Sabe-se que tanto o etanol como o ácido acético inibem o crescimento de *Acetobacter spp.* A inibição do crescimento devido ao etanol mostra-se não afetada pela

concentração de etanol, se a concentração no fermentador for mantida entre 5 e 30 g/l , o que não é difícil de se conseguir na prática por um processo descontínuo alimentado convencionalmente. (ITO et al 1991)

Diferentes autores têm relatado as dificuldades experimentadas, quando cresce uma cultura de *Acetobacter aceti* em meios contendo mais de 15% de etanol (JOYEUX et al. 1984) e o efeito estimulante e a alta inibição prováveis de aparecer se existir baixa (menos que 10 g L<sup>-1</sup>) ou alta (mais que 30 g L<sup>-1</sup>) concentrações de ácido acético no meio, respectivamente (ORY et al., 1998).

O problema é a inibição do crescimento devido a acúmulo de ácido acético, que torna-se significativa quando a concentração de ácido acético é maior que 40g/l. Deve-se notar que a concentração de ácido acético admissível é mais que 80 g/L na prática (ITO et al., 1991).

O produto (ácido acético) também produz um efeito inibitório em concentrações acima de 20 gL<sup>-1</sup> , embora tenha uma ação estimulante em concentrações mais baixas. Assim, quando se usa um meio com uma certa concentração de ácido inicial, as taxas do processo obtidas são maiores do que aquelas quando o ácido é ausente (ROMERO et al., 1994).

Na produção de vinagre, um sistema eficiente de produção é desejável com menos inibição de crescimento pelo ácido acético. Um processo descontínuo alimentado repetidamente, em que a parte da cultura do caldo é usada como inóculo para a próxima fermentação, é as vezes empregada para alcançar alta produtividade. Entretanto, como tem sido apontado por PARK et al. (1991b), o número de células viáveis tende a diminuir abruptamente quando a concentração de ácido acético ultrapassa 60g/L. Isso significa que melhora na produtividade em fermentação descontínua alimentada repetida, não será esperada se a cultura de caldo for colhida quando a concentração de ácido acético ficar entre 80 e 90 g/L .Esse problema de inibição do crescimento pelo ácido acético foi resolvido usando reciclagem de células em um filtro de membranas (PARK et al., 1991b). Entretanto, embora essa operação seja de interesse para muitos, não é a melhor

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

solução do ponto de vista prático porque células mortas acumulam e o fluxo de filtração diminui gradualmente durante uma operação longa (ITO *et al.*, 1991).

### 2.10 Fermentação com reciclo de células

Bioreatores multiestágios como os reatores de tanques em séries e fermentadores de torre com estágios seccionalizados, tem sido usado como fator de aumento no crescimento de células microbianas e aumento da produtividade de metabólitos em processos de fermentação contínua. Recentemente, fermentações contínuas de dois estágios têm sido estudadas, para células recombinantes assim como para não recombinantes. Neste sistema de cultura, o primeiro estágio é usado principalmente como crescimento celular e o segundo como formação do produto, permitindo alta produtividade a ser mantida em comparação com aquelas do caso de cultura contínua de estágio simples. O uso de reciclagem celular no segundo estágio resulta em células e concentrações de produtos intracelulares mais altos do que aquelas sem reciclagem celular, bem como em produtividade mais alta. Como uma configuração de reator, aquele bioreator de células recicláveis de dois estágios no qual o segundo reator é conectado ao primeiro estágio na saída do primeiro filtro, foi empregado para produção de iniciantes concentrados com dois diferentes microorganismos. O desempenho em estado fixo de um fermentador de dois estágios de reciclagem com separadores celulares depois de cada estágio é estudado numericamente para produção contínua de ácido acético (NISHIWAKI *et al.*, 1997).

O crescimento aeróbico dos microorganismos no bioreator é muito importante. Convencionalmente, o suprimento de oxigênio em um bioreator tem sido desenvolvido para dispersar bolhas de ar na cultura do caldo com agitação mecânica. Entretanto, este procedimento necessita de grande quantidade, de energia (PARK *et al.*, 1990). Em um reator de fluxo superficial (TODA *et al.*, 1989) células bacterianas cresceram em uma superfície líquida diretamente com uso de oxigênio atmosférico. Embora não tenha sido feita agitação mecânica, a taxa de

transferência de oxigênio é comparável ao sistema de agitação – aeração, quando a altura do líquido é menor que 10 mm (PARK *et al.*, 1990). A técnica de cultura de superfície líquida de microrganismos tem sido usada para produção industrial de vinagre desde a idade média e ainda tem sido usada em fabricas modernas em uma operação descontínua. As desvantagens deste sistema de cultura são a necessidade de uma pilha larga vertical em estrutura multiestágio (PARK e TODA, 1992).

PARK e TODA, 1992 investigaram a aplicabilidade de um reator de biofilme multiestágio (MSBFR), no qual 10 de unidade de reatores horizontais foram instalados verticalmente, para produção contínua de ácido acético a altas concentrações por *Acetobacter aceti*.

Foi investigado o aumento da taxa de produção de ácido acético em uma cultura de alta densidade celular de *Acetobacter aceti* usando um reator de fluxo completamente misturado. As células no reator foram introduzidas a altas concentrações de ácido acético maior que 40g por litro por tempo de operação (PARK *et al.*, 1989). Foi difícil manter alta taxa de produção em cultura contínua a altas concentrações de ácido acético, mesmo com a densidade celular mantida pela filtração de membrana. Se a cultura de alta densidade celular for conduzida em processo descontínuo, o alcance da inibição do produto deve ser reduzido consideravelmente. Nesse trabalho, tentou-se aumentar a taxa de produção de ácido acético à altas concentrações, em uma cultura descontínua repetindo a cultura descontínua com células recicláveis. (PARK *et al.*, 1991a).

## **2.11 Rendimento e produtividade**

O rendimento e a produtividade variam de acordo de acordo com o método utilizado para a fabricação de vinagre.

### **2.11.1 Acetador de Frings**

No Acetador de Frings, o consumo de energia é de 400 waltts por litro de álcool. Se for utilizado o processo contínuo a concentração vai até 10g/100 ml de ácido acético e quando se usa método semicontínuo o ácido acético produzido é superior a 10g/100ml.

- A concentração inicial 7-10g ácido acético /100 ml e a concentração final 0,05- 0,3% etanol.
- O mosto utilizado para este fim tem 0 a 2 gramas de ácido acético em 100 ml e possui 12 a 15 % de álcool.
- O acetador comercial consome 75 a 1800 litros de etanol por dia, fluxo de ar é de 0,8 a 0,9 m<sup>3</sup> de suporte. A produtividade deste método é de 25 gramas de ácido acético/ m<sup>3</sup>/dia e o seu rendimento atinge 95 a 98 % . O teor alcoólico encontrado na fase final é de 0,1 a 0,3 % de álcool.

Processos microbianos em larga escala são conduzidos sob condições transitórias ou batelada (batelada descontínua ou batelada alimentada). O controle correto de biorreatores é um problema geral que pode ser resolvido pela aplicação de modelos matemáticos confiáveis.

É um fato que a modelagem até do mais simples processo microbiano revela problemas imediatos. Enquanto que a taxa de reação química sob condições de estado transitório e fixo usualmente possa ser tratada como função da concentração local e temperatura.

As razões para este comportamento são esquemas complexos de reação transitória com os próprios microorganismos. O fenômeno observado é geralmente referido como "inércia biológica" (HEKMAT e VORTMEYER, 1992).

#### 2.11.2 Gerador de Vinagre

Segundo HEKMAT e VORTMEYER (1992) a produtividade deste gerador de vinagre é de 2,0 a 5,0 litros de ácido acético/ m<sup>3</sup>/dia. O volume é de 20,40 e 60m<sup>3</sup>; reservatório de 14 m<sup>3</sup>.

O rendimento fica compreendido entre 85 e 95% e o tempo para a acetificação de 4 a 5 dias.

No final da operação é obtido 0,3% de álcool.

### 2.11.3 Método Orleans

Este é considerado o método com menor rendimento dos 3 citados, o rendimento é menor que 94% e a produtividade =  $\frac{1}{2}$  volume /mosto (HEKMAT e VORTMEYER, 1992).

## **2.12 Compostos secundários presentes no vinagre através dos compostos menores**

Além do ácido acético, outros compostos são formados na oxidação como diversos ésteres, outros ácidos (dependendo das frutas) acetoaldeídos, acetato de etila, e outros esterres além do material resultante da degradação de células bacterianas (aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos). Essas substâncias são, em parte, responsáveis pelo aroma e sabor do produto (VANGHN, 1954, SPINOSA, 1996).

A matéria prima utilizada para elaboração do vinagre é variável de acordo com sua disponibilidade em cada país. No Brasil, os vinagres são elaborados principalmente a partir de álcool de cana-de-açúcar e do vinho. O estudo da constituição química do vinagre é de fundamental importância, pois está relacionada com a qualidade, a tecnologia e a matéria-prima utilizada na sua elaboração (RIZZON e MIELE, 1998).

## **CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Matéria-prima**

Na presente pesquisa utilizou-se como matéria prima para obtenção do vinagre, solução alcóolica enriquecida com nutrientes, vinho de caju, proveniente do Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical- CNPAT/EMBRAPA-Fortaleza-CE e vinho de laranja proveniente do Centro Experimental de Ciências da Fundação Educacional do Município de Assis-FEMA-SP.

#### **3.1.2 Nutrientes**

Na solução alcóolica, foram agregados os seguintes nutrientes para conduzir a acetificação seguindo a recomendação de EBNER 1982 (Tabela 02).

**Tabela 02:** Composição de nutrientes adicionados à soluções alcólicas testadas (EBNER, 1982).

Componente	mg/L
Glicose	1000
KCl	600
MgSO <sub>4</sub>	600
CaCl <sub>2</sub>	600
Extrato de levedura	2000

Traços de minerais: Fe, Mn, Co, Cu, Mo, Va.

### 3.1.3 Microrganismos

Para a condução da oxidação acética utilizamos bactérias acéticas presentes no próprio ambiente. Tais bactérias são selecionadas espontaneamente, em função das condições de alta acidez do meio em que são mantidas.

### 3.1.4 Equipamentos

#### 3.1.4.1 Construção do gerador piloto

Foi construído um gerador de vinagre com corpo de vidro constituído de cilindro (diâmetro de 140mm X comprimento 2000mm) tendo o volume interno útil de cerca de 26 litros

Este cilindro foi sustentado por um disco de nylon contendo diversos orifícios ( $\varnothing \frac{1}{4}$ ) para percolação do líquido e aeração, sendo um deles um pouco maior para a retirada de alíquotas do produto final, e para a adição de mosto. Na parte inferior desse cilindro é adaptado um recipiente de vidro para recolher o percolado (capacidade aproximada de 6 litros).

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

Do recipiente inferior, o líquido percolado foi transferido para parte superior do cilindro do gerador através de uma bomba pulsadora Sodi Scientifica, Firenze-Itália, modelo PD/SM (capacidade variável de 1 a 6 litros/hora) e então distribuído através de um borrifador para espalhamento uniforme sobre a coluna de vidro preenchida com toletes de bambu (Figura 03).



**Figura 03:** Fermentador piloto.

#### **3.1.4.2 Demais equipamentos**

Balança analítica

Densímetro digital

Alcoómetro de Gay Lussac

Micro- destilador

Termômetro

Cromatógrafo gasoso HP VDC 5890 A

Coluna Carbowax 20M com as seguintes características: Fase HP-20M, composição : polietileno glicol, polaridade: polar, aplicação: ácidos livres, álcool, ester, óleo essencial, glicol e solventes., diâmetro : 0,2 mm, tamanho : 20 metros, partículas internas 0,2  $\mu$  m .

Seringa Hamilton 10  $\mu$  L

Bureta automática

Câmara fria

#### **3.1.4.3 Reagentes**

Biftalato de potássio

Hidróxido de sódio

Fenolftaleína

#### **3.1.4.4 Solventes**

Etanol PA

#### **3.1.4.4 Gás de arraste**

Hidrogênio

#### **3.1.5 Material suporte**

Cada coluna foi recheada por matéria de suporte onde as bactérias produtoras de ácido acético estavam aderidas. Neste caso toletes de bambu foram utilizados como suporte, após serem cortados em pedaços de aproximadamente 20 mm de comprimento e autoclavados para a retirada de pigmentos e compostos que poderiam interferir no aroma final do produto. Optamos por toletes de bambu cortado pois permite a sua reutilização após a limpeza.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1. Operação do gerador de vinagre**

Trabalhou-se com processo semi- contínuo, sendo as soluções de etanol adicionadas no início da operação no recipiente inferior do aparelho. A bomba pulsadora foi acionada para o processo de recirculação fazendo com que o etanol fosse acetificado pelas bactéria “residentes” no cilindro de gerador (coluna).

No momento que as bactérias transformavam a maior parte do etanol em ácido acético, retirava-se cerca de 1/3 do volume total, repondo em seguida, com o novo “mosto” (solução de etanol e nutrientes, vinho de caju ou laranja).

### **3.2.2 Acompanhamento do processo de fermentação acética**

Determinou-se o teor alcóolico no início e final de cada ciclo fermentativo, enquanto a acidez era acompanhada de acordo com a porcentagem de etanol que ainda estava presente no líquido a ser oxidado.

### **3.2.3 Cálculo da quantidade em % de álcool**

O cálculo da porcentagem de álcool do mosto (solução etanol + nutriente) foi determinado através do alcoómetro de Gay-Lussac. A amostra foi previamente destilada e, em seguida, procedida a leitura do grau alcóolico a 15° C, segundo recomendado por MORETTO (1988). Com o auxílio de tabelas apropriadas, o grau alcóolico foi convertido em grau alcóolico a 20°C ( ZAGO et al., 1996).

A porcentagem de álcool no vinho de frutas também foi determinado através do densímetro digital na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ).

### 3.2.4 Determinação do álcool residual presente no vinagre de laranja e caju

O álcool residual foi quantificado por cromatografia gasosa. Primeiramente foram feitas as diluições de etanol e injetadas em volume de 1  $\mu$  L, de modo que diferentes picos foram observados no cromatograma, permitindo construir a curva de calibração construída.

Utilizou-se a seguinte programação de temperatura: 50<sup>o</sup> C (5 minutos) - 200<sup>o</sup> C, 3<sup>o</sup> C / min.

### 3.2.5 Determinação da acidez total

Em erlenmeyer de 100 ml, foram colocados 1 ml do meio a ser analisado e 3 gotas de solução de fenolftaleína a 1%. Titulou-se com solução de hidróxido de sódio a 0,1 N até a viragem para vermelho. Após a titulação foi feito o seguinte cálculo:

$$\text{g de ácido acético/100 mL} = \frac{\text{mL de NaOH} \times \text{N} \times 60 \times 100}{\text{mL de amostra} \times 1000}$$

### 3.2.6 Cálculo do rendimento do ácido acético

O rendimento em ácido acético foi calculado em função do álcool inicial e da acidez produzida, como se segue:

$$[S] = V_s \times \text{Concentração}$$

$$[P] = V_p \times \text{Concentração}$$

$$Y = P/S = [P]/[S]$$

Sendo que:

$$[S] = \text{Quantidade de álcool adicionado}$$

$$[P] = \text{Quantidade de ácido acético formado}$$

$$Y = \text{Rendimento}$$

### 3.2.7 Cálculo da produtividade do ácido acético

O cálculo da produtividade de ácido acético foi calculada como:

$$V_r \times A_c = W$$

$$P = W / V_i \times d$$

Sendo que:

$V_r$  = Volume retirado

$A_c$  = acidez obtida

$P$  = produtividade

$d$  = tempo/24

$V_i$  = Valor interno útil

## CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Construção do gerador de vinagre

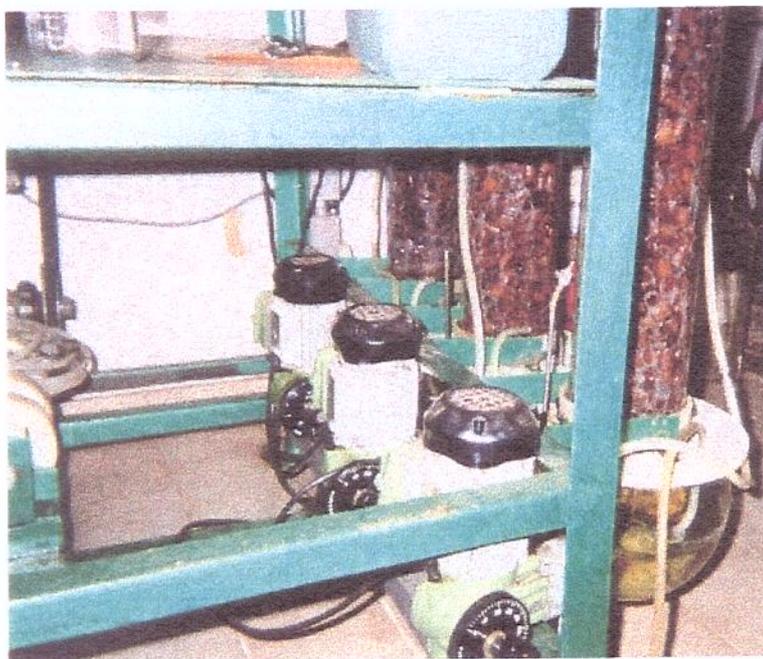
Optou-se pela construção de três geradores idênticos para permitir a comparação simultânea de diferentes dados, como; tipo de matéria prima utilizada, variações que possam ocorrer entre os diferentes geradores, alterações nos níveis de acidez, variações climáticas, dentre outros.

Observa-se na Figura 04 como o vinagre é retirado após atingir a acidez desejada.



**Figura. 04:** Fase de coleta do vinagre obtido.

Do recipiente de vidro que o percolado foi transferido para a parte superior do cilindro do gerador, através de uma bomba pulsadora (Figura 05) e é então distribuído através de um borrifador para espalhamento uniforme sobre a coluna de vidro preenchida por bambu.



**Figura 05:** Visão lateral dos geradores de vinagre, destacando principalmente as bombas pulsadoras.

A produção de vinagre nestes geradores utiliza o processo semi – contínuo ou seja, a solução a ser acetificada (solução de etanol enriquecida com nutrientes ou vinho de fruta), foi adicionada no início da operação, no recipiente inferior do aparelho. A bomba pulsadora foi acionada para a recirculação da solução fazendo com que o mosto seja acetificado pelas bactérias “residentes” na coluna (Figura 06).



**Figura. 06:** Parte superior das colunas dos geradores.

A coluna foi recheada por material de suporte onde as bactérias acéticas estavam aderidas. Neste caso toletes de bambu foram utilizados como suporte, após serem cortados em pedaços de aproximadamente 20 mm de comprimento. Estes toletes permitem um bom contato das bactérias acéticas com o líquido na presença de oxigênio do ar. O suporte permite também que as bactérias se mantenham vivas na presença de ácido ou solução de etanol nas condições normais de operação.

A Figura 07 mostra o material de suporte utilizado.



**Figura 07:** Colunas com material de preenchimento

A construção deste gerador apresentou um custo relativamente baixo se comparado com o método submerso, além de ser de fácil manuseio. Esperamos que este seja mais adequado para ser utilizado em regiões com poucos recursos técnico e infra-estrutura industrial incompleta, condições estas encontradas em muitas cidades brasileira, principalmente aquelas situadas fora dos grandes centros industriais.

#### **4.2 - Operação do gerador de vinagre**

Para iniciar a operação do gerador foi feita a “colonização” da coluna com bactérias acéticas utilizando uma solução de vinagre de boa qualidade com 7-8 % de ácido acético. Essa solução (5 litros) foi inserida no depósito inferior e a bomba pulsadora acionada para permitir a embebição dos toletes de bambu da coluna.

Após 2 dias o volume de vinagre circulante ficou reduzido devido à absorção do mesmo pelo bambu, restando cerca de 3 litros no depósito. A estes foram adicionados dois litros de solução alcoólica 10 % acrescida de nutrientes, totalizando um volume de 5 litros. O aumento da acidez total foi acompanhado por titulação com NaOH 0,1 N. Observou-se que após a transformação da maior parte de etanol em ácido acético pelas bactérias da coluna, a acidez diminuía gradativamente. Indicando a atividade de bactérias superoxidativas. Quando isso ocorria retirava-se novamente parte do líquido, repetindo o processo anterior.

Foram acompanhados ciclos fermentativos com diferentes soluções alcoólicas, para observar qual delas permitia obter melhor rendimento e produtividade (teor alcóolico 10%, 12% e 14%) Logo após estes testes utilizamos vinho de caju e laranja para observar se o gerador também tinha capacidade de operar com tais líquidos.

A quantidade seguida por EBNER (1982) foi duplicada. Observou-se a melhora sensível no desempenho do gerador. Quando se usou vinho de frutas não foram utilizados nutrientes.

### **4.3 Formação de ácido no gerador**

A estabilização do gerador foi obtida adicionando a cada ciclo 2 litros contendo 10% de solução alcóolica enriquecida com nutrientes. A formação do ácido nos ciclos fermentativos foi acompanhado por titulação, verificando-se que no início da operação do gerador a acidez caia rapidamente devido a absorção do líquido pelos toletes de bambu. Após alguns dias observou-se que o gerador estava estabilizado e, portando, pronto para fornecer dados para cálculo do rendimento e produtividade, nesse instante foram adicionados 2 litros de mosto contendo 10% (v/v) de etanol e iniciou-se a coleta de dados.

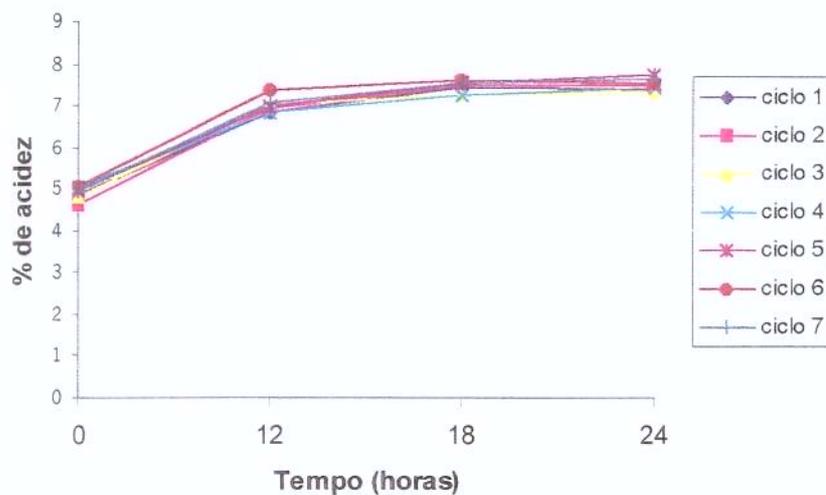
Determinou-se o teor alcoólico no início de cada ciclo fermentativo utilizando o *alcoómetro de Gay Lussac* para verificação do teor alcóolico.

### **4.4 Aumento da acidez no gerador durante o ciclo fermentativo**

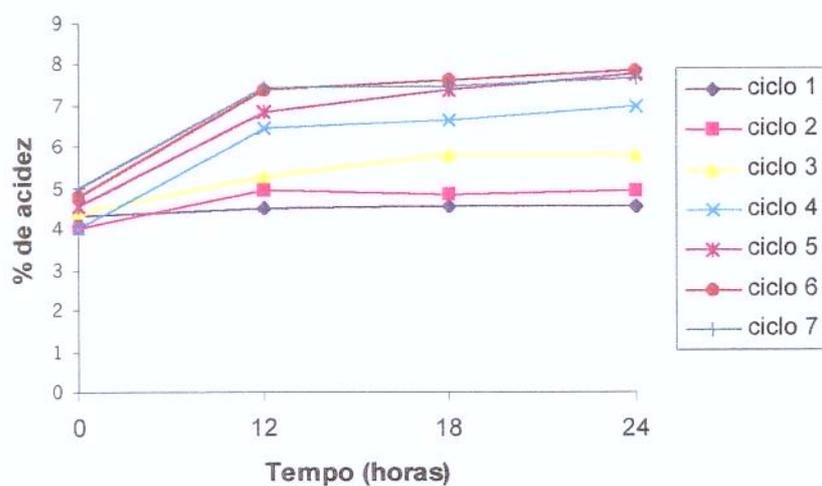
#### **4.4.1 Operação com mosto contendo 10% de álcool.**

Iniciou-se esta etapa adicionando-se 2 litros de mosto contendo 10% de etanol a cada troca. Como no depósito inferior deixava-se 3 litros de vinagre, completando-se o volume a 5 litros. A relação da troca foi de 2/5 nesse primeiro estudo.

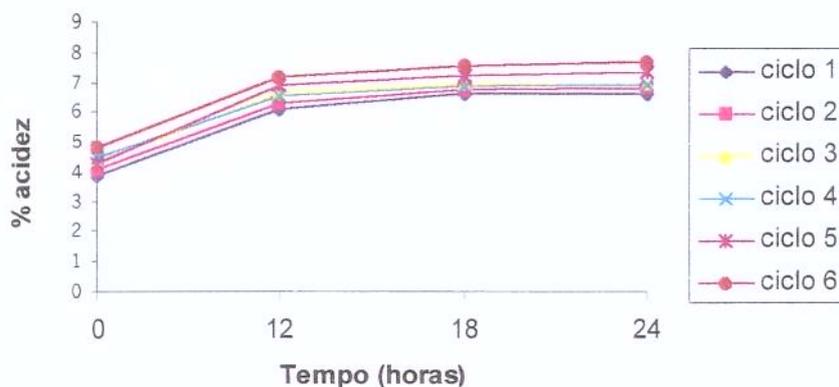
Essa técnica foi aplicada nos três geradores, e o comportamento do aumento da acidez em cada um dos casos está apresentado nas Figuras 08, 09 e 10.



**Figura 08:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 10% de etanol.



**Figura 09:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 10% de etanol.

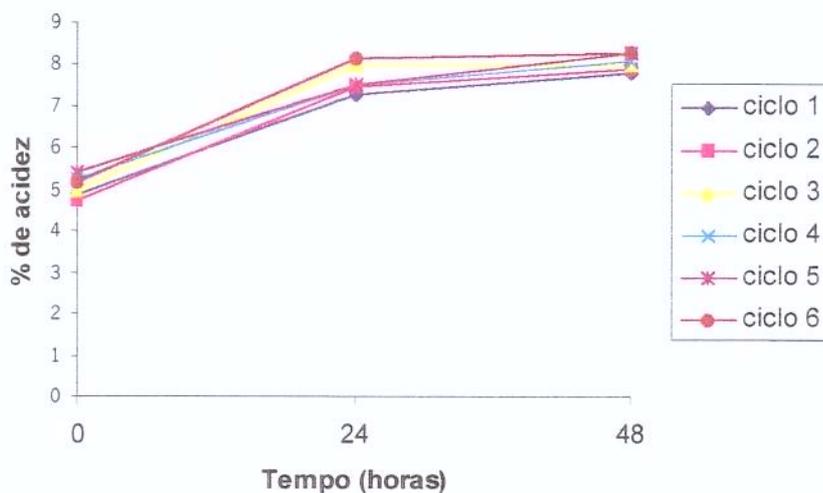


**Figura 10:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 10% de etanol.

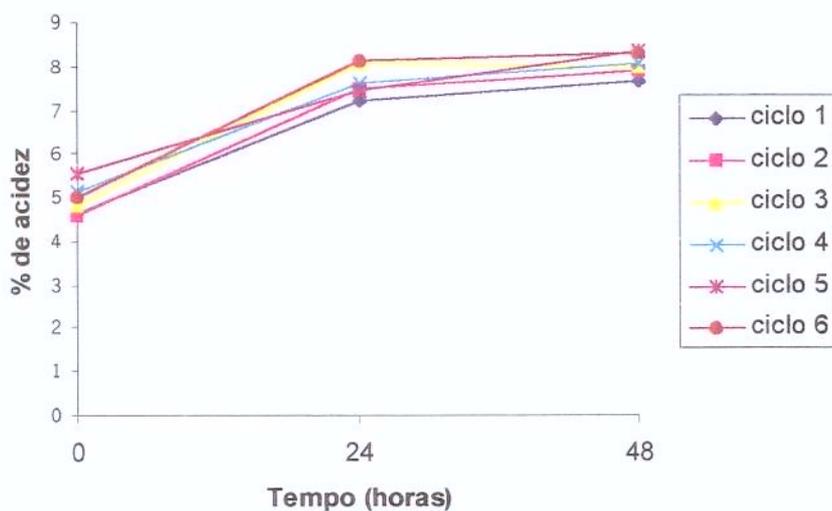
Foi observado que, nos primeiros ciclos (ciclo para este caso é feito sobre sistema de corte, parte do vinagre é retirado e colocado um novo mosto), o aumento da acidez produzida foi menor durante a fermentação, principalmente no gerador dois, o que pode ser explicado pela falta de bactérias adaptadas nos geradores no início da operação. No sexto e sétimo ciclos (Figuras 08, 09, e 10) todos os três geradores apresentavam curvas de acetificação similares iniciando com 4,5 % e terminando com 7,5% após 18 horas de incubação.

#### **4.4.2 Operação com mosto contendo 12% de álcool**

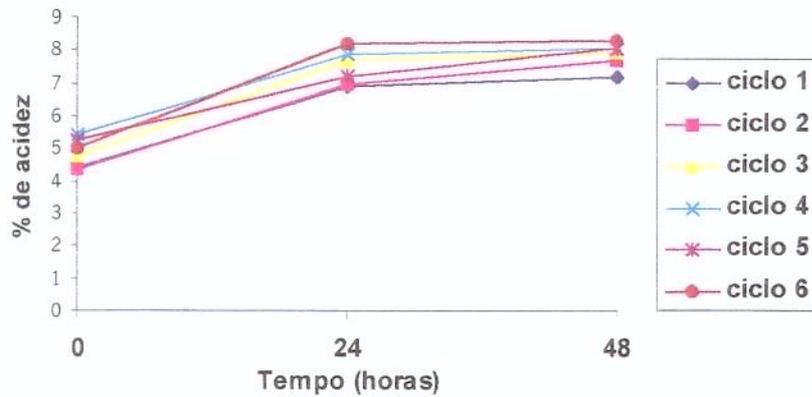
Neste ensaio, como no caso anterior, um volume de 2 litros contendo 12% (v/v) de álcool foi adicionado na parte inferior do gerador e a acidez foi acompanhada e o tempo de acetificação obtido, como podemos observar nas Figuras 11, 12 e 13. Como era de se esperar, o tempo de acetificação do mosto que continha 12% de etanol foi mais intensa que o de 10%.



**Figura 11:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 12% de etanol.



**Figura 12:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 12% de etanol.



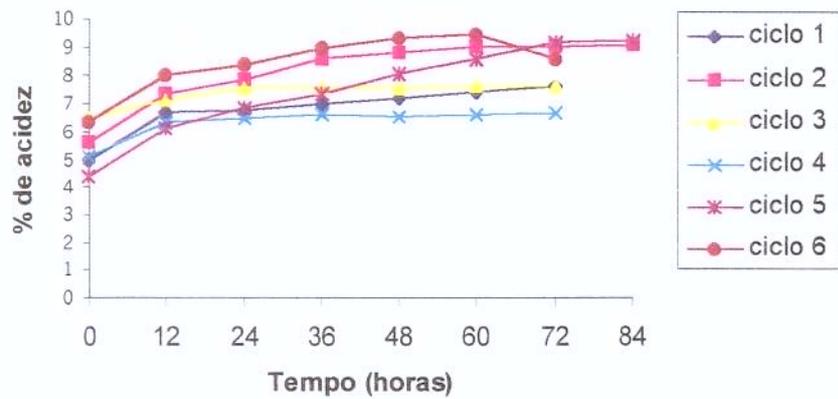
**Figura 13:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 12% de etanol.

Novamente, como mostra a Figura 11, 12 e 13 em todos os geradores houve um período de adaptação nos primeiros ciclos (trocas iniciais de mosto), onde a acidez atingida foi menor que os ciclos subseqüentes. Após o quinto e sexto ciclo, o teor máximo de acidez mostrou-se estabilizado.

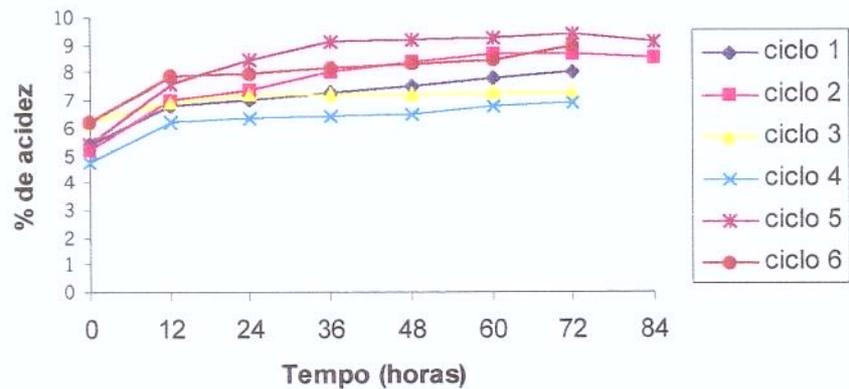
Os valores de acidez inicial e final foram respectivamente de 5,5% e 8,3% e o tempo para completar a acetificação foram de 36 horas

#### **4.4.3 Gerador com mosto contendo 14% de álcool**

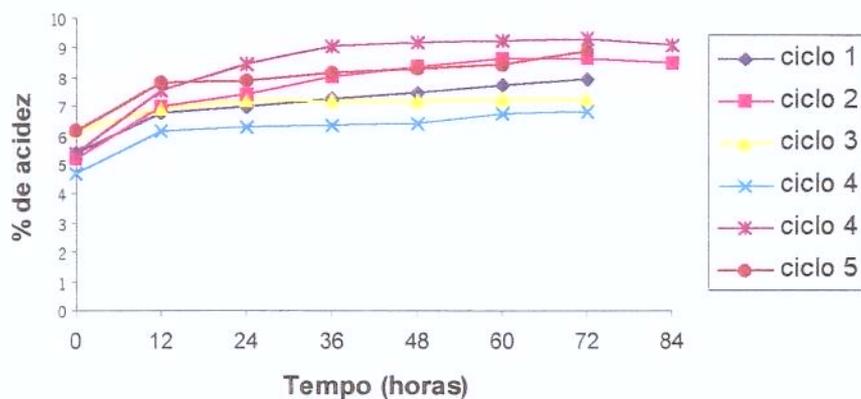
Os resultados destes ensaios estão apresentados nas Figuras 14, 15,16 Após a fase de adaptação nos primeiros quatro ciclos, a curva de acetificação o processo se estabilizou tendo como acidez inicial 6% e final de 9,3% em 60 horas de fermentação.



**Figura 14** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 14% de etanol



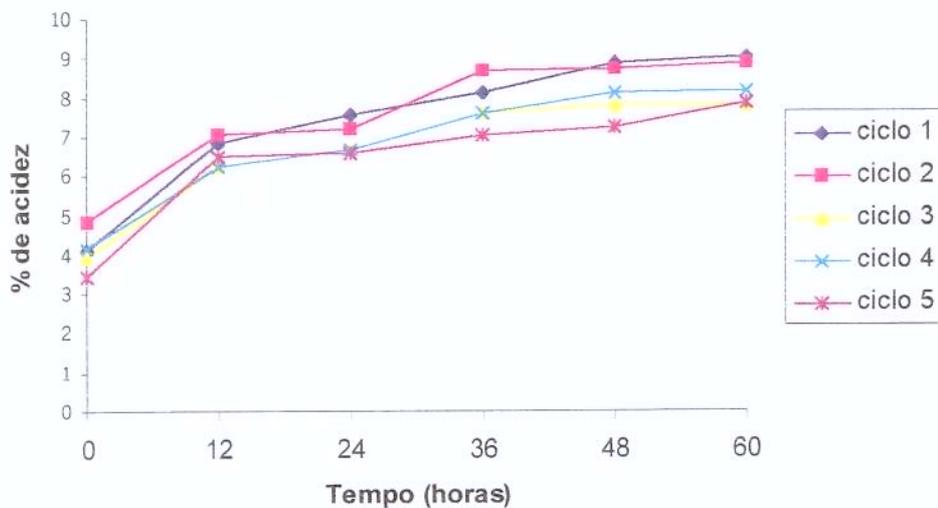
**Figura 15:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 14% de etanol.



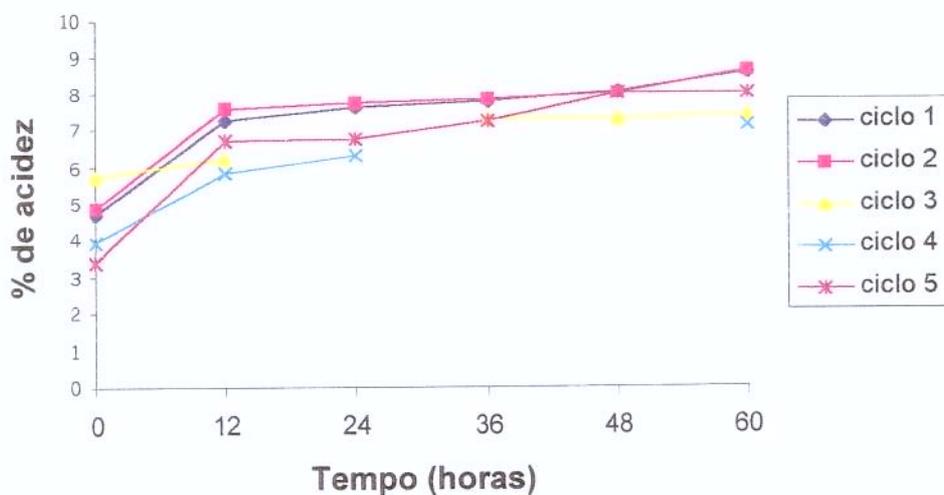
**Figura 16:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3, adicionando no início da operação 2 litros de mosto, com 14% de etanol.

#### **4.5 Variação do volume do mosto adicionado**

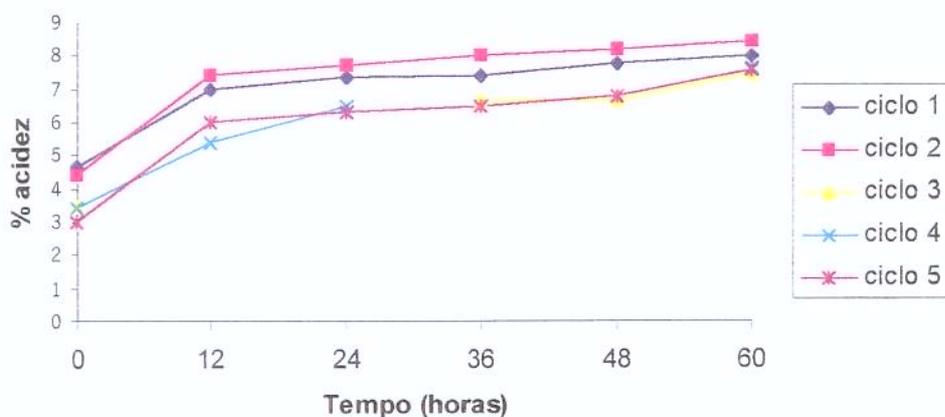
Neste estudo foi utilizado o mosto fixando a concentração de etanol a 10 % (v/v), variando a quantidade de mosto adicionada em cada ciclo, em 3 litros e 1 litro. Os resultados com troca de 3 litros estão apresentados nas Figuras 17, 18, 19. Isso corresponde a substituição de 3/5 de volume do líquido do depósito.



**Figura 17:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no início da operação 3 litros de mosto, com 10% de etanol



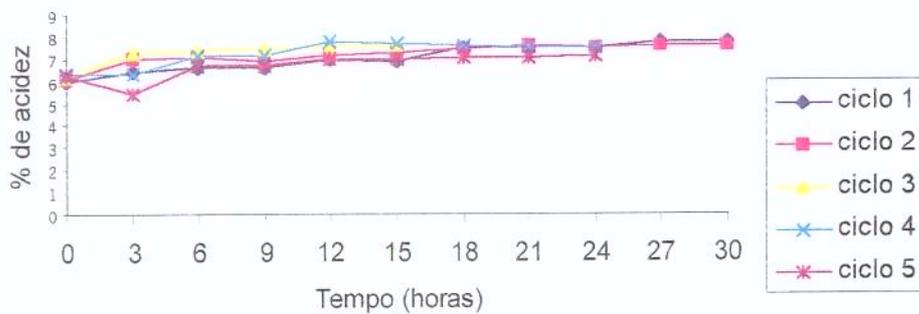
**Figura 18:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no início da operação 3 litros de mosto, com 10% de etanol.



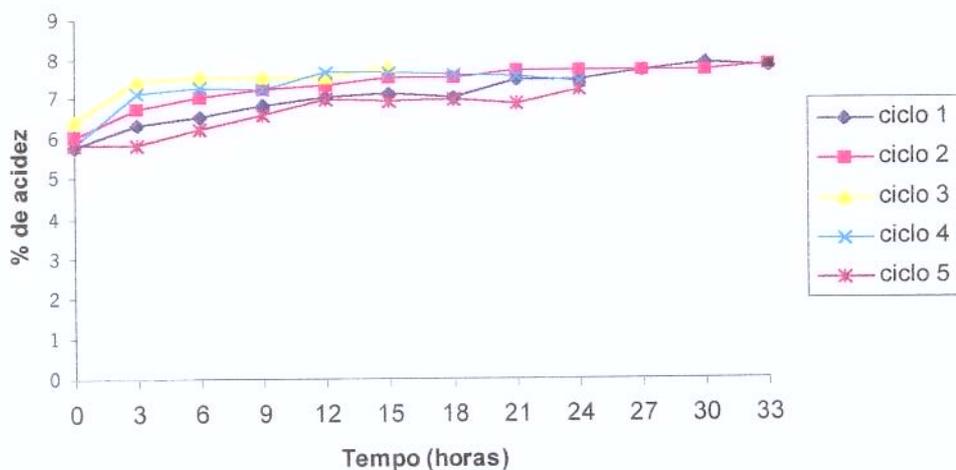
**Figura 19:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3 adicionando no início da operação 3 litros de mosto, com 10% de etanol.

Após 5 ciclos o processo se estabilizou em valores iniciais de acidez em 3,5% e finais de 7,8%. O ciclo se completava em 60 horas.

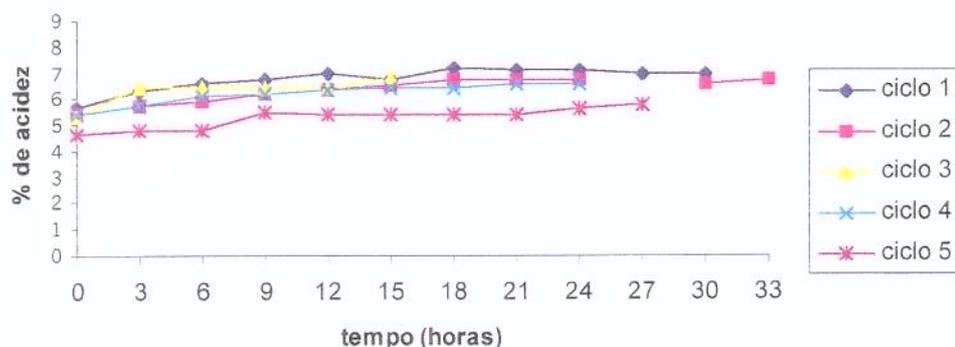
Os resultados com troca de 1 litro estão representados nas Figuras 20; 21 e 22. Isso corresponde a substituição 1\5 de volume do líquido do depósito. Como era de se esperar, o tempo para estabilização foi menor que o tempo utilizado no ensaio anterior, sendo necessárias 30 horas para que ocorresse a estabilização, pois a quantidade de etanol a ser oxidado era bem menor.



**Figura 20:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 1, adicionando no início da operação 1 litro de mosto, com 10% de etanol.



**Figura 21:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 2, adicionando no início da operação 1 litro de mosto, com 10% de etanol inicial.



**Figura 22:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador 3, adicionando no início da operação 1 litro de mosto, com 10% de etanol inicial.

Os testes nos mostram que entre os volumes de mosto adicionado de 1 e 3 litros os valores de rendimento foram equivalentes (0,88g/g). Entretanto, a produtividade foi visivelmente melhor quando o volume adicionado foi de 3 litros (0,26g/g.h e 3,54g/g.h).

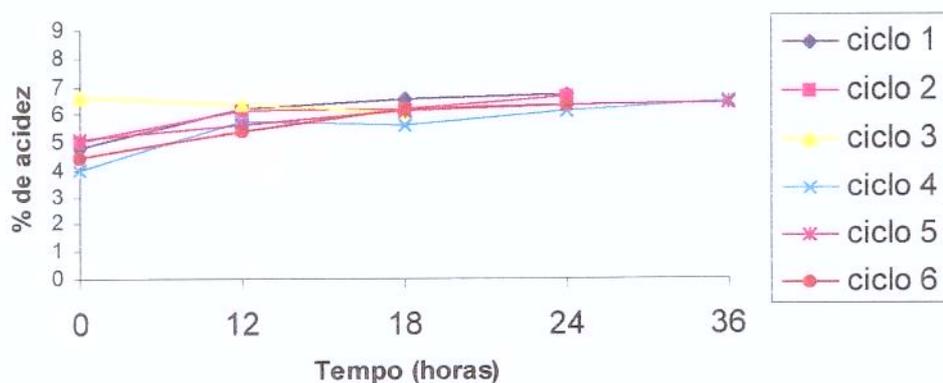
#### **4.6 Operação do gerador com vinho de frutas**

Neste estudo, 2 litros de vinho de frutas foram adicionados na parte inferior do gerador como era feito com as soluções alcólicas. Após a substituição da solução alcólica que estava nos geradores por vinho de fruta (caju e laranja), observou-se que houve uma certa dificuldade inicial das bactérias se adaptarem ao novo mosto. Logo depois de algumas semanas observamos que ocorreu um aumento satisfatório na acidez nestes geradores a cada ciclo. Neste estudo foi utilizado apenas um gerador para cada vinho de fruta, usando um deles (controle) com solução alcólica enriquecida.

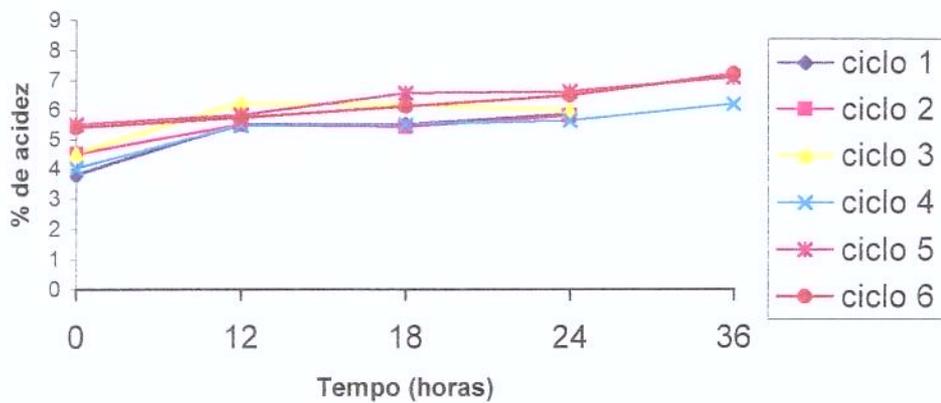
Na fermentação destes vinhos, não foi feito nenhum enriquecimento, pois se supõe que os nutrientes necessários para que ocorra produção de ácido acético já estejam presentes em quantidade adequada.

Os teores alcóolicos dos vinhos foram vinho de caju 8% (v/v) de etanol e vinho de laranja 12% (v/v).

Os resultados da acidez encontrada nestes vinhos estão presentes nas Figuras 23 e 24. Como se pode observar, foram necessários alguns ciclos para estabilização no novo meio.



**Figura 23:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador adicionado no início da operação 2 litros de vinho de caju



**Figura 24:** Porcentagem de acidez presente no vinagre do gerador adicionado no início da operação 2 litros de vinho de laranja.

#### **4.7 Rendimento e produtividade do gerador**

Com os resultados dos geradores estabilizados, foram calculados a produtividade e rendimento da fermentação. Esses valores poderiam ser calculados baseando-se nas concentrações de álcool e acidez inicial e final de cada ciclo. Entretanto, essa técnica poderia induzir a um erro considerável, devido a permanência de volume apreciável do líquido (mosto ou vinagre) retido na coluna do gerador, durante o processo fermentativo, que é difícil de ser determinado. A estimativa nos mostra que cerca de 2 a 3 litros do líquido é retido nos toletes de bambu.

Assim, optamos por determinar parâmetros de rendimento baseando-se na quantidade de álcool (expressa em etanol), adicionado no mosto e na quantidade de ácido (expresso em ácido acético) retirado como vinagre no final do ciclo. A produtividade aparente foi calculada, considerando o tempo necessário para atingir essa conversão e o volume aparente do gerador calculado em 26 litros. Os resultados destas análises estão apresentados nas Tabelas 03, 04 e 05.

**Tabela 03:** Fermentação acética dos três geradores que receberam 2 litros de mosto com 10% de etanol.

Gerador	Tempo de ciclo (h)	Acidez Final	Volume Obtido (mL)	Rendimento (g/g)	Rendimento (mol/mol)	Produtividade Aparente (g/gerador/h)	Produtividade Aparente (g/L/h)
1	18	7,7	1810	0,87	0,66	7,74	0,30
2	18	7,5	2000	0,93	0,71	7,49	0,29
3	18	7,7	1700	0,96	0,74	7,27	0,28
Media	-	7,63	1837	0,92	0,71	7,50	0,29
Desvio Padrão	-	0,11	151,77	0,046	0,043	0,23	0,01

**Teor de álcool no vinho = 10% GL (8,04% INPI)**

**Volume adicionado = 2 litros/ciclo**

**Volume do gerador = 26 litros (d/l.h.)**

**Tabela 04:** Fermentação acética dos três geradores que receberam 2 litros de mosto com 12% de etanol

Gerador	Tempo de ciclo (h)	Acidez Final	Volume Obtido (mL)	Rendimento (g/g)	Rendimento (mol/mol)	Produtividade Aparente (g/gerador/h)	Produtividade Aparente (g/L/h)
1	36	8,5	1810	0,76	0,57	4,26	0,16
2	36	8,4	1900	0,82	0,63	4,52	0,17
3	36	8,0	1800	0,75	0,57	3,99	0,15
Media	-	8,3	1837	0,77	0,59	4,26	0,16
Desvio Padrão	-	0,26	55,07	0,04	0,04	0,26	0,01

**Teor de álcool no vinho = 12% GL (9,67% INPI)**

**Volume adicionado = 2 litros/ciclo**

**Volume do gerador = 26 litros (d/l.h.)**

**Tabela 05:** Fermentação acética dos três geradores que receberam 2 litros de mosto com 14% de etanol.

Gerador	Tempo de ciclo (h)	Acidez Final	Volume Obtido (mL)	Rendimento (g/g)	Rendimento (mol/mol)	Produtividade Aparente (g/gerador/h)	Produtividade Aparente (g/L/h)
1	96	9,37	1300	0,54	0,41	1,27	0,05
2	108	9,40	1590	0,66	0,51	1,38	0,05
3	72	9,28	1300	0,53	0,97	1,67	0,06
Media	92	9,35	1397	0,58	0,63	1,44	0,05
Desvio Padrão	18,33	0,06	167,43	0,072	0,30	0,20	0,01

**Teor de álcool no vinho = 14% GL (11,31% INPI)**

**Volume adicionado = 2 litros/ciclo**

**Volume do gerador = 26 litros (d/l.h.)**

Os dados dos rendimentos foram, 0,85, 0,77 e 0,58 (g/g) para teor alcóolico no mosto de 10%,12% e 14% de álcool no mosto, respectivamente, mostrando que a fermentação foi mais eficiente em concentrações mais baixas. A produtividade foi de 7,5 4,2 e 1,4 gramas de ácido produzidas por gerador hora, para mosto com 10%, 12% e 14% de álcool respectivamente, mostrando redução marcante com o aumento de concentração alcóolica no mosto. A melhor produtividade conseguida de 0,29 g/l.h quando se usa mosto 10% (v/v) de álcool é ligeiramente superior aquele obtido por gerador de Frings (0,2 g/ l.h) (EBNER 1982).

O rendimento de 0,88 (g/g) obtido no ensaio com reposição de 3 litros foi ligeiramente superior aquele com reposição de 2 litros (Tabela 06), mas a

produtividade de 3,5g/gerador/hora foi menos da metade do valor obtido no primeiro caso.

**Tabela 06:** Fermentação acética dos três geradores que receberam 3 litros de mosto com 10% de etanol

Gerador	Tempo de ciclo (hs)	Acidez Final	Volume Obtido (mL)	Rendimento (g/g)	Rendimento (mol/mol)	Produtividade Aparente (g/gerador/h)	Produtividade Aparente (g/l/h)
1	60	7,85	2940	0,96	0,73	3,85	0,15
2	60	8.0	2810	0,93	0,71	3,74	0,14
3	60	7,56	2400	0,75	0,57	3,02	0,12
Media	-	7,80	2716,7	0,88	0,67	3,54	0,14
Desvio Padrão	-	0,22	281,84	0,11	0,08	0,45	0,02

**Teor de álcool no vinho = 10% GL (8,04% INPI)**

**Volume adicionado = 3 litros/ciclo**

**Volume do gerador = 26 litros (d/l.h.)**

A análise dos dados obtidos pela reposição de 1 litro do mosto quanto a rentabilidade e produtividade nos mostra os seguintes valores médios: 88,5% e 0,26g/gerador/l. Isso nos leva a concluir que essa técnica é menos satisfatória (Tabela 07) que a substituição de 2 litros/ciclo quanto a produtividade.

Comparando os três volume de substituição (1,2 e3 litros por ciclo) observa-se que o rendimento é pouco afetado por variação nesse item de fermentação, mantendo-se entre 85 e 88% (p/p), comparável aos dados obtidos por outros pesquisadores (EBNER, 1982).

A produtividade é bastante afetada, sendo que o melhor resultado é conseguido com (2/5) de reposição do líquido no depósito a cada ciclo. A técnica recomendada por Ebner (1982) de substituição total do depósito por novo vinho não parece ser mais adequada para a condição do gerador.

**Tabela 07:** Fermentação acética dos três geradores que receberam 1 litro de mosto com 10% de etanol inicial

Gerador	Tempo de ciclo (h)	Acidez Final	Volume Obtido (mL)	Rendimento (g/g)	Rendimento (mol/mol)	Produtividade Aparente (g/gerador/h)	Produtividade Aparente (g/L/h)
1	24	7,70	920	0,88	0,67	0,25	0,01
2	24	7,66	960	0,91	0,73	0,30	0,01
3	24	6,60	860	0,86	0,66	0,24	0,01
Media	-	7,32	913	0,88	0,69	0,26	0,01
Desvio Padrão	-	0,51	41,09	0,02	0,03	0,03	0,001

**Teor de álcool no vinho = 10% GL (8,04% INPI)**

**Volume adicionado = 1 litros/ciclo**

**Volume do gerador = 26 litros (d/l.h.)**

**Tabela 08:** Fermentação acética de um geradores que recebeu 2 litros de vinho de caju com 8% de etanol inicial

Ciclos	Tempo de ciclo (h)	Acidez Final	Volume Obtido (mL)	Rendimento (g/g)	Rendimento (mol/mol)	Produtividade Aparente (g/gerador/h)	Produtividade Aparente (g/L/h)
4	36	6,45	1450	0,73	0,56	2,59	0,10
5	27	6,40	1600	0,79	0,61	3,79	0,15
6	24	6,30	1350	0,66	0,51	3,54	0,14
7	24	6,20	1450	0,70	0,54	2,49	0,10
Média	27,75	6,34	1456	0,72	0,55	3,10	0,12
Desvio Padrão	5,68	0,11	103,08	0,05	0,04	0,66	0,03

**Teor de álcool no vinho de caju = 8% GL (6,42% INPI)**  
**Volume adicionado = 2 litros/ciclo**  
**Volume do gerador = 26 litros (d/l.h.)**

**Tabela 09:** Fermentação acética de um geradores que recebeu 2 litros de vinho de laranja com 12% de etanol inicial

Ciclos	Tempo de ciclo (h)	Acidez Final	Volume Obtido (mL)	Rendimento (g/g)	Rendimento (mol/mol)	Produtividade Aparente (g/gerador/h)	Produtividade Aparente (g/L/h)
4	36	6,77	1600	0,56	0,43	3,02	0,12
5	36	7,20	1350	0,50	0,38	2,69	0,10
6	32	7,10	1300	0,48	0,37	2,89	0,11
7	30	7,33	1300	0,49	0,38	3,18	0,12
Média	33,5	7,1	1389	0,51	0,39	2,94	0,11
Desvio Padrão	3	0,24	143,61	0,04	0,03	0,21	0,01

**Teor de álcool no vinho de laranja = 12% GL (9,67% INPI)**  
**Volume adicionado = 2 litros/ciclo**  
**Volume do gerador = 26 litros (d/l.h.)**

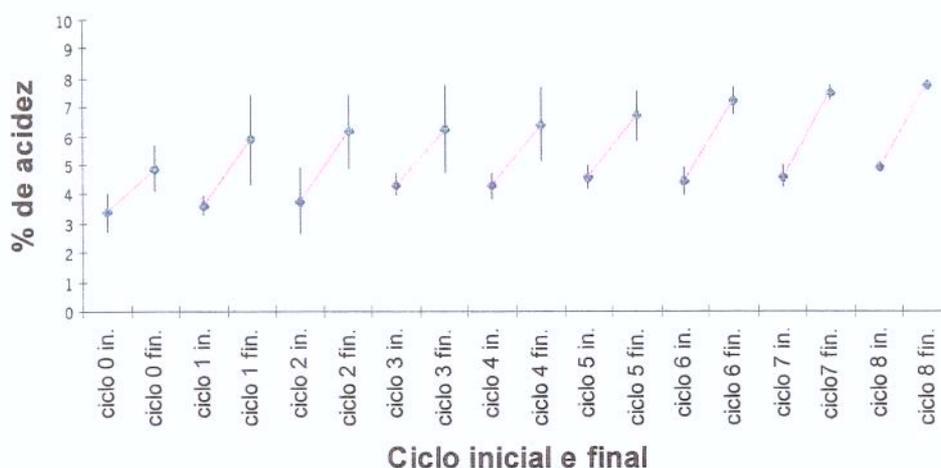
Como apenas um gerador foi operado para cada amostra de vinho, a média e desvio padrão foi calculado em relação aos quatro últimos ciclos, pode ser observado que o gerador operado com vinho de caju obteve melhor resultado que o operado com vinho de laranja.

O rendimento (g/g) obtido nestes ensaios com os vinhos de caju e laranja foram de 0,72 e 0,51g/g respectivamente.

O momento da transição entre troca de mosto também foi analisado. A acidez inicial e final dos ciclos foi observada, calculou-se a media da acidez nos três geradores.

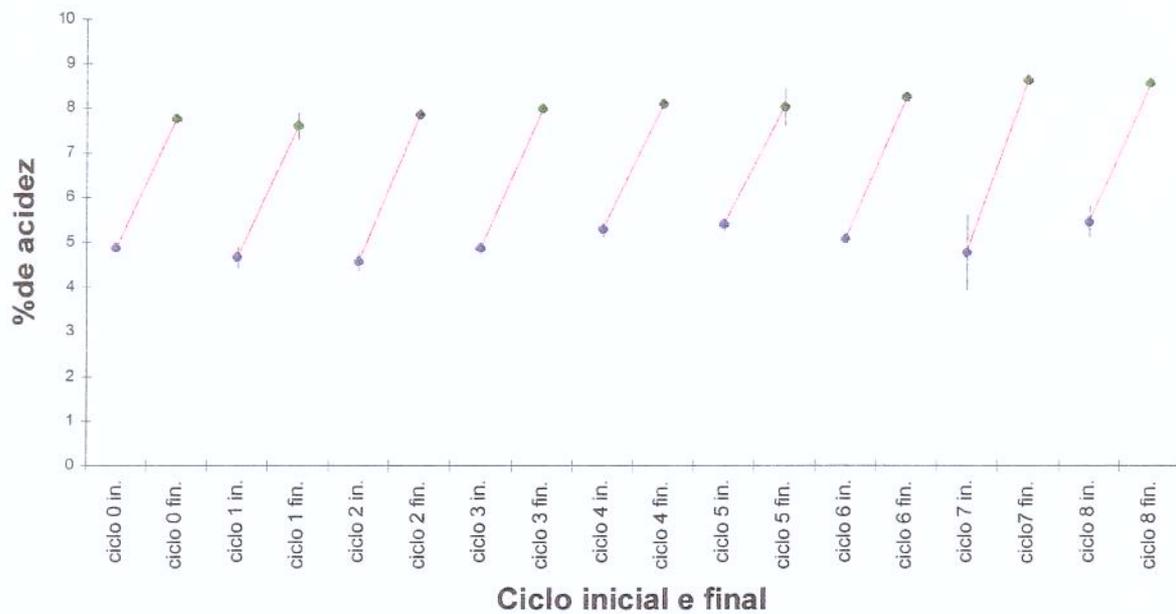
#### 4.8 Acidez inicial e final de cada ciclo com soluções alcoólicas.

O ciclo zero inicial e zero final estão relacionados à acidez encontrada no ciclo que antecede a coleta de dados de cada uma das tabelas.

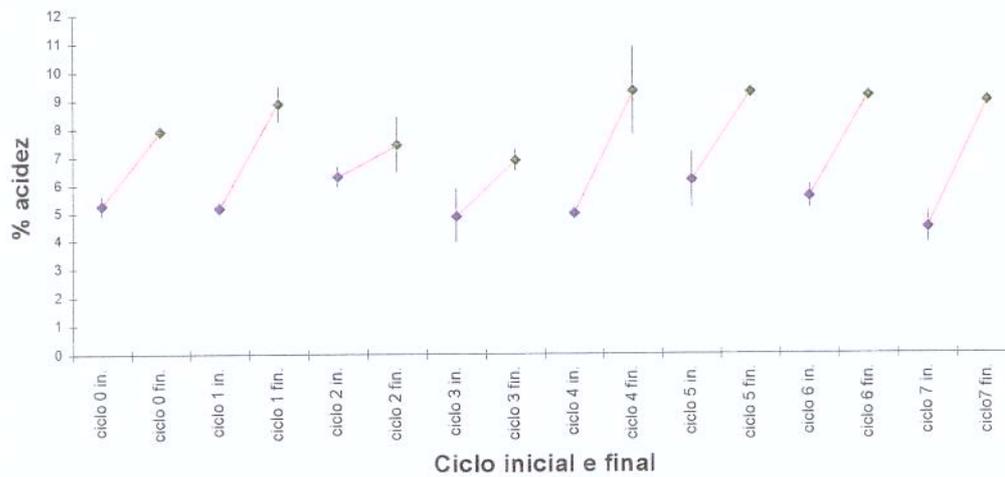


**Figura 25:** Acidez inicial e final dos três geradores contendo 10% de etanol e trocando 2 litros de mosto.

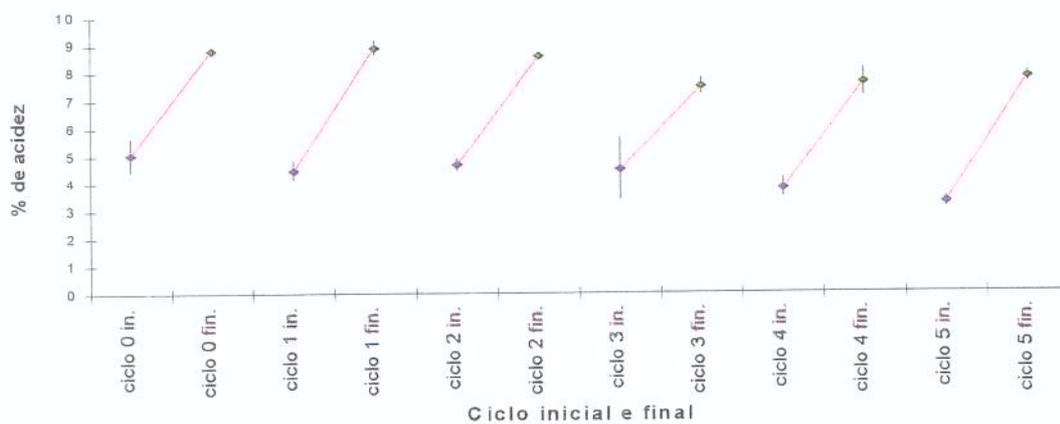
Os ciclos: mosto contendo concentração alcóolica de 10% (2 litros), mosto 12% (2 litros), mosto 14% (2 litros), mosto 10% (3 litros) são antecessores respectivamente como podemos observar nas Figura (25, 26, 27, 28)



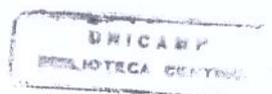
**Figura 26:** Acidez inicial e final dos três geradores contendo 12% de etanol e trocando 2 litros de mosto



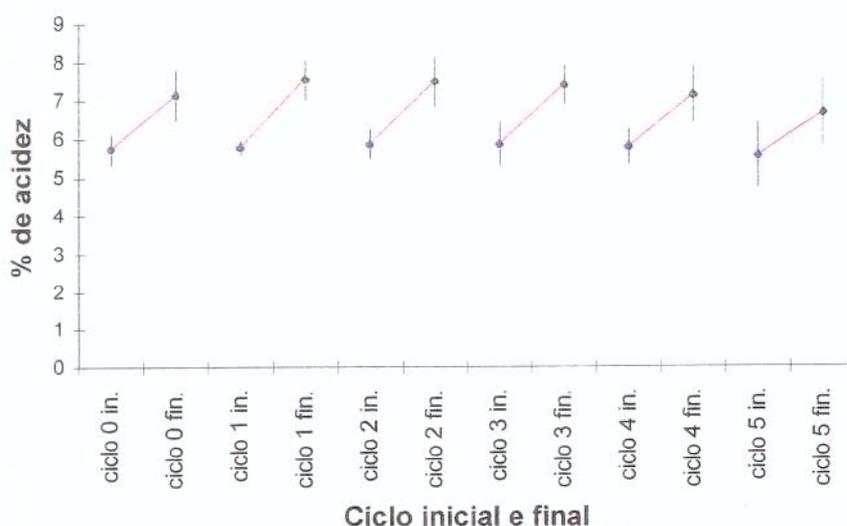
**Figura 27:** Acidez inicial e final dos três geradores contendo 14% de etanol e trocando 2 litros de mosto



**Figura 28:** Acidez inicial e final dos três geradores contendo 10% de etanol e trocando 3 litros de mosto



Como o gerador teve que ficar alguns dias sem troca de mosto resolveu-se novamente colocar um mosto contendo concentração alcóolica de 14% adicionando 2 litros, pois com esta quantidade o tempo de ciclo era maior, desta forma o mosto com 14% (2 litros) também antecede o com 10% 1 litro este dados são mostrados na Figura 29.



**Figura 29:** Acidez inicial e final dos três geradores contendo 10% de etanol e trocando 1 litro de mosto.

#### 4.9 Concentração de álcool residual presente no vinagre de frutas

Foi analisada a presença de álcool residual no vinagre produzido pelos vinhos de frutas, as análises foram feitas com cromatografia gasosa. Foi confeccionada uma curva de calibração e a partir desta feita uma regressão linear, obtendo a seguinte equação da reta:

$$y = 2E-05x - 0,0436$$

Onde x = área do cromatograma

A concentração de etanol residual variou de um ciclo para outro como podemos observar nas tabelas 10 e 11.

**Tabela 10:** Concentração álcool residual presente nos ciclos de caju.

Ciclo (caju)	Área do cromatograma	Etanol residual mL/L
1	2880	0,014
2	8513	0,127
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	9936	0,155

Podemos observar que nos ciclos 3, 4 e 5 do vinho de caju não houve concentração de álcool residual e nos ciclos 1, 5 e 6 também não.

**Tabela 11:** Concentração residual presente nos ciclos de laranja.

Ciclo (laranja)	Área do cromatograma	Etanol residual mL/L
1	0	0
2	6013	0,077
3	3086	0,018
4	1770	0
5	0	0
6	0	0

## CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

O gerador de vinagre quando operado com mosto contendo 10% de etanol adicionando 2 litros de mosto teve rendimento e produtividade satisfatório (0,92 g/g e 0,29 g/L/h), comparável aos valores citados na literatura.

Quando opera-se com vinho de caju ou vinho de laranja o gerador pode ser operado sem necessidade de adicionar nutrientes que é essencial para vinagre de álcool

O bambu mostrou-se ser adequado como material suporte pois pode ser operado cerca de doze meses continuamente sem necessidade de substituição e mostrou-se perfeitamente reutilizável após a retirada de gomas e limpeza dos toletes.

A fase de adaptação do gerador que compreende as mudanças de concentrações de álcool no mosto ou para vinhos de diferentes origens (vinho de caju e vinho de laranja) compreende um período de cerca de 2 semanas.

## CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. R. Vinegar. In: WOOD, B.J.B.. Microbiology of fermented foods. London: Ed. Elsevier Applied Science Publishers. v.1, p.1-47, 1985.
- ALLGEIER, R.J. & HILDEBRANDT, F.M. Newer developments in vinegar manufacture. Advances in Applied Microbiology. New York. v.2, p.163-182, 1960.
- AQUARONE, E. & ZANCANARO JUNIOR, O. Vinagres. In: AQUARONE, E. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Ed. Edgard Blücher. p.104-122, 1990.
- ASAI, T. Acetic acid bacteria: classification and biochemical activities. Tokyo: University of Tokyo Press,. 342p., 1968.
- BARUFFALDI, R. Produção de ácidos por microrganismos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E. & BORZANI, W. Biotechnologia - tecnologia das fermentações. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, v.1, p.70-87, 1975.
- BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. & SMITH, N.R. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, U.S.A.: Ed. The Williams e Wilkins, 9ª ed., 1994.

- BORZANI, W. Fermentação descontínua. In: BORZANI, W. ; LIMA, U.A. & AQUARONE, E. Engenharia bioquímica. São Paulo: Ed. Edgard Blücher / EDUSP, p.105-111, 1975.
- CANHOS, V.P. Estudo das características de espécies de *Acetobacter*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1975. 39p. (Dissertação, mestrado em Ciência de Alimentos).
- CONNER, H.A. & ALLGEIER, R.J. Vinegar: its history and development. Advances in applied microbiology, v.20, p.81-133, 1976.
- CRUEGER, W. & CRUEGER, A . Biotechnology:: A textbook of industrial actives. Madison, Ed. Science Tech. Inc., 1984.
- EBNER, H. & FOLLMANN, H. Acetic acid. In: REHM, H.J. & REED, E. Biotechnology, A. Comprehensive Treatise. Austria. v.3, p.389-407, 1983.
- EBNER, H. Vinegar. In: REED, E. Prescott and Dunn's Microbiology. Austria. 4<sup>a</sup>ed., p.803-833, 1982.
- HEKMAT, D. & VORTMEYER, D. Measurement, Control, and Modeling of Submerged Acetic Acid Fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering. Germany. v.73, p.26-31, 1992.
- ITO, T.; SOTA, H.; HONDA, H.; SHIMIZU, K. & KOBAYASHI, T. Efficient acetic acid production by repeated fed-batch fermentation using two fermentors. Applied Microbiology Biotechnology. Japan. v.36, p.295-299, 1991.

- JOYEUX A ., LAFON- LAFOURCADE S, RIBÉREAU- GAYON. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. Applied Environmental Microbiology. V.48, p.153-156, 1984.
- LOTONG, N.; MALAPAN, W.; BOONGORSRANG, A. & YONGMANITCHAI, W. Production of vinegar by *Acetobacter* cells fixed on a rotating disc reactor. Applied Microbiology Biotechnology. Thailand. v.32, p.27-31, 1989.
- MACÍAS, M.; CARO, I. & CANTERO, D. Optimum operating conditions in closed-system industrial acetifiers (semi-continuous operation): a study by computer simulation. Chemical Engineering Journal. Spain. v.65, p.201-207, 1997.
- MAEDA, A.H. Estudo das bactérias acéticas de usina de açúcar e álcool. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1997. 65p. (Dissertação, mestrado em Ciência de Alimentos)
- MORETTO, E. Vinhos e Vinagres (Processamento e Análises). Florianópolis: Ed. UFSC, 1988.
- NISHIWAKI, A. Analysis of a two-stage fermentor with cell recycling for continuous acetic acid production. Journal of Fermentation and Bioengineering. v.83, p.565-570, 1997.
- ORY, I.D.; ROMERO, E.L. & CANTERO, D. Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. Applied Microbiology and Biotechnology. Spain. v.49, p.189-193, 1998.

- PARK, Y.S.; OHTAKE, H.; FUKAYA, M.; OKUMURA, H.; KAWAMURA, Y. & TODA, K. Effects of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. Journal of Fermentation and Bioengineering. Japan. v.68 (2), p.96-101, 1989.
- PARK, Y. S.; FUKAYA, M.; OKUMURA, H.; KAWAMURA, Y. & TODA, K. (a) Production of acetic acid by a repeated batch culture with cell recycle of *Acetobacter aceti*. Biotechnology Letters. Japan. v.13, p.271-276, 1991.
- PARK, Y.S.; TODA, K.; FUKAYA, M.; OKUMURA, H. & KAWAMURA, Y. (b)Production of a high concentration acetic acid by *Acetobacter aceti* using a repeated fed-batch culture with cell recycling. Applied Microbiology Biotechnology. Japan. v.35, p.149-153, 1991.
- PARK, Y.S. & TODA, K. Multi-stage biofilm reactor for acetic acid production at high concentration. Biotechnology Letters. Japan. v.14, p.609-612, 1992.
- RIZZON, L.A. & MIELE, A. Características analíticas de vinagres comerciais de vinhos Brasileiros. Brazilian Journal of Food Technology. Brasil. v.1, p.25-31, 1998.
- RODRIGUEZ MASSAGUER, P. Microbiologia dos processos alimentares. Campinas: FEA/UNICAMP, 1997.
- ROMERO, L.E.; GÓMEZ, J.M.; CARO, I. & CANTERO, D. A kinetic model for growth of *Acetobacter aceti* in submerged culture. The Chemical Engineering Journal. Spain. v.54, p.B15-B24, 1994.

SÃO PAULO. Decreto nº 12486,20 de outubro de 1978. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. Diário Oficial, Estado de São Paulo, 21 outubro 1978.42p.

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

TODA, K., *et al.* Applied Microbiology Biotechnology v. 30, p.559-563, 1989.

VAUGHN, R.H. Acetic acid - vinegar. In: UNDERKOFFLER, L.A.; HICKEY,R.J. Industrial fermentations. New York: Ed. Chemical Publishing. v.1, p.498-534, 1954.

ZAGO E. A . *et al.* Métodos analíticos para controle da produção de álcool e açúcar. Piracicaba : FERMENTEC/ FEALC/ ESALQ-USP, 1996.

ZANCANARO JÚNIOR, O. Otimização do processo lento de fermentação acética. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1988. (Tese, doutorado em Ciência de Alimentos).

## APÊNDICE

**Tabela 12:** Dados utilizados para confecção da curva de calibração.

Área do cromatograma	Concentração de etanol ml/L
143102	2,5
90396	1,666
57006	0,8333
9590	0,17
7363	0,0806
4966	0,0297
2256	0,0269

**Fig. 30:** Gráfico da regressão linear e equação da reta.

