MAGALI THIYOMI UONO

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DO *Bacillus coagulans* BVB5 COMO POTENCIAL CEPA PROBIÓTICA

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Profª. Drª. Cristina Stewart Bittencourt Bogsan

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DO *Bacillus coagulans* BVB5 COMO POTENCIAL CEPA PROBIÓTICA

Magali Thiyomi Uono

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profª. Drª. Cristina Stewart Bogsan

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Uono, Magali Thiyomi
U64d Desenvolvimento tecnológico do Bacillus coagulans BVB5 como potencial cepa probiótica / Magali Thiyomi Uono. - São Paulo, 2019.
77 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Bogsan, Cristina Stewart Bittencourt

1. Bacillus coagulans. 2. Esporulação. 3. Esporos. 4. Probióticos. 5. Alimentos funcionais. I. T. II. Bogsan, Cristina Stewart Bittencourt, orientador.

Nome: Magali Thiyomi Uono

Título: Desenvolvimento Tecnológico do *Bacillus coagulans* BVB5 como potencial cepa probiótica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Aprovado em: 30/04/2019

Banca Examinadora

Orientadora: Profª. Drª. Cristina Stewart Bittencourt Bogsan
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP
Assinatura:

Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP
Julgamento: Assinatura:

Profª. Drª. Neuza Mariko Aymoto Hassimoto
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP
Julgamento: Assinatura:

Drª. Marcela Albuquerque Cavalcanti de Albuquerque
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP
Julgamento: Assinatura:

São Paulo, 30 de abril de 2019

DEDICATÓRIA

A Deus, por me amar e nunca desistir de mim, por ter traçado esse plano que hoje se cumpre na minha vida.

Aos meus filhos, Ayana e Kay, que têm sido fiéis companheiros de luta nessa peregrinação, proporcionando-me amor e o conforto no lar.

AGRADECIMENTOS

À Deus que está acima de todo o entendimento e que me proporciona experiências ímpares.

À Sibylle Sophie Hacker pelo incentivo, amizade sincera e companheirismo e que sem a sua ajuda, o curso de mestrado não teria atingido as metas traçadas. Agradecimento especial à sua família que me acolheu como sua integrante e dispensou carinho, a mim e aos meus filhos.

Ao amigo Erik Seegerer que sem o seu suporte este projeto não teria chegado a este patamar.

À Marcela Albuquerque pelo carinho da amizade e pelo grande auxílio prestado no decorrer do curso.

Ao Professor Marco Antonio Stephano por toda a amizade e grande ajuda técnica que dispendeu no decorrer da jornada.

Ao Professor Leoberto Costa Tavares pelos conselhos sempre muito úteis como parecerista do meu projeto e pelas conversas sempre muito agradáveis e prazerosas, por ter aceitado participar da minha banca, tanto da qualificação como da defesa.

À Professora Neuza Mariko Aymoto Hassimoto pelos conselhos extremamente úteis e pontuais, tanto na qualificação como na defesa, que fizeram toda a diferença na jornada do mestrado.

À Professora Carlota de Oliveira Rangel Yagui pela orientação acadêmica no início do mestrado.

Às Professoras Juliana Neves Rodrigues Ract, Suzana Caetano da Silva Lannes, Suzana Marta Isay Saad pelos auxílios técnicos prestados.

Ao Professor Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, pelos auxílios prestados na fermentação.

Ao Professor Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio pela disposição abnegada em auxiliar-me na caracterização dos microrganismos. À Fabiana Teixeira que não mediu esforços para viabilizar as análises.

Ao Professor Svetoslav Dimitrov Todorov por toda a amizade e ensinamentos de valor na caracterização microbiana.

Ao meu pai, Masayuki Uono (*in memoriam*) pelo amor e confiança que depositou em mim e no projeto. À minha mãe Lídia por ter me educado para ser resiliente e perseverante.

Aos meus irmãos Hélcio Hiroyuki Uono e Márcio Teruyuki Uono e aos respectivos cônjuges, Benedita Macedo (Bê) e Angélica Alcalá Neves, pelo carinho, pela irmandade e pelo incentivo para trilhar o caminho que hoje trilho. Ao irmão Marcelo Takayuki Uono pela sua existência.

Aos meus tios Adélia e Tunehiro Uono, Martha e Sadao Takubo, Toyomi e Yoshiyuki Uono que sempre cuidaram de mim e meus filhos com muito amor e carinho e nos proporcionou o aconchego familiar desde que chegamos ao Brasil em 2016.

Aos tios, Mário Hashimoto e Elizabeth Hashimoto pelo carinho e amizade, e pelo incentivo para seguir em frente.

À prima Andrea Uono Terazaki e Hugo Issao Terazaki, pelo carinho, irmandade e grande auxílio que prestam em todos os momentos, e à prima Fabiana Uono e Marcio Roberto Ruiz por sempre me motivarem a seguir em frente.

Aos meus primos Carla Rumi Uono e Amauri Uono, Miriam Uono e Renato Medeiros pela grande amizade e irmandade. Agradecimento especial à Carla pela correção da dissertação.

Aos meus tios Takanobu Hanada, Ondina Hanada e família, que não medem esforços para nos receber em seu lar nos momentos em que mais necessito desse calor familiar.

À toda a grande família do Brasil, que me ajuda e incentiva a trilhar pelos caminhos do sucesso.

À minha mãe do Japão, Makiko Ishibe, e à irmã, Mika Suzuki, pela acolhida nos momentos mais críticos e pelo grande conforto que me proporcionou dando-me um lar, e que sem isso eu não estaria hoje, concluindo o mestrado.

Às minhas amigas/irmãs que deixei no Japão que oram por mim e estão na torcida, Nobuko Chinen, Helena Yamamura e Gisa Sakai, Yaeko Higa, Ritsuko Kinjo e Dayse Miyamoto.

Às companheiras de mestrado, Camila Hiromi Chiba e Viviane Borges Vieira por todos os momentos que compartilhamos juntas.

Às meninas do laboratório, Marsia Dolores Serrano Sansón (Lola), Alessandra Prestes, Caroliny de Almeida Souza (Carol), Mariana Mitiko Matsuo, Victória Ananias de Oliveira Rolim (Vicky), Catarina Vezetiv Manfrinato pela força, auxílios e amizade que me prestaram.

Aos colegas, Taís Mayumi Kuniyoshi, Sabrina da Silva Sabo, Anna Carolina Meireles Piazentin, Ariane Silveira Santiago, Gabriel Moretti de Almeida, Pamela de Souza de Oliveira de Azevedo e Eduardo Kleingesinds, pela amizade e pelas muitas ajudas técnicas.

Ao casal de amigos Ingryd Carolinne Costa Campos e José Thiago do Carmo Santos, que me deram bons fluidos de amizade e motivação para continuar a jornada do mestrado

Às queridas Rose Clélia Dedivitis, Elza Ferreira Silva, Tania Nogueira Martinez, pelo carinho e pelo auxílio que sempre nos prestam com amor e dedicação.

À Sueli Duarte e Irineu Ruel de Oliveira, por sempre nos receber com carinho e paciência e prestar os auxílios burocráticos necessários. À Erika Benz, pela amizade que alegrou os dias do mestrado.

Aos técnicos, Nilton de Morais Bloisi, Alexandre Mariane Rodrigues, Anderson Franco Anselmo, Gledson Manso Guimarães, Ivani Aparecida Raphael pelo auxílio prestado nas técnicas e no uso de equipamentos

À Cristiane Mika Fujii e Vitória Catunda Viana e Beatriz Pires dos Santos pela amizade e todo auxílio técnico prestado.

À Adriana Matsukuma e Prof. Robert Schumacher pelas instruções em citometria de fluxo.

À Solange Kazue Utimura, pela amizade e preciosas informações providenciais, que abriu a porta de esperança do futuro próximo.

À minha orientadora Professora Doutora Cristina Stewart Bittencourt Bogsan que me acolheu como sua primeira aluna de mestrado, pela orientação, pela paciência em ensinar, pela amizade despendida. Que Deus venha a abençoar a sua vida.

“Porque eu bem sei os planos que tenho a vosso respeito, diz o Senhor; planos de paz, e não de mal, para vos dar o fim que desejais.” Jeremias 29:11

Uono, MT. Desenvolvimento tecnológico do *Bacillus coagulans* BVB5 como potencial cepa probiótica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2019.

RESUMO

Introdução: O aumento da demanda por alimentos funcionais, os quais incluem os suplementados ou fermentados por microrganismos probióticos, resultou no avanço da pesquisa e desenvolvimento de novas cepas potencialmente probióticas. Os microrganismos probióticos pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. são atraentes devido a sua estabilidade inerente de bactérias formadoras de esporos. Os esporos permitem uma vida de prateleira prolongada e aumentam a capacidade do microrganismo de sobreviver às barreiras gástricas, que se revelam uma vantagem sobre os lactobacilos. **Objetivo:** Foram realizados experimentos para o desenvolvimento tecnológico de duas cepas formadoras de esporos de *Bacillus coagulans* BVB1 e BVB5 como potenciais microrganismos probióticos objetivando avaliar o potencial probiótico dos mesmos. **Método:** Como primeira etapa, as caracterizações fenotípica e genotípica identificaram que a cepa BVB1 não era *B. coagulans* e sim *B. subtilis*. Os estudos seguiram com a cinética da fermentação/esporulação apenas da cepa de *Bacillus coagulans* BVB5. **Conclusão:** O desafio da esporulação de *Bacillus coagulans* BVB5 foi vencido, fato que pode ser verificado na cinética da fermentação que apresentou resultados superiores a 99% de grau de esporulação.

Palavras-chave: *Bacillus coagulans*, esporulação, esporos, probiótico, alimentos funcionais

Uono, MT. Technological development of *Bacillus coagulans* BVB5 as potential probiotic strains [dissertation]. São Paulo: Faculty of Pharmaceutial Sciences, University of São Paulo; 2019.

ABSTRACT

Introduction: The increased demand for functional foods, which include those supplemented or fermented by probiotic microorganisms, resulted in the advancement of research and development of new potentially probiotic strains. Probiotic microorganisms *Bacillus* spp. are attractive because of their inherent stability of spore forming bacteria. Spores allow prolonged shelf life and increase the ability to survive gastric barriers, which prove to be an advantage over lactobacilli. **Objective:** Experiments were performed for the technological development of *Bacillus coagulans* BVB1 and BVB5 as potential probiotic microorganisms with two strains of *Bacillus coagulans* aiming to evaluate the efficacy of probiotic product composed of spore forming microorganism (*Bacillus coagulans* strains BVB1 and BVB5). **Method:** As a first step, phenotypic and genotypic characterization identified that the BVB1 strain was not *B. coagulans* but *B. subtilis*. Although *Bacillus subtilis* strain BVB1 presented a technological potential to be used as a probiotic strain in food additives, the studies followed with the kinetics of fermentation/sporulation of *Bacillus coagulans* BVB5, in agreement with the master's project originally proposed. **Conclusion:** The challenge of sporulation of *Bacillus coagulans* BVB5 was overcome, a fact that can be verified with the results of fermentation kinetic which presented sporulation degree more than 99%.

Key words: *Bacillus coagulans*, sporulation, spores, probiotic, functional feed

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rRNA	RNA ribossômico16S
aadK	Aminoglicosido 6-adeniltransferase
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AGP	Antimicrobianos Promotores de Crescimento
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
BVB	*Bacillus* VitaBridge
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CAS	Número CAS (*Chemical Abstracts Service*)
CDS	Sequência de codificação de DNA
CHN	Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio
DEPEC	Depto. de Estudos de Pesquisas Econômicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Varredura Diferencial de Calorimetria
ECDC	Centro Europeu para Prevenção de Controle de Doenças
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
FANEM	Fábrica de Aparelhos Nacionais de EletroMedicina
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FCF – USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
FDA	*Food and Drug Administration*
FNY	Meio de cultura de esporulação
GYP	Meio de cultura de *Bacillus*
GYT	Meio de cultura de *Bacillus*
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
KIT NF – PROV	Kit para identificação de Bacilos Gram-Negativos não fermentadores da glicose
LACRIS-S	Nome comercial do preparado de *Bacillus coagulans* SANK70258
LYOSTAT	Microscópio de liofilização Lyostat
MALDI TOF/MS	*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*
MARAN	*Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage*

MNA	Meio de Ágar Nutriente
MNB	Meio de Caldo Nutriente
MR-VP	Teste de *Voges Proskauer*
MYP	Meio de Extrato de Levedura e Peptona
NextSeq500	Sistema de sequenciamento de genomas
OIE	Organização Mundial para Saúde Animal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SARAMIS	*Spectral Archive and Microbial Identification System*
SIM	Meio de diferenciação de bactérias entéricas
SNA	Sociedade Nacional de Agricultura
tet(L)	*Tetracycline-Divalent Metal/H+ Antiporters*
TOF	*Time of Flight*
TPB	Meio de Triptose Fosfato
UK	Reino Unido
USA	Estados Unidos da América
USP	Universidade de São Paulo
WHO/OMS	Organização Mundial da Saúde
YE	Meio de cultura para esporulação

LISTA DE SÍMBOLOS

$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
KOH	Hidróxido de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
pH	Potencial hidrogenionico
tet(L)	*Tetracycline-Divalent Metal/H+ Antiporters*
µm	Micrometro
ºC	Graus Centígrados
m^2	Metro quadrado
%	Porcentagem
ND	No Data Available
V (Figura 5)	Instabilidade da cepa
d (Figura 5)	11-89% das cepas são positivas
NG (Figura 5)	Sem crescimento
KCl	Cloreto de Potássio
CO_2	Dióxido de Carbono
CO	Monóxido de Carbono
K_2HPO_4	Fosfato Dibásico de Potássio
KH_2PO_4	Fosfato Monobásico de Potássio
CH_3COONa	Acetato de sódio
$MnSO_4$	Sulfato de Manganês
$FeSO_4$	Sulfato de Ferro II
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
$ZnSO_4$	Sulfato de Zinco
rpm	Rotação por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µL	Microlitro
NA	Não Disponível
Tg	Temperatura de Transição Vítrea
H_2	Gás Hidrogênio
MG/SF	Verde Malaquita/Safranina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema comparativo de divisão celular dos lactobacilos e bacilos 21
Figura 2 – Estrutura dos esporos. 23
Figura 3 – Esquema de formação e germinação de esporos bacterianos 24
Figura 4 – Morfologia dos esporos 24
Figura 5 – Testes bioquímicos de identificação de bacilos 28
Figura 6 – Passos da coloração de Gram 29
Figura 7 – Passos da coloração de Verde Malaquita/Safranina 30
Figura 8 – Esquema de funcionamento de MALDI TOF/MS 31
Figura 9 – Análise morfológica comparativa entre BVB1 em (a) e BVB5 em (b) 42
Figura 10 – Análise de Gram de BVB1 em (a) e (b), e BVB5 em (c) 42
Figura 11 –Atividade amilolitica de BVB1 sem lugol (a), revelada com lugol (b) e controle (c) 43
Figura 12 – Resultado do teste de protease de BVB1 - BVB1 (a) e controle (b) 43
Figura 13 – Resultado do teste de lipase de BVB1 (a, b) e controle (c) 44
Figura 14 – Resultado da análise de espectrometria de BVB1 por MALDI TOF/MS 45
Figura 15 – Resultado da análise de espectrometria de BVB5 por MALDI TOF/MS 46
Figura 16 – Esquerda: Gênero; Direita: Famíla 47
Figura 17 – Esquerda: espécie; Direita: subespécie 47
Figura 18 – Presença de plasmídeos em BVB1 48
Figura 19 – Presença de genes de resistência a antibióticos em BVB1 48
Figura 20 – Gráfico de UFC/mL x Tempo (h) da cinética da esporulação de BVB5 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação científica de *Bacillus coagulans* 26
Tabela 2 - Composição dos meios de cultura GYP, YE, YE50, GYT, FNY e FNY50 ... 39
Tabela 3 - Resultados dos testes enzimáticos de BVB1 e BVB5..... 44
Tabela 4 – Resultados dos testes bioquímicos e referências..... 45
Tabela 5 – Resultados do 16S rRNA 46
Tabela 6 – Morfologias de BVB5 nos diferentes meios da primeira fermentação de 96 horas. Lâminas tingidas com verde MG/SF. 49
Tabela 7 – Morfologias de BVB5 nos diferentes meios da segunda fermentação de 96 horas. Lâminas tingidas com verde MG/SF. 50
Tabela 8 – Enumeração da cinética de esporulação de BVB5..... 50
Tabela 9 – Pontos máximo e mínimo de UFC/mL de cada caldo fermentativo e suas respectivas imagens. 52
Tabela 10 – Contagem de esporos de *Bacillus coagulans* BVB5 53

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – FICHA DO ALUNO 62

ANEXO 2 – *CURRICULUM LATTES* 65

ANEXO 3 – TRABALHOS SUBMETIDOS 70

ANEXO 4 - ARTIGOS 73

SUMÁRIO

RESUMO **10**

ABSTRACT **11**

1. INTRODUÇÃO **18**

2. FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA **19**

2.1. PROBIÓTICOS 21
2.2. ESPOROS BACTERIANOS – ENDÓSPOROS 22
2.3. ESPORULAÇÃO DE *BACILLUS COAGULANS* 25
2.4. CARACTERIZAÇÃO DA CEPA DE *BACILLUS COAGULANS* 26
2.4.1. Testes Bioquímicos *27*
2.4.3. Testes físico-químicos *30*

3. OBJETIVOS **32**

4. MATERIAIS E MÉTODOS **33**

4.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS DE *BACILLUS COAGULANS* BVB1 E BVB5 33
4.1.1 Ativação das cepas *33*
4.1.2 Coloração de Gram *33*
4.1.3 Caracterização por testes bioquímicos *33*
4.1.3.1 Testes bioquímicos *34*
4.1.4 Caracterização físico-química por espectrometria *36*
4.1.5 Caracterização genômica *36*
4.1.5.1 16S rRNA *36*
4.1.5.2 Sequenciamento completo *37*
4.1.6 Detecção das atividades enzimáticas *37*
4.1.8 Métodos analíticos de enumeração de células vegetativas e detecção de esporos *38*
4.2 FERMENTAÇÃO 39
4.2.1 Escolha do meio adequado para aumento de biomassa e esporulação *40*
4.2.2. Cinética da Esporulação *40*
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **41**

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CEPA DE *BACILLUS COAGULANS* 41
5.1.1 Ativação da cepa *41*
5.1.2 Caracterização por testes morfológicos *41*
5.1.3 Testes enzimáticos de BVB1 ..... *42*
5.1.4 Testes bioquímicos *44*
5.1.5 Caracterização físico-química por espectrometria *45*
5.1.6 Caracterização genômica por sequenciamento *46*
5.2 FERMENTAÇÃO 49
5.2.1. Escolha do meio adequado para aumento de biomassa e esporulação *49*
5.2.2. Cinética da Esporulação *50*

6. CONCLUSÃO **54**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **55**

ANEXO 1 – FICHA DO ALUNO **62**

ANEXO 2 – *CURRICULUM LATTES* **65**

ANEXO 3 – TRABALHOS SUBMETIDOS **70**

ANEXO 4 - ARTIGOS **73**

1. INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento da indústria de alimentos funcionais tem aumentado a demanda por produtos que tenham como finalidade melhorar a saúde do consumidor, tanto a humana como a animal. Incluem-se nos alimentos funcionais aqueles os quais são suplementados ou fermentados com microrganismos probióticos. Segundo a FAO/ WHO (2002) e Hill e colaboradores (2014), "Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro".

Dentre os probióticos mais estudados atualmente, destacam-se as bactérias formadoras de esporos, sendo a maioria das bactérias esporuladas probióticas pertencente ao gênero *Bacillus* spp. Elas são atrativas devido à resistência inerente dos esporos ao estresse ambiental (SANDERS, *et al*., 2003). Estes microrganismos se apresentam na forma de bastonetes, Gram-positivos, aeróbios ou aeróbios facultativos, catalase positivo, produtor de esporos, e de enzima como a protease. Devido à diversidade fisiológica das formas vegetativas, estes microrganismos são considerados como organismos ubíquos, podendo ser isolados do solo e de gêneros alimentícios (GOMES, 2013). Possuem ciclo de vida bimodal de crescimento e esporulação no ambiente, bem como no trato gastrointestinal (HONG *et al*., 2004).

A habilidade em formar esporos faz dos bacilos atrativos como aditivos alimentares devido a sua capacidade em sobreviver às barreiras gástricas, apresentando vantagens sobre os microrganismos não formadores de esporos tais como os *Lactobacillus* spp. A característica de formador de esporo garante, a princípio, vida prolongada de prateleira sem refrigeração (CUTTING, 2010).

Dessa forma, o desenvolvimento tecnológico eficaz de um produto contendo uma bactéria probiótica formadora de esporos, envolve a esporulação durante o processo de produção da mesma. *Bacillus coagulans*, dentre as bactérias do gênero *Bacillus*, apresenta grande dificuldade de esporulação (AMAHA *et al*., 1956), representando um desafio tecnológico para a nossa equipe.

Duas cepas, BVB1 e BVB5, de *Bacillus coagulans* foram doadas pela empresa VitaBridge para a avaliação do potencial probiótico destas cepas visando o desenvolvimento de um aditivo alimentar em substituição aos antimicrobianos promotores de crescimento.

2. FUNDAMENTAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil é o maior exportador mundial de carne de aves desde 2004, sendo o segundo maior produtor, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. O frango brasileiro está presente no cardápio dos consumidores em mais de 150 países, sendo um terço da produção brasileira, destinada à exportação (ALVARENGA, 2016; ABPA, 2016; DEPEC, 2016). Devido às restrições legais no uso de antimicrobianos dos países importadores, como a União Europeia, representada pelos países da Holanda, Alemanha e Reino Unido, uma atenção maior é requerida com relação à saúde das aves voltadas para a exportação, principalmente no que se refere à questão da resistência aos antimicrobianos, pela excessiva ou inadequada utilização dos mesmos (EFSA 2013/652/EU, 2013; ALVARENGA, 2016; SNA, 2016).

Os promotores de crescimento, ou antimicrobianos, extensivamente usados na produção de frangos de corte, são antibióticos administrados em dosagem inferior à concentração inibitória mínima, ou seja, em concentrações subterapêuticas, a fim de controlar o crescimento exacerbado e indesejado de determinadas populações microbianas e não para eliminá-las como fazem os terapêuticos e profiláticos, minimizando dessa forma a secreção de toxinas dessas populações, o que resulta na redução da inflamação da mucosa intestinal, evitando disfunções intestinais como diarreias (MARTINS, 2016; BRISOLA, 2010). A EFSA (*European Food Safety Authority*) junto com ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control* - Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças) (EFSA 2013/652/EU, 2013) detectaram provas da resistência dos antibióticos aos microrganismos como ampicilina, fluoroquinolonas, tetraciclinas e sulfonamidas em aves. Segundo ECDC, esta descoberta é preocupante, pois significa que estes medicamentos podem deixar de ser, em breve, efetivos no tratamento de infecções humanas, como por exemplo, a crescente resistência aos antibióticos no tratamento da Salmonelose. Todos estes fatores confirmam a crescente preocupação mundial no que concerne à alimentação humana (MARTINS, 2016; FAO/OIE/WHO, 2016).

Órgãos como OMS (Organização Mundial da Saúde), FAO (*Food and Agriculture Organisation* – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura) e OIE (*Word Organisation for Animal Heath* – Organização Mundial da Saúde Animal), uniram-se para minimizar o surgimento e o crescimento da resistência aos antimicrobianos, através de ações que objetivam assegurar que os mesmos continuem a ser eficazes e úteis, para a cura de doenças causadas por bactérias tanto em humanos como em animais. Estas ações promoveram a utilização prudente e responsável dos agentes antimicrobianos. Na Europa, entre 1997 e 2006, antibióticos (e.g., ampicilinas, fluoroquinonas, sulfonamidas, tetracilinas) foram proibidos para

uso em animais com objetivo de reduzir os problemas de resistência bacteriana em seres humanos (ALVARENGA, 2016). Porém, somente após 2008 é que houve diminuição gradativa na comercialização e uso dos principais antimicrobianos veterinários, intensificando-se as buscas por produtos alternativos (ALVARENGA, 2016; MARAN, 2016).

Não somente na Europa, mas também nos EUA (Estados Unidos da América), devido à pressão dos consumidores, em dezembro de 2013, a *Food and Drug Administration* (FDA) iniciou a retirada gradativa dos antimicrobianos, e a partir de dezembro de 2016 não seriam mais usados nas criações de animais de corte. Essa medida fez com que as principais redes de *Fast Food* começassem a comunicar que utilizariam apenas proteína animal livre de antimicrobianos (ALVARENGA, 2016; FAO, 2013).

Devido a estes movimentos iniciais, as pesquisas e os desenvolvimentos de novos produtos alternativos se intensificaram em todo o mundo (ALVARENGA, 2016). No Brasil, em 2004 foi criada a Portaria SARC nº 13 e confirmada pela Instrução Normativa N. 15 de 2009, que define aditivo como: “substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais” (ALVARENGA, 2016; MAPA, IN n.15 de 2009).

2.1. PROBIÓTICOS

No Brasil, pela Portaria SARC nº13 criada em 2004 e confirmada pela Instrução Normativa de nº15/2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os probióticos são considerados aditivos que podem ser utilizados como suplementos nutricionais. Pela definição da FAO/ WHO (2002), atualizada por Hill e colaboradores em 2014 (HILL *et al*., 2014), "Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro". Dentre os probióticos utilizados na pecuária, destacam-se as bactérias formadoras de esporos, sendo a maioria pertencente ao gênero *Bacillus* spp. A característica de esporos confere aos microrganismos a resistência inerente ao estresse ambiental (SANDERS, *et al.*, 2003). Suas característica gerais são: forma de bastonetes, são Gram-positivas, aeróbias ou aeróbias facultativas, catalase positivas, produtoras de esporos, e de enzimas, são considerados organismos ubíquos, podendo ser isolados do solo e de gêneros alimentícios (GOMES, 2013). Segundo Hong e colaboradores (2004) os bacilos colonizam o trato gastrointestinal devido ao ciclo bimodal de crescimento.

Algumas espécies do gênero *Bacillus* podem ser consideradas probióticas e são atrativas como aditivos alimentares pela sua estabilidade térmica e capacidade em sobreviver às barreiras gástricas, características essas conferidas pelos esporos. Elas fazem com que as espécies probióticas do gênero *Bacillus* spp. apresentem vantagens sobre os microrganismos não formadores de esporos tais como os *Lactobacillus* spp. A comparação entre as suas divisões celulares está representada na figura 1. Os esporos garantem, a princípio, vida prolongada de prateleira sem refrigeração (CUTTING, 2010).

[1]Figura 1 - Esquema comparativo de divisão celular dos lactobacilos e bacilos

[1] Disponível em: < http://cp.glico.jp/bisco/about/ > Acesso em 15 de maio de 2019.

Dentre o gênero *Bacillus*, a espécie *Bacillus coagulans* é conhecida como sendo uma excelente candidata a probiótico também por sua característica intrínseca de bactéria produtora de ácido láctico como metabólito (CUTTING, 2010) e por não apresentar fatores de virulência como algumas cepas de *Bacillus subtilis,* cuja espécie apresenta inúmeros estudos como probióticos. O *Bacillus coagulans* é usado como probiótico há aproximadamente 86 anos no Japão com a marca de biscoitos infantis recheados BISCO (BISCO, ビスコ) e 58 anos na Itália com o produto LactoSpore da Sabinsa, porém ganhou notoriedade no campo científico há apenas 23 anos (CUTTING, 2010).

Bacillus coagulans pode ser utilizado como alternativa ao uso de antibióticos profiláticos e terapêuticos, como agente promotor do crescimento na produção de frangos, por ser formador de esporos, produtor de ácido lático, e possuir *Status GRAS* (*Generally Recognized as Safe* – Geralmente Reconhecido como Seguro), o que o torna uma bactéria probiótica em potencial (HUNG *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2011, BISCO,ビスコ).

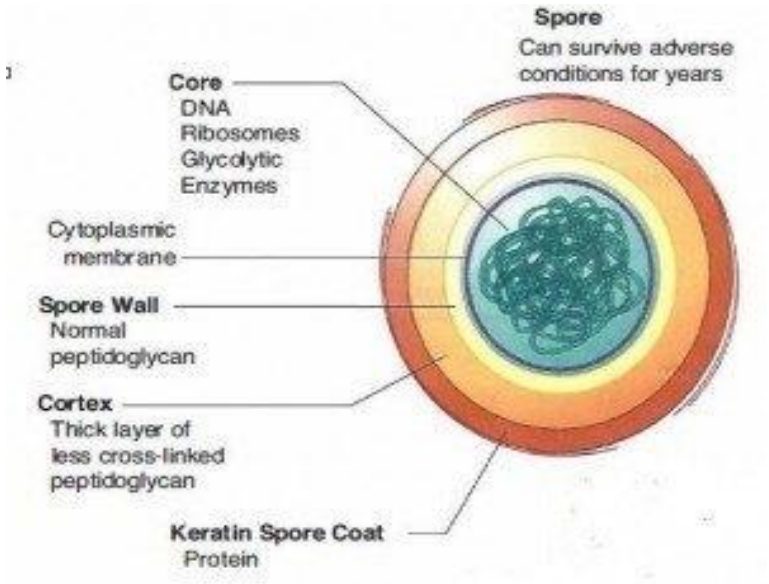
A resistência a alguns antimicrobianos, detectada pela EFSA/ECDC e também reportada nos relatórios de MARAN (2016), tanto em seres humanos como em animais, levou a União Europeia a tomar medidas de banimento dos antibióticos promotores de crescimento (AGP). Esse fator foi determinante para a pesquisa e desenvolvimento de aditivos alimentares alternativos, na busca da substituição eficaz dos AGPs. Dessa forma, os probióticos entram em evidência como aditivos alimentares eficazes para o crescimento e engorda dos frangos de corte.

2.2. ESPOROS BACTERIANOS – ENDÓSPOROS

Desde 1876, três cientistas notaram, de forma independente, que algumas bactérias formavam endósporos, que é um estado morfológico dormente da bactéria (NICHOLSON et al., 2000). Sabe-se atualmente que alguns microrganismos (mais de 25 gêneros e acima de 200 espécies) possuem a capacidade de formar esporos e entre eles se encontram as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* (FRITZE, D., 2004). O termo esporo origina do grego "*spora*" que significa semente. Os esporos ou endósporos são formados intracelularmente, não mais que um por célula, em condições adversas à sobrevivência do microrganismo na forma vegetativa, e o fator principal que estimula a esporulação é a falta de nutrientes (ERRINGTON, J., 2003). O endósporo é resultante da desidratação da célula bacteriana vegetativa, processo em que ocorre a formação de uma parede grossa no citoplasma desidratado. O esporo não apresenta atividade metabólica e é bem resistente aos estresses químicos e físicos, o que favorece a sua sobrevivência por longos períodos de tempo na forma dormente, podendo germinar quando

entra em condições favoráveis à germinação, características essas que o diferencia da célula vegetativa (figura 2).

Figura 2 – Estrutura dos esporos.[2]

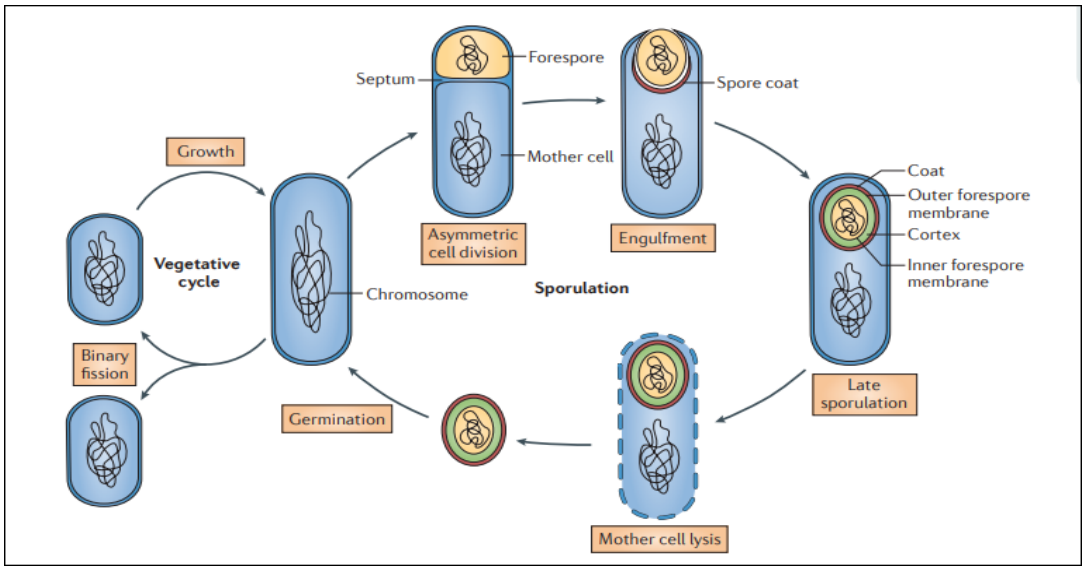


Fonte: Microbe online, 2013[3]

A formação dos endósporos pode ser desencadeada no final da fase exponencial de crescimento por alguns fatores tais como a privação de nutrientes, a temperatura de crescimento, pH, aeração, presença e concentração de certos minerais, fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e a densidade populacional do microrganismo. De uma maneira geral, no processo de formação de esporos ocorre a duplicação do cromossomo, um dos quais isola-se, sendo envolvido por uma membrana plasmática. Uma parede grossa se forma ao redor da membrana formando-se assim o esporo. Em seguida, a parte externa ao esporo se degrada e a parede celular é rompida, liberando, dessa forma, o esporo. A germinação do esporo pode ocorrer em condições favoráveis para o desenvolvimento do microrganismo (DRIKS, A., 2002).

[2] Disponível em: <https://microbeonline.com/bacterial-spores-structure-importance-and-examples-of-spore-forming-bacteria/>. Acesso em: 01 de março de 2018.

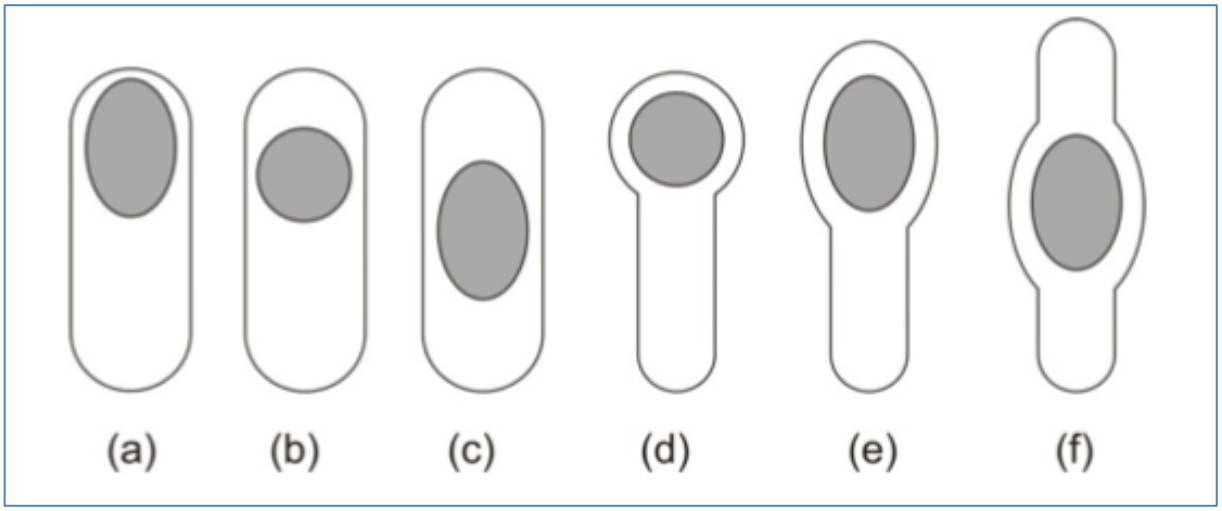
Figura 3 – Esquema de formação e germinação de esporos bacterianos [4]



Fonte: McKenney et al., 2013.

As morfologias dos esporos podem ser elipsoidais, cilíndricas ou esféricas, e localizam-se na parte central, terminal ou subterminal da célula. Os tamanhos dos esporos variam entre faixas de 0,5 x 1,5µm a 2,5 x 10,0µm. Cada espécie apresenta um tipo morfológico definido de esporo e assim sendo as características morfológicas dos esporos são úteis para parte da caracterização da bactéria em si (Figuras 3 e 4) (VOS, P. et al., 2001).

Figura 4 – Morfologia dos esporos[5]



Localização do esporo: terminal (a) e (d), subterminal (b) e (e), central (c) e (f).

[4] Disponível em < http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/PracticalMicrobiology/ch06s04.html > Acesso em 15 de maio de 2019

[5] Disponível em: < http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/PracticalMicrobiology/ch06s04.html > Acesso em 30 de abril de 2018

2.3. ESPORULAÇÃO DE *Bacillus coagulans*

A esporulação de *Bacillus coagulans* é um requisito necessário tanto para a secagem por *spray dryer*, técnica de secagem que utiliza temperaturas entre 100 a 105 ºC (YADAV et al., 2009), como para a incorporação na ração peletizada de frangos de corte, cujo processo envolve temperaturas maiores nas quais os lactobacilos e as células vegetativas de *Bacillus* não suportam.

O processo de esporulação não ocorre com facilidade durante a fermentação das cepas dessa espécie de *Bacillus* (AMAHA et al., 1955; JOGI et al, 2008) o que representa um desafio tecnológico para o desenvolvimento de produtos que utilizem processos de produção a altas temperaturas. Esse fato exige, portanto, um estudo mais profundo sobre as condições de esporulação simultânea à fermentação. Podemos verificar em estudos prévios (AMAHA et al., 1955; JOGI et al, 2008) que esporular o *Bacillus coagulans* exige meios de cultivo especiais tais como, por exemplo, os enriquecidos com minerais como Manganês e Cálcio durante a fermentação. Sabendo que a esporulação é favorecida em ambientes com falta de nutrientes, a presença de grandes quantidades de Carbono e Nitrogênio, favorecem o aumento de biomassa (CHEN et al., 2016) e podem desfavorecer a esporulação. Portanto o estudo do equilíbrio na quantidade de nutrientes de um meio favorável tanto para o aumento de biomassa quanto para a esporulação torna-se um desafio.

2.4. CARACTERIZAÇÃO DA CEPA DE *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans é considerada uma cepa de alto potencial probiótico e pode ser encontrado comercializado pelas empresas Unique/Índia, Ganeden/EUA, Lacris-S/Mitsubishi Japão, as quais possuem *status Gras*. Já existem produtos sendo comercializados com esta cepa, no Japão há 86 anos (BISCO) e há 58 anos na Itália (LactoSpore) e uma das três (3) cepas autorizadas para uso como probiótico pela ANVISA GBI-30 (Ganeden/EUA). É uma bactéria Gram positiva formadora de esporos, catalase positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa, apresenta motilidade, homofermentativa (produtora de *L*-ácido láctico), produtora de enzimas como a protease, apresenta forma de bastonete, não patogênica, possui habilidade de formar esporo, um escudo externo resistente, quando entra em condições desfavoráveis e germinam em células vegetativas em condições favoráveis ao crescimento. É comumente chamada de organismo de solo, entretanto é considerado como organismo ubíquo, podendo ser isolado do solo e de gêneros alimentícios. As suas cepas apresentam muitas aplicações industriais dentre as quais está sua utilização como bactéria probiótica. A classificação científica da espécie está apresentada na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação científica de *Bacillus coagulans*

Nome binomial	*Bacillus coagulans*
Reino	Bactéria
Filo	Firmicutes
Classe	*Bacilli*
Ordem	*Bacillales*
Família	*Bacillaceae*
Gênero	*Bacillus*
Espécie	*coagulans*
Número CAS	68038-65-3

Fonte: MANFIO (2003).

Segundo MANFIO (2003), as pesquisas na área de microbiologia “restringem-se principalmente à caracterização de microrganismos isolados, geralmente de interesse médico”. O presente estudo pretende aprofundar a pesquisa do microrganismo *Bacillus coagulans* como aditivo alimentar devido sua característica de formador de esporos e resistência ao tratamento térmico e trato gastrintestinal.

2.4.1. Testes Bioquímicos

BAYANE e colaboradores (2010) descreveram alguns dos testes que caracterizam o microrganismo *B. coagulans*: testes bioquímicos para análise de catalase, motilidade, observação da produção de ácido, e testes enzimáticos, como o de amilase, além de outras análises como teste API 50 CHB, tolerância aos sais biliares, detecção de produção de gás por tubo de Durham, tolerância a condições ácidas, análise de ácidos graxos e microscopia com contraste de fase. PAÇO (2001) utilizou, para caracterização de *Bacillus* spp*,* obtido de amostras de camas de frango, o teste de coloração de Gram e os testes bioquímicos de catalase, redução de nitrito, produção de oxidase e motilidade, citrato, amilase, gelatinase, indol, crescimento em NaCl a 2, 5, 7 e 10% e crescimento em 5, 10, 15, 35, 45, 50 e 60 °C.

Já pelo estudo de SNEATH e colaboradores (1986), obtém-se vasta quantidade de informações sobre microrganismos, o que permite melhor entendimento de qual a razão da utilização de cada um dos testes bioquímicos e os resultados esperados para cada tipo de *Bacillus* (figura 5).

Figura 5 – Testes bioquímicos de identificação de bacilos

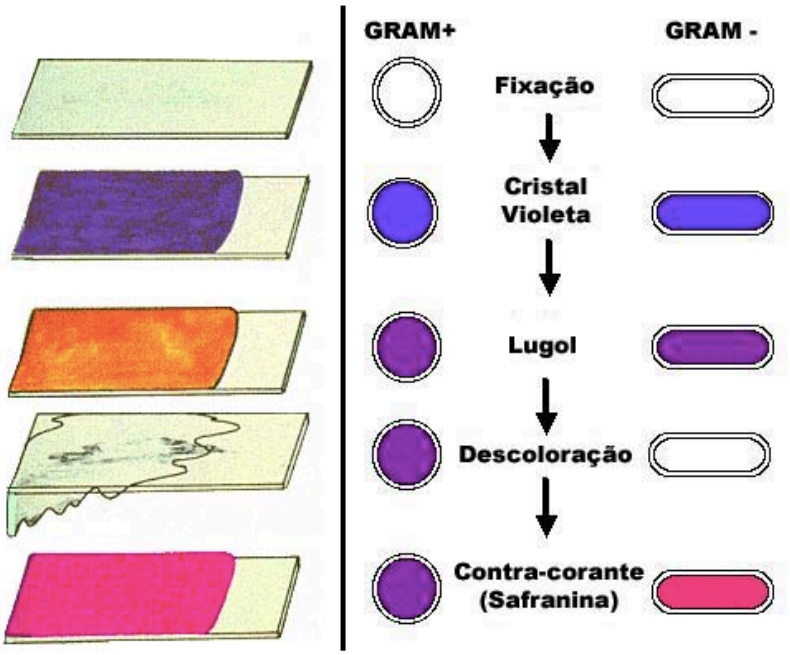
Characteristics	1. *B. subtilis*	2. *B. acidocaldarius*[a]	3. *B. alcalophilus*[a]	4. *B. abel*	5. *B. anthracis*	6. *B. azotoformans*[a]	7. *B. badius*	8. *B. brevis*	9. *B. cereus*	10. *B. circulans*	11. *B. coagulans*	12. *B. fastidiosus*[a]	13. *B. firmus*[b,c]	14. *B. globisporus*[b,c]	15. *B. insolitus*[b,c]	16. *B. larvae*	17. *B. laterosporus*
Cell diameter >1.0 μm	–	ND	–	–	+	–	v	–	+	–	–	+	–	–	v	–	–
Spores round	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–
Sporangium swollen	–	+	+	+	–	+	–	+	–	+	v	–	–	+	–	+	+
Parasporal crystals	–	ND	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Catalase	+	ND	+[f]	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Anaerobic growth	–	–	–	+	+	–	–	–	+	d	+	–	–	–	–	+	+
Voges-Proskauer test	+	–	–	+	+	–	–	–	+	–	+	NG	–	–	–	–	–
pH in V-P broth																	
<6	d		ND	+	+	ND	–	–	+	+	+	NG	–	–	–	d	d
>7	–		ND	–	–	ND	+	+	–	–	–	NG	–	–	–	–	–
Acid from																	
D-Glucose	+	ND	+	+	+	–	–	d	+	+	+	NG	+	+	–	+	+
L-Arabinose	+	ND	+	–	–	ND	–	–	–	+	d	NG	–	–	–	–	–
D-Xylose	+	ND	+	–	–	–	–	–	–	+	d	NG	–	–	–	–	–
D-Mannitol	+	ND	+	–	–	–	–	d	–	+	d	NG	+	–	–	d	+
Gas from glucose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Hydrolysis of																	
Casein	+	ND	+	+	+	ND	+	d	+	d	d	–	+	d	–	+	+
Gelatin	+	ND	+	+	+	–	ND	d	+	d	–	–	+	+	–	+	d
Starch	+	+	+	+	+	–	–	d	+	+	+	–	+	d	–	–	–
Utilization of																	
Citrate	+	–	–	–	d	+	–	d	+	d	d	–	–	–	–	–	–
Propionate	–	ND	–[f]	ND	ND	–	ND	ND	ND	ND	–	–	–	ND	ND	ND	ND
Degradation of tyrosine	–	ND	–[f]	d	d	–	+	+	+	–	–	–	d	–	–	–	+
Deamination of phenylalanine	–[d]	ND	ND	–	–	–	–	–	–	–	–	–	d	+	d	–	–
Egg-yolk lecithinase	–	ND	–[f]	–	+	–	ND	–	+	–	–	–	–	ND	ND	ND	+
Nitrate reduced to nitrite	+	ND	–	–	+	ND	–	d	+	d	d	–	d	d	–	d	+
Formation of																	
Indole	–[d]	–	–	+	ND	–	–	–	–[g]	–	–	ND	–	–	–	–	d
Dihydroxyacetone	ND	ND	–[f]	+	ND	–	–	–	ND	–	d	ND	–	–	–	–	–
NaCl and KCl required	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Allantoin or urate required	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Growth at pH																	
6.8, nutrient broth	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+
5.7	+	d	–	–	+	–	–	d	+	d	+	–	–	–	–	–	–
Growth in NaCl																	
2%	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	d	+	ND
5%	+	ND	–	d	+	–	+	–	ND	d	–	+	+	–	–	–	d
7%	+	ND	–	–	+	–	ND	–	d	d	–	–	+	–	–	–	–
10%	ND	ND	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–	ND	–	–	–	–
Growth at																	
5°C	–	–	ND	–	–	ND	–	–	–	–	–	–	–[b]	+	+	–	–
10°C	d	–	ND	–	–	ND	–	–	d	d	–	+	d[b]	+	+	–	–
30°C	+	–	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	d	–	+	+
40°C	+	–	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+[b]	–	–	+	d
50°C	d	+	–	–	–	–	+	d	–	–	+	–	–	–	–	–	–
55°C	–	+	–	–	–	–	–	d	–	–	+	–	–	–	–	–	–
65°C	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Growth with lysozyme present	d	ND	–[f]	+	+	–	–	d	+	d	–	ND	–	–	–	+	+
Autotrophic with H_2+ CO_2 or CO	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Fonte: SNEATH, P. H. et al, 1986.

2.4.2. Testes morfológicos

A coloração de Gram (Figura 6), utilizada na caracterização morfológica das colônias bacterianas, consiste na utilização dos corantes de cristal violeta e fucsina (ou safranina), lugol e descorante acetona ou álcool etílico sobre o esfregaço do microrganismo. Bactérias com parede celular composta por mureína (peptídeoglicano - peptídeo de ácido n-acetil murâmico), durante o processo de descoloração com álcool etílico, retém o corante, enquanto as bactérias com paredes celulares compostas predominantemente por ácidos graxos (lipopolissacarídeos e lipoproteínas) perdem o complexo iodo-pararosanilina, assumindo a cor do corante de fundo (MARTINS *et al*., 2001).

Figura 6 – Passos da coloração de Gram[6]



Outra forma de análise por microscopia é a observação dos aspectos morfológicos dos microrganismos, permitindo distinguir a forma da colônia e a presença ou não de esporos em lâminas de esfregaço corados com verde malaquita e o contra-corante safranina (Figura 7).

[6] Disponível em: < https://ibapcursos.com.br/coloracao-de-gram/ > Acesso em 15 de maio de 2019.

Figura 7 – Passos da coloração de Verde Malaquita/Safranina[7]

MANNHEIMER (2002), GOWTHAMI e (2015) e BAYANE (2010) com seus respectivos colaboradores utilizaram o carbonato de cálcio para a seleção de cepas formadoras de ácidos orgânicos, característica típica de algumas espécies de *bacillus*, visualizada através halos transparentes formados pela produção de ácidos em volta da colônia avaliada.

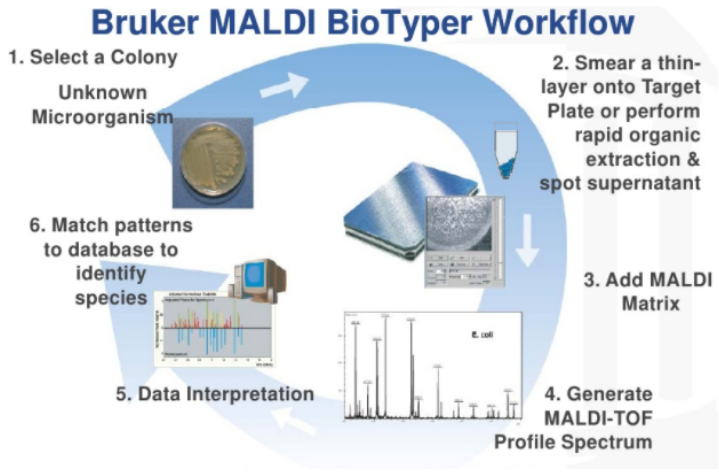
2.4.3. Testes físico-químicos

Como teste físico-químico, a análise de MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*) se apresenta como técnica robusta para análise de moléculas orgânicas (FERREIRA, 2010). A amostra contendo o microrganismo, embebida em matriz ácida fornece prótons para o processo de ionização dos componentes da amostra. Um feixe de laser promove a dessorção e ionização dos cristais da amostra e esta energia é absorvida pela matriz (FERREIRA, 2010). Os íons formados são analisados do tipo TOF, separados formando espectros de massa de acordo com sua razão m/z (massa/carga), com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada. Para a identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados, arquivo contendo as impressões digitais das moléculas. Para a identificação de microrganismos, são usados bancos de dados *Biotyper software* (Brucker Daltonics) e o 5 (SARAMIS - AnagnosTec GmbH) (Figura 8). No

[7] Disponivel em: < https://microbiologyinfo.com/endospore-staining-principle-reagents-procedure-and-result/ > Acesso em 19 de maio de 2019

entanto, culturas de fungos não podem ser analisadas por esta metodologia por não desenvolverem estruturas reprodutivas (SANTOS et al, 1998 apud DIANESE & SANTOS, 2010).

Figura 8 – Esquema de funcionamento de MALDI TOF/MS[8]



Fonte: Página do 40th Annual Symposium "Diagnostic and Clinical Challenges of 20th Century Microbes"- Philadelphia 2010 do SlideShare[9].

2.4.4. Testes genômicos

Os testes moleculares 16S rRNA são importantes provas finais de identificação de um microrganismo (KOTAY & DAS, 2007; GOWTHAMI *et al*., 2015; YE *et al*., 2013; HU *et al*., 2015).

As bactérias Gram positivas do gênero *Bacillus* spp. apresentam superposição de espécies tanto em MALDI TOF, teste físico-químico, quanto em 16S rRNA. Esses fatos geram a necessidade de um teste definitivo para a caracterização segura da cepa estudada. Assim sendo o sequenciamento completo do genoma é considerado definitivo para a caracterização segura de bactérias do gênero *Bacillus* spp.

Existem poucos estudos do uso de *Bacillus coagulans* em ração de frangos apesar do seu grande potencial probiótico, desta forma, este estudo visa avaliar a caracterizar bioquímica, morfológica e geneticamente as cepas de *Bacillus coagulans* BVB1, assim como reproduzir o processo de fermentação em condições ótimas com esporulação simultânea em escala semi-piloto visando o mercado de suplementação da dieta de frangos de corte como substituto ao uso de antibióticos.

[8] Disponível em: <https://www.slideshare.net/epaasm/millerpdf >. Acesso em: 12 de dezembro de 2017.

3. OBJETIVOS

O presente projeto objetivou o desenvolvimento tecnológico das cepas de *Bacillus coagulans* BVB1 e BVB5 como potenciais microrganismos probióticos.

Os objetivos específicos foram:

(i) Caracterizar bioquímica, morfológica e geneticamente as cepas probióticas;

(ii) Reproduzir o processo de fermentação em condições ótimas com esporulação simultânea da cultura da cepa probiótica BVB5 em escala semi-piloto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS DE *Bacillus coagulans* BVB1 E BVB5

As cepas BVB1 e BVB5 foram doações da empresa VitaBridge Desenvolvimento Científico Ltda.

4.1.1 Ativação das cepas

Os papéis de filtro impregnados com as cepas *Bacillus coagulans* VitaBridge BVB1 e BVB5 respectivamente, em forma de esporos foram transferidos para um *erlenmeyer* de 100 mL contendo 25 mL de Caldo Nutriente (Difco, USA) enriquecido como 0,3% de extrato de levedura (Difco, USA) (MNB). Este foi incubado em DBO (FANEM Mod. 347CD) a 37 ºC por 48 h. O repique foi realizado em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de caldo nutriente (Difco, USA) e levados para cultivo na DBO a 37 ºC por 48 h. Alíquotas de 1,0 mL do caldo fermentado de ambas as cepas foram colocados em tubos tipo *eppendorf* com 30% de glicerol e armazenados em freezer a -20 ºC como banco de trabalho para testes e usos posteriores.

4.1.2 Coloração de Gram

Foi realizado esfregaço de 10 µL do caldo fermentado por *Bacillus coagulans* BVB1 e BVB5 (VitaBridge, São Paulo, SP) em lâmina de vidro para a coloração de Gram. A amostra foi imersa nos corantes cristal violeta e fucsina (ou safranina), lugol e descorante acetona ou álcool etílico utilizando o *kit* de coloração de Gram da Newprov (Newprov Produtos para Laboratório, LTDA). As lâminas coradas foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico (OLYMPUS BX51, Japão) por imersão e verificadas quanto às morfologias celulares e presença de esporos.

4.1.3 Caracterização por testes bioquímicos

4.1.3.1 Testes bioquímicos

Para os testes bioquímicos foram utilizadas as culturas de 24 h de BVB1 e BVB5 estriadas em placa de Petri contendo ágar nutriente Biolog (DLabor) suplementado com 0,3% de extrato de levedura. Foram realizados os testes abaixo descritos.

Catalase

Foi gotejado o reativo peróxido de hidrogênio a 10 volumes (Newprov Produtos para Laboratório, LTDA.) sobre as colônias das cepas BVB1 e BVB5 após 24 horas de cultivo para a detecção da enzima catalase, presente nas bactérias que possuem citocromos. O reativo foi gotejado sobre a quantidade de uma alça das colônias de 24 horas de BVB1 e BVB5 colhidas em placas de Petri. (KONEMAN & ALLEN, 2008)

Amido

As cepas BVB1 e BVB5 foram cultivadas em ágar batata (Difco, USA) por 24 horas em incubadora DBO (demanda biológica de oxigênio) a 42 ºC. Sobre a placa de cultivo das cepas BVB1 e BVB5, foi gotejado Lugol (Newprov Produtos para Laboratório, LTDA.) com o intuito de detecção de halo de atividade da enzima amilolítica. (KONEMAN & ALLEN, 2008).

Lecitinase

Para esse teste foi utilizado o meio Ágar MYP Base (Biolog, fornecido pela Ávila Científica, Uberaba-MG) suplementado com Egg Yolk sem telurito (Laborclin, Paraná), na proporção de 450 mL para 50 mL. A inoculação foi realizada através de repique de BVB1 e BVB5 cultivada por 24 horas em meio de ágar nutriente Biolog (DLabor) suplementado com 0,3% de extrato de levedura. A placa foi levada para a DBO (FANEM Mod. 347CD) a 37 ºC por 24 horas.

Crescimento em NaCl a 6,5%

Foi inoculado através de repique de cultura de BVB1 (cultivada por 24 horas em meio de ágar nutriente (Biolog) suplementado com Bacto Ágar) em meio de caldo nutriente isento de NaCl (Biolog) e suplementado com 6,5% de NaCl em tubos de ensaio. O tubo inoculado com BVB1 foi levado para a DBO (FANEM Mod. 347CD) a 37 ºC por 7 dias com observação diária de crescimento das colônias. (KONEMAN & ALLEN, 2008)

Gelatina

Foi utilizado o teste de gelatina do *kit* NF – PROV (Newprov Produtos para Laboratório, LTDA) para a detecção de bacilos Gram negativos. A composição do meio de gelatina contém 3 g/L de extrato de carne; 150 g/L de gelatina bacteriológica; 5 g/L de peptona bacteriológica; e água purificada para 1000 mL. As cepas de BVB1 e BVB5 foram inoculadas no meio descrito, e as leituras feitas a cada 24 h por sete (7) dias. O tubo de ensaio contendo a cultura em meio de gelatina foi refrigerado por 15 min a 4 ºC antes da leitura da prova. O meio liquefeito após a refrigeração, revela resultado positivo, e o meio solidificado após a refrigeração revela resultado negativo para *Bacillus coagulans*. (KONEMAN & ALLEN, 2008)

Motilidade

Para a detecção de motilidade das cepas BVB1 e BVB5, foi utilizado o meio de SIM (Sulfeto Indol Motilidade), receita original da Newprov (Newprov Produtos para Laboratório, LTDA.). O meio é composto de 30,0 g/L de meio de SIM em 1000 mL de água purificada. Em tubo contendo o meio de SIM sólido foi feita a inoculação de BVB1 e BVB5 com agulha bacteriológica contendo uma pequena quantidade da colônia, através de uma picada central, até um terço da profundidade do meio. O tubo inoculado foi incubado por 18 a 24 horas a 37 ºC. A motilidade foi observada pela turvação do meio ao redor da picada. (KONEMAN & ALLEN, 2008)

Indol

Após a realização da leitura do teste de motilidade e verificar se há motilidade ou não, o mesmo tubo de ensaio das culturas de BVB1 e BVB5 em SIM, foram utilizados para verificar a produção de Indol. Para tanto foi gotejado o reativo de Kovacs (Newprov Produtos para Laboratório, LTDA) sobre as culturas. A formação de anel de cor vermelha na interface entre o meio e o reativo significa que a prova é positiva. (KONEMAN & ALLEN, 2008)

Voges Proskauer

Foi utilizado um conjunto de reativos para a prova de Voges – Proskauer (VP) da Newprov Produtos para Laboratório LTDA. Este *kit* é composto por um frasco de 10mL de alfa-naftol 5% e um frasco de 10 mL de KOH 40%, que detecta a acetoína produzida por algumas bactérias durante a fermentação da glicose. A acetoína é verificada pela coloração rósea ou fúcsia na presença de alfa-naftol. As cepas de BVB1 e BVB5 foram inoculadas em meio de MR-VP (Newprov Produtos para Laboratório, LTDA.) e incubadas a 37 ºC por 24

horas. O meio de MR-VP é composto por 3,5 g/L de peptona de caseína; 3,5 g/L de peptona de carne; 5,0 g/L de dextrose; 5,0 g/L de fosfato dibásico de potássio; e 1000 mL q.s.p. de água purificada. Após a incubação, 1 mL do caldo resultante do cultivo foi retirado com auxílio de micropipeta e transferido para outro tubo de ensaio, onde foram adicionados 0,6 mL de alfa-naftol 5% e 0,2 mL de KOH 40%. O tubo foi agitado por agitador vórtex por alguns segundos, e posteriormente deixado em repouso por 5 minutos. A positividade da prova é indicada pelo desenvolvimento da cor vermelha rósea na superfície do meio. (KONEMAN & ALLEN, 2008)

4.1.4 Caracterização físico-química por espectrometria

As amostras das cepas BVB1 e BVB5 foram encaminhadas ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP para a caracterização físico-química utilizando a técnica MALDI-TOF MS, cujo método envolve a ionização da amostra a ser submetida a espectrometria de massa para a detecção por expressão de proteínas da espécie. Esta análise foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio utilizando o equipamento Bruker Daltonik MALDI.

4.1.5 Caracterização genômica

4.1.5.1 16S rRNA

As culturas em Caldo Nutriente (Difco, USA) da cepa BVB1 e BVB5 foram encaminhadas para o Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF-USP para o preparo das amostras de sequenciamento. Os DNAs dos microrganismos foram extraídos com ZR Fungal/Bacterial DNA *kit* (Zymo Research, Irvine, CA, USA) e as concentrações e as purezas dos DNAs foram determinadas por NanoDrop (Thermo Fisher) (Todorov et al., 2010).

Os microrganismos foram identificados pelo uso de PCR por amplificação de 16S rRNA com os *primers* 8f (CAC GGA TCC AGA CTT TGA TYM TGG CTC AG) e 1512r (GTG AAG CTT ACG GYT AGC TTG TTA CGA CTT) (Felske et al., 1997). O PCR foi conduzido em Veriti 96 Well Thermal Cycle, ABApplied Biosystems em volume total de 25 µL (DNA 1,0 µL, GoTaq ® master mix 12,5 µL, *primer* 8f 1,0 µL e *primer* 1512r 1,0 µL, a água destilada foi adicionada para completar os 25 µL) e seguindo as condições de desnaturação a 94 ºC por 5 min e 35 ciclos de 94 ºC por 10 seg, 61 ºC por 20 seg, 68 ºC por 2 min e extensão final à 72 ºC por 7 min.

Os fragmentos foram purificados (QIAquick PCR Purification *Kit* - Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com o manual do fabricante, e os materiais obtidos foram sequenciados no Centro de Estudos dos Genomas Humanos, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As sequencias foram comparadas àquelas depositadas em GenBank, usando o algoritmo BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

4.1.5.2 Sequenciamento completo

Foi realizado o sequenciamento completo da cepa BVB1 utilizando o sequenciador NextSeq500 da Illumina. A análise por Shotgun (Nextera XT DNA *kit*) seguiu a partir da extração de DNA da cepa BVB1, a qual foi submetida a 300 ciclos no modo High do NextSeq500 v2, sendo considerado como parâmetro mínimo 1 Gb de *throughput* com pelo menos 75% (Q>=30) e 1000 ng de massa mínima de DNA genômico em concentração igual ou superior a 50 ng/L por amostra. A integridade do material foi avaliada em gel de agarose.

4.1.6 Detecção das atividades enzimáticas

Para o inóculo foram utilizadas alíquotas de 10 µL das diluições seriadas do caldo nutriente contendo as cepas BVB1 e BVB5 em água peptonada a 0,1%.

A capacidade da produção de enzimas foi investigada através de inoculação de alíquotas de 10 µL das diluições seriadas de 10^{-4} a 10^{-7} em placas contendo meios apropriados para atividades enzimáticas de amilase, protease e lipase, segundo CUZZI e colaboradores (2011), como brevemente descrito abaixo. As atividades foram somente identificadas e não quantificadas pelo tamanho dos halos.

Atividade Amilolítica

As cepas de BVB1 e BVB5 foram cultivadas em meio de teste de atividade amilolítica, onde 9,75 g de ágar batata (Difco) foram ressuspensos em 250 mL de água destilada e autoclavadas a 121 ºC por 15 min. As placas foram cultivadas em DBO por 48 h a 42 ºC e os halos translúcidos identificados por adição de lugol.

Atividade proteolítica

As cepas de BVB1 e BVB5 foram cultivadas em meio contendo 7,38 g de TPB (Caldo de Triptose Fosfato, Difco, USA), 3,25 g de ágar bacteriológico (Bacto Agar) e 230 mL de água destilada e autoclavada a 121 ºC por 15 min e suplementado com suspensão de 5,0 g de *Skim*

Milk (Difco) em 20 mL de água destilada e autoclavada. Os halos translúcidos foram identificados diretamente nas placas para as atividades proteolíticas.

Atividade lipolítica

As cepas de BVB1 e BVB5 foram cultivadas em meio contendo 2,5 g de Peptona (Difco, USA), 1,25 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,025 g de cloreto de cálcio ($CaCl_2$), 3,25 g de ágar bacteriológico (Bacto Agar), 0,5% (v/p) de Tween 80 e 250 mL de água destilada e autoclavada a 121 ºC por 15 min. Os halos de precipitação identificados visualmente nas placas detectam as atividades lipolíticas.

4.1.8 Métodos analíticos de enumeração de células vegetativas e detecção de esporos

Contagem de BVB5 nos caldos fermentados

Volumes de 100 µl de cada amostra dos caldos fermentados dos meios escolhidos para a esporulação foram diluídos em 900 µl de 0,1% de água peptonada (peptona – Difco, USA) e 5 µl de cada solução diluída foi inoculada em triplicata em placas de Petri contendo ágar nutriente (Difco, USA). As placas foram incubadas em DBO à 44 ºC por 24 horas e o número de colônias contados de onde foram calculados os resultados em UFC/mL segundo a seguinte fórmula:

Número de colônias x Diluição x 200 = UFC/mL

Os resultados foram plotados em gráfico de difusão com escala logarítmica no eixo vertical. As curvas resultantes foram analisadas em conjunto com os resultados de lâminas de esfregaços coradas com verde malaquita/safranina (MG/SF) segundo método de Schaeffer-Fulton, para verificar se houve ou não houve a ocorrência da esporulação e o seu grau, de forma empírica.

Lâminas de esfregaço do caldo fermentado de BVB5 corados com MG/SF

Lâminas de vidro de esfregaços de um volume de 5 µl das amostras coletadas foram fixadas por chama de bico de Bunsen, coradas com MG/SFde acordo com o método de Schaeffer-Fulton (HAMOUDA et al., 2002), e observadas sob microscópio óptico (OLYMPUS BX51, Japão) para verificar a presença ou ausência de esporos. Os resultados observados foram comparados com os resultados da enumeração microbiológica.

4.2 FERMENTAÇÃO

O crescimento da biomassa se dá através de processo fermentativo em batelada realizado em biorreatores. A escolha do meio nutricional é fator decisivo para a fermentação ótima e eficácia na formação de biomassa esporulada. Para esse propósito foram selecionados alguns meios da literatura conhecidos por serem específicos para isolamento e crescimento de *Bacillus coagulans*, GYT, GYP, GYPs, YE, este último utilizado pela indústria para o crescimento e esporulação de *Bacillus* spp, e o meio FNY (adaptado de RABINOVITCH & OLIVEIRA, 2015). Foram utilizadas também as versões diluídas dos meios de YE e FNY a fim de limitar os nutrientes para propiciar a esporulação. A descrição dos meios e suas composições em porcentagem se encontram na tabela 2.

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura GYP, YE, YE50, GYT, FNY e FNY50

Meios / Reagentes	GYP	YE	YE50	GYT	FNY	FNY50
Glucose	2,0%	0,39%	0,195%	4,0%	0,195%	4,0%
Triptona	–	–	–	1,3%	–	–
Proteína de soja	–	0,24%	0,12%	–	2,0%	1,0%
Extrato de levedura	0,5%	0,08%	0,04%	1,3%	1,0%	0,5%
Peptona	0,5%	–	–	–	–	–
CH_3COONa	–	–	–	0,067%	0,0335%	0,0168%
K_2HPO_4	–	0,1%	0,05%	–	–	–
KH_2PO_4	–	0,1%	0,05%	–	–	–
NaCl	–	–	–	0,0015%	1,2%	0,6%
$MnSO_4$	–	0,00086%	0,00043%	0,0015%	0,18%	0,09%
$CaCO_3$	0,01%	0,1%	0,05%	2,0%	–	–
$MgSO_4.7H_2O$	–	0,00086%	0,00043%	0,0013%	0,012%	0,006%
$FeSO_4.7H_2O$	–	0,0001%	0,00005%	0,024%	0,012%	0,006%
$ZnSO_4$	–	0,00086%	0,00043%	–	0,012%	0,006%
$CaCl_2$	–	–	–	–	0,06%	0,03%
pH	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

GYP – Meio de glicose, extrato de levedura, peptona; YE – Meio de glicose, proteína de soja, extrato de levedura; YE50 – Meio YE diluído em 50%; GYT – Meio de glicose, extrato de levedura, triptona; FNY – Meio de glicose, proteína de soja, extrato de levedura; FNY50 – Meio FNY diluído em 50%.

4.2.1 Escolha do meio adequado para aumento de biomassa e esporulação

Testes preliminares de fermentação, primeira e segunda, incluíram a ativação da BVB5 em 30 mL de caldo nutriente (Difco, USA) estéril contido em *erlenmeyers* de 100 mL. O caldo inoculado com BVB5 foi levado ao *shaker* (Gyromax 737 – Amerex Instruments, Inc.) à 43 ºC e 275 rpm durante 48 h. Alíquotas de 5 mL desse caldo foram inoculados em 100 mL dos meios de GYT, GYP, YE e FNY contidos em *erlenmeyers* de 300 mL previamente autoclavados à 121 ºC durante 15 min. Os *erlenmeyers* contendo os meios inoculados foram levados ao *shaker* à 43 ºC e 275 rpm por 96 h.

Foram feitos os esfregaços com alíquotas de 30 µL dos respectivos caldos fermentados das amostras de 96 h e visualizados em microscópio óptico (OLYMPUS BX51, Japão) para uma análise qualitativa de células vegetativas e esporos através da coloração de esporos com MG/SF. Posteriormente foram feitas as análises de contagem das bactérias para a quantificação das colônias viáveis em UFC/mL. Para garantir a germinação dos esporos, as amostras sofreram um choque térmico de 10 minutos em banho de 80 ºC com mais 5 minutos em banho de gelo à 0 ºC. Após o choque térmico, alíquotas de 1 mL de cada meio foram retiradas para uma diluição seriada, e posterior plaqueamento. As placas foram levadas para a incubadora DBO à 43 ºC por 48 h quando foram feitas as contagens das colônias viáveis.

4.2.2. Cinética da Esporulação

Ativação de BVB5

A ativação de BVB5 foi conduzida inoculando 5 colônias de BVB5 do banco de trabalho (cultivado em placas de ágar nutriente durante 24 h em incubadora DBO à 44 ºC) em 10 mL de meio GYPs em erlenmeyers de 50 ml e incubados em *shaker* à 44 ºC e 275 rpm por 24 h.

As cinéticas da esporulação de BVB5, inoculado com 300 µL do caldo ativado em 30 mL de cada meio escolhido, os quais apresentaram esporos, através dos testes preliminares, foram conduzidas em um *shaker* (Gyromax 737 – Amerex Instruments, Inc.) à 44 ºC e 275 rpm. Amostras foram coletadas logo após a inoculação (amostra da 0 h) e a cada 3 horas até 24 horas, e a cada 24 horas até 96 horas, i.e., 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 15 h, 18 h, 21 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. Lâminas de esfregaços coradas com MG/SF foram preparadas para cada amostra e as suas contagens das células vegetatiavas foram realizadas. Os resultados das enumerações foram calculados em UFC/mL e plotados em gráfico.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos resultados obtidos foi feita Análise Estatística utilizando o teste de *Tukey* através do programa *Prisma* versão 7 (GraphPad, USA). Em todas as análises foi considerado nível de significância $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CEPA DE *Bacillus coagulans*

Houve um equívoco no envio da primeira cepa de BVB1, que foi detectado pelos testes de caracterização, abaixo descritos, como sendo *Bacillus subtilis*. Dessa forma a cepa BVB1 foi reservada para futuros testes de avaliação do potencial probiótico. Após essas análises, foi recebida nova cepa, BVB5, que passou pelos mesmos testes de BVB1 (exceto o sequenciamento do genoma completo), sendo caracterizada como *Bacillus coagulans,* dando sequencia ao estudo de análise da cinética de fermentação para produzir crescimento de biomassa e esporulação ótimos em uma única batelada.

5.1.1 Ativação da cepa

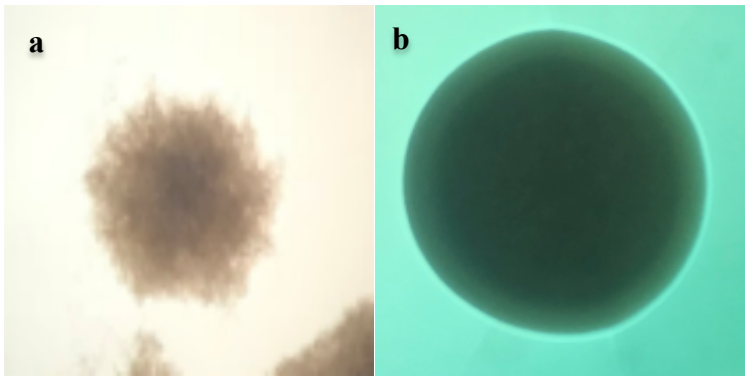
As cepas BVB1 e BVB5 foram pré-ativadas com choque térmico a 80 ºC por 10 minutos seguido de resfriamento a 0 ºC por 5 minutos para a germinação dos esporos. Após o choque, as cepas foram ativadas com sucesso e utilizadas nos testes de caracterização subsequentes. Esse procedimento de ativação é utilizado pela empresa doadora das cepas e o mesmo foi reprodutível.

5.1.2 Caracterização por testes morfológicos

Análise fenotípica por microscopia óptica

As colônias das cepas de BVB1 e BVB5 apresentaram diferenças fenotípicas significativas ao serem observadas em microscópio óptico (Figura 9). A coloração de Gram foi realizada para verificação dessas diferenças morfológicas.

Figura 9 – Análise morfológica comparativa entre BVB1 em (a) e BVB5 em (b)

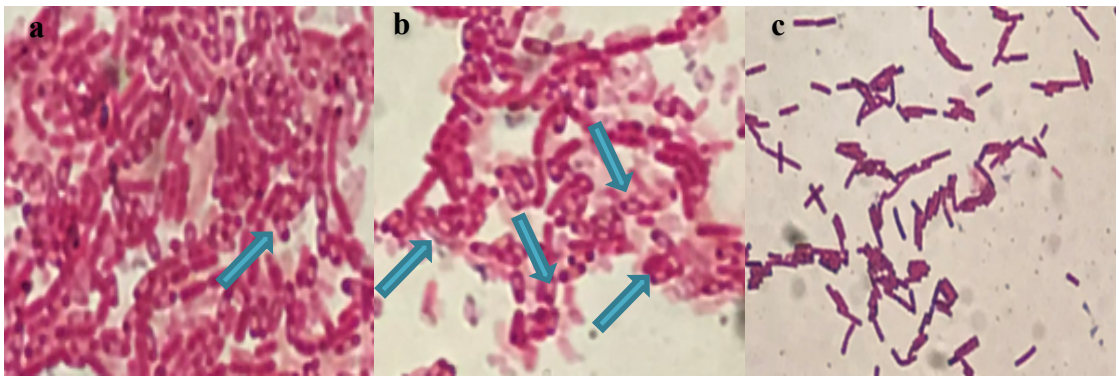


Fonte: o autor, 2019.

Coloração de Gram

A coloração roxa do teste de Gram mostra que tanto a cepa BVB1 quanto a cepa BVB5 são Gram positivas e apresentam formação de esporos. A cepa BVB1 (indicadas pelas setas nas figuras 10a e 10b) apresentou esporos em alta concentração quando comparada à cepa BVB5 (Figuras 10c). A formação de esporos é desejada para o desenvolvimento tecnológico da cepa. A cepa BVB1 apresentou esporulação mais rápida que a cepa BVB5. A cepa BVB5 não apresentava esporos nas primeiras análises (Figura 10c)

Figura 10 – Análise de Gram de BVB1 em (a) e (b), e BVB5 em (c)



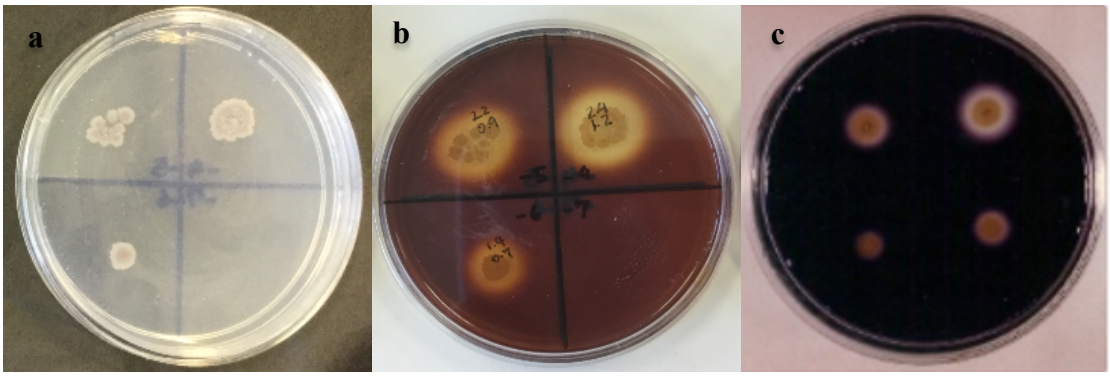
Fonte: o autor, 2019.

5.1.3 Testes enzimáticos de BVB1

Os testes enzimáticos foram conduzidos com as cepas BVB1 (Figuras 11, 12 e 13) e BVB5. Os resultados de amilase, protease e lipase foram positivos para BVB1 que podem ser confirmados pelos halos: translúcidos em amilase e protease e por halos de precipitação em lipase. Em contrapartida a BVB5 não apresentou resultado positivo em amilase, e quanto a protease houve resposta positiva fraca e não foi possível identificar a atividade de lipase com

exatidão como da BVB1 (dados não apresentados). Pode-se afirmar que os resultados de BVB5 seguem os padrões da referência literária de Bergey's, onde a amilase é negativa; a protease apresenta resultados variáveis; e, a resposta para lipase não está disponível para *B. coagulans*.

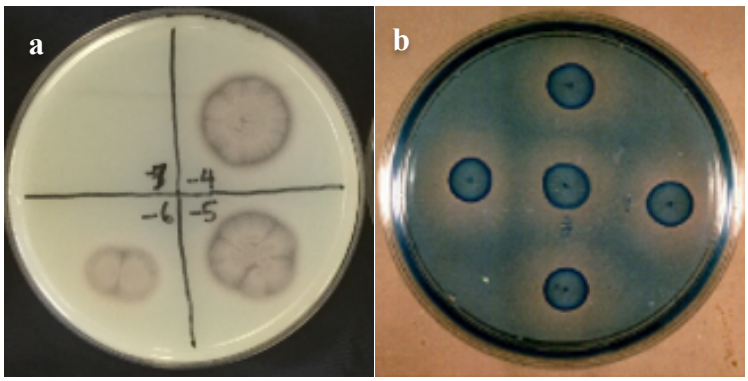
Figura 11 –Atividade amilolitica de BVB1 sem lugol (a), revelada com lugol (b) e controle (c)



Fonte: o autor, 2019.

A atividade amilolítica da cepa BVB1 (Figura 11b) apresentou atividade superior ao controle (Figura 11c).

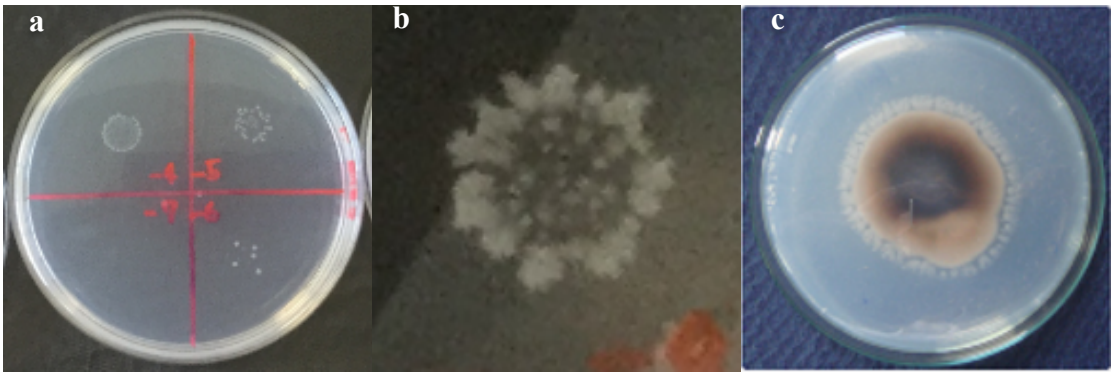
Figura 12 – Resultado do teste de protease de BVB1 - BVB1 (a) e controle (b)



Fonte: o autor, 2019.

A atividade de protease da cepa BVB1 (Figura 12a) apresentou atividade equivalente ao controle (Figura 10b).

Figura 13 – Resultado do teste de lipase de BVB1 (a, b) e controle (c)



Fonte: o autor, 2019.

A atividade de lipase da cepa BVB1 encontra-se aumentada (Figura 11b).

As figuras 11, 12 e 13 mostram que a cepa de BVB1 apresentou atividades amilolítica, proteolítica e lipolítica (CUZZI *et al*., 2011). A existência do halo da atividade amilolítica não pôde ser detectada a menos que fosse revelada com lugol. Na atividade proteolítica o halo se apresenta visível devido à turbidez que o leite confere ao meio. A atividade lipolítica se apresentou nitidamente através do halo de precipitação ao redor da colônia de BVB1. O halo se apresentou morfologicamente análogo à coroa de uma flor.

Os resultados das atividades enzimáticas de BVB1 e BVB5 foram coletadas e estão apresentadas na tabela 3, sendo que as imagens das atividades enzimáticas de BVB5 não estão disponíveis.

Tabela 3 - Resultados dos testes enzimáticos de BVB1 e BVB5

Teste enizmático	BVB1	BVB5	**Parâmetros de Referência de Bergey's (*B. coagulans*)**
Amilase	+	–	–
Protease	+	+	+
Lipase	+	**N/D**	**N/D**

As atividades enzimáticas analisadas são de interesse significativo para se conhecer o potencial probiótico do microrganismo, por disponibilizarem os nutrientes de maneira mais fácil à absorção intestinal (FLEMMING *et al*., 2005).

5.1.4 Testes bioquímicos

Para os testes bioquímicos foram utilizadas as culturas de 24 h de BVB1 e BVB5 estriadas em placa de Petri contendo meio de ágar nutriente (MNA) suplementado com 0,3%

de extrato de levedura. Os testes realizados foram: catalase, hidrólise de amido, lecitinase, crescimento em NaCl a 6,5%, gelatinase, motilidade, indol e Voges-Proskauer. Os resultados obtidos foram apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados dos testes bioquímicos e referências

Teste bioquímico	**BVB1**	**BVB5**	**Referência**
Catalase	+	+	+
Amido	+	–	–
Lecitinase	–	–	–
Gelatina	+	–	–
Motilidade	+	+	+
Indol	–	–	–
Voges Proskauer	+	+	+
Crescimento em Caldo Nutriente	+	+	+
Crescimento em NaCl a 6.5%	+	–	–

Fonte: o autor, 2019.

Na avaliação bioquímica, foi constatado que a cepa BVB1 apresentou características distintas da cepa BVB5, sendo as características da cepa BVB5 condizentes com as definidas por SNEATH e colaboradores (1986) para *Bacillus coagulans*.

Os testes de Gelatina (+) e crescimento em NaCl a 6,5% (+) indicaram que a cepa BVB1 provavelmente é um bacilo não pertencente à espécie *coagulans*. Desta forma, as cepas BVB1 e BVB5 foram submetidas às análises físico-químicas e genômicas de identificação e caracterização.

5.1.5 Caracterização físico-química por espectrometria

As estirpes BVB1 e BVB5 foram submetidas à análise físico-química utilizando a técnica de MALDI-TOF MS, e seus espectros foram comparados usando bancos de dados *Biotyper software* (Brucker Daltonics) para a identificação do microrganismo (FERREIRA, 2009). Apesar da técnica apresentar certa limitação na análise de bactérias Gram positivas esporuladas em que existe a possibilidade de ocorrer a superposição de cepas, os resultados (Figuras 14 e 15) se apresentaram satisfatórios verificados pelos índices maiores que 2.

Figura 14 – Resultado da análise de espectrometria de BVB1 por MALDI TOF/MS

A11 (++) (A)	6	Bacillus subtilis	2.183	Bacillus subtilis	2.093

Fonte: o autor, 2019.

Figura 15 – Resultado da análise de espectrometria de BVB5 por MALDI TOF/MS

J8#1 (++)(A)	J8#1	Bacillus coagulans	2.096	Bacillus coagulans	1.746

Fonte: o autor, 2019.

5.1.6 Caracterização genômica por sequenciamento

A técnica de MALDI-TOF não é segura para microrganismos Gram positivos esporulados (devido à ocorrência de superposição de cepas), fungos e leveduras, desta forma, fizeram-se necessárias as caracterizações genômicas por 16S rRNA realizadas para ambas as cepas, e de sequenciamento genômico completo somente da BVB1.

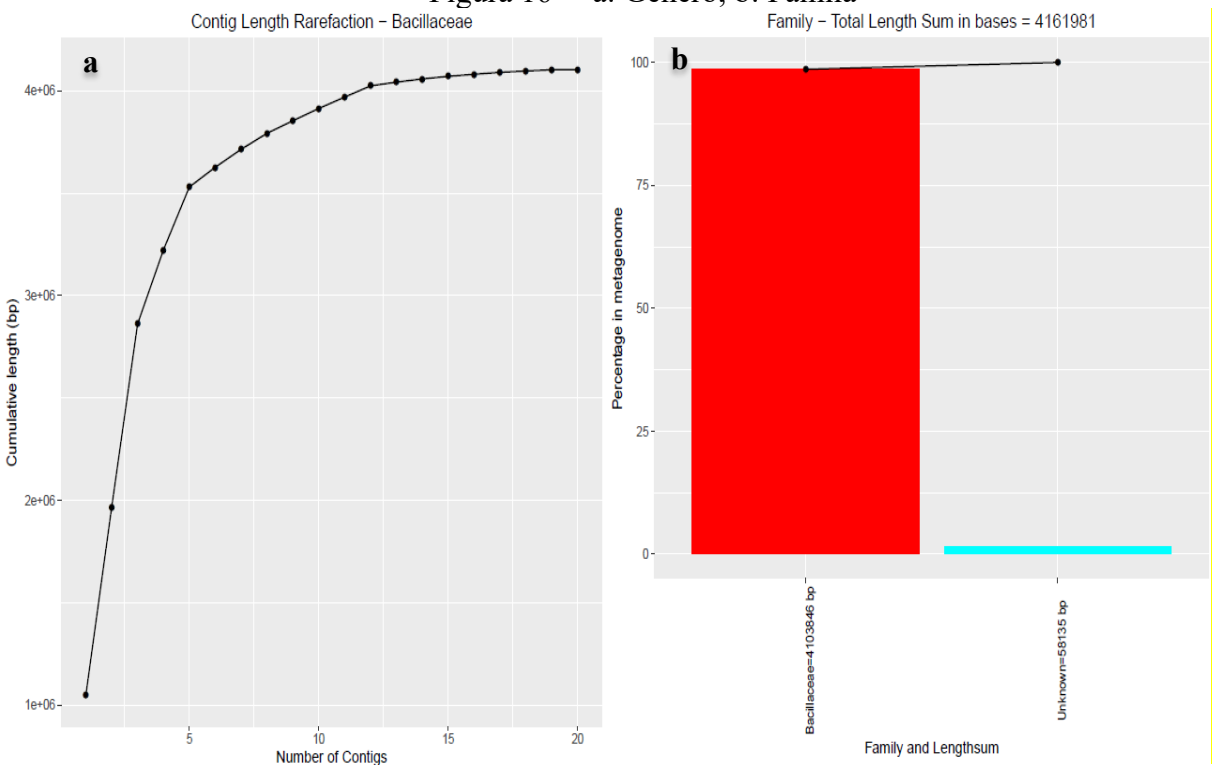
A técnica de sequenciamento por Ilumina confirmou que a cepa BVB1 se trata de *Bacillus subtillis* e não de *Bacillus coagulans* (Figuras 16 e 17). A cepa BVB5 foi confirmada como sendo *Bacillus coagulans* através do sequenciamento 16S rRNA (Tabela 5). O sequenciamento 16S rRNA da tabela 5 confirmou o resultado do sequenciamento por Illumina para BVB1 de *Bacillus subtilis* (Figuras 16 e 17).

Tabela 5 – Resultados do 16S rRNA

Amostra	Resultado	Identidade	Amostra	Resultado	Identidade
CB02 BVB5	*B. coagulans*	98%	CB07 BVB5	*B. coagulans*	97%
CB03 BVB5	*B. coagulans*	95%	CB08 BVB5	*B. coagulans*	96%
CB04 BVB1	*B. subtilis*	97%	CB09 BVB1	*B. subtilis*	95%
CB05 BVB1	*B. subtilis*	93%			

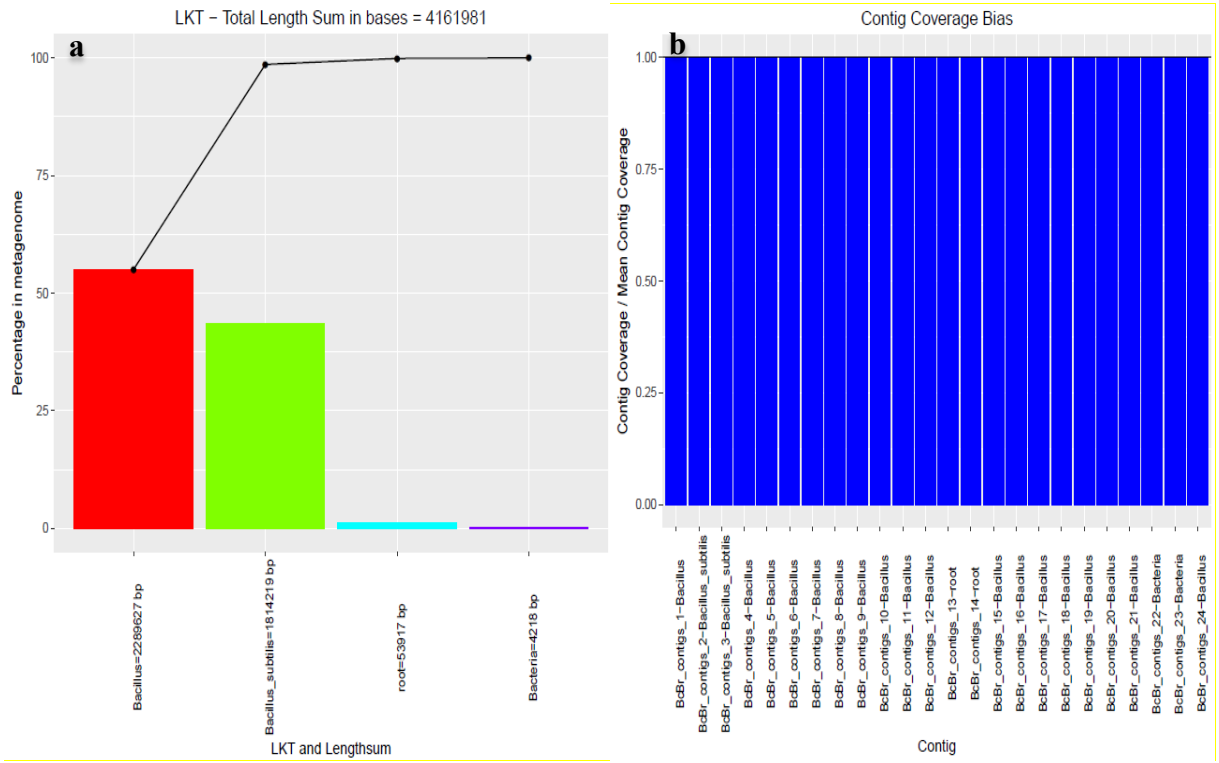
Fonte: o autor, 2019.

Figura 16 – a: Gênero; b: Famíla



Fonte: o autor, 2019.

Figura 17 –a: espécie; b: subespécie



Fonte: o autor, 2019.

Estudos anteriores (Cardozo, 2006) mostraram a eficácia da bactéria *Bacillus subtillis* no melhoramento do desempenho zootécnico em frangos de corte. Desta forma, foi avaliada a possibilidade de também utilizar esta cepa como melhorador zootécnico. Para tanto, foi investigada a presença de genes de virulência, genes de resistência antimicrobiana e patogenicidade da cepa.

A cepa BVB1 não apresentou plasmídeos (Figura 18), de acordo com a especificação de segurança para desenvolvimento de novas cepas probióticas (FAO/WHO, 2002). Foram encontrados genes cromossomais de resistência para tetraciclina tet(L) e para estreptomicina (aadK) (Figura 19). O gene tet(L) representa o mecanismo de resistência por bomba de efluxo, de forma que sendo um gene cromossomal não implica em risco para o uso zootécnico. Dos possíveis fatores de virulência (4206 CDSs), apenas 0,02% (1 fator em 4206 CDSs) mostrou toxicidade e 8,11% (341 fatores de 4206) foram confirmados como não patogênicos. Mais estudos são necessários para garantir a inocuidade desta cepa. Para tanto o projeto seguiu apenas com a cepa BVB5, cujo sequenciamento de 16S rRNA confirmou o resultado de *Bacillus coagulans* (Tabela 4).

Figura 18 – Presença de plasmídeos em BVB1

Plasmids

Contig	PlasmidOri	HITCOVERAGE	PCTIDENTITY	COVoverMEAN
none	0	0	0	0

Contigs with plasmid origins

Fonte: o autor, 2019.

Figura 19 – Presença de genes de resistência a antibióticos em BVB1

Resistance genes

Contig	ResGene	HITCOVERAGE	PCTIDENTITY	Replicon	COVoverMEAN
BcBr_contigs_3	aadK	100	100	Unknown	1
BcBr_contigs_1	tet(L)	100	100	Unknown	1

Significant hits to known resistance genes

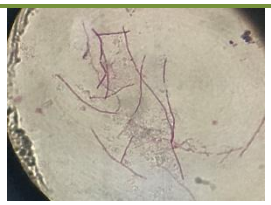
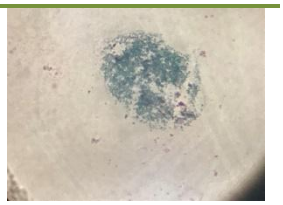
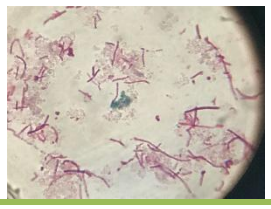
Fonte: o autor, 2019.

5.2 FERMENTAÇÃO

5.2.1. Escolha do meio adequado para aumento de biomassa e esporulação

Testes prévios dos meios utilizados na análise morfológica da fermentação de BVB5 estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Morfologias de BVB5 nos diferentes meios da primeira fermentação de 96 horas. Lâminas tingidas com verde MG/SF.

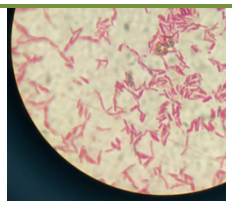
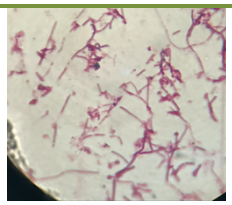
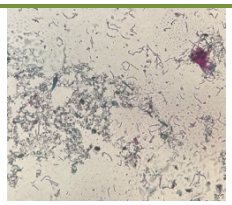
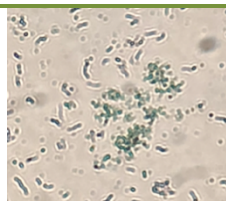
Meios	GYP	GYT	YE
Normal			
Diluído	N/A		

GYP – Meio de glicose, extrato de levedura, peptona; YE – Meio de glicose, proteína de soja, extrato de levedura; GYT – Meio de glicose, extrato de levedura, triptona
Fonte: o autor, 2019.

Através destes resultados (tabela 6) pode-se verificar que o meio YE apresentou somente esporos (coloração verde) após 96 horas de fermentação, fato não verificado no meio GYP, em que apresenta somente células vegetativas de coloração vermelha; e a frequência de esporos em GYT foi baixa com presença de grande quantidade de células vegetativas (coloração vermelha). Esse resultado parcial mostrou que a esporulação é possível, apesar da literatura considerá-la um grande desafio (AMAHA et al., 1955; JOGI et al, 2008).

Foi testado o meio FNY (tabela 6) no segundo teste prévio, onde os esporos puderam ser vistos nos esfregaços de YE e FNY corados com MG/SF, enquanto meios de cultura contendo grandes quantidades relativas de glicose tais como GYP, GYPs e GYT não exibiram esporulação satisfatória. A morfologia de células vegetativas do caldo GYP é a que mais difere das outras, apresentando células filamentosas, o que possivelmente se deve à ausência de sais na sua composição (AMAHA et al., 1956), e mais longas do que as outras que apresentaram células mais curtas. Assim, YE e FNY foram os meios de cultura escolhidos para seguir com os experimentos da cinética da esporulação.

Tabela 7 – Morfologias de BVB5 nos diferentes meios da segunda fermentação de 96 horas. Lâminas tingidas com verde MG/SF.

GYP	GYPs	GYT	YE	FNY
				

GYP – Meio de glicose, extrato de levedura, peptona; GYPs – Meio de glicose, extrato de levedura, peptona, solução de sais; YE – Meio de glicose, proteína de soja, extrato de levedura; GYT – Meio de glicose, extrato de levedura, triptona; FNY – Meio de glicose, proteína de soja, extrato de levedura
Fonte: o autor, 2019.

5.2.2. Cinética da Esporulação

O esfregaço de GYPs com MG/SF (Tabela 7) apresentou células curtas coradas em vermelho na sua maioria, sendo escolhido como a semente de inoculação para a cinética de esporulação com os meios YE, YE50, FNY e FNY. O número de bactérias inoculadas (5,13x10^8 UFC/mL) em cada meio da cinética de esporulação foi calculado a partir do resultado da enumeração do caldo da ativação em UFC/mL. Desta forma, a inoculação de 300 µL do caldo da ativação (GYPs) representou a quantidade de 1,54x10^8 UFC/mL de bactérias inoculadas em 30 mL dos respectivos meios de inoculação em duplicata.

Tabela 8 – Enumeração da cinética de esporulação de BVB5

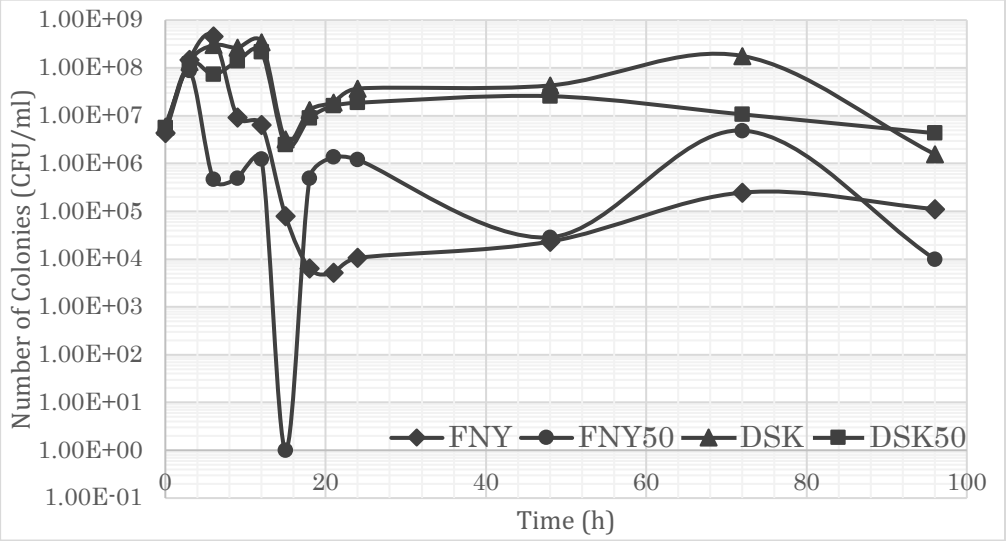
Sem choque térmico	FNY(UFC/ml)	FNY50(UFC /ml)	YE (UFC /ml)	YE50(UFC /ml)
0 h	4,37E+06	4,78E+06	6,02E+06	5,70E+06
3 h	1,48E+08	8,83E+07	1,33E+08	1,19E+08
6 h	4,57E+08	4,67E+05	2,99E+08	7,28E+07
9 h	9,29E+06	4,92E+05	2,64E+08	1,38E+08
12 h	6,50E+06	1,25E+06	3,48E+08	2,18E+08
15 h	8,01E+04	0,00E+00	3,18E+06	2,45E+06
18 h	6,41E+03	4,88E+05	1,31E+07	8,91E+06
21 h	5,21E+03	1,36E+06	1,91E+07	1,64E+07
24 h	1,06E+04	1,20E+06	3,70E+07	1,87E+07
48 h	2,33E+04	2,87E+04	4,30E+07	2,57E+07
72 h	2,47E+05	4,89E+06	1,78E+08	1,07E+07
96 h	1,12E+05	1,00E+04	1,56E+06	4,32E+06

Fonte: o autor, 2019.

O grau de esporulação foi calculado através da razão entre o resultado da subtração dos valores máximos e mínimos de UFC/mL pelo valor máximo de UFC/mL de cada meio (Tabela 9). Os resultados mostraram que os caldos de YE e YE50 obtiveram altos resultados de esporulação, 96,40% e 98,88% respectivamente, e FNY50 apresentou o maior grau de esporulação de 100,00% seguido de FNY com 99,99%.

O gráfico de curvas bem ordenadas mostrando uma frequência regular permite que os pontos de máxima esporulação sejam verificados antes das 21 horas de fermentação para todos os meios de cultura: 21h para FNY e 15h para FNY50, YE e YE50 (Figura 18).

Figura 20 – Gráfico de UFC/mL x Tempo (h) da cinética da esporulação de BVB5



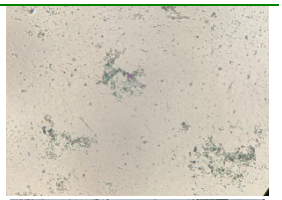
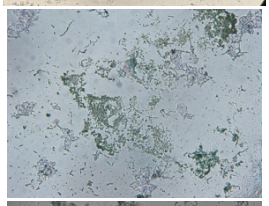
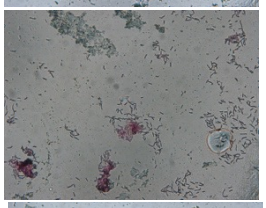
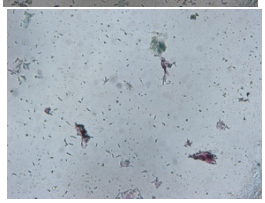
Fonte: o autor, 2019.

Na tabela 9 é possível identificar que FNY50 e FNY apresentam esporos (corados de verde) na sua totalidade, enquanto YE e YE50 apresentam esporos em verde e células vegetativas em vermelho.

Foram testados meios de cultura com metade da concentração original de nutrientes, FNY50 e YE50, para verificar se a epleção de nutrientes poderia ser a chave para a esporulação de BVB5 (AMAHA et al., 1956). O gráfico da figura 20, mostra que FNY50, comparado a FNY, parece seguir essa condição. Entretanto, o mesmo não aconteceu com YE50 comparado a YE, nos quais ambos apresentaram o mesmo valor mínimo de UFC/mC. Dessa forma, a depleção nutricional não é uma condição válida para todos os meios de cultura de esporulação para BVB5. A presença ou ausência de certos minerais pode ser uma condição de esporulação para BVB5, pois as morfologias das células de BVB5 apresentaram-se filamentosas e ausentes

de esporos no meio de GYP, enquanto outros meios contendo minerais apresentaram células mais curtas com esporos em FNY, FNY50, YE, YE50 e pouca quantidade de esporos em GYPs (Tabela 9). Entre todos os meios de cultura, a esporulação ocorreu em FNY e YE e nos meios correlacionados (Tabela 9). Comparando os seus nutrientes com os outros meios de cultura em que a esporulação não ocorreu ou foi insatisfatória, a maior diferença reside na presença de proteína de soja não hidrolisada e, portanto, não solúvel nos meios de cultura.

Tabela 9 – Pontos máximo e mínimo de UFC/mL de cada caldo fermentativo e suas respectivas imagens.

Meio de cultura	Valor Minimo (UFC/ml)	Valor Máximo (UFC/ml)	Tempo de Esporulação	Grau de Esporulação	Imagens dos esfregaços com MG/SF
FNY	5,21E+03	4,57E+08	21 h	99,99 %	
FNY50	0,0E+00	8,83E+07	15 h	100,00 %	
YE	3,18E+06	3,48E+08	15 h	96,40 %	
YE50	2,45E+06	2,18E+08	15 h	98,88 %	

MG/SF – Coloração de verde malaquita/safranina; FNY – Meio de glicose, proteína de soja, extrato de levedura; FNY50 – Meio diluído a 50% de glicose, proteína de soja, extrato de levedura; YE – Meio de glicose, proteína de soja, extrato de levedura ; YE50 – Meio diluído a 50% de glicose, proteína de soja, extrato de levedura

Fonte: o autor, 2019.

Foram realizados experimentos na tentativa de quantificar o número de esporos em UFC/mL, aplicando choque térmico (75 ºC/10 min, 0 ºC/5 min) nas amostras coletadas durante a cinética de esporulação de BVB5 a fim de eliminar as células vegetativas presentes no caldo,

e promover a germinação dos esporos. Os resultados das enumerações estão apresentados na tabela 9.

Tabela 10 – Contagem de esporos de *Bacillus coagulans* BVB5

Choque térmico	FNY(UFC/mL)	FNY50(UFC/mL)	YE(UFC/mL)	YE50(UFC/mL)
0h	1,04E+05	4,24E+05	7,78E+04	2,26E+05
3h	1,53E+05	1,89E+05	9,63E+04	1,57E+05
6h	1,01E+05	1,89E+03	5,34E+05	4,68E+05
9h	1,33E+03	1,67E+03	3,34E+03	4,67E+04
12h	0,00E+00	2,33E+05	3,44E+06	2,27E+06
15h	0,00E+00	0,00E+00	1,71E+04	5,03E+02
18h	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,40E+05
21h	0,00E+00	0,00E+00	1,61E+03	1,53E+04
24h	8,07E+06	4,93E+08	2,67E+04	2,16E+08
48h	2,62E+05	2,13E+04	4,00E+03	6,67E+02
72h	6,67E+03	1,17E+04	2,72E+05	2,70E+05
96h	1,48E+04	2,73E+04	0,00E+00	1,00E+03

Fonte: o autor, 2019.

Os resultados apresentados não refletiram a quantidade de esporos esperados quando se comparou os dados dos testes com e sem choque térmico (tabelas 8 e 10) presentes no caldo fermentado de BVB5 nos respectivos tempos de fermentação. Observou-se, através das lâminas dos esfregaços corados com MG/SF, que os esporos formam aglomerados (Tabela 9), fato que provavelmente dificulta sua germinação. Os dados da tabela 10, não refletem números comparativos com os dados da tabela 8, sugerindo que mais estudos serão necessários para se determinar o número de esporos presentes no caldo fermentado de BVB5. A sonicação pode ser uma alternativa para esta dificuldade, assim como mudar parâmetros de tempo e temperatura do choque térmico, ou ainda testar um choque ácido.

Os meios FNY e FNY50 são tecnologicamente interessantes devido ao curto tempo de esporulação máxima (<24 h) e os respectivos graus de esporulação. Analisando somente o grau de esporulação, FNY50, a princípio, apresenta ser mais interessante. No entanto quando o número máximo de colônias é considerado, conclui-se que FNY, que alcançou o valor de $4{,}57 \times 10^8$ UFC/mL, é realmente mais interessante tecnologicamente, pelo número total de células vegetativas alcançadas em 21 horas de fermentação, do qual 99,99% foram

transformados em esporos (Tabela 8). Este valor se apresenta maior que o número de esporos de $8,87x10^7$ UFC/mL de FNY50, o qual alcançou o maior grau de esporulação. São necessários mais estudos para o aumento de biomassa de células vegetativas sendo totalmente transformadas em esporos.

6. CONCLUSÃO

- A cepa BVB5, *Bacillus coagulans* tem potencial probiótico, porém apresenta dificuldade no processo de esporulação (inerente à espécie), sendo este o principal desafio tecnológico em estudo para dar sequência aos ensaios *in vivo* e avaliar seu potencial probiótico em substituição aos Antimicrobianos Promotores de Crescimento, os AGPs. Apesar de a esporulação de *Bacillus coagulans* apresentar um grande desafio, pode-se concluir através dos resultados deste estudo que os ensaios preliminares de cinética da fermentação são promissores.
- Resultados promissores no aumento de biomassa e esporulação total simultânea foram alcançados nos ensaios de cinética da fermentação de BVB5.
- Mais estudos de aumento de biomassa esporulada de BVB5 são necessários para dar sequência aos estudos *in vivo* e avaliar seu potencial probiótico como aditivo alimentar em substituição aos AGPs.
- A cepa BVB1 apresentou resultados promissores como microrganismo probiótico. Entretanto ela foi reservada para estudos posteriores por não fazer parte do escopo do projeto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, B. **Alternativas aos Promotores de Crescimento**, BioCamp Laboratórios Ltda. Palestra do Curso FACTA de 16 e 17 de fevereiro de 2016. Disponível em: <http://www.facta.org.br/cursonutricao/programacao/>. Acesso em 1º de dezembro de 2018.

AMAHA, M., & ORDAL, Z. J. **Effect of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*.** Journal of bacteriology, v.74(5), p.596, 1957.

AMAHA, M., ORDAL, Z. J., & TOUBA, A. **Sporulation requirements of *Bacillus coagulans* var. thermoacidurans in complex media.** Journal of bacteriology, v.72(1), p.34, 1956.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL E APEX BRASIL. BRAZILIAN CHICKEN. **O Frango no Mundo,** 2016. Disponível em: <http://www.brazilianchicken.com.br/pt/poultry-industry/world-chicken>. Acesso em: 29 de novembro de 2018.

BAYANE, A., DIAWARA B., DUBOIS, R. D., DESTAIN, D., ROBLAIN, D., THONART, P., **Isolation and Characterisation of New Spore-forming Lactic Acid Bacteria with Prospects of use in Food Fermentations and Probiotic Preparations**; African Journal of Microbiology Research Vol. 4 (11), pp. 1016-1025, 4 June 2010.

BISCO, ビスコ. **Bisco, 83 anos no Japão, *B. coagulans*** Disponível em: <http://www.glico.co.jp/biscuit/bisco/biscoboy.html> Acesso em: 09 de dezembro de 2018.

BRISOLA, M. C., STEFANI. L. M., **O que são promotores de crescimento?** Jornal Sul Brasil Rural, Chapecó, SC, p. 1 - 1, 2010. http://www.ceo.udesc.br/arquivos/id_submenu/285/caderno_udesc_050.pdf

CARDOZO, E. C**. Utilização de Probiótico (*Bacillus subtilis*) como Aditivo Alimentar em Dietas de Frangos**. Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006

CHEN, Y., DONG, F., & WANG, Y. **Systematic development and optimization of chemically defined medium supporting high cell density growth of *Bacillus coagulans*.** Applied microbiology and biotechnology, v.100, n.18, p.8121-8134, 2016.

CUTTING, S. M. ***Bacillus* probiotics**, Food Microbiol**.** v.28, pp.214-220. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.007, 2010.

CUZZI, C., LINK, S., VILANI, A., & ONOFRE, S. B. **Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraeceae*).** Global Science and Technology, v*4*, p2, 2011**.**

DEPARTAMENTO DE PESQUISAS E ESTUDOS ECONÔMICOS – BRADESCO, 2016. **Carne Avícola**. Disponível em: <http://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_carne_avicola.pdf>. Acesso em: 29 de novembro de 2017.

DIANESE, J. C.; SANTOS, L. T. P. 2010. dos; Anais: VI Congresso Brasileiro de Micologia; **Sociedade Brasileira de Micologia** (SBMy); Brasília- DF. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/16830/1/3200.pdf>. Acesso em: 26/10/2017.

DRIKS, A. **Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*.** Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, v.59 n.3 pp.389-391, 2002.

ERRINGTON, J. **Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis***. Nature Reviews Microbiology, v.1 n.2 p.117, 2003.

EUROPEAN FOOD SAFE AUTHORITY, 2013. **Europe`s fight against antimicrobial resistance**, apud **European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012**.

FERREIRA, L., SÁNCHEZ-JUANES, F., GONZÁLEZ-ÁVILA, M., CEMBRERO-FUCIÑOS, D., HERRERO-HERNÁNDEZ, A., GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M., & MUÑOZ-BELLIDO, J. L.. **Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by**

matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology, v.48, n.6, pp. 2110-2115, 2010.

FLEMMING, J.S., FREITAS, R.J.S. **Avaliação do efeito de prebióticos (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformes* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte.** Archives of Veterinary Science, v.10, n.2, p.41-47. 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013. **Phasing Out Certain Antibiotic Use in Farm Animals**. Disponível em: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm378100.htm>. Acesso em: 29 de novembro de 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. 2002

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016. **Tripartite Collaboration on AMR**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/tripartite/en/>. Acesso em: 29 de novembro de 2017.

FRITZE, D. 1999. **Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria**. Phytopathology, v.94 n.11, pp. 1245-1248. 2004.

GOMES, M. J. P.,. **Gênero *Bacillus* spp**. *Tópicos em Bacteriologia Veterinária*. FAVET – UFRGS. 2013.

GOWTHAMI, P.; MUTHUKUMAR, K.; VELAN, M. **Utilization of Coconut Oil Cake for the Production of Lipase Using *Bacillus coagulans* VKL1**; Biocontrol Science, v. 20, n. 2, pp.125-133, 2015.

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R. B., FLINT, H. J., SALMINEN, S., CALDER, P. C., SANDERS, M. E., **Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics**

and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, v.11(8), p.506, 2014.

HONG, H. A., DUC, L. H., CUTTING, S. M, **The use of bacterial spore formers as probiotics.** FEMS Microbiology Reviews, v.29, pp. 813-835, 2004.

HU, J.; ZHANG, Z.; LIN, Y.; ZHAO, S.; MEI, Y.; LIANG, Y.; PENG, N.; **High-titer lactic acid production from NaOH-pretreated corn stover by *Bacillus coagulans* LA204 using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation under non-sterile condition**; Bioresource Technology, v.182, pp.251–257, 2015.

HUNG, A. T., LIN, S. Y., YANG, T. Y., CHOU, C. K., LIU, H. C., LU, J. J. & LIEN, T. F. **Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens**. Animal production science, v.*52*(9), pp.874-879, 2012.

JOGI, E., **Method for obtaining endospores of sporogenous fermentable thermophilic strains of microorganism and use of the obtained endospores to inoculate fermentation.** Estonia International patent WO2008043368 A2, 17 abr. 2008.

KONEMAN, E. W., & ALLEN, S. **Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis**: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. Ed. Médica Panamericana. 2008

KOTAY, S. M.; DAS, D.; **Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge**; Bioresource Technology, v.98, pp.1183–1190, 2007.

MANFIO, G. P.; **Avaliação do Estado do Conhecimento da Diversidade Biológica do Brasil: MICROBIOTA**. Ministério Do Meio Ambiente. 2003. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/microb1.pdf. > Acesso em: 22 de outubro de 2017.

MANNHEIMER, W. A.. **Microscopia dos Materiais: Uma Introdução**. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

MARTINS, C. R. F., FERREIRA, J. A. P. de S., SIQUEIRA, L. F. de G., FERREIRA, L. A. P., BAZZO, M. L.,FRANCHINI, M., BERRO, O. J., VALLE, S. **Técnica de Coloração de GRAM**. Ministério da Saúde**,** Secretaria de Políticas de Saúde, Programa Nacional de DST e Aids; Brasília 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf >. Acesso em: 24 de outubro de 2017.

MARTINS, P. Aditivos melhoradores de desempenho: **Aditivos não químicos**. BioCamp Laboratórios Ltda. Palestra do Curso FACTA de 16 e 17 de fevereiro de 2016. Disponível em <http://www.facta.org.br/cursonutricao/programacao/ >. Acesso em: 1º de dezembro de 2017.

MCKENNEY, P. T., DRIKS, A., & EICHENBERGER, P. **The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat**. Nature Reviews Microbiology, v.11, n.1, p.33, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2004. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 30 DE NOVEMBRO DE 2004, confirmada na INSTRUÇÃO NORMATIVA 15/2009/MAPA**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692. >. Acesso em: 29 de novembro de 2016.

MONITORING OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND ANTIBIOTIC, 2016. **Usage in Animals, Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in The Netherlands in 2015**. Disponível em: <http://www.wur.nl/upload_mm/0/b/c/433ca2d5-c97f-4aa1-ad34-a45ad522df95_92416_008804_NethmapMaran2016+TG2.pdf >. Acesso em: 29 de novembro de 2016.

NICHOLSON, W. L., MUNAKATA, N., HORNECK, G., MELOSH, H. J., & SETLOW, P. **Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments**. Microbiology and molecular biology reviews, v.64 n.3, pp.548-572, 2000.

PAÇO, R. S.; **Isolamento e Identificação de *Bacillus sp* e *Lactobacillus sp* em camas de frango e a detecção da atividade antimicrobiana, enzimática e o crescimento na presença de sais biliares;** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP; São Paulo, 2001.

PROMEGA CORPORATION; TECHNICAL MANUAL: **Wizard® Genomic DNA Purification Kit - Instructions for Use of Products A1120, A1123, A1125 and A1620**; Madison-EUA, 2017. Disponível em: <https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/ >. Acesso em: 26 de outubro de 2017.

RABINOVITCH, L & OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos.** Ministério da Saúde e Fundação Oswaldo Cruz, Anexo 7, p.78, 2015.

SANDERS, M.E., Morelli, L., Tompkins T. A. **Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*.** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 2, n. 6, pp. 101-110, 2003.

SNEATH, P. H., MAIR, N. S., SHARPE, M. E., & HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2**. Williams & Wilkins; v.2, s.13, p.1104 a 1140, 1986.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Os 10 maiores importadores de carne de frango de 2016 na visão da FAO**. 2016. Disponível em http://sna.agr.br/os-10-maiores-importadores-de-carne-de-frango-de-2016-na-visao-da-fao/. Acessado em 29 de novembro de 2016.

SU, Y., RHEE, M. S., INGRAM, L. O., SHANMUGAM, K. T. **Physiological and fermentation properties of *Bacillus coagulans* and a mutant lacking fermentative lactate dehydrogenase activity**. J Ind Microbiol Biotechnol, v. 38, pp. 441-450, 2011.

VOS, P., GARRITY, G., JONES, D., KRIEG, N. R., LUDWIG, W., RAINEY, F. A., WHITMAN, W. B. **Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes,** Springer Science & Business Media, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD ORGANISATION, 2015. **World Health Organization, Food and Agriculture Organization and World Organisation for Animal Health unite in fight against Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/amr_tripartite_flyer.pdf >. Acesso em: 29 de novembro de 2016.

YADAV, A. K., CHAUDHARI, A. B., KOTHARI, R. M. **Enhanced viability of *Bacillus coagulans* after spray drying with calcium lactate, storage and re-hydration.** Indian Journal of Chemical Technology, v.16, pp.519-522, 2009.

YE, L., ZHOU, X., HUDARI, M. S. B., LI, Z., WU, J. C. **Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106**; Bioresource Technology, v32, pp38-44, 2013.

ANEXO 1 – FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9133 - 1612936/1 - Magali Thiyomi Uono

Email:	magaliuono@usp.br
Data de Nascimento:	04/04/1963
Cédula de Identidade:	RG - 9.292.628-9 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Química - Instituto de Química - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 1988

Curso:	Mestrado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Alimentos
Data de Matrícula:	16/03/2017
Início da Contagem de Prazo:	16/03/2017
Data Limite para o Depósito:	18/03/2019
Orientador Acadêmico:	Prof(a). Dr(a). Carlota de Oliveira Rangel Yagui - 16/03/2017 até 04/07/2017. Email: corangel@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Cristina Stewart Bittencourt Bogsan - 05/07/2017 até o presente. Email: cris.bogsan@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 16/03/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 08/05/2018
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 16/03/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/01/2019
Impresso em: 08/03/2019 01:17:32

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9133 - 1612936/1 - Magali Thiyomi Uono

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
VPS5728-3/1	Gestão do Conhecimento para a Qualidade e Segurança dos Alimentos (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	12/04/2017	16/05/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5729-7/1	Liofilização e suas Aplicações a Alimentos e à Medicamentos	22/05/2017	23/07/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5776-5/5	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	07/07/2017	20/07/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5773-7/10	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	07/08/2017	15/10/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5898-7/3	Bacteriocinas e suas Aplicações em Alimentos	04/09/2017	24/09/2017	45	3	100	A	N	Concluída
VPS5717-7/2	Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	12/03/2018	25/03/2018	30	2	87	A	N	Concluída
FBT5715-7/4	Complementos de Matemática Aplicada para Biotecnologia	15/05/2018	09/07/2018	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5788-1/3	Aplicação de Alimentos Probióticos na Modulação de Imunidade de Mucosas	06/08/2018	26/08/2018	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5886-7/1	Microrganismos Gram Positivos Patogênicos em Alimentos	17/09/2018	28/10/2018	90	6	100	A	N	Concluída
QBQ5781-7/2	Fundamentos da Citometria de Fluxo – Aplicações em Biologia Celular, Molecular e Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	05/11/2018	11/11/2018	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 14/01/2019

Impresso em: 08/03/2019 01:17:32

ANEXO 2 – *CURRICULUM LATTES*

Magali Thiyomi Uono

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/6253512860573706

Última atualização do currículo em 05/03/2019

Possui graduação em Bacharel em Química pelo Instituto de Química da USP (1987). Atualmente é aluna de mestrado em tecnologia de alimentos da Faculdade de Ciências farmacêuticas da USP. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Tecnologia de Alimentos (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome
Magali Thiyomi Uono

Endereço

Endereço Profissional
Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Av. Lineu Prestes, 580
Butantã
05508-000 – São Paulo, SP – Brasil
Telefone: (011) 3091-2379

Formação acadêmica/titulação

1984 - 1987
Graduação em Bacharel em Química.
Instituto de Química da USP, IQUSP, Brasil.
Título: Non available.
Orientador: Non available.

Formação complementar

1988 – 1989
Extensão universitária em Química Orgânica. (Carga horária: 40h). Kumamoto University, Japão.

Atuação profissional

University of the Ryukyus, U.R., Japão.
Vínculo institucional
2008 - 2016

Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Técnico de Laboratório de Eng. de Materiais, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Faculdade de Ciências farmacêuticas da USP, FCFUSP, Brasil.
Vínculo institucional

2017 - Atual
Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluna de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Projetos de pesquisa

2017 - Atual
Desenvolvimento Tecnológico do *Bacillus coagulans* BVB5 como potencial cepa probiótica

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Mestrado acadêmico: (1).

Integrantes: Magali Thiyomi Uono - Integrante / Cristina Bittencourt Stewart Bogsan Coordenador.
Financiador(es): CAPES - Centro Anhanguera de Promoção e Educação Social - Bolsa.

Áreas de atuação

Grande área: Ciências Agrárias / Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos / Subárea: Tecnologia de Alimentos.

Idiomas

Espanhol
Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Inglês
Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Japonês
Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. BOZLUR, R. M.; SHIBATA, S.; DIBA, C. F.; UONO, M. T. . Low Cost Biodegradable Adsorbent Material for the Removal of Dissolved Dyes from Aqueous Solutions: An Economical Process. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENGINEERING AND TECHNOLOGY (IJET), v. 2, p. 469, 2010.

Apresentações de Trabalho

UONO, M. T.; SEEGERER, E.; BOGSAN, C. B. S. SÍNTESE DE PLA OTIMIZADA POR BACTÉRIA CONTAMINANTE. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

UONO, M. T.; BOGSAN, C. B. S. SYNTHESIS OF PLA OPTIMIZED BY CONTAMINATING BACTERIA. 2017.
(Apresentação de Trabalho/Simpósio).

HACKER, S. S.; STEPHANO, M. A.; UONO, M. T. USE OF THE KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (KEGG) DATABASE FOR BACTERIAL CULTURE OPTIMIZATION. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

HACKER, S. S.; STEPHANO, M. A.; UONO, M. T.; SILVEIRA, A. C. F.. X-RAY DIFFRACTION STUDIES FROM CAPSULAR POLYSSACHARIDE OF GROUP B STREPTOCOCCI. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BOZLUR, R. M.; SHIBATA, S.; DIBA, C. F.; UONO, M. T. Effect of holding time and the amount of fiber content on the flexural properties of bagasse /bamboo fiber reinforced biodegradable composite. 2010. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Patentes e registros

Patente

A Confirmação do status de um pedido de patentes poderá ser solicitada à Diretoria de Patentes (DIRPA) por meio de uma Certidão de atos relativos aos processos

1. SHIBATA, S.; UONO, M. T. Novel lactic acid bacteria: characterization and methodology to produce L-lactic acid to food and pharmaceutical products which includes lactic acid bacteria. 2011, Japão.

Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: P2012-223171A, título: "Novel lactic acid bacteria: characterization and methodology to produce L-lactic acid to food and pharmaceutical products which includes lactic acid bacteria", Instituição de registro: Japanese Patent Office, Depositante (s): University Of The Ryukyus, Depósito PCT: 14/04/2011

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. International Conference on Food Engineering and Biotechnology – ICFEB. 2018 (Congresso)
2. 25 Congresso Brasileiro de Avicultura e Suinocultura - SIAVS. 2017. (Congresso).
3. III Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

BIO REGULAMENTAÇÃO - Regulalmentação em Bioprodutos: Tendência e Regulamentação em Engenharia Farmacêutica. 2017. (Outra).

4. XVIII Simpósio Brasil Sul de Avicultura. 2017. (Simpósio).
5. IHSIG. 2016. (Simpósio).
6. Preprosim. SÍNTESE DE PLA OTIMIZADA POR BACTÉRIA CONTAMINANTE. 2015. (Congresso).
7. inno BioPlast 2013.Economical l-(+)-Lactic Acid fermentation using sucrose without enzyme by novel strain Bacillus coagulans F6-2. 2013. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. UONO, M. T. III CURSO DE INVERNO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-FARMACÊUTICA. 2017. (Outro).

Inovação

Patente

1. SHIBATA, S.; UONO, M. T. . Novel lactic acid bacteria: characterization and methodology to produce L-lactic acid to food and pharmaceutical products which includes lactic acid bacteria. 2011, Japão.
Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: P2012-223171A, título: "Novel lactic acid bacteria: characterization and methodology to produce L-lactic acid to food and pharmaceutical products which includes lactic acid bacteria" , Instituição de registro: Japanese Patent Office, Depositante (s): University Of The Ryukyus, Depósito PCT: 14/04/2011

Projetos de pesquisa

Educação e Popularização de C & T

Artigos

Artigos completos publicados em periódicos

1. BOZLUR, R. M.; SHIBATA, S.; DIBA, C. F.; UONO, M. T. Low Cost Biodegradable Adsorbent Material for the Removal of Dissolved Dyes from Aqueous Solutions: An Economical Process. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENGINEERING AND TECHNOLOGY (IJET), v. 2, p. 469, 2010.

Apresentações de Trabalho

1. BOZLUR, R. M.; SHIBATA, S.; DIBA, C. F. ; UONO, M. T. . Effect of holding time and the amount of fiber content on the flexural properties of Bagasse /bamboo fiber reinforced biodegradable composite. 2010. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. UONO, M. T.; SEEGERER, E.; BOGSAN, C. B. S. SÍNTESE DE PLA OTIMIZADA POR BACTÉRIA CONTAMINANTE. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. UONO, M. T.; BOGSAN, C. B. S.. SYNTHESIS OF PLA OPTIMIZED BY CONTAMINATING BACTERIA. 2017.
(Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4. HACKER, S. S.; STEPHANO, M. A.; UONO, M. T. USE OF THE KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (KEGG) DATABASE FOR BACTERIAL CULTURE OPTIMIZATION. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. HACKER, S. S.; STEPHANO, M. A.; UONO, M. T.; SILVEIRA, A. C. F. . X-RAY DIFFRACTION STUDIES FROM CAPSULAR POLYSSACHARIDE OF GROUP B STREPTOCOCCI. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. UONO, M. T. III CURSO DE INVERNO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-FARMACÊUTICA. 2017. (Outro).

ANEXO 3 – TRABALHOS SUBMETIDOS

Address: Unit B, 6/F, Dragon Industrial Building, 93 King Lam Street, Lai Chi Kok, Kowloon, Hong Kong, Email: admin@cbees.org
Tel: +852-3500-0137(HK), +86-28-86528465(CN Branch), +1-206-456-6022 (USA)

Notification of Acceptance of the ICFEB 2018

Okinawa, Japan, March 28-30, 2018

http://www.icfeb.org/

Paper ID : C0002

Paper Title : Technological Development of Probiotic Supplement for Zootechnical Improvement of Broilers

Dear Magali T. Uono, Sibylle S. Hacker, Catarina V. Manfrinato, Mariana M. Matsuo, Svetoslav D. Todorov and Cristina S. B. Bogsan,

First of all, thank you for your concern. 2018 9th International Conference on Food Engineering and Biotechnology (ICFEB 2018) review procedure has been finished. We are delighted to inform you that your manuscript has been accepted for presentation at 2018 9th International Conference on Food Engineering and Biotechnology (ICFEB 2018), Okinawa, Japan. Your paper was tripling blind-reviewed and, based on the evaluations. The reviewers' comments are enclosed.

The conference received papers from about 12 different countries and regions during the submission period. And there are about 20 papers accepted by our reviewers who are the international experts from all over the world.The selected papers could be published in the international conference proceeding with high quality. According to the recommendations from reviewers and technical program committees, we are glad to infrom you that your paper identified above have been selected for publication and oral presentation. You are invited to present your paper and studies during our ICFEB conference that would be held on March 28-30, 2018.

The ICFEB 2018 is co-sponsored by Hong Kong Chemical, Biological & Environmental Engineering Society (HKCBEES).

Journal of Advanced Agricultural Technologies (JOAAT ISSN: 2301-3737), and be included in Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Engineering & Technology Digital Library, Crossref and Electronic Journals Digital Library.

(Important Steps for your registration): Please do finish all the 6 steps on time to guarantee the paper published in the proceeding successfully:

Notification

EFF2019

Bologna
26-29 May 2019

AIDIC

Engineering Future Food

My personal Page

(Please avoid that the e-mail icheap14@aidic.it is junked by your system)

My Profile
My Submission
Full Paper Submission
See Review
Revised Paper Submission
Copyright Submission
Registration

7 Days to GO

AIDIC

Reviewers Comments

Comments

#submission id: 117

TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF BIOMASS AND THE CHALLENGE OF COMPLETE AND EFFICIENT SPORULATION OF BACILLUS COAGULANS BVB5

Uono M., Hacker S., Stephano M., Viana V., Manfrinato C., Bogsan C.

status : FINAL

format: OA

LEGENDA

	Status
AR	Abstract received
FS	Abstract accepted, Full paper to be submited
REV	Full Paper under Review
FAR	Full paper accepted, Revised paper to be submitted
RJ	Full paper rejected
FINAL	Final Revision received
	Format
<blank>	To be defined
O	Lecture
OA	Lecture proposed by the Author(acceptance pending)
P	Poster
PA	Poster proposed by the Author(accepted)
PL	Plenary Lecture
KL	Keynote Lecture
W	Withdrawn
RJ	Full paper rejected

ANEXO 4 - ARTIGOS

Artigos aceito em Congressos

◉ UONO, M. T., HACKER, S. S., MANFRINATO, C. V., MATSUO, M. M., TODOROV, S. D., BOGSAN, C. S., Technological Development of Probiotic Supplement for Zootechnical Improvement of Broilers.ICFEB 2018 - 9th International Conference on Food Engineering and Biotechnology, Okinawa, Japão, de 28 a 30 de março de 2018

◉ UONO, M. T., HACKER, S. S., STEPHANO, M. A., VIANA, V. C., MANFRINATO, C. V., BOGSAN, C. S. B., Technologial development of biomass and the challenge of complete and efficient sporulation of *Bacillus coagulans* BVB 5. EFF 2019 - 2nd International Conference on Engineering Future Food, Bologna, Itália, de 26 a 29 de maio de 2019.

Artigos publicados

◉ UONO, M. T., HACKER, S. S., MANFRINATO, C. V., MATSUO, M. M., TODOROV, S. D., BOGSAN, C. S., Technological Development of Probiotic Supplement for Zootechnical Improvement of Broilers. **Journal of Advanced Agricultural Technologies.**

◉ HACKER, S. S., SILVEIRA, A. C. F., UONO, M., BOGSAN, C. S. B., STEPHANO, M. A., The importance of X-ray Diffraction /studies in the purification process of capsular polysaccharide of Group B *Streptococci*.

Artigo aceito para publicação

◉ UONO, M. T., HACKER, S. S., STEPHANO, M. A., VIANA, V. C., MANFRINATO, C. V., BOGSAN, C.S.B., Technological Development of Biomass and the Challenge of complete and efficient Sporulation of *Bacillus coagulans* BVB5. **Chemical Engineering Transactions.**

Artigos em preparação

◉ HACKER, S. S., SILVEIRA, A. C. F., UONO, M., BOGSAN, C. S. B., STEPHANO, M. A., The importance of X-ray Diffraction /studies in the purification process of capsular polysaccharide of Group B *Streptococci*.

◉ HACKER, S. S., UONO, M., STEPHANO, M. A., Using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database resource to understand the metabolic flux of *Streptococcus agalactiae*.

◉ UONO, M. T., BOGSAN, C. S., The use of sporulated probiotic microorganisms in zootechnical products.

◉ Artigo aceito em ICFEB 2018 e publicado em JOAAT

Journal of Advanced Agricultural Technologies Vol. 6, No. 1, March 2019

Technological Development of Probiotic Supplement for Zootechnical Improvement of Broilers

Magali T. Uono, Sibylle S. Hacker, Catarina V. Manfrinato, Mariana M. Matsuo, Svetoslav D. Todorov, and Cristina S. B. Bogsan
Department of Biochemical-Pharmaceutical Technology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
Email: {magaliuono, sibylle, mariana.matsuo, cris.bogsan}@usp.br, cat.v.m@hotmail.com, slavi310570@abv.bg

***Abstract*—The increasing of the demand for functional foods, which include those supplemented or fermented by probiotic microorganisms, resulted in the advancement of research and development of new strains. The probiotic microorganisms *Bacillus* spp. are attractive for the inherent stability due to their characteristic of spore-forming bacteria. Spores allow prolonged shelf life and increase the ability to survive gastric barriers, which turn out to be an advantage over lactobacilli. Two bacteria were supplied by VitaBridge Company in order to identify which strain would have the best technological performance for the development of a novel functional food with high performance in the zootechnical improvement of broilers. The characterization was performed according to the protocol which included phenotypic and genotypic tests for determining the probiotic potential of the strains. The results of the tests revealed that BVB1 possesses the best technological characteristics and can be used with efficiency in the improvement of the zootechnical performance of broilers.**

***Index Terms*—screening, biochemical tests, MALDI TOF, genome sequencing**

I. Introduction

The fast development of the functional food industry has increased the demand for products which aim the improvement of consumer health, both human and animal. Functional foods include those which are supplemented or fermented with probiotic microorganisms. According to the definition of FAO / WHO (2002), which was revisited by Hill and colleagues (2014), "Probiotics are living microorganisms that when administered in adequate amounts confer benefit to the health of the host" [1], [2].

The antibiotic used as a growth promoter in agricultural and zootechnical development raises concerns about antibiotic resistance. Since 2006, the European Union has banned these practices and the probiotic has been introduced into animal husbandry as an alternative to improving animal growth [3].

Among the most studied probiotics, the spore-forming bacteria stand out, being the majority belonging to the genus *Bacillus spp*. They are attractive due to the inherent resistance of the spores to the environmental stress [4]. These microorganisms' morphology is in the rod shape, gram-positives, aerobes or facultative aerobes, catalase positive, spore and enzyme producers. Due to the physiological diversity of the vegetative forms, these microorganisms are considered as ubiquitous organisms, being able to be isolated from soil and foodstuffs [5]. They have a bimodal life cycle of growth and sporulation in the environment as well as in the gastrointestinal tract [6].

The fact that it is a spore-former makes bacilli attractive as food additives due to its ability to survive gastric barriers, presenting advantages over non-spore forming microorganisms such as *Lactobacillus* spp. The spore-former characteristic guarantees, in principle, prolonged shelf life without refrigeration [7].

Two putative probiotic bacteria were provided by the VitaBridge Company to identify which of them would have the best probiotic potential and the best technological performance and thus to be used as a functional food in the improvement of the zootechnical performance of broilers.

II. Material and Methods

A. Bacillus Strain

Two strains of *Bacillus* spp., BVB1 and BVB5, were provided by VitaBridge Company (São Paulo, Brazil) for the technological characterization as a potential probiotic strain.

B. Morphological Tests – Phenotypical Chacterization

The colony morphology on the surface of the culture in Petri dishes containing nutrient agar media enriched with 0.3% of yeast extract was observed through an Olympus BX 51 optical microscope. Smears of the 10µl of each fermented broth samples of *Bacillus* spp. were prepared on glass slides for Gram staining and the colored samples were visualized by optical microscopy (OLYMPUS BX51, Japan) by immersion to verify the cell morphologies and dye properties of the strains [8].

Manuscript received June 24, 2018; revised November 22, 2018.

©2019 Journal of Advanced Agricultural Technologies

doi: 10.18178/joaat.6.1.48-52

◉ Artigo aceito em IFEE 2019 e para publicação em CET "Chemical Engineering Transactions"

CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS
VOL. 76, 2019

A publication of AIDIC
The Italian Association of Chemical Engineering
Online at www.aidic.it/cet

Guest Editors: Sauro Pierucci, Jiří Jaromír Klemeš, Laura Piazza
Copyright © 2019, AIDIC Servizi S.r.l.
ISBN 978-88-95608-73-0; **ISSN** 2283-9216

Technologial development of biomass and the challenge of complete and efficient sporulation of *Bacillus coagulans* BVB5

Magali Uono[a*], Sibylle Hacker[a], Marco Antonio Stephano[a], Vitória C. Viana[b], Catarina V. Manfrinato[a], Cristina S. B. Bogsan[a]

[a]Department of Biocheemical-Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo
[b]Biomedical Sciences, University of São Judas Tadeu
*magaliuono@usp.br

The present study aims to develop an efficient industrial fermentation process that promotes the increase of sporulated biomass of *Bacillus coagulans* BVB5. Preliminary studies of various culture media were performed in Erlenmeyer flasks for 96 hours in a shaker at 44 °C and 240 rpm, and the degree of sporulation was analyzed. The culture media tested were GYP, GYP with salts (GYPs), GYT, FNY, 50 %FNY (FNY50), DSK and 50 % DSK (DSK50). The results had shown that the FNY50 medium obtained a higher degree of sporulation of 100 % followed by FNY with 99.99 %, whereas media containing relatively large amounts of glucose such as GYP, GYPs and GYT did not exhibit satisfactory sporulation. The reduction of the cost and consequent increase of the efficiency in the preparation of a probiotic microorganism of BVB5 in the DVS format are the main benefits of reducing the time of the fermentation/sporulation process. For this, more studies are needed, and the next step of the studies will be to increase sporulation efficiency, inserting some new parameters, such as the addition of some salts, control of both aeration and pH, that will be performed in bioreactors to increase efficiency of fermentation/sporulation process of BVB5 on an industrial scale.

1. Introduction

The concept of functional foods involves the benefit of health gain if consumed periodically by both, humans and animals (Ashwell, 2012). Among so-called functional foods are the ones incorporated with probiotics that are "living microorganisms, which when administered in adequate amounts confer benefits to the health of the host" (Hill et al., 2014). Since the European Union banned the use of antimicrobials in animal feed in 2006, alternatives are being sought to replace them, and the probiotic microorganism comes into focus as one of these alternatives. Some *Bacillus* species could be characterized as probiotic with the technological differential due to the ability to form spores, whose characteristic is inherent to the genus. The thermal resistance of the spores confers technological advantages over non-spore-forming probiotic bacteria, as resisting to a thermal process used in the food industry, for example, spray dryer and pelletizing processes. The prolonged shelf life also is acquired due to spores. *Bacillus coagulans* reunites all those characteristics and furthermore, depending on the culture medium, can produce a great quantity of lactic acid as a metabolite, thus being considered as a lactic acid bacterium (Juturu & Wu, 2018). However, *Bacillus coagulans* shows difficulties in promoting sporulation compared to *Bacillus subtillis*, for example (Amaha et al., 1956). Chen and colleagues (2016) present a long list of reagents aiming a high-density growth of *Bacillus coagulans* and Amaha and colleagues (1956), minerals that could be responsible for sporulation, such as manganese and calcium, followed by conditions of depletion of nutrients such as phosphor and carbon source, and also, addition of soil extracts (Amaha & Ordal, 1957) to change the sporulation pattern. Some sporulation processes take a long time to be considered technologically efficient, there are also processes that take days to obtain only a low degree of sporulation (Laflamme et al., 2004). This study carried out experiments in several culture media to attempt an efficient BVB5 fermentation/sporulation technological process, aiming at its complete sporulation in a shorter time, to promote

◉ Artigo publicado em 2019 em International Journal of Current Advanced Research

International Journal of Current Advanced Research
ISSN: O: 2319-6475, ISSN: P: 2319-6505, Impact Factor: 6.614
Available Online at www.journalijcar.org
Volume 8; Issue 04 (C); April 2019; Page No.18232-18237
DOI: http://dx.doi.org/10.24327/ijcar.2019.18237.3480

Research Article

ANALYSIS OF IMPURITIES BY X-RAY DIFFRACTION AFTER PURIFICATION PROCESS OF THE BACTERIAL POLYSACCHARIDE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

Hacker, Sibylle S.[1], Silveira, A. C. F.[2], Uono, Magali T[1], Bogsan, Cristina S. B.[1] and Stephano, Marco A.[1]

[1] Pharmaceutical-Biochemistry Technology of Pharmaceutical Science School at São Paulo University, Brazil
[2] Laboratories of Physic at São Paulo University Brazil

A R T I C L E I N F O

Article History:
Received 06th January, 2019
Received in revised form 14th February, 2019
Accepted 23rd March, 2019
Published online 28th April, 2019

Key words:

X-Ray diffraction, impurities identification, purification process, bacterial polysaccharides, Streptococcus agalactiae

A B S T R A C T

Through this study it is clear that each purification process of the bacterial polysaccharide is different, obtaining different results of X-ray diffraction patterns. The MRI (magnetic resonance imaging) methodology for the characterization of polysaccharides during the production of vaccines is currently used and there are few studies conducted by X-ray diffraction for molecular characterization in the vaccine area. The use of X-ray diffraction can contribute to a better description of the processes and thus the reduction / removal of impurities caused by the decomposition of the product or the manufacturing process, improving the discussion of the potential impact on quality, safety and efficacy.

Polysaccharides are high molecular weight polymers with repeating units composed of glucose, galactose, N-acetylglucosamine and sialic acid. Some bacterial capsular polysaccharides possess virulence factors and are responsible for pathogenicity. The bacterial strain of Streptococcus agalactiae ATCC 12386, corresponding to serotype Ia, was cultivated and four different polysaccharide purification processes with different reagents were performed. X-ray diffraction was carried out to evaluate the identification of molecules of the polysaccharide. Through this study, could be observed that, each purification process of the bacterial polysaccharide is different, obtaining different results of X-ray diffraction patterns. The magnetic resonance imaging methodology for the characterization of polysaccharides during the production of vaccines is currently used, wherein it is proved that the X-ray diffraction could be a useful tool as a complementary molecular characterization methodology for identifying impurities in the purification process of a biological product.The present article focuses on the possibility of using the X - ray diffraction technique as an analytical methodology to evaluate the purification process, free of impurities. It can be useful as methodology of process route analysis and identification of contaminants. At work, we are not characterizing the monosaccharides and their composition, but it would be interesting more studies to compare the purity of materials.

Copyright©2019 ***Hacker, Sibylle S et al.*** *This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.*

INTRODUCTION

Streptococcus agalactiae (group B streptococci, GBS) is a commensal bacterium, being part of the healthyhuman microbiota. Besides beasymptomatically in the gastrointestinal and genitourinary tract. *S. agalactiae* was recognized as a leading cause of neonatal sepsis and meningitis (BELLAIS *et al.* 2012; CI, BAKER; EDWARDS, 1988).Recently as an important pathogen in adults with underlying medical conditions (DUTRA *et al.* 2014, AUPÉRIN *et al.* 2005). Its taxonomy is shown in table 1. Bergey and colleagues (1934) present *Streptococcus* spp. as Gram-positive, catalase-negative bacteria, they are in the form of spheres, with a diameter less than 2 µm (TORRES, 2012; BERGEY, 1934).

Corresponding author:* **Hacker, Sibylle S
Pharmaceutical-Biochemistry Technology of Pharmaceutical Science School at São Paulo University, Brazil

Group B streptococcal (GBS) are classified into ten (10) serotypes based on different type of polysaccharides (types Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX). About 40% of invasive diseases are caused by the capsular polysaccharide (CPS) types Ia or Ib, of GBS isolates (GLASER *et al.* 2002).

Polysaccharides are high molecular weight polymers with repeating units composed of glucose, galactose, N-acetyl glucosamine and N-acetylneuraminic acid (sialic acid) (JENNINGS *et al*. 1984).Each serotype produces a specific polysaccharide with a regularly repeating sequence of at least two saccharide units (ISAAC *et al* 1978).Most of the bacteria produce polysaccharide with high molecular weight with acidic isoeletric points. These polysaccharides are highly charged and their polar nature provides multifunctional role of them (ISAAC *et al* 1978).The capsular polysaccharide (CPS)