

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

**ESTUDO DOS FATORES NUTRICIONAIS DE  
BACTÉRIAS ACÉTICAS**

**VITÓRIO DOS SANTOS JUNIOR**

Biólogo

**Dr. FUMIO YOKOYA**

Orientador

**Dra. WILMA APARECIDA SPINOSA**

Co-orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP,  
para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos

**Campinas**

**2004**

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

Santos Junior, Vitório  
Sa59e Estudo dos fatores nutricionais de bactérias acéticas /  
Vitório dos Santos Junior - Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1.Nutrição. 2.*Acetobacter*. I.Yokoya, Fumio.  
II.Spinosa, Wilma Aparecida. III.Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
IV.Título.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
FEA / UNICAMP  
Membro Titular**

---

**Prof. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte  
CPQBA / UNICAMP  
Membro Titular**

---

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

## DEDICATÓRIA

Para Eneida, Wilma, Silvia e a memória dos meus pais...

## AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor Fumio Yokoya pela orientação segura, acertada e tolerante.

Aos meus queridos amigos Estêvão e Rhavena por todos os dias, noites e finais de semana dedicados à realização desse trabalho.

Ao meu grande amigo David pelas calorosas discussões sobre os dogmas da ciência.

Aos “Bioloucos”, pela grande amizade sempre. Todos são realmente muito importantes para mim, apesar de alguma distância ocasional sabem que são umas *Onças* adoráveis!

Agradeço ao Reinaldo pelos últimos momentos... mesmo sem saber sua companhia foi acolhedora! E a Fabiana pela atenciosa colaboração no *summary*;

À Elaine, pela valiosa orientação e colaboração na análise estatística;

Ao Juvenal Zancheta pelas inúmeras revisões e ajustes do texto, desde sempre;

Aos professores doutores Pedro de Oliva Neto e Rubens Cruz, pela orientação em momentos importantes desse trabalho e pelo incentivo desde a iniciação científica.

Aos amigos e colaboradores sempre prontos Gil, Fabiano, Patrícia, Renata, Karina, Carol, Erico, Aleicho, Gisele, Vivian, Stêfano, Mônica, Fabiane, Rafael e todos os colegas de trabalho, que não só procuraram ajudar nessa pesquisa, como ofereceram condições para que pudesse me concentrar nesta atividade;

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

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
RESUMO.....	xiii
<i>SUMMARY</i> .....	xiv
1       INTRODUÇÃO .....	1
2       OBJETIVOS .....	3
3       REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1     Nutrição de bactérias acéticas .....	4
3.1.1   Necessidades nutricionais .....	4
3.2     Produção de inóculo de bactérias acéticas .....	18
3.3     Planejamento e otimização de experimentos .....	19
4       MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1     Microrganismos .....	21
4.2     Meios de cultura.....	21
4.3     Estudo do requerimento nutricional.....	22
4.3.1   Preparo do inóculo .....	22
4.3.2   Ensaio qualitativo de requerimento de minerais, vitaminas e fator de crescimento.....	26
4.3.2.1   Estudo das necessidades nutricionais de minerais.....	26
4.3.2.2   Estudo das necessidades nutricionais de vitaminas e fator de crescimento.....	28

4.3.3	Ensaio quantitativo de requerimento de minerais e vitaminas.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1	Estudo do requerimento nutricional .....	35
5.1.1	Preparo do inóculo .....	35
5.1.2	Resultados dos ensaios qualitativo de requerimento de minerais, vitaminas e fator de crescimento.....	38
5.1.2.1	Seleção de minerais.....	38
5.1.2.2	Seleção de vitaminas e fator de crescimento.....	42
5.1.3	Resultados dos ensaios quantitativos dos minerais, vitaminas e fator de crescimento.....	47
6	CONCLUSÕES .....	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1a Obtenção de massa celular em função das concentrações de piridoxina e vitamina B12, apresentados em superfície (linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06) .....	53
Figura 1b Obtenção de massa celular em função das concentrações de piridoxina e vitamina B12, apresentados em contorno (linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06) .....	54
Figura 2a Obtenção de massa celular em função das concentrações de ferro e boro, apresentados em superfície (linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06) .....	55
Figura 2b Obtenção de massa celular da linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06 em função das concentrações de ferro e boro, apresentados em contorno .....	55
Figura 3a Obtenção de massa celular em função das concentrações de tiamina e ácido <i>p</i> -aminobenzóico, apresentados em superfície (linhagem <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565) .....	59
Figura 3b Obtenção de massa celular em função das concentrações de tiamina e ácido <i>p</i> -aminobenzóico, apresentados em contorno (linhagem <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565) .....	59
Figura 4a Obtenção de massa celular em função das concentrações de ferro e boro, apresentados em superfície (linhagem <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565) .....	60

Figura 4b Obtenção de massa celular em função das concentrações de ferro e boro, apresentados em contorno (linhagem <i>Acetobacter acetii</i> CCT 2565) .....	61
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Meio de crescimento definido para <i>Acetobacter</i> .....	16
Tabela 2 Composição mínima do meio para crescimento de <i>Acetobacter</i> .....	17
Tabela 3 Concentrações dos componentes do meio MYP .....	23
Tabela 4 Formulação dos meios de cultivo controle .....	25
Tabela 5 Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial $2^{(5-1)}$ para estudo do efeito de minerais no cultivo de bactérias acéticas.....	27
Tabela 6 Planejamento fatorial $2^{(5-1)}$ para estudo do efeito de minerais no cultivo de bactérias acéticas.....	27
Tabela 7 Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial $2^{(8-3)}$ para estudo do efeito de vitaminas e fator de crescimento no cultivo de bactérias acéticas .....	28
Tabela 8 Planejamento fatorial $2^{(8-3)}$ para estudo do efeito de vitaminas e fator de crescimento no cultivo de bactérias acéticas .....	29

Tabela 9	Valores decodificados utilizados na Metodologia de Superfície de Resposta no estudo do efeito da concentração dos minerais e das vitaminas do meio de cultivo, no crescimento da linhagem 086/06 .....	30
Tabela 10	Planejamento experimental (MSR) para estudo do efeito de minerais e vitaminas do meio de cultivo, no crescimento da linhagem 086/06 .....	31
Tabela 11	Valores decodificados utilizados na Metodologia de Superfície de Resposta no estudo do efeito da concentração dos minerais e das vitaminas do meio de cultivo, no crescimento da linhagem padrão CCT 2565 .....	32
Tabela 12	Planejamento experimental (MSR) para estudo do efeito de minerais e vitaminas do meio de cultivo, no crescimento da linhagem padrão CCT 2565 .....	33
Tabela 13	Composição dos nutrientes adicionados ao meio basal para validação do modelo experimental da otimização do meio de cultivo da linhagem 086/06 .....	34
Tabela 14	Composição dos nutrientes adicionados ao meio basal para validação do modelo experimental da otimização do meio de cultivo da linhagem CCT 2565 .....	34
Tabela 15	Contagens de células viáveis (células/mL) em câmara de Neubauer após 48h de incubação (30°C, 120rpm) com corante Azul Trypan .....	36

Tabela 16 Crescimento das linhagens <i>Acetobacter</i> sp. 086/06 e <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565 em meio de cultivo MYP3 em ciclos consecutivos .....	37
Tabela 17 Efeito de minerais no crescimento da linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06, de acordo com o desenho experimental (D.O. medida em 600 nm) ....	38
Tabela 18 Efeito de minerais no crescimento da linhagem <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565, de acordo com o desenho experimental (D.O. medida em 600 nm) .....	39
Tabela 19 Análise de variância do teste de seleção de minerais para linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06 .....	40
Tabela 20 Análise de variância do teste de seleção de minerais para linhagem padrão <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565 .....	41
Tabela 21 Efeito de fator de crescimento e vitaminas no crescimento da linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06, de acordo com o desenho experimental fatorial (D.O. medida em 600 nm) .....	43
Tabela 22 Efeito de fator de crescimento e vitaminas no crescimento da linhagem <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565, de acordo com o desenho experimental fatorial (D.O. medida em 600 nm) .....	44
Tabela 23 Análise de variância do teste de requerimento de vitaminas e fator de crescimento para a linhagem de <i>Acetobacter</i> sp. 086/06 .....	46
Tabela 24 Análise de variância do teste de requerimento de vitaminas e fator de crescimento para a linhagem padrão <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565 ...	46

Tabela 25	Efeito da concentração de minerais e vitaminas no crescimento da linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06, de acordo com Metodologia da Superfície de Resposta (D.O. medida em 600 nm).....	48
Tabela 26	Efeito da concentração de minerais e vitaminas no crescimento da linhagem <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565, de acordo com Metodologia da Superfície de Resposta (D.O. medida em 600 nm) .....	50
Tabela 27	Análise de variância dos resultados para a resposta massa celular medida em D.O. do delineamento composto central 2 <sup>8</sup> para a linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06 .....	51
Tabela 28	Previsões do modelo para massa celular com valores dentro da máximo crescimento celular para linhagem <i>Acetobacter</i> sp. 086/06.	56
Tabela 29	Análise de variância dos resultados para a resposta massa celular medida em D.O. do delineamento composto central 2 <sup>5</sup> para linhagem <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565 .....	57
Tabela 30	Previsões do modelo para obtenção de massa celular de <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565 com valores dentro do máximo crescimento celular.	61
Tabela 31	Composição dos meios de cultivo obtidos pelo planejamento experimental e resultados da produção de massa celular de <i>Acetobacter</i> sp. 086/06 .....	62
Tabela 32	Composição dos meios de cultivo obtidos pelo planejamento experimental e resultados da produção de massa celular de <i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565 .....	63

## RESUMO

As bactérias acéticas são utilizadas na produção de vinagre a partir de vinho e de outras matérias primas. O requerimento nutricional das bactérias acéticas é pouco conhecido e a manutenção desses microrganismos é muito difícil. Este estudo tem como objetivo selecionar qualitativa e quantitativamente minerais, vitaminas e fator de crescimento, visando o aumento de produção de massa celular. Os experimentos foram conduzidos com duas linhagens: uma de *Acetobacter* sp. isolada de indústria produtora de vinagre (086/06) e outra linhagem padrão de *Acetobacter aceti* (CCT 2565), vinda de coleção de cultura. As etapas do trabalho foram: preparo de inóculo sem interferência dos componentes do meio de cultura complexo; seleção qualitativa dos minerais, vitaminas e fator de crescimento utilizando o delineamento fatorial incompleto como ferramenta estatística; determinação quantitativa dos nutrientes eleitos na etapa anterior por meio da metodologia da superfície de resposta e confirmação experimental dos resultados obtidos na etapa anterior. O meio de cultivo composto de 25 g/L de manitol, 0,625 g/L de extrato de levedura e 0,375 g/L de peptona mostrou-se adequado para a preparação de inóculo de bactérias acéticas, sendo obtida uma suspensão celular com  $10^9$  células/mL. Com os resultados obtidos a partir de um ensaio fatorial incompleto para a linhagem 086/06 foram selecionados os minerais ferro, boro, molibdênio, zinco e manganês e as vitaminas ácido *p*-aminobenzóico, piridoxina e cianocobalamina. Para a linhagem CCT 2565 os minerais foram ferro e boro e as vitaminas ácido *p*-aminobenzóico, tiamina e ácido nicotínico. O meio de cultivo formulado pela análise da superfície de resposta para o ponto de máximo com a linhagem 086/06 foi ferro 12 mg/L, boro 0,6 mg/L, molibdênio 0,4 mg/L, zinco 1,1 mg/L e manganês 12 mg/L; as vitaminas ácido *p*-aminobenzóico 0,25 mg/L, piridoxina 0,25 mg/L, cianocobalamina 2,75 mg/L. O meio formulado para a linhagem CCT 2565 foi ferro 16 mg/L, boro 0,6 mg/L; as vitaminas ácido *p*-aminobenzóico 0,55 mg/L, tiamina 0,25 mg/L e ácido nicotínico 0,5 mg/L. O modelo matemático obtido aproximou-se dos resultados experimentais testados nas condições de pH 6,0 e 30°C usando 25 g/L de manitol como fonte de carbono,

0,1 g/L de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio e sais de potássio e magnésio como fonte de macronutrientes, sendo 73,5 g/L de potássio, 10 g/L de enxofre, 40,6 g/L de fósforo e 8 g/L de magnésio para as linhagens estudadas.

## SUMMARY

The acetical bacteria are used in vinegar production from wine and others primary matter. The nutritional requirement of acetical bacteria is poorly know, and the maintenance of this microorganisms is too difficult. The experiments were conducted with two strains, one of *Acetobacter* sp. isolated from vinegar industry production (086/06) and another typical strain of *acetobacter aceti* (CCT 2565) from culture collection. This research is divided in four stages: prepare of inoculum without interference of the complex medium components; qualitatively selection of minerals, vitamins and growing factor using the incomplete factorial design as statistic tool; quantitatively determination of chosen nutrients in the preview stage trough the methodology of surface response and experimental confirmation of the results got in the preview stage. The medium formulated by manitol 25 g.L<sup>-1</sup>, yeast extract 0,625 g.L<sup>-1</sup> and peptone 0,375 g.L<sup>-1</sup>, was presented appropriated for acetical bacteria inoculum preparation, and a population with 10<sup>9</sup> cells.mL<sup>-1</sup> were obtained. The results obtained from a laboratory test of incomplete factorial for the strains 086/06, were selected the minerals iron, boron, molybdenum, zinc, manganese and the vitamins *p*-aminobenzoic acid, pyridoxine and cyanocobalamin. To the strain CCT 2565 the minerals were iron and boron, and the vitamins *p*-aminobenzoic acid, thiamine and nicotinic acid. A constructed medium by response surface analyse to the height point in the 086/06 strain was iron 12 mg.L<sup>-1</sup>, boron 0,6 mg.L<sup>-1</sup>, molybdenum 0,4 mg.L<sup>-1</sup>, zinc 1,1 mg.L<sup>-1</sup> and manganese 12 mg.L<sup>-1</sup>; the vitamins *p*-aminobenzoic acid 0,25 mg.L<sup>-1</sup>, pyridoxine 0,25 mg.L<sup>-1</sup> and cyanocobalamin 2,75 mg.L<sup>-1</sup>. The constructed medium to CCT 2565 strain was: iron 16 mg.L<sup>-1</sup>, boron 0,6 mg.L<sup>-1</sup>, the vitamins *p*-aminobenzoic acid 0,55 mg.L<sup>-1</sup>, thiamine 0,25 mg.L<sup>-1</sup> and nicotinic acid 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. The

mathematical model obtained was near of the test experimental results under conditions of the pH 6,0 and 30°C temperature, using manitol 25 g.L<sup>-1</sup> as carbon source, ammonia sulphate 0,1 g.L<sup>-1</sup> as nitrogen source and potassium and magnesium salts as macronutrients source, seeing potassium 73,5 g.L<sup>-1</sup>, sulphur 10 g.L<sup>-1</sup>, phosphorus 40,6 g.L<sup>-1</sup> and magnesium 8 g.L<sup>-1</sup> to the studied strains.

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo nacional per capita de vinagre é estimado em torno de 2 L/ano, muito aquém daquele verificado nos Estados Unidos e Europa, onde o produto também é utilizado em outras atividades cotidianas, como na lavagem de roupa para fixação de cor, retirada de manchas em aço inoxidável, tecidos, recipientes de alumínio, além da eliminação de odores indesejáveis do ambiente e de garrafas térmicas.

A indústria da fermentação acética no Brasil conta com parque de produção de vinagre por processo submerso composto por 60 unidades. Segundo dados da União Brasileira de Vitivinicultura - UVIBRA, localizada no Estado do Rio Grande do Sul, a produção nacional de vinagre de vinho nos anos de 2000, 2001 e 2002 foi respectivamente de 6.654.097, 1.767.848 e 1.587.601 L. No ano de 2001 e 2002, a produção de Agrin foi respectivamente de 7.169.864 e 6.954.069 L.

Agrin é o fermentado acético de mosto de álcool de cana de açúcar adicionado de borra de fermentação de vinhos tintos e brancos.

O principal processo usado na fabricação de vinagre hoje em dia é o submerso. O primeiro equipamento comercial para o processo submerso foi descrito por Hromatka (1952). Esse processo, patenteado por Hromatka & Ebner (1955), vem sendo melhorado pela empresa Heinrich Frings, sediada em Bonn, Alemanha.

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

O insumo mais usado na produção de vinagre é um composto comercializado com o nome Acetozim<sup>®</sup>, patenteado pela empresa alemã Frings, e produzido por sua subsidiária brasileira localizada em Piracicaba-SP. Este produto é adicionado à calda da fermentação acética com objetivo de enriquecimento em minerais e vitaminas. O custo do quilograma gira em torno de R\$6,00 (US\$2<sup>1</sup>) e a recomendação de uso é de 0,1% (p/v). Na prática, sabe-se que a adição desse nutriente aumenta o rendimento da produção de ácido acético em até 50%.

---

<sup>1</sup> Cotação setembro/2003

## 2. OBJETIVOS

- a) Contribuir para o conhecimento do requerimento nutricional qualitativo e quantitativo de uma linhagem do gênero *Acetobacter* isolada de unidade produtora de vinagre no Brasil e comparar com linhagem padrão depositada em coleção de cultura;
- b) Contribuir para estudo da formulação de meio de cultura para produção de inóculo de bactérias do gênero *Acetobacter*;
- c) Pesquisar componentes que atuem como suplemento nutricional no processo fermentativo de bactérias acéticas;
- d) Consolidar núcleo de pesquisa e disseminar conhecimentos relativos a uma área ainda pouco estudada no país.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 NUTRIÇÃO DE BACTÉRIAS ACÉTICAS

##### *3.1.1 Necessidades nutricionais*

No processo de fabricação de vinagre parte-se de calda, solução contendo álcool, obtida de matéria-prima fermentada, que pode ser de fruta, malte, soro de leite, glicose ou arroz. Dependendo da matéria-prima torna-se necessária a adição de nutrientes em maior ou menor quantidade na referida calda. As necessidades nutritivas dos microrganismos que irão processar a transformação do etanol em ácido acético são as mesmas que as de todos os seres vivos que para renovarem seu protoplasma e exercerem suas atividades metabólicas exigem: fontes de energia e nutrientes (EBNER, 1983; LIMA et al., 1988).

Muitas enzimas requerem um ou mais cofatores não proteicos para sua função catalítica, que pode ser uma molécula orgânica, ou um componente inorgânico como um íon metálico. Em algumas enzimas o cofator é participante direto do processo catalítico; em outras ele serve como transportador transitório de algum grupo funcional específico derivado do substrato. Embora esses cofatores enzimáticos ocorram em pequenas quantidades nas células eles são essenciais para a ação de muitas enzimas desempenhando papel vital no metabolismo celular (LEHNINGER, 1989).

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

Os micronutrientes são requeridos em quantidades muito pequenas, entretanto, são tão importantes quanto os macronutrientes para as atividades do metabolismo celular. Eles são metais, muitos dos quais formam partes de enzimas. Eles são fundamentais para a ação enzimática, na maioria dos casos, funcionando como grupos prostéticos ou cofatores de importantes enzimas do metabolismo bacteriano (LEHNINGER, 1989; FLORKIN & STOTZ, 1971).

Quanto a sua ação nas enzimas, os minerais podem funcionar de três formas diferentes: ter atividade catalítica própria sobre uma reação química, sendo esta aumentada pela enzima; formar um complexo com o substrato e com o sítio catalítico do enzima, aproximando os dois de uma forma ativa; e funcionar como receptor de elétrons em algum momento do ciclo catalítico (LEHNINGER, 1989).

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

Em materiais biológicos, o ferro ocorre primariamente na forma de complexos. O ferro livre, na forma iônica, ocorre somente em casos negligenciáveis. Dessa forma, o metabolismo do ferro consiste na transformação bioquímica de complexos de ferro. Os compostos de ferro facilitam o transporte de elétrons e geralmente estão associados à fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. É componente fundamental dos citocromos, catalase, peroxidases, ferridoxina, NAD-desidrogenase e flavoproteínas (FLORKIN & STOTZ, 1971).

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

O íon zinco é um componente essencial de aproximadamente uma centena de diferentes enzimas. Está presente em muitas desidrogenases dependentes de  $NAD^+$  ou  $NADP^+$ , enzimas que promovem a transferência de íons hidreto de moléculas de substrato para as coenzimas citadas. É também um componente essencial das polimerases do DNA e RNA, participando assim das importantes reações envolvidas na replicação e transcrição da informação genética (LEHNINGER, 1989).

O molibdênio está presente no sítio ativo de certas flavina-desidrogenases, xantina oxidases, nitrato redutases, nitrogenases e oxi-transferases. Juntamente com o ferro e a flavina, participa da ação enzimática no processo de transferência de elétrons do substrato para o oxigênio (FLORKIN & STOTZ, 1971; LEHNINGER, 1989; MADINGAN et al., 1997).

Segundo Florkin & Stotz (1971) a primeira evidência da importância biológica do molibdênio foi relatada por Bortels quando demonstrou que o molibdênio era requerido para a fixação de nitrogênio por *Azotobacter*.

Apesar de suas funções serem ainda desconhecidas, o boro é requerido por algumas plantas e microrganismos.

As vitaminas têm sua importância biológica reconhecida primeiramente pelo fato de que alguns organismos não podem sintetizá-las, devendo, em consequência, obtê-las de fontes exógenas. Muitos microrganismos são capazes de sintetizar todos os componentes de suas coenzimas, mas alguns são incapazes de fazê-lo e devem ser suplementados com certas partes destas coenzimas em forma de vitaminas. As mais requeridas pelos microrganismos são tiamina, biotina, piridoxina e cianocobalamina (LEHNINGER, 1976; MADINGAN et al., 1997).

A tiamina, vitamina B1, aneurina ou orizanina é uma base hidrogenada, encontrada quase sempre na forma de cloreto-hidrocloreto de forma empírica  $C_{12}H_{17}ON_4Cl.HCl$  (BOBBIO & BOBBIO, 1995). Ocorre nas células, principalmente na forma de sua coenzima ativa, o pirofosfato de tiamina ou tiamina pirofosfato

(TTP). A TTP funciona como coenzima para duas classes de reações catalisadas por enzimas, no fluxo do metabolismo de carboidratos, em que grupos aldeídicos são removidos e/ou transferidos. A tiamina sozinha promove a descarboxilação não enzimática do piruvato para produzir acetaldeído e CO<sub>2</sub>. É bastante estável, tanto na forma cristalizada quanto em soluções, podendo ser aquecida até 120°C em pH 3,5 (LEHNINGER, 1976).

O ácido nicotínico, também chamado de niacina faz parte das coenzimas desidrogenase I e II, importantes em várias reações enzimáticas de oxidação e tem como precursor o triptofano. Duas coenzimas contendo nicotinamida (a amida do ácido nicotínico), a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) e a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP) são importantes em um grande número de óxido-redutases, chamadas de desidrogenases ligadas à piridina (LEHNINGER, 1976). É uma das vitaminas mais estáveis, sendo resistente a ácidos, bases, calor, luz e agentes fracamente oxidantes (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

O ácido pantotênico é um dos componentes da coenzima A, envolvida nas reações enzimáticas de acetilação, serve como transportador de grupamentos acila nas reações enzimáticas envolvidas na oxidação e na síntese de ácidos graxos e na oxidação do piruvato (LEHNINGER, 1976). Sua principal fonte são as leveduras. É formado por um hidroxíácido e um aminoácido, unidos por uma ligação peptídica e tem fórmula empírica C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub>N (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

O ácido *p*-aminobenzóico é um fator de crescimento com efeito biológico comprovado, principalmente em bactérias e fungos. É precursor do ácido fólico,

sendo essencial à síntese das bases nitrogenadas dos nucleotídeos. Quimicamente, possui fórmula empírica  $C_7H_7H_2N$  (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

A piridoxina faz parte do grupo das vitaminas  $B_6$  e é também conhecida como adermina ou piridoxol. As coenzimas da piridoxina são extremamente versáteis, funcionando em um grande número de reações enzimáticas diferentes nos quais os aminoácidos ou aminogrupos são transformados ou transferidos (LEHNINGER, 1976). Tem fórmula empírica  $C_8H_{11}NO_3HCl$  e se decompõe entre 205 e 212°C (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

A cianocobalamina é também denominada vitamina  $B_{12}$ , foi o primeiro composto orgânico obtido de fontes naturais em cuja molécula existe cobalto. Apresenta um sistema complexo de anel de corrina e sua coenzima funciona na catálise enzimática dos deslocamentos de átomos de hidrogênio entre átomos de carbono adjacentes (LEHNINGER, 1976). Possui fórmula empírica  $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ , é estável entre pH 4 e 6, podendo ser aquecida sob pressão (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

A biotina é um composto nitrogenado, cuja função é a síntese de ácidos graxos e utilização do  $CO_2$ . A biotina atua como um transportador intermediário do dióxido de carbono durante a ação de certas enzimas carboxilantes, como a acetil-CoA-carboxilase. Sua fórmula empírica é  $C_{10}H_{10}O_3N_2S$  (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

O inositol é uma substância cristalina com sabor doce, considerada um dos fatores essenciais à vida. Ele não é um bloco construtivo de qualquer coenzima

conhecida e sua atividade biológica é pouco elucidada (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

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

Rao & Stokes (1953 apud ASAI, 1968) observaram que linhagens de *A. suboxydans* e *A. melanogenus* incapazes de crescerem em meio quimicamente definido, com etanol como a única fonte de carbono, cresceram com a adição de pequena quantia de levedura autolisada, peptona ou extrato de fígado. Eles sugeriram que a atividade promotora de crescimento desses materiais biológicos foi devido a açúcares redutores presentes. Realmente comprovou-se que glicose, frutose, manitol ou glicerol podem ser encontrados em extrato de levedura. Esses açúcares redutores devem ser necessários para iniciar o crescimento dessas bactérias, que utilizariam então o etanol, como uma fonte adicional de carbono e energia, oxidando-o a ácido acético. Bactérias do ácido acético cresceram em meio com glicose e etanol na presença de  $\text{CH}_3^{14}\text{CH}_2\text{OH}$ , e o  $^{14}\text{C}$  do etanol foi incorporado no material celular.

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

Fewster (1958 apud ASAI, 1968) examinou vários carboidratos como efetivas fontes de energia para crescimento de *A. suboxydans* ATCC 621, usando um meio complexo (contendo peptona e extrato de levedura) e um meio semi-definido (contendo hidrolisado ácido de caseína, aminoácidos, minerais e fatores de crescimento). O crescimento máximo foi obtido com D-manitol e D-sorbitol e bom crescimento com glicerol, frutose e com glicose na presença de  $\text{CaCO}_3$ . O crescimento de microrganismos com D-glucanato de cálcio, L-sorbose, D-manose, D-galactose, D-xilose, L-arabinose, e sacarose como fonte de carbono foi desprezível.

Fontes de carbono desejáveis para o crescimento de linhagens de *Acetobacter* sp. foram glicose, arabinose, manitol, sorbitol e glicerol. Etanol, piruvato e lactato não foram utilizados sob condições rotineiras, mas foram utilizados em presença de um ou mais componentes indefinidos encontrados em extrato de levedura e triptona, além de nitrogênio amoniacal e hidrolisado de

caseína. Várias linhagens de *A. gluconicus* e *A. rancens* aparentemente requeriam um ou mais componentes indefinidos encontrados em leveduras autolisadas.

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

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

Gray & Tatum (1944 apud ASAI, 1968) relataram que linhagens de *A. melanogenus* utilizaram nitrogênio amoniacal em presença de tiamina, ácido pantotênico, ácido nicotínico, e ácido *p*-aminobenzóico. A respeito disso, Rao & Stokes (1953 apud ASAI, 1968) fizeram uma interessante observação, relativa à habilidade do uso de nitrogênio amoniacal e observaram que isso é mais comum entre as bactérias do ácido acético do que tinham suspeitado. Em muitas linhagens de *A. suboxydans* e *A. melanogenus* foi encontrada essa habilidade. No entanto, muitas linhagens de *A. suboxydans* requeriam a adição de ácido

pantotênico, ácido nicotínico e *p*-aminobenzóico no meio como fatores de crescimento e linhagens de *A. melanogenus* necessitaram da adição de tiamina.

Os fatores de crescimento requeridos por estas bactérias, dependem da fonte de carbono fornecida (RAO & STOKES, 1953 apud ASAI, 1968). Em meios sintéticos contendo nove vitaminas e D-manitol como fonte de carbono, algumas linhagens requerem ácido *p*-aminobenzóico, niacina, tiamina ou ácido pantotênico como fatores de crescimento (GOSSELÉ et al., 1980 apud DE LEY et al., 1984). Várias linhagens são capazes de crescer em meio quimicamente definido sem aminoácidos, usando íons  $\text{NH}_4^+$  como fonte única de N e etanol como de carbono. Este conhecido como meio Frateur modificado por Hoyer cuja composição por litro de água destilada é: 38 mL de etanol; 1,0g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,9 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005g de  $\text{FeCl}_3$ ; 0,001 g (cada vitamina) de d-biotina, pantotenato de cálcio, tiamina, ácido fólico, ácido *p*-aminobenzóico e vitamina B12, e 0,0015g (cada vitamina) de piridoxal-HCl, niacina e riboflavina. Efeitos inibitórios no crescimento de *A. acetii* causados por adição individual de treonina, glicina, valina, serina, homoserina, cisteína e alanina foram descritos por O'Sullivan (DE LEY et al., 1984).

Lampen et al. (1942 apud ASAI, 1968) e Underkofler et al. (1943 apud ASAI, 1968) observaram que *A. suboxydans* ATCC 621, quando cultivada num meio contendo caseína hidrolisada como fonte de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono, requisitou ácido pantotênico, ácido *p*-aminobenzóico e ácido nicotínico. Devido aos estudos de Landy & Dicken (1942 apud ASAI, 1968) e Landy & Streightoff (1943 apud ASAI, 1968), *A. suboxydans* ATCC 621 tornou-se

um organismo teste para ensaio microbiológico de ácido *p*-aminobenzóico. Marshall & Postage (1949 apud ASAI, 1968) relataram que uma linhagem de *A. suboxydans* não requeria *p*-aminobenzoato e era resistente a inibição por sulfonamidas.

Gray & Tatum (1944 apud ASAI, 1968) observaram que as três vitaminas citadas acima são requeridas também por uma linhagem de *A. melanogenus*. No mesmo artigo eles notaram a necessidade de prolina por um mutante de *A. melanogenus* (induzido por raio-X) e de serina ou glicina e adenosina por outros mutantes.

Foda & Vaughn (1953 apud ASAI, 1968) examinaram seis linhagens de *A. melanogenus* e uma linhagem de *A. oxydans* e *A. rancens* quanto a sua necessidade de vitaminas quando cultivados em meio sintético de Foda & Vaughn. Todas as culturas requisitaram ácido pantotênico, ácido *p*-aminobenzóico e ácido nicotínico. *A. melanogenus* e *A. rancens* requisitaram tiamina também. De acordo com Hall et al. (1952 apud ASAI, 1968) *A. suboxydans* ATCC 621, quando cultivada em meio sintético Dunn's, requisitou ácido nicotínico e pH 5,0 - 6,0 com glicerol, como fonte de carbono. Com glicose como fonte de carbono, ácido nicotínico não foi essencial em pH 6,0 e foi essencial em pH 5,0.

Litsky et al. (1953 apud ASAI, 1968) verificaram que o ácido *p*-aminobenzóico foi o único composto requerido para o cultivo de *A. xylinum* num meio sintético, contendo caseína hidrolisada como fonte de aminoácidos. *A.*

*mobile* também requisitou ácido *p*-aminobenzóico (RAINBOW & MITSON, 1953 apud ASAI, 1968).

Biotina foi reportada por Litsky et al. (1953 apud ASAI, 1968) como sendo essencial para o crescimento de *A. suboxydans*, mas Karabinoos & Dicken (1944 apud ASAI, 1968) atribuíram o fenômeno a possível contaminação da biotina com ácido nicotínico. De acordo com Hall et al. (1953 apud ASAI, 1968), a biotina mostrou-se efetiva na promoção do crescimento de *A. pasteurianus*, *A. ascendens*, e *A. acidum-mucosum*, e Baestle (1953 apud ASAI, 1968) também relatou o efeito da biotina no crescimento de bactérias do ácido acético.

O requerimento de vitamina num meio sintético usado pelo Underkofler et al. (1943 apud ASAI, 1968) foi investigado do ponto de vista taxonômico e direcionado ao acompanhamento de isolados por Ameyama & Kondo (1966 apud ASAI, 1968) (a composição mínima do meio é mostrada na Tabela 2). Linhagens de *Gluconobacter* geralmente necessita de ácido pantotênico e algumas linhagens necessitam da adição de tiamina, ácido nicotínico e ácido *p*-aminobenzóico. Além disso, uma diferença das necessidades entre as linhagens tem sido nivelada nas mesmas espécies. Riboflavina, piridoxina, vitamina B12, ácido fólico, biotina e inositol foram desnecessárias para o crescimento.

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

Tabela 1. Meio de crescimento definido para *Acetobacter* (RAO & STOKES, 1953)

Componente	
Etanol, glicose ou outra fonte de carbono	2,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou	0,1 g
Caseína hidrolisada ( livre de vitamina) (mais 10 mg de L-cisteína e 20 mg de DL-triptofano)	0,5 g
Solução de Sal A	0,5 mL
Solução de Sal B	0,5 mL
Mistura de vitaminas: 40 µg de cada componente: tiamina, riboflavina, ácido nicotínico e ácido pantotênico, 80 µg de piridoxina, 10 µg de ácido <i>p</i> -aminobenzóico, 1 µg de ácido fólico, 0,1 µg de vitamina B12, 0,04 µg de biotina, e 0,5 mg de inositol	
Água destilada	100 mL
pH do meio ajustado para 6,2 - 6,5	

Solução de Sal A		Solução de Sal B	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 g	NaCl	1 g
H <sub>2</sub> O	500 mL	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
		MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	1 g
		HCl concentrado	1 mL
		H <sub>2</sub> O	500 mL

Tabela 2 – Composição mínima do meio para crescimento de *Acetobacter*  
(UNDERKOFER et al., 1958)

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

O ácido nicotínico requerido para o crescimento de *A. suboxydans*, é necessário, conforme Sarett & Cheldelin (1945 apud ASAI, 1968), para a síntese de piridinanucleotídeos.

Pantotenato é necessário para o crescimento de *A. ascendans*, *A. capsulatus*, *A. pasteurianus*, *A. turbidans* (HALL et al., 1953 apud ASAI, 1968) e *A. gluconicus* (RAINBOW & MITSON, 1953 apud ASAI, 1968) e é um importante constituinte da molécula CoA. O requerimento de ácido pantotênico por bactérias acéticas foi estudado com *A. suboxydans* ATCC 621 em relação as etapas da síntese de CoA.

Brown & Snell (1953, apud ASAI, 1968) verificaram que o composto, cisteína pantotenil teve uma forte ação no crescimento de *A. suboxydans* ATCC 621. Acreditava-se que essa substância era um intermediário na síntese de

panteteína a partir de pantotenato. Os mesmos autores (1954 apud ASAI, 1968) descobriram que o efeito da cisteína-pantotenil e panteteína no crescimento de *A. suboxydans* ATCC 621, em um meio livre de ácido pantotênico, foi grandemente aumentado com a autoclavagem do meio ou com a presença de agentes redutores. Foi obtido maior efeito com mercaptídeos de mercúrio, de cisteína-pantotenil e panteteína. Concluiu-se que compostos -SH e não -S-S- servem como fatores de crescimento. O efeito da fosfopanteteína e CoA no crescimento de microrganismos também aumentou com a adição de agentes redutores.

Brown et al. (1955 apud ASAI, 1968) concluíram que a atividade desses compostos foi atribuída à: presença de grupos -SH que permitem uma eficiente absorção apesar do grupo carboxil ionizado e a habilidade de *A. suboxydans* de hidrolisar facilmente os conjugados de ácido pantotênico. Sarett e Cheldelin (1945 apud ASAI, 1968) descreveram a utilização de *A. suboxydans* em bioensaios de pantoil lactona. Hall et al. (1954 apud ASAI, 1968) observaram o efeito de pantoil lactona no crescimento de outras espécies de *Acetobacter* em um meio deficiente de ácido pantotênico. O efeito desse composto foi mais evidente em um pH inicial de 6,2 do que em pH menores.

### 3.2 PREPARO DE INÓCULO DE BACTÉRIAS ACÉTICAS

Trabalhos recentes (SPINOSA, 2002; SOKOLLEK & HAMMES, 1997) relatam que uma contagem  $\geq 1,0 \times 10^9$  células/mL é essencial para a produção de um inóculo para bactérias acéticas.

Spinosa (2002) descreve os seguintes passos para o preparo de inóculo: partindo-se de uma quantia de 0,1 mL da cultura purificada, armazenada a  $-196^{\circ}\text{C}$  ou de uma alçada leve da cultura mantida em *slant* no meio de cultivo *MYP* a  $5^{\circ}\text{C}$ : descongelamento à temperatura ambiente, quando o caso; inoculação em um tubo de 22 x 250 mm, com 5 mL do meio de cultivo *MYP*; encaminhamento para incubadora rotatória a 120 rpm por 48 horas, com volume total transferido para um Erlenmeyer de 250 mL, com 50 mL do mesmo meio e incubado nas mesmas condições anteriores. Acompanha-se o crescimento da população pela contagem total em câmara de *Neubauer* até obtenção de inóculo com no mínimo  $1,0 \times 10^9$  células/mL, utilizando-se o corante vital azul *Trypan*.

### 3.3 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

Geralmente, em processos fermentativos, estão envolvidas muitas variáveis. Com um número muito grande de variáveis, torna-se praticamente inviável realizar todos os experimentos necessários para estudar as suas influências pelos métodos tradicionais. Neste caso, é aconselhável, realizar uma fração do planejamento fatorial, para minimizar o trabalho de laboratório. Depois de analisar os resultados dessa fração, o pesquisador poderá decidir se vale a pena fazer os ensaios restantes. Se os resultados indicarem que só algumas variáveis são importantes, pode-se introduzir novas variáveis, ou alterar os níveis das já estudadas, em busca de obter melhores repostas (BARROS-NETO et al., 1995).

Segundo Barros-Neto et al. (1995) a essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que procuramos. Já a decisão de adotar um método de planejamento experimental para um estudo envolvendo muitas variáveis possibilita a execução de forma organizada e a realização de um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Permite ainda a verificação dos efeitos individuais e interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo e a avaliação dos erros experimentais.

O uso de técnicas de planejamento por fatoriais fracionários na formulação de meios possibilita em poucos ensaios, a triagem de variáveis usando um número mínimo de ensaios. Essas técnicas permitem a avaliação dos efeitos principais de até sete parâmetros em dois níveis, em apenas oito ensaios (BOX et al., 1987).

## 4. MATERIAL & MÉTODOS

### 4.1 *Microrganismos*

Utilizou-se linhagem de *Acetobacter* sp. selecionada por Spinosa (2002), mantida em coleção de cultura particular e identificada com o número 086/06, e linhagem padrão de *Acetobacter aceti* (Pasteur) Beijerinck CCT 2565.

Estas linhagens foram preservadas em nitrogênio líquido, acondicionadas em criotubos a -196°C com crioprotetor extrato de malte 20% (SPINOSA, 2002).

### 4.2 *Meios de Cultura*

- Meio de crescimento - *MYP* (DE LEY et al., 1984)

---

extrato de levedura	5 g
manitol	25 g
peptona bacteriológica	3 g
água destilada e deionizada	1000 ml

---

- Meio de crescimento modificado *MYP 1*

---

extrato de levedura	2,5 g
manitol	25 g
peptona bacteriológica	1,5 g
água destilada e deionizada	1000 ml

---

- Meio de crescimento modificado *MYP 2*

---

extrato de levedura	1,25 g
manitol	25 g
peptona bacteriológica	0,75 g
água destilada e deionizada	1000 ml

---

---

- Meio de crescimento modificado *MYP 3*

---

extrato de levedura	0,625 g
manitol	25 g
peptona bacteriológica	0,375 g
água destilada e deionizada	1000 ml

---

- Meio de crescimento modificado *MYP 4*

---

extrato de levedura	0,3125 g
manitol	25 g
peptona bacteriológica	0,1875 g
água destilada e deionizada	1000 ml

---

- Meio basal (modificado de Rao & Stokes apud Asai, 1968)

---

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
manitol	25 g
minerais (macronutrientes)*	5 mL
água destilada e deionizada	1000 ml

---

\* KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100,0 g/L + K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100,0 g/L + MgSO<sub>4</sub> 40 g/L

O pH dos meios utilizados neste trabalho foi ajustado para 6,0.

### 4.3 Estudo do requerimento nutricional

#### 4.3.1 Preparo de inóculo

Foram testadas duas técnicas para garantir que os nutrientes provenientes do meio de cultura usado na produção do inóculo não interferissem no teste de seleção de minerais, vitaminas e fator de crescimento. Em primeiro lugar foi testada a metodologia descrita por Oliva Neto e Yokoya (1991) onde as células de bactérias acéticas foram lavadas com solução de EDTA 25 mM, centrifugadas e

ressuspendidas em solução salina 0,85% (p/v). Como essa metodologia mostrou-se inadequada, testou-se o cultivo de bactérias acéticas em meios de cultivo MYP modificados contendo concentrações decrescentes de extrato de levedura e peptona.

Essa técnica deveria garantir o fornecimento de minerais e vitaminas em quantidade mínima no meio de cultura de modo que promovesse o crescimento do microrganismo até uma população igual ou superior a  $10^9$  células/mL. Além disso, buscou-se não interferir na resposta crescimento, nos experimentos de requerimento de minerais, vitaminas e fator de crescimento das bactérias acéticas.

Inoculou-se 0,1 mL da cultura reativada em *MYP* padrão em 5 mL, de cada um dos quatro meios de cultura, com concentrações decrescentes de extrato de levedura e peptona. A suspensão de bactérias foi transferida para *erlenmeyer* com 50 mL do respectivo meio, na proporção de 1:10. A Tabela 3 mostra as concentrações dos componentes dos meios de cultivo *MYP* padrão e modificados.

Tabela 3 – Concentrações dos componentes do meio *MYP*

Componentes	<i>MYP</i> padrão	<i>MYP</i> 1	<i>MYP</i> 2	<i>MYP</i> 3	<i>MYP</i> 4
Extrato de Levedura (g/L)	5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Peptona (g/L)	3	1,5	0,75	0,375	0,1875
Manitol (g/L)	25	25	25	25	25
Água ultra-purificada (q.s.p.)	1000	1000	1000	1000	1000

Para o estudo da capacidade de crescimento do microrganismo nos diferentes meios *MYP* modificados, uma alíquota de 0,1 mL da cultura em meio

MYP incubado durante 24 horas a 30°C e 120 rpm, foi transferida assepticamente para tubos contendo 5 mL dos meios modificados MYP 1, MYP 2, MYP 3 e MYP 4. A resposta avaliada foi a medida da população crescida após o tempo de incubação, 30°C, 120 rpm por 48 horas. Após a seleção do meio de cultivo em que se obteve o melhor resultado, repetiu-se o ensaio por sete ciclos, determinando-se o crescimento do microorganismo.

Para realização dos testes de requerimento nutricional das bactérias acéticas utilizou-se esses inóculos, produzidos no meio *MYP 3*, com população sempre superior a  $1,0 \times 10^9$  células/mL. Esse procedimento foi modificado a partir do trabalho de Spinosa (2002).

A cultura estudada acondicionada em criotubo foi transferida, assepticamente, para tubo de ensaio contendo meio de crescimento *MYP* (DE LEY et al., 1984), na proporção de 1:50 (inóculo / meio de cultura). O tubo foi incubado durante 48 horas sob agitação a 120 rpm a 30°C e uma alíquota de 0,1 mL do meio de cultura foi transferido para tubo contendo 5 mL do meio de crescimento *MYP 3*. O tubo foi incubado durante 48 horas a 30°C e 120 rpm. Após esse período, o meio foi transferido para frasco *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 50 mL do meio *MYP 3* e incubado nas mesmas condições descritas anteriormente.

A garantia da não interferência da concentração dos componentes, minerais e vitaminas remanescentes do extrato de levedura e peptona, presentes no inóculo, foi comprovada através da medida do crescimento em meios de cultivo controle preparados a partir do meio basal conforme descrito na Tabela 4. Este

ensaio foi conduzido junto com os experimentos de fatoriais incompletos para estudo do requerimento de minerais, vitaminas e fator de crescimento

Tabela 4. Formulação dos meios de cultivo controle

Meios de cultivo controle	Meio basal			Testes de seleção	
	Fonte C	Fonte N	Minerais (macro)	Vitaminas	Minerais em estudo
Controle 1	+	+	+	+	
Controle 2	+	+	+		+
Controle 3	+	+	+		
Controle 4	+	+			

(+) presente, nas concentrações citadas nos itens 4.2 e 4.3.2

Ou seja, no meio de cultivo controle 1 não houve a adição de minerais em estudo no meio basal, no meio de cultivo controle 2 não houve a adição de vitaminas no meio basal. No meio de cultivo controle 3 não foram adicionados minerais e vitaminas em estudo também no meio basal e o meio de cultivo controle 4 foi preparado sem adição dos minerais e vitaminas em estudo e minerais (macronutrientes). A proporção do inóculo em todos os testes foi de 5% (v/v), igualmente usada nos testes fatoriais e superfície de resposta. Mediu-se o crescimento e as células viáveis ao microscópio com auxílio de uma câmara de Neubauer e do corante vital azul *Trypan* (Spinosa, 2002).

A condução desses testes se deu antes do início do experimento estatístico fatorial incompleto.

#### *4.3.2 Planejamento fatorial para estudo qualitativo de requerimento de minerais, vitaminas e fator de crescimento de bactérias acéticas*

Os minerais utilizados e suas concentrações foram 0,5 mg/L de boro; 0,5 mg/L de molibdênio; 0,5 mg/L de zinco; 10 mg/L de ferro e 10 mg/L de manganês (RAO & STOKES apud Asai, 1968).

As vitaminas utilizadas no experimento e suas concentrações foram 1mg/L de tiamina; 0,2 mg/L de ácido nicotínico; 0,5 mg/L de ácido pantotênico; 800 mg/L de piridoxina; 0,2 mg/L de ácido *p*-aminobenzóico (Paba) 0,2 mg/L; 0,8 mg/L de biotina; 1 mg/L de cianocobalamina (vitamina B12); e o fator de crescimento utilizado foi 5 mg/L de Inositol (RAO & STOKES apud Asai, 1968).

O crescimento foi estimado pela medida da densidade ótica (D.O.), dada em absorvância, em espectrofotômetro UV-Vis, com comprimento de onda ( $\lambda$ ) 600 nm. Foram feitas medidas nos tempos 0 e 96 horas após a inoculação.

##### *4.3.2.1 Estudo do requerimento de minerais de bactérias acéticas*

O ensaio utilizou todas as vitaminas em concentrações fixas, alternando-se as concentrações dos minerais, conforme planejamento fatorial incompleto  $2^{(5-1)}$ . (Tabela 6). A Tabela 5 mostra as concentrações de minerais utilizadas no experimento.

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

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

Tabela 6 – Planejamento fatorial  $2^{(5-1)}$  para estudo do efeito de minerais no cultivo de bactérias acéticas

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

Os resultados obtidos foram avaliados usando o programa Statistica 5.0. A partir desses resultados foram determinados quais dos minerais estudados foram essenciais para o crescimento dos microrganismos.

#### 4.3.2.2 Estudo do requerimento de vitaminas e fator de crescimento das bactérias acéticas

Este teste utilizou todos os minerais em concentrações fixas, alternando-se as vitaminas, com concentrações fixas, conforme planejamento fatorial incompleto  $2^{(8-3)}$  (Tabela 8). A Tabela 7 mostra as os valores decodificados utilizados no estudo do efeito das vitaminas e fator de crescimento no cultivo de bactérias acéticas.

Tabela 7 – Valores decodificados utilizados no planejamento fatorial  $2^{(8-3)}$  para estudo do efeito de vitaminas e fator de crescimento no cultivo de bactérias acéticas

Nutrientes	Codificação das variáveis / Concentração (mg/L)		
	- 1	0	+ 1
Paba	0,0	0,1	0,2
Tiamina	0,0	0,5	1,0
Ácido Nicotínico	0,0	0,1	0,2
Ácido Pantotênico	0,0	0,25	0,5
Inositol	0,0	2,5	5,0
Piridoxina	0,0	400,0	800,0
Biotina	0,0	0,4	0,8
Cianocobalamina	0,0	0,5	1,0

Tabela 8 - Planejamento fatorial  $2^{(8-3)}$  para estudo do efeito de vitaminas e fator de crescimento no cultivo de bactérias acéticas

Exp.	Paba	Tiamina	Nicotínico	Pantotênico	Inositol	Piridoxina	Biotina	Cianocobalamina
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	+1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
3	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1
4	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
6	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9	+1	-1	1	+1	+1	-1	-1	-1
10	+1	-1	1	+1	-1	-1	-1	+1
11	+1	-1	1	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	-1	1	-1	-1	-1	+1	-1
13	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
14	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
15	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
17	-1	1	1	+1	+1	-1	-1	+1
18	-1	+1	1	+1	-1	-1	-1	-1
19	-1	+1	1	-1	+1	-1	+1	-1
20	-1	+1	1	-1	-1	-1	+1	+1
21	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
22	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1
23	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	+1
24	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1
25	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	-1
26	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
27	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
28	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1
29	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1
30	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
31	-1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	-1
32	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1
33 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0
34 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0

Os resultados obtidos foram avaliados usando o programa Statistica 5.0. A partir desses resultados foram determinados quais vitaminas e fator de crescimento estudados foram essenciais para o crescimento dos microrganismos.

#### 4.3.3 Ensaio quantitativo de requerimento de minerais e vitaminas

A partir dos resultados obtidos no estudo qualitativo, realizaram-se os testes para determinação quantitativa das necessidades nutricionais dos organismos em estudo.

Utilizou-se a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) como ferramenta estatística para determinação das concentrações ótimas dos minerais e vitaminas selecionados nos testes anteriores. As variáveis do teste com a linhagem 086/06 estão descritos na Tabela 9 e as da linhagem padrão CCT 2565 na Tabela 11.

Tabela 9 – Valores decodificados utilizados na Metodologia de Superfície de Resposta no estudo do efeito da concentração dos minerais e das vitaminas do meio de cultivo, no crescimento da linhagem 086/06

Nutrientes	Codificação da MSR / Concentração (mg/L)				
	-2	- 1	0	+ 1	+2
Molibdênio	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
Boro	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Zinco	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1
Ferro	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Manganês	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Paba	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25
Piridoxina	500,0	600,0	700,0	800,0	900,0
Cianocobalamina	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5

Os experimentos foram realizados segundo o desenho experimental descrito nas Tabelas 10 e 12.

Tabela 10 – Planejamento experimental (MSR) para estudo do efeito de minerais e vitaminas do meio de cultivo, no crescimento da linhagem 086/06

Exp.	Mo	B	Zn	Fe	Mn	PABA	Piridox	B12
1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
2	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
4	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
5	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1
7	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1
8	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	-1
9	-1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	+1
10	+1	+1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
11	+1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
12	+1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
13	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
14	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
16	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1
17	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1
18	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1
19	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	+1
20	-1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1
21	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
22	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1
23	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1
24	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1
25	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
26	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1
27	-1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
28	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
29	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1
30	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
31	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
32	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
33	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
34	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
35	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
36	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
37	-2	0	0	0	0	0	0	0
38	+2	0	0	0	0	0	0	0
39	0	-2	0	0	0	0	0	0
40	0	+2	0	0	0	0	0	0
41	0	0	-2	0	0	0	0	0
42	0	0	+2	0	0	0	0	0
43	0	0	0	-2	0	0	0	0

Exp.	Mo	B	Zn	Fe	Mn	PABA	Piridox	B12
44	0	0	0	+2	0	0	0	0
45	0	0	0	0	- 2	0	0	0
46	0	0	0	0	+ 2	0	0	0
47	0	0	0	0	0	- 2	0	0
48	0	0	0	0	0	+ 2	0	0
49	0	0	0	0	0	0	- 2	0
50	0	0	0	0	0	0	+ 2	0
51	0	0	0	0	0	0	0	- 2
52	0	0	0	0	0	0	0	+ 2
53 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0
54 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 11 – Valores decodificados utilizados na Metodologia de Superfície de Resposta no estudo do efeito da concentração dos minerais e das vitaminas do meio de cultivo, no crescimento da linhagem padrão CCT 2565

Nutrientes	Codificação da MSR / Concentração (mg/L)				
	-2	- 1	0	+ 1	+2
Boro	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Ferro	8,0	10,0	12,0	14,0	16,0
Paba	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Tiamina	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Ácido nicotínico	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

Tabela 12 – Planejamento experimental (MSR) para estudo do efeito de minerais e vitaminas do meio de cultivo, no crescimento da linhagem padrão CCT 2565

Experimento	Boro	Ferro	Paba	tiamina	Ác. nicotínico
1	- 1	- 1	- 1	- 1	+ 1
2	- 1	- 1	- 1	+ 1	- 1
3	- 1	- 1	+ 1	- 1	- 1
4	- 1	- 1	+ 1	+ 1	+ 1
5	- 1	+ 1	- 1	- 1	- 1
6	- 1	+ 1	- 1	+ 1	+ 1
7	- 1	+ 1	+ 1	- 1	+ 1
8	- 1	+ 1	+ 1	+ 1	- 1
9	- 1	- 1	- 1	- 1	- 1
10	+ 1	- 1	- 1	+ 1	+ 1
11	+ 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1
12	+ 1	- 1	+ 1	+ 1	- 1
13	+ 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1
14	+ 1	+ 1	- 1	+ 1	- 1
15	+ 1	+ 1	+ 1	- 1	- 1
16	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1
17	- 2	0	0	0	0
18	+ 2	0	0	0	0
19	0	- 2	0	0	0
20	0	+ 2	0	0	0
21	0	0	- 2	0	0
22	0	0	+ 2	0	0
23	0	0	0	- 2	0
24	0	0	0	+ 2	0
25	0	0	0	0	- 2
26	0	0	0	0	+ 2
27 (C)	0	0	0	0	0
28 (C)	0	0	0	0	0
29 (C)	0	0	0	0	0

Para a verificação da aplicabilidade do modelo, procedeu-se um ensaio adicionando-se ao meio basal as quantidades indicadas de cada componente selecionado na etapa de seleção quantitativa de nutrientes, conforme descrito nas Tabelas 13 e 14. As formulações dos meios testados, segundo o modelo, são as

condições de obtenção de máxima produção de massa celular. As condições de incubação são as mesmas utilizadas nos testes anteriores.

Tabela 13. Composição dos nutrientes adicionados ao meio basal para validação do modelo experimental da otimização do meio de cultivo da linhagem 086/06

Componentes do meio de cultura	<i>Concentração dos componentes (mg/L)</i>	
	Meio 1	Meio 2
Molibdênio	0,4	0,4
Boro	0,6	0,6
Zinco	1,1	1,1
Ferro	12,0	12,0
Manganês	12,0	12,0
Paba	0,25	0,25
Piridoxina	900	900
Cianocobalamina	2,75	2,5

Tabela 14. Composição dos nutrientes adicionados ao meio basal para validação do modelo experimental da otimização do meio de cultivo da linhagem CCT 2565

Componentes do meio de cultura	<i>Concentração dos componentes (mg/L)</i>	
	Meio 3	Meio 4
Boro	0,60	0,60
Ferro	16,0	16,0
Paba	0,55	0,55
Tiamina	0,25	0,25
Ácido nicotínico	0,50	0,10

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO DO REQUERIMENTO NUTRICIONAL

#### 5.1.1 Preparo de inóculo

De acordo com a literatura (SPINOSA, 2002; SOKOLLEK & HAMMES, 1997) um inóculo para ser viável deve apresentar população igual ou superior a  $10^9$  células por mL. Quando usou-se inóculo preparado no meio *MYP* sem o procedimento de centrifugação, lavagem e ressuspensão das células, os componentes presentes, fonte de minerais, vitaminas e fator de crescimento interferiram nos resultados de crescimento obtidos durante a condução dos testes de seleção. Por essa razão, a técnica de preparo do inóculo teve que ser modificada a partir do método proposto por Spinosa (2002) devido à natureza dos experimentos delineados no estudo.

Recorreu-se então ao procedimento de centrifugação das células, posterior lavagem com solução de EDTA 25 mM e ressuspensão em solução salina 0,85% (p/v). Isso, no entanto, mostrou-se inadequado para eliminar a interferência dos nutrientes presentes nos diversos meios de cultura, pois, após esse procedimento, as bactérias não cresciam, quando inoculadas no meio de teste. Confirmou-se a fragilidade e a dificuldade de manipulação das bactérias acéticas, relatadas em trabalhos anteriores (KITTELMANN et al., 1989; SIEVERS et al., 1992; SOKOLLEK & HAMMES, 1997; SPINOSA, 2002).

Testou-se outro procedimento para solucionar o problema. Para minimizar o efeito sinérgico buscou-se a concentração mínima dos componentes do meio *MYP*, de tal forma que não influenciasse no crescimento bacteriano nos testes de seleção de minerais, vitaminas e fator de crescimento requeridos pelas bactérias em estudo. A Tabela 15 descreve os resultados obtidos nas contagens das células viáveis ao microscópio com auxílio de uma câmara de Neubauer e do corante vital azul *Trypan* (SPINOSA, 2002).

Tabela 15 – Contagens de células viáveis (células/mL) em câmara de Neubauer após 48h de incubação (30°C, 120rpm) com corante vital Azul *Trypan*

Linhagem	<i>MYP</i> 1	<i>MYP</i> 2	<i>MYP</i> 3	<i>MYP</i> 4
086/06	$1,3 \times 10^{10}$	$5,9 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$	$8,9 \times 10^8$
CCT2565	$8,3 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$

O meio selecionado foi o *MYP* 3. Conseguiu-se produzir um inóculo para as duas linhagens com população final igual ou superior a  $1 \times 10^9$  células/mL. O meio *MYP* 4 foi abandonado pois o crescimento das bactérias acéticas foi insuficiente ou baixo como no caso da linhagem *Acetobacter acetii* CCT 2565. Já os meios *MYP* 1 e 2 foram descartados pois pretendia-se trabalhar com a menor concentração de extrato de levedura e peptona possível, evitando-se assim a interferência nos testes de componentes residuais do meio nos testes de requerimento de minerais, vitaminas e fator de crescimento das bactérias acéticas.

Observou-se em microscópio ótico que com a diminuição do aporte de nutrientes, o tamanho das células diminuiu e o seu arranjo em cadeias também passou a ser pouco notado.

Conseguiu-se chegar a uma concentração mínima dos componentes complexos do meio, considerando-se os resultados obtidos nos Controles 1, 2, 3 e 4, que não apresentaram crescimento significativo durante os testes subsequentes nos tempos medidos (Tabelas 17, 18, 21 e 22). Pôde-se inferir que a concentração testada foi mínima para a produção do inóculo e não interferiu nos ensaios realizados com esse meio.

Foi possível obter crescimento durante repiques consecutivos no meio *MYP* 3, conforme a Tabela 16.

Tabela 16 – Crescimento das linhagens *Acetobacter* sp. 086/06 e *Acetobacter aceti* CCT 2565 em meio de cultivo MYP3 em ciclos consecutivos

Linhagem	D.O. 600 nm após 96 horas						
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo	7º ciclo
086/06 <i>Acetobacter</i> sp.	0,325	0,273	0,280	0,281	0,285	0,283	0,275
CCT 2565 <i>A. aceti</i>	0,292	0,258	0,300	0,291	0,298	0,296	0,290

5.1.2 Resultados do ensaio qualitativo de requerimento de minerais, vitaminas e fator de crescimento das linhagens *Acetobacter* sp. 086/06 e *Acetobacter aceti* CCT 2565

5.1.2.1 Seleção de minerais

As Tabelas 17 e 18 ilustram respectivamente o efeito de minerais no crescimento das linhagens *Acetobacter* sp. 086/06 e *Acetobacter aceti* CCT 2565 de acordo com o desenho experimental descritos no item 4.3.2.1 e Tabelas 4 e 5.

Tabela 17 – Efeito de minerais no crescimento da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06, de acordo com o desenho experimental (D.O. medida em 600 nm)

Experimento	D.O. inicial	D.O. 96 horas	$\Delta$ D.O.
1	0,025	0,025	0,000
2	0,016	0,052	0,036
3	0,025	0,033	0,008
4	0,016	0,027	0,011
5	0,022	0,874	0,852
6	0,015	0,407	0,392
7	0,021	0,032	0,011
8	0,016	0,789	0,773
9	0,019	0,063	0,044
10	0,015	0,532	0,517
11	0,023	0,625	0,602
12	0,018	0,035	0,017
13	0,025	0,037	0,012
14	0,015	0,571	0,556
15	0,028	0,040	0,012
16	0,019	0,025	0,006
17	0,018	0,019	0,002
18	0,021	0,023	0,002
C 1	0,022	0,033	0,011
C 3	0,023	0,023	0,000
C 4	0,022	0,018	-0,004

Tabela 18 – Efeito de minerais no crescimento da linhagem *Acetobacter acetii* CCT 2565, de acordo com o desenho experimental (D.O. medida em 600 nm)

Experimento	D.O. inicial	D.O. 96 horas	Δ D.O.
1	0,098	0,422	0,324
2	0,082	0,242	0,160
3	0,091	0,399	0,308
4	0,083	0,175	0,092
5	0,090	0,402	0,312
6	0,085	0,277	0,192
7	0,092	0,440	0,348
8	0,080	0,280	0,200
9	0,089	0,389	0,300
10	0,079	0,175	0,096
11	0,091	0,511	0,420
12	0,077	0,297	0,220
13	0,092	0,252	0,160
14	0,083	0,315	0,232
15	0,090	0,318	0,228
16	0,081	0,337	0,256
17	0,092	0,312	0,220
18	0,085	0,365	0,280
C 1	0,084	0,100	0,016
C 3	0,080	0,083	0,003
C 4	0,085	0,087	0,002

Pela avaliação dos resultados estatísticos, pôde-se medir a influência dos minerais selecionados sobre o crescimento celular das linhagens. Para a linhagem *Acetobacter* sp. 086/06, todos os minerais testados afetaram significativamente a resposta. Observou-se que o molibdênio (0,041) e o zinco (0,123) exerceram efeito significativo ( $P < 0,05$ ) positivo, indicando que o aumento da concentração desses componentes otimiza a resposta. Já o boro (-1,171), o ferro (-0,094) e o manganês (-0,092) exerceram, efeito significativo ( $P < 0,05$ ) negativo, indicando que a diminuição da concentração destes componentes aumenta a resposta. Para a linhagem *Acetobacter acetii* CCT 2565 somente o ferro (0,030) apresentou efeito significativo ( $P < 0,05$ ) positivo, indicando que o aumento da concentração desse

componente melhora a resposta. O mineral boro teve efeito significativo na interação com o ferro ( $P < 0,05$ ), portanto este também foi selecionado para o experimento seguinte.

Os resultados da análise de variância das respostas de crescimento celular – medida em absorvância (D.O.) – das linhagens *Acetobacter* sp. 086/06 e *Acetobacter aceti* CCT 2565, obtidas a partir do delineamento fatorial incompleto  $2^{(5-1)}$ , com 2 repetições no ponto central, estão demonstrados nas Tabelas 19 e 20, respectivamente. Observa-se que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,93613 para a linhagem *Acetobacter* sp. 086/06 ou 93,61% da variação da resposta é explicada pelo modelo. Para a linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565, o  $R^2$  foi de 0,98453 ou 98,45% da variação da resposta é explicada pelo modelo. Os experimentos de seleção de minerais para ambas as linhagens obtiveram um ótimo coeficiente de correlação, superior a 0,9, por ser um experimento biológico o valor encontrado é altamente significativo.

Tabela 19 – Análise de variância do teste de seleção de minerais para linhagem *Acetobacter* sp. 086/06

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Molibdênio	1	0,0068	0,006800	13695,13	0,005
Boro	1	0,1165	0,116500	232903,10	0,001
Zinco	1	0,0604	0,060400	120786,10	0,002
Ferro	1	0,0354	0,035400	70876,13	0,002
Manganês	1	0,0336	0,033600	67161,13	0,002
Interações	10	1,2350	0,123500	247000,00	0,050
Falta de Ajuste	1	0,1015	0,101500	202990,70	0,001
Erro Puro	1	5E-07	0,000001		
Total	17	1,5890			
Coeficiente de Correlação ( $r^2$ )			0,93613		

Tabela 20 – Análise de variância do teste de seleção de minerais para linhagem padrão *Acetobacter aceti* CCT 2565

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Molibdênio	1	2,25E-06	2,25E-06	0,036726	0,865
Boro	1	2,50E-07	2,50E-07	0,004081	0,954
Zinco	1	0,000342	0,0003420	5,586488	0,141
Ferro	1	0,003540	0,0035400	57,786900	0,016
Manganês	1	2,03E-05	2,03E-05	0,330537	0,623
Interações	10	0,003889	0,0003889	3,161788	0,098
Erro Puro	2	0,000123	6,13E-05		
Total	17	0,007918			
Coeficiente de Correlação ( $r^2$ )			0,98453		

Ao final desse experimento, chegou-se à seleção dos seguintes minerais para a linhagem *Acetobacter* sp. 086/06, ferro, boro, molibdênio, zinco, e manganês. Já para a linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565 foram somente os micronutrientes ferro e boro. Sabe-se que a função específica destes para os organismos vivos é atuar como cofator e grupo prostético de enzimas. O ferro, que foi elemento selecionado pelas duas linhagens avaliadas, participa no citocromo, é componente de catalases, peroxidases, oxidases e todas as nitrogenases. As bactérias pertencentes ao gênero *Acetobacter* são catalases positivas e oxidases negativas. Os citocromos  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_4$ , b, c,  $c_1$  e d têm sido encontrados em *Acetobacter* mas não estão sempre presentes todos juntos em uma linhagem. O citocromo  $a_1$  parece ser típico de *Acetobacter* e não tem sido detectado em *Gluconobacter*. O molibdênio tem função celular em várias enzimas que contêm flavina e em nitrogenases, redutases e algumas desidrogenases. O zinco está presente nas enzimas álcool desidrogenase e nas RNA e DNA polimerases. As desidrogenases (álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase), enzimas

fundamentais no processo de *acetificação* do álcool são responsáveis pela transferência dos elétrons do etanol e do acetaldeído para os NAD<sup>+</sup> no ciclo de conversão. Pôde-se constatar que a linhagem *Acetobacter* sp. 086/06 isolada de indústria de vinagre, requer mais micronutrientes do que aquela considerada típica. Essas necessidades talvez possam ser explicadas pelo fato de a bactéria isolada da indústria produtora de vinagre apresentar rotas metabólicas ativadas para a produção do ácido acético e aquela mantida em coleção de cultura tenha perdido devido a manipulação excessiva.

### 5.1.2.2 Seleção de vitaminas e fator de crescimento para o cultivo das bactérias acéticas *Acetobacter* sp. 086/06 e *Acetobacter aceti* CCT 2565

As Tabelas 21 e 22 ilustram respectivamente o efeito de minerais no crescimento das linhagens *Acetobacter* sp. 086/06 e *Acetobacter aceti* CCT 2565 de acordo com o desenho experimental descritos no item 4.3.2.2 e Tabelas 6 e 7.

Tabela 21 – Efeito de fator de crescimento e vitaminas no crescimento da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06, de acordo com o desenho experimental fatorial (D.O. medida em 600 nm)

Experimento	D.O. inicial	D.O. 96 horas	$\Delta$ D.O.
1	0,076	0,103	0,027
2	0,074	0,114	0,040
3	0,077	0,100	0,023
4	0,075	0,120	0,045
5	0,075	0,169	0,094
6	0,073	0,212	0,139
7	0,077	0,173	0,096
8	0,075	0,154	0,079
9	0,075	0,162	0,087
10	0,073	0,160	0,087
11	0,079	0,180	0,101
12	0,073	0,122	0,049
13	0,078	0,091	0,013
14	0,076	0,096	0,020
15	0,082	0,082	0,000
16	0,077	0,099	0,022
17	0,078	0,167	0,089
18	0,071	0,159	0,088
19	0,080	0,168	0,088
20	0,075	0,183	0,108
21	0,079	0,109	0,030
22	0,075	0,088	0,013
23	0,076	0,093	0,017
24	0,075	0,100	0,025
25	0,079	0,113	0,034
26	0,076	0,092	0,016
27	0,078	0,103	0,025
28	0,077	0,118	0,041
29	0,082	0,208	0,126
30	0,075	0,168	0,093
31	0,078	0,138	0,060
32	0,078	0,183	0,105
33	0,078	0,162	0,084
34	0,073	0,165	0,092
C 2	0,075	0,092	0,017
C 3	0,077	0,080	0,003
C 4	0,075	0,078	0,003

Tabela 22 – Efeito de fator de crescimento e vitaminas no crescimento da linhagem *Acetobacter acetii* CCT 2565, de acordo com o desenho experimental fatorial (D.O. medida em 600 nm)

Experimento	D.O. inicial	D.O. 96 horas	$\Delta$ D.O.
1	0,051	0,180	0,129
2	0,049	0,178	0,129
3	0,050	0,167	0,117
4	0,053	0,178	0,125
5	0,045	0,155	0,110
6	0,045	0,153	0,108
7	0,047	0,165	0,118
8	0,048	0,188	0,140
9	0,047	0,179	0,132
10	0,044	0,162	0,118
11	0,045	0,171	0,126
12	0,045	0,161	0,116
13	0,050	0,170	0,120
14	0,047	0,183	0,136
15	0,050	0,158	0,108
16	0,047	0,157	0,110
17	0,044	0,160	0,116
18	0,044	0,171	0,127
19	0,039	0,130	0,091
20	0,048	0,183	0,135
21	0,045	0,157	0,112
22	0,046	0,178	0,132
23	0,049	0,150	0,101
24	0,050	0,173	0,123
25	0,047	0,164	0,117
26	0,046	0,181	0,135
27	0,048	0,159	0,111
28	0,047	0,150	0,103
29	0,045	0,141	0,096
30	0,045	0,117	0,072
31	0,044	0,114	0,070
32	0,047	0,106	0,059
33	0,046	0,172	0,126
34	0,046	0,167	0,121
C 2	0,047	0,071	0,024
C 3	0,046	0,050	0,004
C 4	0,046	0,049	0,003

Verificou-se a influência significativa ( $P < 0,05$ ) negativa do ácido *p*-aminobenzóico (-0,012) e da piridoxina (-0,078) e o efeito positivo da cianocobalamina (0,012) sobre o crescimento celular da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06. Esses resultados indicam que, para essa linhagem, acréscimos na concentração da cianocobalamina e a diminuição das concentrações do ácido *p*-aminobenzóico e a piridoxina aumentam a resposta. Para a linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565 o ácido *p*-aminobenzóico (0,016), a tiamina (0,012) e o ácido nicotínico (0,013) apresentaram efeito significativo ( $P < 0,05$ ) positivo, indicando o aumento da concentração desses componentes otimizam a resposta.

Os resultados da análise de variância das respostas de crescimento celular – medida em absorvância (D.O.) – das linhagens de *Acetobacter* sp. 086/06 e *Acetobacter aceti* CCT 2565, obtidas a partir do delineamento fatorial incompleto  $2^{(8-3)}$ , com duas repetições no ponto central, estão demonstrados nas Tabelas 23 e 24, respectivamente.

Tabela 23 – Análise de variância do teste de requerimento de vitaminas e fator de crescimento para a linhagem de *Acetobacter* sp. 086/06

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
p-aminobenzóico	1	0,001128	0,001128	250,6944	0,040
Tiamina	1	3,20E-05	3,20E-05	7,111111	0,228
Nicotínico	1	0,000595	0,000595	132,25	0,055
Pantotênico	1	6,05E-05	6,05E-05	13,444440	0,169
Inositol	1	0,000072	0,000072	16,00	0,155
Priridoxina	1	0,048985	0,048985	10885,44	0,006
Biotina	1	0,000190	0,000190	42,25	0,097
Cianocobalamina	1	0,001152	0,001152	256,00	0,039
Falta de Ajuste	24	0,032406	0,001350	300,05	0,045
Erro Puro	1	4,50E-06	4,50E-06		
Total	33	0,084624			
Coeficiente de Correlação ( $r^2$ )		0,61701			

Tabela 24 – Análise de variância do teste de requerimento de vitaminas e fator de crescimento para a linhagem padrão *Acetobacter acetii* CCT 2565

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
p-aminobenzóico	1	0,001985	0,001985	8,967560	0,006
Tiamina	1	0,001176	0,001176	5,314675	0,029
Nicotínico	1	0,001275	0,001275	5,762036	0,024
Pantotênico	1	0,000666	0,000666	3,010086	0,095
Inositol	1	0,000338	0,000338	1,527355	0,227
Priridoxina	1	0,000841	0,000841	3,798052	0,062
Biotina	1	1,25E-05	1,25E-05	0,056485	0,814
Cianocobalamina	1	6,61E-05	6,61E-05	0,298806	0,589
Erro Puro	25	0,005532	0,000221		
Total	33	0,011891			
Coeficiente de Correlação ( $r^2$ )		0,53475			

Observa-se que o  $R^2$  foi de 0,6170 para a linhagem *Acetobacter* sp. 086/06 e de 0,5347 para a linhagem *Acetobacter acetii* CCT 2565. Apesar de os valores dos coeficientes de correlação não terem sido altamente significativos, considerou-se esses resultados por se tratar de experimento biológico de grande complexidade.

Seguindo o mesmo raciocínio usado para os micronutrientes, ao final da condução desse experimento chegou-se à seleção das seguintes vitaminas para a linhagem *Acetobacter* sp. 086/06, ácido *p*-aminobenzóico, piridoxina e cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>). Já para a linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565 foram ácido *p*-aminobenzóico, tiamina e ácido nicotínico. A função do ácido *p*-aminobenzóico é ser precursor do ácido fólico e este tem papel importante no metabolismo de carbono e transferência do grupo metil. A piridoxina é importante no metabolismo de aminoácidos e cetoácidos. A cianocobalamina participa da síntese de desoxiribose. A tiamina é uma vitamina que participa das reações de  $\alpha$ -descarboxilação e o ácido nicotínico é precursor do NAD envolvido nas reações de transferência de elétrons em vias metabólicas de catabolismo (MADINGAN et al. 1997).

Consta na literatura que em meios sintéticos com manitol como fonte de carbono as bactérias acéticas requerem a adição de ácido *p*-aminobenzóico, ácido nicotínico, tiamina e ácido pantotênico, tais resultados foram evidenciados nos experimentos deste estudo (GOSSELÉ et al., 1980 apud DE LEY et al., 1984).

### *5.1.3 Resultados dos ensaios quantitativos de requerimento de minerais e vitaminas para o crescimento de Acetobacter sp. 086/06 e Acetobacter aceti CCT 2565*

Após a análise do planejamento fatorial incompleto e seleção dos nutrientes, vitaminas e fator de crescimento, aplicou-se um delineamento central

composto 2<sup>5</sup> para linhagem 086/08 e 2<sup>8</sup> para linhagem padrão *Acetobacter aceti* CCT 2565 utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta, objetivando determinar o ponto máximo de obtenção de massa celular.

As variações na densidade ótica obtidas nos ensaios, estão apresentados na Tabela 25 e 26.

Tabela 25 – Efeito da concentração de minerais e vitaminas no crescimento da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06, de acordo com Metodologia da Superfície de Resposta (D.O. medida em 600 nm)

Experimento	D.O. inicial	D.O. 96 horas	Δ D.O.
1	0,021	0,084	0,063
2	0,022	0,204	0,182
3	0,023	0,232	0,209
4	0,019	0,140	0,121
5	0,020	0,264	0,244
6	0,023	0,116	0,093
7	0,023	0,228	0,205
8	0,021	0,136	0,115
9	0,025	0,260	0,235
10	0,025	0,208	0,183
11	0,022	0,092	0,070
12	0,021	0,180	0,159
13	0,023	0,220	0,197
14	0,021	0,172	0,151
15	0,018	0,112	0,094
16	0,016	0,228	0,212
17	0,018	0,236	0,218
18	0,019	0,296	0,277
19	0,017	0,276	0,259
20	0,016	0,212	0,196
21	0,020	0,284	0,264
22	0,022	0,120	0,098
23	0,023	0,380	0,357
24	0,020	0,180	0,160
25	0,022	0,108	0,086
26	0,021	0,140	0,119
27	0,024	0,200	0,176
28	0,022	0,148	0,126

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento	D.O. inicial	D.O. 96 horas	$\Delta$ D.O.
29	0,022	0,196	0,174
30	0,021	0,164	0,143
31	0,023	0,092	0,069
32	0,020	0,172	0,152
33	0,022	0,104	0,082
34	0,024	0,096	0,072
35	0,022	0,088	0,066
36	0,020	0,268	0,248
37	0,021	0,244	0,223
38	0,020	0,164	0,144
39	0,024	0,272	0,248
40	0,021	0,164	0,143
41	0,021	0,084	0,063
42	0,021	0,092	0,071
43	0,019	0,288	0,269
44	0,024	0,196	0,172
45	0,023	0,112	0,089
46	0,021	0,168	0,147
47	0,023	0,256	0,233
48	0,023	0,104	0,081
49	0,020	0,280	0,260
50	0,021	0,176	0,155
51	0,021	0,148	0,127
52	0,020	0,220	0,200
53 (C)	0,020	0,108	0,088
54 (C)	0,022	0,108	0,086

Tabela 26 – Efeito da concentração de minerais e vitaminas no crescimento da linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565, de acordo com Metodologia da Superfície de Resposta (D.O. medida em 600 nm)

Experimento	D.O. inicial	D.O. 96 horas	Δ D.O.
1	0,050	0,197	0,147
2	0,049	0,240	0,191
3	0,047	0,207	0,160
4	0,044	0,204	0,160
5	0,045	0,216	0,171
6	0,045	0,204	0,159
7	0,046	0,248	0,202
8	0,044	0,247	0,203
9	0,045	0,224	0,179
10	0,044	0,207	0,163
11	0,049	0,255	0,206
12	0,045	0,230	0,185
13	0,049	0,233	0,184
14	0,049	0,253	0,204
15	0,048	0,269	0,221
16	0,043	0,241	0,198
17	0,046	0,214	0,168
18	0,039	0,190	0,151
19	0,042	0,202	0,160
20	0,043	0,218	0,175
21	0,044	0,204	0,160
22	0,041	0,194	0,153
23	0,042	0,207	0,165
24	0,041	0,189	0,148
25	0,045	0,216	0,171
26	0,040	0,185	0,145
27 (C)	0,042	0,196	0,154
28 (C)	0,043	0,201	0,158
29 (C)	0,041	0,192	0,151

Os resultados da análise de variância das respostas massa celular medida por D.O. do delineamento composto central 2<sup>8</sup>, da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06 estão indicados na Tabela 27.

Tabela 27 – Análise de variância dos resultados para a resposta massa celular medida em D.O. do delineamento composto central 2<sup>8</sup> para a linhagem *Acetobacter* sp. 086/06

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Linear				
X1	1	0,000014	0,000014	7,163
X2	1	0,000004	0,000004	1,850
X3	1	0,000005	0,000005	2,604
X4	1	0,000128	0,000128	64,158**
X5	1	0,00000015	0,00000015	0,0748
X6	1	0,000100	0,000100	49,816**
X7	1	0,000275	0,000275	137,679**
X8	1	0,000122	0,000122	60,811**
Quadrática				
X1	1	0,000202	0,000202	100,912**
X2	1	0,000249	0,000249	124,428**
X3	1	0,000828	0,000828	413,928*
X4	1	0,000659	0,000659	329,595*
X5	1	0,000123	0,000123	61,547**
X6	1	0,000003	0,000003	1,333
X7	1	0,000490	0,000490	245,071*
X8	1	0,000043	0,000043	21,666
Interação	28	0,007913	0,000283	141,3122**
Regressão	44	0,0012	0,0002	2,1431**
Falta de Ajuste	8	0,002415	0,000302	150,9402**
Erro Puro	1	0,000002	0,000002	
Total	53	0,018225		
Coeficiente de Determinação (R2)			0,86738	

\*Significativo ao nível de 5% ( $p < 0,05$ )

\*\*Significativo ao nível de 10% ( $P < 0,10$ )

X1 – Molibdênio

X2 – Boro

X3 – Zinco

X4 – Ferro

X5 – Manganês

X6 – PABA

X7 – Piridoxina

X8 – B12

O modelo matemático, que representa o comportamento de crescimento celular da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06 em função dos minerais, vitaminas e fator de crescimento do meio de cultivo, foi:

$$y_2 = 0,018 - 0,0012 x_1 - 0,00015 x_2 - 0,00097 x_3 - 0,00089 x_4 - 0,00080 x_5 - 0,00515 x_6 - 0,00560 x_7 + 0,00450 x_8 + 0,0018 x_1^2 + 0,0028 x_2^2 - 0,0051 x_3^2 + 0,0045 x_4^2 - 0,0020 x_5^2 + 0,00028 x_6^2 + 0,0039 x_7^2 + 0,0011 x_8^2 - 0,0065 x_1x_3 - 0,0098 x_1x_4 + 0,0055 x_1x_5 + 0,0034 x_1x_6 - 0,0033 x_1x_7 - 0,0060 x_2x_3 - 0,0071 x_2x_4 + 0,0088 x_2x_6 + 0,0047 x_2x_7 + 0,0059 x_2x_8 - 0,0053 x_3x_4 - 0,0059 x_3x_6 + 0,0054 x_3x_7 + 0,0055 x_4x_5 + 0,0017 x_4x_6 + 0,0097 x_4x_8 + 0,0095 x_5x_7 - 0,0044 x_6x_7 + 0,0099 x_6x_8$$

Observa-se na Tabela 27 para a resposta avaliada, um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,86738, ou seja, 86,73% da variação da resposta é explicada pelo modelo.

A regressão foi significativa ao nível de 13% ( $P < 0,13$ ) porém, a falta de ajuste também foi significativa, indicando que o modelo não ajustou adequadamente aos dados. Entretanto, BOX & DRAPER (1987) observaram que o teste de significância para a falta de ajuste não deve ser considerado relevante quando os quadrados médios do erro puro são muito baixos. Assim, como o quadrado médio do erro puro foi de 0,000002, o modelo obtido foi utilizado na definição das melhores concentrações dos nutrientes para obter a máxima produção de células da linhagem de *Acetobacter* sp. 086/06.

Assim, na Figura 1, pode ser observada a superfície de resposta (a) e as linhas de contorno (b), na obtenção de massa celular da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06, em função das concentrações de piridoxina e vitamina B12 estudadas, fixando-se os demais micronutrientes no ponto de mínima.

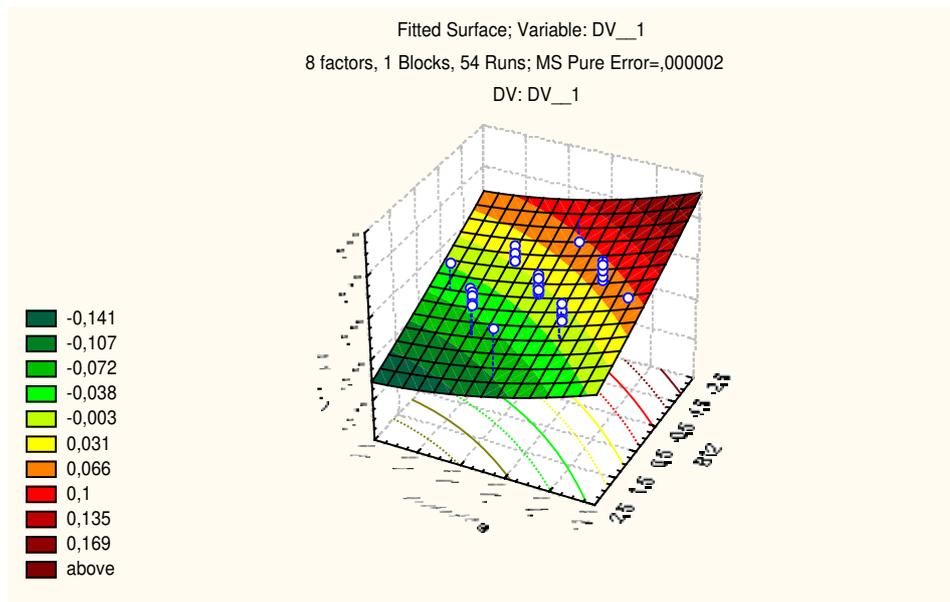


Figura 1a. Obtenção de massa celular em função das concentrações de piridoxina e vitamina B12, apresentados em superfície (linhagem *Acetobacter* sp. 086/06)

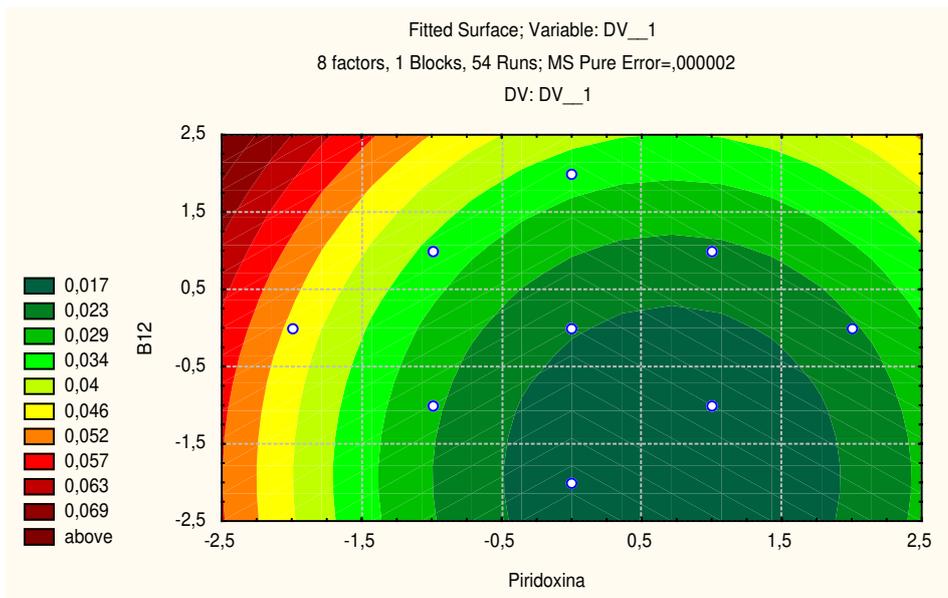


Figura 1b Obtenção de massa celular em função das concentrações de piridoxina e vitamina B12, apresentados em contorno (linhagem *Acetobacter* sp. 086/06)

Avaliando a Figura 1(b), observa-se que a obtenção máxima de massa celular corresponde concentrações acima de 2,25 mg/L (+1,5) de cianocobalamina combinado a concentrações inferiores a 450 mg/L (-2,5) de piridoxina.

As Figuras 2, mostram a superfície de resposta (2a) e as linhas de contorno (2b), da obtenção de massa celular, em função das concentrações de ferro e boro, fixando-se a cianobocalamina no ponto de máxima e o molibdênio, o zinco, o manganês, a PABA e a piridoxina no ponto de mínima.

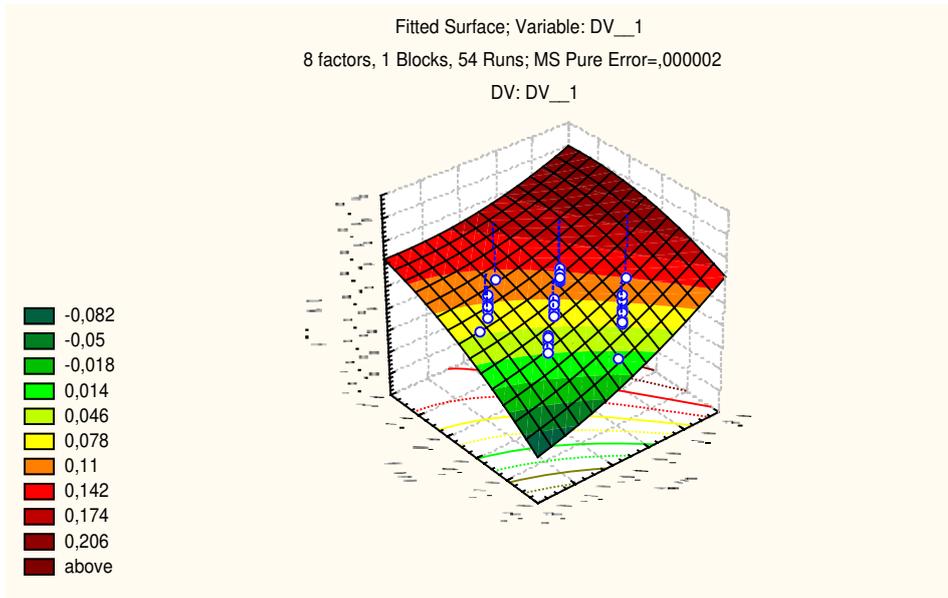


Figura 2a. Obtenção de massa celular em função das concentrações de ferro e boro, apresentados em superfície (linhagem *Acetobacter* sp. 086/06)

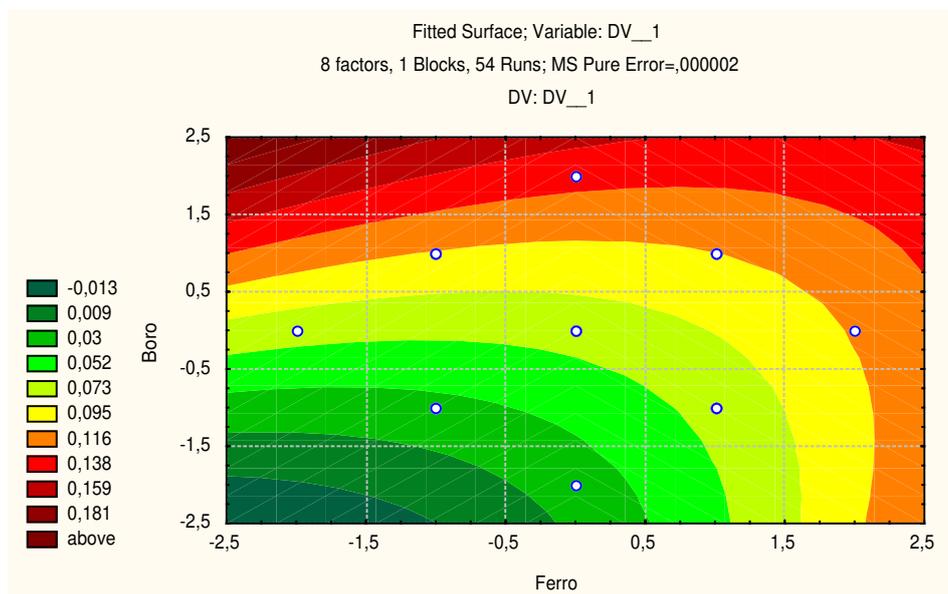


Figura 2b. Obtenção de massa celular da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06 em função das concentrações de ferro e boro, apresentados em contorno

Avaliando a Figura 2 (b), observa-se que a obtenção máxima de massa celular da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06 corresponde concentrações acima de 13 mg/L (+2,5) de ferro combinado a concentrações superiores a 0,55 mg/L (+1,5) de boro.

Na Tabela 28, simulou-se condições de cultivos dentro da região de máxima obtenção de massa celular para se obter a estimativa de massa celular pelo modelo.

Tabela 28 – Previsões do modelo para massa celular com valores dentro da máximo crescimento celular para linhagem *Acetobacter* sp. 086/06

Mo (mg/L)	B (mg/L)	Zn (mg/L)	Fe (mg/L)	Mn (mg/L)	Paba (mg/L)	Pirido xina (mg/L)	B12 (mg/L)	D.O. Valor estimado pelo modelo
0,4	0,6	1,1	12	12	0,25	900	2,75	0,295
0,8	0,6	1,1	12	12	0,25	900	2,5	0,126
0,8	0,55	1,1	13	12	0,25	950	2,25	0,112
0,75	0,55	1,1	11	12	0,25	850	2,75	0,132
0,4	0,6	1,1	12	12	0,25	900	2,5	0,256
0,4	0,3	1,1	12	12	0,25	900	2,5	0,187
0,4	0,4	1,1	12	10	0,25	900	2,5	0,188
0,4	0,4	1,1	12	8	0,15	700	2,5	0,139
0,4	0,3	0,5	12	8	0,25	900	2,5	0,131

Os resultados da análise de variância das respostas de produção de massa celular medidas por D.O. do delineamento composto central 2<sup>8</sup> para a linhagem padrão *Acetobacter aceti* CCT 2565, estão indicados na Tabela 29.

Tabela 29 – Análise de variância dos resultados para a resposta massa celular medida em D.O. do delineamento composto central 2<sup>5</sup> para linhagem *Acetobacter acetii* CCT 2565

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Linear				
X1	1	0,0002	0,0002	92,5714*
X2	1	0,0005	0,0005	200,6429*
X3	1	0,0003	0,0003	108,6429*
X4	1	0,00001	0,00001	5,78571
X5	1	0,0003	0,0003	114,2857*
Quadrática				
X1	1	0,0003	0,0003	113,2969*
X2	1	0,0005	0,0005	204,2612*
X3	1	0,0002	0,0002	81,4112*
X4	1	0,0002	0,0002	88,8898*
X5	1	0,0002	0,0002	96,6969*
Interação	10	0,0007	0,0008	0,0001
Regressão	20	0,0012	0,0002	2,1431**
Falta de Ajuste	6	0,0011	0,0002	79,8339*
Erro Puro	2	0,000005	0,0000023	
Total	28	0,794131		
Coeficiente de Determinação (R <sup>2</sup> )			0,7071	

\*Significativo ao nível de 5% ( $p < 0,05$ )

\*\*Significativo ao nível de 10% ( $P < 0,10$ )

X1 – Boro

X2 – Ferro

X3 – Ácido *p*-aminobenzoico

X4 – Tiamina

X5 – Ácido Nicotínico

O modelo matemático que representa o comportamento de crescimento celular da linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565, em função dos minerais, vitaminas e fator de crescimento, foi:

$$y_2 = 0,069 + 0,003 x_1 + 0,0044 x_2 + 0,0032 x_3 - 0,00075 x_4 - 0,0033 x_5 + 0,0033 x_1^2 + 0,0044 x_2^2 + 0,0028 x_3^2 + 0,0029 x_4^2 + 0,0030 x_5^2 - 0,0005 x_1x_2 + 0,00062 x_1x_3 - 0,0025 x_1x_4 + 0,00075 x_1x_5 + 0,0029 x_2x_3 - 0,00075 x_2x_4 - 0,0005 x_2x_5 - 0,0026 x_3x_4 + 0,0034 x_3x_5 - 0,0035 x_4x_5$$

Observa-se na Tabela 29 para a resposta avaliada, um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,7071, ou seja, 70,71% da variação da resposta é explicada pelo modelo. Vale lembrar que este percentual, de variação explicada, é aceitável em experimentos biológicos em função da complexidade destes processos.

A regressão foi significativa porém, a falta de ajuste também foi significativa, indicando que o modelo não se ajustou adequadamente aos dados. Entretanto, BOX e DRAPER (1987) observaram que o teste de significância para a falta de ajuste não deve ser considerado relevante quando os quadrados médios do erro puro são muitos baixos. Assim, como o quadrado médio do erro puro foi de 0,0000023, o modelo obtido foi utilizado para definir as melhores concentrações dos nutrientes para obter a máxima produção de células da linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565 de *Acetobacter*.

Assim, nas Figuras 3, podem ser observadas a superfície de resposta (3a) e as linhas de contorno (3b), na obtenção de massa celular da linhagem de *Acetobacter aceti* CCT 2565, em função das concentrações de tiamina e ácido *p*-

aminobenzóico estudados, fixando-se o boro, o ferro e o ácido nicotínico no ponto de máxima.

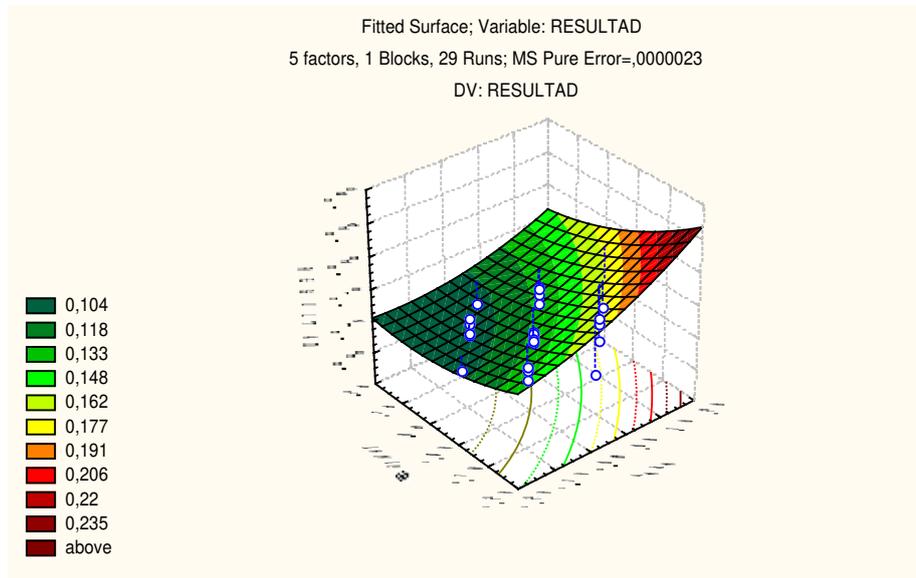


Figura 3a. Obtenção de massa celular em função das concentrações de tiamina e ácido *p*-aminobenzóico, apresentados em superfície (linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565)

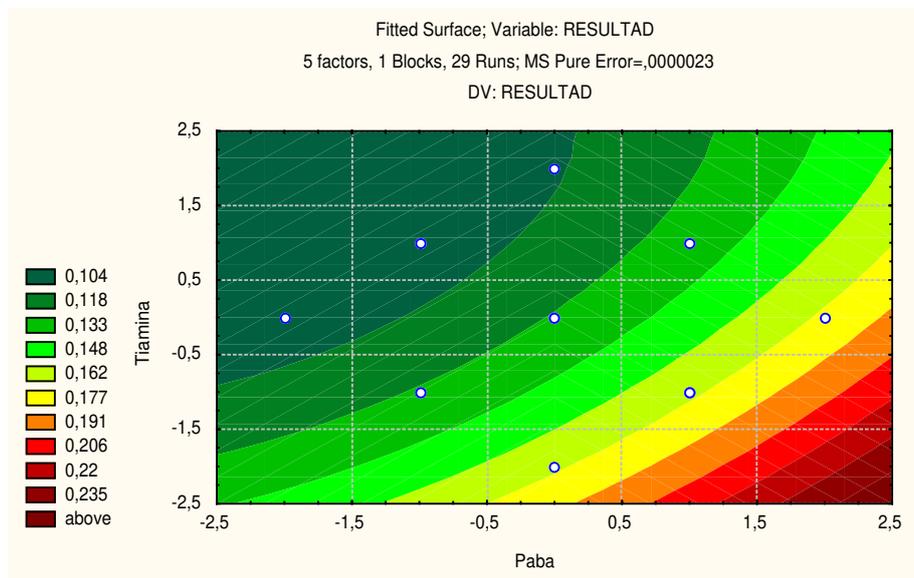


Figura 3b. Obtenção de massa celular em função das concentrações de tiamina e ácido *p*-aminobenzóico, apresentados em contorno (linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565)

Avaliando a Figura 3(b), observa-se que a obtenção máxima de massa celular corresponde a concentrações acima de 0,45 mg/L (+1,5) de ácido *p*-aminobenzóico combinado a concentrações menores de 1,25 mg/L (-0,5) de tiamina.

As Figuras 4 mostram a superfície de resposta (4a) e as linhas de contorno (4b), da obtenção de massa celular, em função das concentrações de ferro e boro, fixando-se o ácido *p*-aminobenzóico no ponto de máxima e a tiamina e o ácido nicotínico no ponto de mínima.

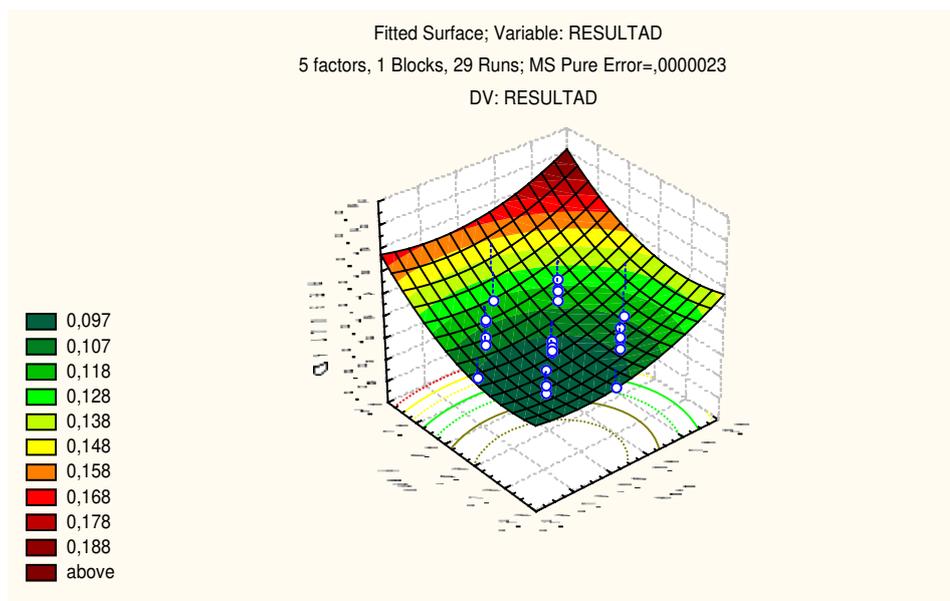


Figura 4a. Obtenção de massa celular em função das concentrações de ferro e boro, apresentados em superfície (linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565)

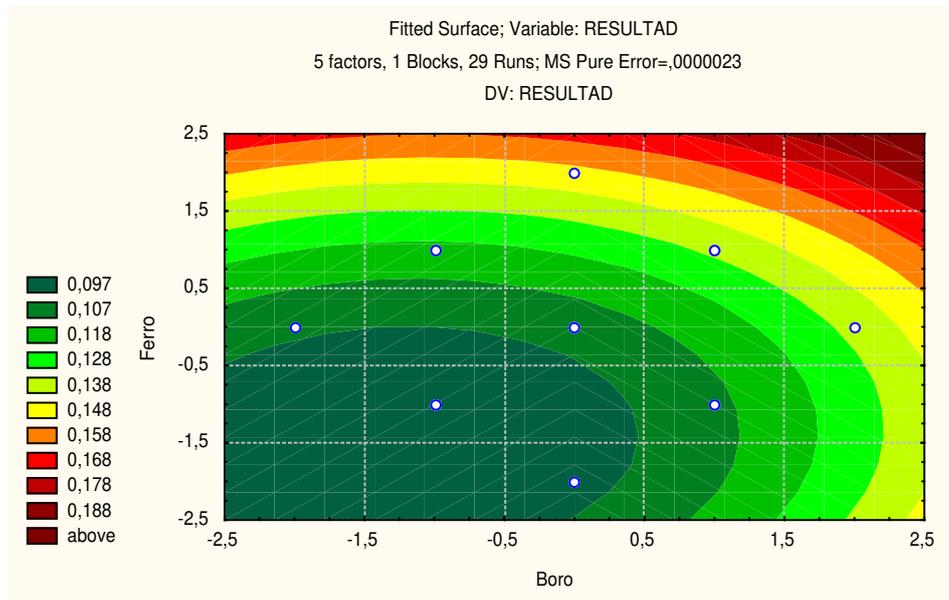


Figura 4b. Obtenção de massa celular em função das concentrações de ferro e boro, apresentados em contorno (linhagem *Acetobacter aceti* CCT 2565)

Na Tabela 30, simulou-se condições de cultivos dentro da região de máxima obtenção de massa celular estimada pelo modelo.

Tabela 30 – Previsões do modelo para obtenção de massa celular de *Acetobacter aceti* CCT 2565 com valores dentro do máximo crescimento celular

Boro (mg/L)	Ferro (mg/L)	Paba (mg/L)	Tiamina (mg/L)	Nicotínico (mg/L)	D.O. Valor estimado pelo modelo
0,6	16	0,55	0,25	0,5	0,249
0,6	16	0,5	2,5	0,5	0,137
0,6	16	0,5	0,5	0,1	0,171
0,5	14	0,5	1,0	0,2	0,117
0,6	16	0,5	1,5	0,3	0,144
0,6	16	0,5	1,0	0,2	0,155
0,6	16	0,5	1,0	0,1	0,157
0,6	16	0,5	0,25	0,1	0,181
0,6	16	0,55	0,25	0,1	0,192

Testou-se experimentalmente o cultivo das linhagens *Acetobacter* sp. 086/06 e *Acetobacter aceti* CCT 2565, nas condições determinadas pela Metodologia da Superfície de Resposta no qual se obteve crescimento máximo, como descrito no item 4.3.3. As condições avaliadas e os resultados obtidos estão ilustrados nas Tabelas 31 e 32.

Tabela 31. Composição dos meios de cultivo obtidos pelo planejamento experimental e resultados da produção de massa celular de *Acetobacter* sp. 086/06

Componentes do meio de cultura	Concentração dos componentes (mg/L)	
	Meio 1	Meio 2
Molibdênio	0,4	0,4
Boro	0,6	0,6
Zinco	1,1	1,1
Ferro	12,0	12,0
Manganês	12,0	12,0
Paba	0,25	0,25
Piridoxina	900	900
Cianocobalamina	2,75	2,5
D.O. estimada pelo modelo	0,295 <sup>a</sup>	0,256 <sup>a</sup>
D.O. observada no experimento	0,264 <sup>a</sup>	0,208 <sup>b</sup>

\*Teste de comparação de médias Tukey ao nível de 5%, letras iguais não existe diferença significativa entre os valores preditos e observados, letras diferentes existe diferença significativa.

Tabela 32 – Composição dos meios de cultivo obtidos pelo planejamento experimental e resultados da produção de massa celular de *Acetobacter aceti* CCT 2565

Componentes do meio de cultura	Concentração dos componentes (mg/L)	
	Meio 1	Meio 2
Boro	0,60	0,60
Ferro	16,0	16,0
Paba	0,55	0,55
Tiamina	0,25	0,25
Ácido nicotínico	0,50	0,10
D.O. estimada pelo modelo	0,249 <sup>a</sup>	0,192 <sup>a</sup>
D.O. observada no experimento	0,241 <sup>a</sup>	0,159 <sup>b</sup>

\*Teste de comparação de médias Tukey ao nível de 5%, letras iguais não existe diferença significativa entre os valores preditos e observados, letras diferentes existe diferença significativa.

A ferramenta estatística da Metodologia da Superfície de Resposta foi eficiente na estimativa do resultado. Os resultados previstos e observados para ambas as linhagens foram avaliados pelo Teste de Tukey. O crescimento celular de *Acetobacter* sp. 086/06 não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para o meio formulado 1 entre os resultados preditos pelo modelo e o os obtidos experimentalmente (Tabela 31), portanto a formulação: molibdênio 0,4 mg/L, boro 0,6 mg/L, zinco 1,1 mg/L, ferro 12,0 mg/L, manganês 12,0 mg/L, Paba 0,25 mg/L, piridoxina 900 mg/L e cianocobalamina 2,75 mg/L, foi a escolhida por proporcionar máximo crescimento para a referida linhagem. O crescimento celular de *Acetobacter aceti* CCT 2565 não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para o meio formulado 1 entre os resultados esperados pelo modelo e o os obtidos experimentalmente (Tabela 32), portanto a formulação: boro 0,6 mg/L, ferro 16,0

mg/L, Paba 0,55 mg/L, tiamina 0,25 mg/L e ácido nicotínico 0,50 mg/L, foi a escolhida por proporcionar máximo crescimento para a referida linhagem.

### 6 CONCLUSÕES

As bactérias acéticas *Acetobacter* sp. 086/06 e *Acetobacter aceti* CCT 2565 mostraram-se sensíveis à centrifugação, lavagem com solução de EDTA 25 mM e solução salina 0,85 g/100 mL e ressuspensão.

O meio *MYP* 3, com concentração de seus componentes manitol 25 g/L, extrato de levedura 0,625 g/L e peptona 0,375 g/L é eficiente para produzir um inóculo de  $10^9$  células/mL de bactérias acéticas.

Diferentes linhagens de bactérias acéticas requerem não somente diferentes micronutrientes e vitaminas como quantidade distintas quando a fonte de carbono é o manitol e a fonte de nitrogênio é sulfato de amônia em pH 6,0.

A linhagem *Acetobacter* sp. 086/06 isolada de indústria de vinagre necessitou de mais microminerais que a linhagem de coleção de cultura *Acetobacter aceti* (Pasteur) Beijerinck CCT 2565.

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

## CONCLUSÕES

---

A metodologia da superfície de resposta fornece um prognóstico adequado do ponto de máximo da resposta almejada quando os componentes da formulação encontrada na modelagem matemática dos dados foram testados experimentalmente.

A formulação obtida para a máxima produção de massa celular da linhagem *Acetobacter* sp. 086/06 foi a seguinte: manitol 25g/L, sulfato de amônio 1 g/L, solução de sais (macronutrientes) 5 mL/L, molibdênio 0,4 mg/L, boro 0,6 mg/L, zinco 1,1 mg/L, ferro 12,0 mg/L, manganês 12,0 mg/L, Paba 0,25 mg/L, piridoxina 900 mg/L e cianocobalamina 2,75 mg/L, nas condições: pH 6,0, 30°C e 120 rpm de agitação

A formulação obtida para a máxima produção de massa celular da linhagem padrão *Acetobacter aceti* CCT 2565 foi a seguinte: manitol 25g/L, sulfato de amônio 1 g/L, solução de sais (macronutrientes) 5 mL/L, boro 0,6 mg/L, ferro 16,0 mg/L, Paba 0,55 mg/L, tiamina 0,25 mg/L e ácido nicotínico 0,50 mg/L, nas condições: pH 6,0, 30°C e 120 rpm de agitação

**BIBLIOGRAFIA**

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

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

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2ed. São Paulo: Livraria Varela, 1995. 223p

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

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

EBNER, H. Vinegar: production of vinegar. In: PRESCOTT, S.C.; DUNN, C.G. **Industrial microbiology**. Westport: AVI, 1983. p. 803-833.

EBNER, H.; FOLLMANN, H. Acetic Acid. In: REHM, H.-J; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: VCH, 1983. v. 3, p. 389-407.

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

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

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

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

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

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica: Componentes moleculares das células** (vol.1). São Paulo: Edgard Blücher, 1976. 262p.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Editora Sarvier, 1989. 725p.

LIMA, U.A.; BORZANI, W.; AQUARONE, E. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1988. 300 p. (Tecnologia das Fermentações, v.1)

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock: biología de los microorganismos**. 8.ed. Madrid: Prentice Hall Iberia, 1997.

OLIVA-NETO,P.; YOKOYA.F. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Microbiologia**. São Paulo, v. 22 (1), p. 12-16, 1991.

SIEVERS, M.; SELLMER, S.; TEUBER, M. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 15, n.3, p. 386-392, 1992.

SOKOLLEK, S.J.; HAMMES, W.P. Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 481-491, 1997.

SOKOLLEK, S.J.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. **Journal of Biotechnology**, Stuttgart, v. 60, n. 3, p.195-206, 1998a.

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