

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE AGRONOMIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**Estudos da Atividade Proteolítica de *Bacillus cereus*
em Biorreator**

**MARCOS MOTTA MARQUARDT
Farmacêutico (UFRGS)**

**Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.**

Porto Alegre, maio de 2003.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr^a. Sueli Van Der Sand e Dr. José Carlos Germani, pelo auxílio e atenção dispensados no decorrer deste trabalho.

Aos meu pais, Sérgio Ubiratan Marquardt e Teresa Motta Marquardt, pelos inestimáveis conselhos e exemplos de vida.

A minha irmã, Andréa Motta Marquardt, pela amizade sempre presente.

Aos amigos Ana, Carla, Clarissa, Cristián, Fernanda e Maria.

Aos colegas do LaPPS pelo auxílio em diversos momentos.

Aos colegas do LDNF pelo apoio.

Ao MSc. Sydney Mitidieri e bolsistas do Laboratório 119 pela disponibilidade e amizade demonstradas.

Ao Peterson e Vanessa pela ajuda durante os trabalhos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

ESTUDOS DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *Bacillus cereus*. EM BIORREATOR¹

Autor: Marcos Motta Marquardt
Orientador: Sueli T. Van Der Sand
Co-orientador: José Carlos Germani

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a produção de enzimas proteolíticas por *Bacillus cereus*. As fermentações foram conduzidas em Biorreator Biodesign, com aeração de 1vvm, temperatura de 37°C e agitação de 400 r.p.m. como parâmetros fixos. Dois meios diferentes foram utilizados, Meio Referência (MR) e Meio de Proteína de Soja PS60[®] (MPS1), em experimentos realizados com 24 horas. Para avaliação da produção de complexos enzimáticos, retirou-se amostras a intervalos de 3 horas para análise de valores de pH, densidade ótica e massa seca. A atividade proteolítica, concentração de proteína solúvel e açúcares redutores, contagem de células viáveis totais e esporos também foram investigadas. Os resultados demonstraram que ambos os meios propiciaram condições para o ótimo desenvolvimento do *B. cereus*. Os resultados também indicam que, embora os dois meios tenham apresentado um crescimento celular semelhante, o meio composto por proteína de soja propiciou a obtenção de um extrato bruto com atividade proteolítica mais elevada. Nas condições de fermentação empregadas, o meio MPS1 apresentou em 15 horas uma atividade enzimática de 18,7 UmL⁻¹.h⁻¹, enquanto que o meio MR apresentou uma atividade proteolítica de 11,8 UmL⁻¹.h⁻¹.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, (101 p.), maio, 2003.

STUDIES ON PROTEOLYTIC ACTIVITY BY *Bacillus cereus* IN BIOREACTOR¹

Author: Marcos Motta Marquardt
Adviser: Sueli T. Van Der Sand
Co-adviser: José Carlos Germani

ABSTRACT

The present work had the main objective to evaluate the production of proteolytic enzymes by *Bacillus cereus*. Cultivations were performed on a Biodesign biorreator, with aeration of 1vvm, temperature of 37°C and 400r.p.m. stirring as fixed parameters. Two different media were used, the Standard Medium (MR) and Soy Protein PS60® (MPS1) medium and the experiments were carried out for 24 hours. For evaluation of the enzyme compound production, samples were drawn each 3 hours to assess pH values, optic density and dry mass. The proteolytic activity, concentration of soluble protein and reducing sugar, countings of total viable cells and spores also were investigated. The results demonstrated that both media propitiated adequate conditions for the good development of the *B. cereus*. The results also indicate that, although both media have presented a similar cellular growth, the medium composed with soy protein propitiated a crude extract with higher proteolytic activity. In the employed fermentation production conditions, medium MPS1 presented in 15 hours enzymatic activity of 18,7U_{mL}⁻¹.h⁻¹ and the MR medium presented a protease activity of 11,8U_{mL}⁻¹.h⁻¹.

¹ Master of Science's Degree Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, (101 p.), may, 2003.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	3
2.1. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. <i>Bacillus cereus</i>	4
3.2. Importância Industrial	
3.2.1. Contaminação por <i>B. cereus</i>	4
3.2.2. Utilização como Probiótico.....	6
3.3. Importância Clínica e Toxinas Produzidas	7
3.4. Enzimas Isoladas de <i>B. cereus</i>	9
3.5. Cultivo de <i>B. cereus</i>	9
3.6. Proteases como Fatores de Virulência	10
3.7. Proteases	11
3.8. Proteases em <i>Bacillus sp.</i>	13
3.9. Regulação da Produção de Proteases.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Obtenção e Manutenção do Microrganismo Utilizado	20
4.2. Identificação do Microrganismo	21
4.3. Matérias-primas Utilizadas	22
4.4. Parâmetros de Fermentação	23
4.4.1. Temperatura	23
4.4.2. Agitação.....	24
4.4.3. Espuma.....	24
4.4.3. Volume.....	24
4.4.5. Aeração	24
4.5. Seleção do Meio de Proteína de Soja	25
4.6. Ensaio em Biorreator	26
4.6.1. Preparação do Pré-inóculo	26
4.6.2. Preparação do Inóculo para o Biorreator	26
4.6.3. Preparação do Meio Referência	27
4.6.4. Preparação do Meio PS60 [®] (MPS1)	27
4.7. Avaliação dos Parâmetros de Fermentação.....	28
4.7.1. Amostra: Volume Coletado	28
4.7.2. Determinação de pH	29

	Página
4.7.3. Determinação de Absortividade	29
4.7.4 Determinação de Células Viáveis Totais e Esporos	29
4.7.4.1. Preparação de Placas de Petri	29
4.7.4.2. Preparação das Amostras Para Contagem	30
4.7.4.3. Determinação de Células Viáveis Totais	30
4.7.4.4. Determinação do Número de Esporos.....	30
4.7.5. Determinação de Massa Seca	31
4.7.6. Determinação de Proteína	31
4.7.6.1. Determinação de Proteína Segundo o Método do Biureto	31
4.7.6.2. Preparação da Curva-Padrão para Determinação de Proteína Segundo o Método do Biureto	32
4.7.6.3. Determinação de Proteína Segundo Método de Bradford	33
4.7.6.4. Preparação da Curva-Padrão para Determinação de Proteína Segundo Método de Bradford.....	33
4.7.7. Determinação de Açúcares Redutores: Método do Ácido Dinitrossalicílico.....	34
4.7.7.1. Preparação da Curva-Padrão para Determinação de Açúcar Redutor	35
4.7.8. Determinação de Atividade Proteolítica	35
4.7.8.1. Preparação do Controle para Leitura de Atividade Proteolítica	35
4.8. Obtenção do Extrato Proteolítico a partir do Meio de Produção.....	36
4.9. Precipitação com Sulfato de Amônio.....	36
4.10. Diálise da Fração da Precipitação	37
4.11. Preparação das Colunas de Troca Iônica	37
4.12. Avaliação do Crescimento, Esporulação e Produção.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1. Seleção do Meio de Proteína de Soja	40
5.2. Determinação do pH	42
5.3. Determinação de Absortividade	46
5.4. Determinação da massa seca	50
5.5. Determinação de Proteína Solúvel	54
5.6. Determinação de Açúcar Redutor	58
5.7. Determinação de Atividade Proteolítica	60
5.8. Determinação do Número de Células Viáveis Totais e Esporos Viáveis.....	65
5.9. Tratamento do Complexo Proteolítico	70
5.10. Avaliação do Crescimento, Esporulação e Produção.....	73

	Página
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS	77
8. APÊNDICES.....	84

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Linhagens de <i>Bacillus sp.</i> descritas como produtoras de enzimas proteolíticas	14
2. Provas bioquímicas realizadas para identificação do <i>Bacillus cereus</i>	21
3. Composição do Meio Referência.....	22
4. Composição do meio de proteína de soja MPS1.....	22
5. Composição da proteína de soja Samprosoy90®	23
6. Composição do caldo nutritivo de inóculo	27

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Fluxograma de cultivo do <i>Bacillus cereus</i>	28
2. Gráfico de atividade proteolítica de <i>Bacillus cereus</i> em meio com proteína de soja.....	41
3. Curvas de pH em função do tempo de crescimento do <i>Bacillus cereus</i>	46
4. Curvas de absorvidade em função do tempo de crescimento do <i>Bacillus cereus</i>	49
5. Curvas de massa seca em função do tempo de crescimento do <i>Bacillus cereus</i>	52
6. Curvas de proteína solúvel em função do tempo de crescimento do <i>Bacillus cereus</i>	57
7. Curvas de açúcar redutor em função do tempo de crescimento do <i>Bacillus cereus</i>	59
8. Curvas de atividade proteolítica em função do tempo de crescimento do <i>Bacillus cereus</i>	63
9. Curvas de células viáveis totais (CVT) e esporos em função do tempo de crescimento do <i>Bacillus cereus</i>	67
10. Gráfico de purificação em coluna de Q Sepharose [®] do extrato proteolítico dialisado do <i>Bacillus cereus</i> em meio MPS1.....	71
11. Gráfico de purificação em coluna de SP Sepharose [®] do extrato proteolítico dialisado do <i>Bacillus cereus</i> em meio MPS1.....	72

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são empregadas como agentes modificadores desde o início do desenvolvimento da humanidade. Inicialmente, estas aplicações eram restritas aos alimentos como queijos e bebidas alcoólicas, os quais eram preparados sob condições que favoreciam o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela produção das enzimas atuantes.

O desenvolvimento da microbiologia e da bioquímica permitiu o gradual conhecimento a respeito dos mecanismos responsáveis por estas modificações. Este avanço possibilitou não apenas o aprimoramento de processos já conhecidos como também levou a utilização de enzimas, isoladas ou não, às áreas onde não eram aplicadas.

As enzimas possuem ampla aplicação tecnológica, a qual abrange desde os processos menos refinados como a produção de detergentes até o estudo visando a sua administração como medicamentos destinados ao tratamento de doenças de origem genética. Estima-se que aproximadamente 75% das enzimas produzidas sejam de natureza hidrolítica e, deste grupo, a maior parte sejam proteases.

As proteases são utilizadas na indústria alimentícia para a produção de queijos, como amaciantes de carne, na clarificação de cervejas e sucos, na

preparação de hidrolizados proteicos de soja com características nutricionais e de solubilidade mais adequadas.

Na indústria farmacêutica, as proteases são encontradas em medicamentos empregados como auxiliares digestivos e naqueles destinados ao tratamento de ferimentos com escleroproteínas (elastase, colagenase, queratinase). Suas aplicações incluem também o curtimento de couro, como detergentes biológicos, o tratamento de material têxtil, a produção de colas líquidas e de peptonas para meios de cultura.

Devido a importância biotecnológica das enzimas proteolíticas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de proteases por *Bacillus cereus*. As condições de cultivo deste microrganismo foram anteriormente avaliadas estabelecendo-se os parâmetros adequados para o seu crescimento. O desenvolvimento de *B. cereus* em biorreator foi realizado utilizando-se dois diferentes meios de cultura, sendo o primeiro composto por proteína de soja PS60[®] (meio MPS1) e o segundo por peptona de soja e caseína (meio MR).

A avaliação da síntese de proteases dos dois meios foi realizada através da hidrólise de azocaseína das amostras coletadas dos ensaios. Esta análise teve como objetivo a seleção, no caso de diferença significativa, do meio de cultura mais adequado para a sua produção.

2. OBJETIVO

Avaliar a produção de proteases por *Bacillus cereus*.

2.1 Objetivos Específicos

Analisar as condições de crescimento e síntese de enzimas nos meios de cultura empregados na produção.

Selecionar o meio mais adequado para a produção de proteases.

Estabelecer o intervalo mais adequado para a produção de proteases.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* é um bastonete gram-positivo com 1,0-1,2µm de largura e 3-5µm de comprimento, móvel, com flagelos peritríqueos. Tende a se dispor em cadeias, que possuem diferentes graus de estabilidade; apresenta grandes colônias irregulares, rugosas, brancas e de odor característico. É aeróbico facultativo, heterotrófico, não necessita de vitaminas, mas requer diferentes aminoácidos para o desenvolvimento; esta necessidade varia de acordo com as cepas e a temperatura ótima de crescimento está em torno de 35°C. Forma endósporos na posição central da célula (Sneath et al., 1986).

3.2 Importância Industrial

3.2.1 Contaminação por *B. cereus*:

Os endósporos são responsáveis pela disseminação de *B.cereus* no ambiente. Sua alta resistência ao aquecimento, falta de umidade e demais agentes externos permite ao bacilo manter-se viável sob esta forma durante longos períodos. Esta capacidade colabora, inclusive, para a presença da bactéria como contaminante em alimentos (Lund et al., 1999).

Inicialmente poucos estudos foram dedicados ao *B. cereus* em relação a sua importância clínica, sendo o microrganismo qualificado apenas como um contaminante. Entretanto, sucessivos estudos comprovaram a sua patogenicidade levando o *B. cereus* a constar entre os microrganismos pesquisados como patógenos no controle de qualidade de medicamentos (administrados via oral e intramamária) e alimentos, ao lado de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e outros (F. BRAS. IV).

A associação entre *B. cereus* e intoxicações alimentares conduziu diversos pesquisadores a realizarem estudos específicos a respeito da resistência do microrganismo e seus esporos frente a condições encontradas no meio industrial. A eficácia de determinados sanitizantes na remoção de biofilmes (Peng et al., 2002), influência do pH e temperatura de armazenagem na preservação de alimentos minimamente processados (Valero et al., 2002) e o efeito preservante de reconhecidos aditivos alimentares como os lactatos de sódio e cálcio (Aran et al., 2001) são exemplos de trabalhos relacionados ao assunto.

Os principais parâmetros encontrados em alimentos e que podem modificar a resistência dos esporos são: pH, temperatura de armazenamento, temperatura de esporulação, atividade de água e concentração de sais (principalmente cloreto de sódio). A concentração de NaCl parece ser o fator que apresenta menor influência sobre esporos, de acordo com Leguerinel et al. (2000). Em relação à temperatura de esporulação não existe, de acordo com González et al. (1999), um consenso em relação ao seu efeito, embora a maioria dos trabalhos realizados indiquem que temperaturas mais elevadas acarretam em aumento da resistência térmica dos esporos.

O pH é o parâmetro mais influente, sendo reconhecido que o aumento da acidez do meio leva à redução da termorresistência. Diversos trabalhos foram realizados, buscando-se analisar a influência do pH do meio de germinação sobre os esporos (González et al., 1996), o efeito sobre temperatura de esporulação (Couvert et al., 1999) e a ação de diferentes ácidos orgânicos sobre inativação térmica (Leguerinel et al., 2001). Também foi estudada sua influência sobre o crescimento quando combinada a gradientes de NaCl (Peters et al., 1991) e presença de etanol (Lanciotti et al., 2001).

Na busca por métodos de controle microbiológico menos agressivos para serem aplicados à indústria Raso et al. (1998) investigou o influência da pressão hidrostática sobre a viabilidade dos esporos. O estímulo à germinação promovido pelo uso da pressão hidrostática torna mais eficaz processos de inativação de esporos, permitindo que sejam aplicados processos sob condições mais brandas.

3.2.2 Utilização como Probiótico

Apesar da reconhecida patogenocidade de *B. cereus*, algumas cepas são utilizadas como na indústria de medicamentos como probióticos. Probióticos são preparações de culturas de microrganismos viáveis que administradas a um hospedeiro, promovem efeitos benéficos sobre a microflora.

Existem vários trabalhos a respeito da atuação dos probióticos compostos por *B. cereus* (Turnes et al., 1999; Jadamus et al., 2002; Baum et al., 2002). A produção de antibióticos ou supressão competitiva da flora patogênica são mecanismos propostos para a atuação do microrganismo. As cepas *B. cereus* var.

toyoi e *B. cereus* G são encontradas no mercado farmacêutico como medicamentos (Biovicerin[®], CenBiot[®]).

3.3 Importância Clínica e Toxinas Produzidas

A intoxicação por *B. cereus* manifesta-se principalmente através de gastroenterites, as quais são adquiridas através de alimentos contaminados.

Segundo Kotiranta et al. (2000) as principais toxinas produzidas por cepas virulentas dividem-se em quatro grupos: hemolisinas (cereolisina, esfingomielinase e hemolisina II), enterotoxinas, toxina emética (cereulida) e fosfolipases C (fosfatidilinositol hidrolase, fosfatidilcolina hidrolase, esfingomielinase).

Atualmente, são conhecidas cinco enterotoxinas, as quais são associadas à diarreia. Três toxinas possuem apenas uma cadeia peptídica: citoxina K (citK), enterotoxina T (BcET) e enterotoxina FM (EntFM). As outras duas são compostas complexos protéicos triplos: HBL e NHE (Choma et al., 2002).

Um estudo realizado com CytK demonstrou que a toxina é altamente citotóxica em ensaios com células epiteliais intestinais, sendo a mesma isolada de casos de enterites necróticas (Hardy et al., 2001). Por outro lado, a enterotoxina T não está ainda comprovadamente associada a intoxicações alimentares (Choma et al., 2002).

A síntese de toxinas associadas a diarreia é realizada na fase logarítmica de crescimento celular (Fermanian et al., 1996). Por não apresentar estabilidade, a intoxicação ocorre por ingestão de esporos e sua germinação no intestino do hospedeiro, com formação *in situ* da toxina.

Dos quatro grupos citados por Kotiranta et al. (2000), possivelmente a cereulida é a mais visada devido a sua alta patogenicidade. A toxina, formada por doze aminoácidos cíclicos e complexada com íon potássio (Isobe et al., 1995), está associada a êmese em macacos rhesus (Shinagawa et al., 1995) e a danos em hepatócitos de cobaias. Casos relatados de infecções fatais devido ao comprometimento hepático relacionam a cereulida como um dos fatores envolvidos.

A cereulida é altamente termoestável, sendo produzida na fase estacionária do crescimento celular. Embora Andersson et al. (1998) tenha associado a produção de toxinas à presença de esporos, Finlay et al. (2002) não confirmou tal correlação. Este autor, entretanto, verificou que a sua produção está relacionada à oxigenação do meio de cultura.

Também foi verificada a produção de cereulida em diversos alimentos (Agata et al., 2002), onde foi comprovada a sua síntese em altas concentrações nos alimentos farináceos. Em outro estudo, Finlay et al. (2002) constatou que a temperatura de 15°C favoreceu a sua produção em comparação a temperaturas mais elevadas.

Apesar das intoxicações alimentares serem a forma mais comum de patogenicidade de *B. cereus*, existem trabalhos que relatam infecções em pacientes imunodeprimidos e em pós-operatório, bem como queratites relacionadas a lentes de contato (Pinna et al., 2001).

3.4 Enzimas Isoladas de *B. cereus*

Diversas enzimas foram identificadas e isoladas de *B. cereus*. Entre elas, encontram-se amilases e beta-lactamases (Asano et al., 1996), chitosanases (Kurakake et al., 2000), exoquitinase (Wang et al., 2001). Várias proteases também foram obtidas: camelisina (uma metaloprotease ligada à parede celular) (Fricke et al., 2001), metaloprotease neutra (Sierecka et al., 1998), colagenases (Lund et al., 1999; Makinen et al., 1987) e enzimas similares à tripsina.

3.5 Cultivo de *B. cereus*

O cultivo de *B. cereus* em biorreator foi realizado por Silva (2001) que otimizou as condições de crescimento de duas linhagens industriais empregadas como probióticos. Este autor constatou que, entre os meios de cultura utilizados, os meios constituídos por proteína de soja (PS60[®]) e por peptona de caseína e soja (TSB) demonstraram ser adequados para a produção do microrganismo.

Os resultados de Silva (2001) também demonstram que ambos os meios no decorrer dos experimentos passam a apresentar valores de pH alcalinos. A alcalinização é decorrente do consumo de proteínas indicando, portanto, a capacidade de síntese de proteases pelo microrganismo. Devido ao interesse biotecnológico das enzimas proteolíticas, é interessante avaliar o *B. cereus* quanto a produção de proteases, uma vez que as condições de cultivo do bacilo já foram estabelecidas.

3.6 Proteases Como Fatores de Virulência

As enzimas proteolíticas envolvidas na patogênese pertencem à família das metalo-proteases, sendo responsáveis por uma série de danos ao tecido do hospedeiro, como necrose, hemorragia e hemólise. Esta ampla faixa de efeitos é consequência da baixa especificidade das enzimas pelo sítio de atuação (Miyoshi et al., 2000)

A participação de proteases com espectro de ação mais estreito também é reconhecida em diversos casos como, por exemplo, as toxinas de *Bacillus anthracis*, *Clostridium tetani* e *C. botulinum* (Rossetto et al., 2000). Nestes microrganismos, as neurotoxinas realizam a clivagem de proteínas específicas nos neurônios pré-sinápticos, impedindo a liberação dos neurotransmissores.

O emprego de inibidores proteolíticos como agentes terapêuticos no tratamento de pacientes é levantada como um novo foco na pesquisa de futuros agentes quimioterápicos (Travis et al., 1995).

No *B. cereus*, além das toxinas eméticas e diarréicas, pode haver a participação de outras proteínas no processo de infecção, como as várias enzimas proteolíticas isoladas deste microrganismo. Lund et al. (1999) realizaram o isolamento de uma metalo-protease com atividade sobre colágeno, a qual era componente da enterotoxina Nhe.

Sierecka et al. (1998) e Fricke et al. (2001) também realizaram o isolamento de uma protease neutra e de uma metalo-protease, respectivamente. Embora a relação entre as enzimas e fatores patogênicos não esteja diretamente comprovada, foi constatado a atividade sobre albumina e hemoglobina por

Sierecka et al. (1998) e sobre colágeno, fibrina, fibrinogênio e α 2-antiplasmina por Fricke et al. (2001).

3.7 Proteases

As proteases, também denominadas de proteinases ou peptidases, são enzimas que atuam sobre proteínas, clivando-as a aminoácidos ou peptídeos. Sua classificação foi bastante dificultada devido à falta de especificidade por substratos definidos, não sendo inicialmente possível realizá-la de modo sistemático. As denominações foram primeiramente baseadas na fonte de origem, como por exemplo, papaína, tripsina, pepsina e subtilisina. Também foram utilizadas as denominações "exo" ou "endoproteases", de acordo com localização na célula produtora (Reed et al., 1966).

A classificação foi ainda mais dificultada pelo fato de existirem enzimas que além da ação proteolítica possuem atividades adicionais. A peptidase D-alcalina, produzida por *B. cereus*, possui uma atividade beta-lactâmica levando-a a inativar antibióticos como amoxicilina e ampicilina.

As proteases microbianas são mais difíceis de estudar, devido a sua menor especificidade em relação às enzimas de origem vegetal e animal. Por este motivo, a sua classificação foi realizada inicialmente baseando-se no microrganismo de origem (bactérias, leveduras, fungos filamentosos) e em suas características físico-químicas (pH de atividade ótima, estabilidade térmica)(Torrome et al., 1980).

Atualmente, são conhecidos quatro diferentes mecanismos de catálise que permitem a divisão das proteases em seis famílias: 1. serina proteases I e II,

2. cisteína protease, 3. aspartato protease e 4. metalo-proteases I e II. Esta divisão se reflete nos substratos utilizados e nos agentes inibidores atuantes nas diversas classes (Neurath H., 1996).

As proteases de serina, cisteína e aspartato recebem estes nomes devido aos aminoácidos presentes no sítio catalítico e que atuam como nucleófilos na hidrólise protéica. As metalo-proteases atuam de maneira semelhante, mas o íon (Zn^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+}) é necessário para ativar uma determinada carbonila de amida presente no sítio ativo (Espada, 1997). As aspartato proteases por possuírem grupos carboxílicos em seus centros ativos são ativas apenas em pH inferior a 5, sendo por isto também chamadas de proteases ácidas (Torrome et al., 1980).

As famílias de serina proteases I e II são encontradas em organismos superiores e microrganismos, respectivamente e os centros ativos das duas famílias possuem os mesmos aminoácidos que são asparagina, serina e histidina. A diferença encontra-se nas seqüências de aminoácidos e no arranjo terciário nas regiões ao redor do centro de catálise (Neurath et al., 1996).

As enzimas secretadas (exoenzimas) apresentam maior interesse biotecnológico, pois a sua extração e purificação são menos complexas e onerosas. É comum a sua utilização sob a forma de extratos ou mesmo a adição do microrganismo produtor da protease diretamente no produto a ser transformado.

A relevância econômica das proteases em processo industriais de processamento de alimentos, de produção de medicamentos, de detergentes e na biorremediação (Godfrey et al., 1996) incentiva a pesquisa por novos complexos

de enzimas (Rozs et al., 2001) bem como o estudo de processos para o aprimoramento de sua produção (Kanekar et al., 2002).

As enzimas de importância econômica como a papaína e a pepsina podem ser obtidas de organismos superiores; entretanto, as enzimas de origem microbiológica principalmente do gênero *Bacillus sp.* são as que despertam maior interesse comercial.

3.8. Proteases em *Bacillus sp.*

A identificação de proteases neste gênero tem sido realizada há várias décadas (May et al., 1968; Feder et al., 1971). As enzimas proteolíticas são encontradas em outros microrganismos, como *Aspergillus sp.*, mas o gênero *Bacillus sp.* é considerado o mais importante em termos de produtores de enzimas proteolíticas de interesse industrial (Kumar et al., 1999).

Conforme pode ser visto na tabela 1, o número de espécies de *Bacillus sp.* produtores de enzimas é elevado, mas os principais produtores pertencem ao grupo de *B. subtilis*: *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e o próprio *B. subtilis*.

As quantidades de enzimas produzidas variam de acordo com as características fisiológicas do microrganismo e com as condições do meio de cultura, do substrato e do pH. Os efeitos dos diferentes substratos são bastante estudados na seleção de linhagens com potencial proteolítico sendo que, sob a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, apresentam resultados divergentes de acordo com as condições do experimento.

Tabela 1: Linhagens de *Bacillus sp.* descritas na literatura como produtores de enzimas proteolíticas.

<i>Bacillus sp.</i>	Referência
<i>Bacillus alcalophilus</i>	a
<i>B. alcalophilus</i>	a
<i>B. alcalophylus</i>	Kanekar et al. (2002)
<i>B. alcalophilus</i> subesp. <i>halodurans</i> KP 1239	a
<i>B. amyloliquefaciens</i>	a
<i>B. cereus</i>	Sierecka et al. (1998)
<i>B. cereus</i>	Lund et al. (1999)
<i>B. cereus</i>	Fricke et al. (2001)
<i>B. circulans</i>	a
<i>B. clausii</i>	Christiansen et al. (2002)
<i>B. coagulans</i>	a
<i>B. coagulans</i> PB-77	a
<i>B. firmus</i>	a
<i>B. horikoshii</i> .	Joo et al. (2002)
<i>B. intermedius</i>	a
<i>B. lentus</i>	a
<i>B. liqueniformis</i>	a
<i>B. licheniformis</i>	Rozs et al. (2001)
<i>B. mojavensis</i>	Beg et al. (2002)
<i>B. proteolyticus</i>	a
<i>B. pseudofirmus</i>	Gessesse et al. (2002)
<i>B. pumilus</i>	a
<i>B. sphaericus</i>	a
<i>B. stearothermophilus</i>	Kim et al. (2002)
<i>B. subtilis</i>	a
<i>B. subtilis</i> var. <i>amylosacchariticus</i>	a
<i>B. thuringiensis</i>	a
<i>Bacillus sp.</i> Ya-B	a
<i>Bacillus sp.</i> NKS-21	a
<i>Bacillus sp.</i> B21-2	a
<i>Bacillus sp.</i> Y	a
<i>Bacillus sp.</i> CW-1121	a
<i>Bacillus sp.</i> KSM-K16	a
<i>Bacillus sp.</i> MK5-6	a

a: adaptado de Kumar et al. (1999).

A influência da glicose e de outros açúcares é um dos fatores mais estudados na caracterização e isolamento de proteases (Kanekar et al., 2002; Gessesse et al., 2002; Chu et al., 1992; Hanlon et al., 1981) e dados muitas vezes contraditórios são reportados.

Em experimentos realizados por Kanekar et al. (2002) e Joo et al. (2002) verificou-se que a adição de diferentes carboidratos como a glicose e a lactose provocam redução na atividade proteolítica em meios suplementados com fontes de nitrogênio orgânico.

De maneira oposta, a adição de lactose, de sacarose e de glicose por Banerjee et al. (1999) e de amido por Chu et al. (1992) permitiu um aumento na atividade enzimática em meios compostos por farinha de soja. Resultado semelhante foi obtido por Gessesse et al. (2002) onde foi constatado aumento de quase 100% após a adição de glicose a um meio composto por penas de aves.

Estes dados aparentemente contraditórios são resultado de ensaios realizados em agitador orbital sem avaliação adequada de nutrientes. Trabalhos realizados sob condições controladas de concentração de glicose demonstraram adequadamente a sua influência.

Hanlon et al. (1981) verificou que uma concentração de glicose entre 0,01 e 0,05M promoveu aumento da atividade enzimática, enquanto que concentrações fora desta faixa resultaram em sua queda. Possivelmente concentrações inferiores de glicose são insuficientes para permitir o crescimento celular. Neste mesmo trabalho também foi demonstrado que a adição de glicose após o consumo quase total do substrato no meio provocou aumento na atividade enzimática, enquanto que a adição da glicose na concentração total desde o início resultou em sua

redução. Beg et al (2002) obtiveram resultados semelhantes com adição de glicose e casaminoácidos após o crescimento celular ter atingido a fase estacionária.

As características da fonte protéica são fundamentais para a atividade, sendo a farinha de soja uma das fontes de nitrogênio orgânico mais estudadas devido ao seu baixo custo. Esta matéria-prima também apresenta resultados divergentes a respeito de sua influência.

Banerjee et al. (1999) também demonstraram a influência de diferentes fontes protéicas sobre a produção enzimática, onde a indução por farinha de soja foi dez vezes superior à indução por peptona. Beg et al. (2002), ao contrário, relata que farinha de soja é um fraco indutor para *Bacillus mojavensis*, obtendo maior atividade enzimática com a utilização de caseína e casaminoácidos.

Kanekar et al. (2002) verificou que para *B. alcalophilus* a matéria-prima composta por soja apresentou atividade intermediária, sendo ela superior a da caseína e inferior a da gelatina enquanto que Joo et al. (2002) constatou que a combinação de farinha de soja e peptona de caseína favoreceu a produção enzimática em *B. horikoshii*.

Outras fontes protéicas alternativas também são estudadas. Gessesse et al. (2002) verificou a atividade em um meio composto de penas de frango enquanto Ellouz et al. (2001), trabalhando com resíduos da indústria pesqueira, constatou-se que a matéria-prima com menor teor protéico e maior teor lipídico produziu maior atividade.

A influência de diferentes fontes de nitrogênio inorgânico como cloreto de amônio também é pesquisada. A redução na produção de proteases pelos íons

amônio foi constatada por diversos pesquisadores (Hanlon, et al., 1981; Chu et al., 1992; Beg et al., 2002).

O efeito do pH sobre a produção enzimática é relativamente pouco estudada em relação a parâmetros como fontes de carbono e nitrogênio. A seleção de linhagens produtoras ou a otimização de sua produção sem a presença de um sistema tamponante foi realizada por Gessesse et al. (2002), Rozs et al. (2001), Ellouz et al. (2001) e Johnvesly et al. (2001).

Outros trabalhos em agitador orbital descritos na literatura foram conduzidos com meios tamponados (Beg et al., 2002; Chu et al., 1992; Kanekar et al., 2002; Hanlon et al. 1981) ou na presença de sais (como fosfato de sódio monobásico) que dificultavam a acidificação do meio (Kim et al. 2002, Banerjee et al. 1999; Mehrotra et al., 1999).

3.9. Regulação da Produção de Proteases

A síntese de proteases está submetida a um rígido controle gênico. O modelo mais estudado é o gene *aprE*, o qual codifica a protease subtilisina do *Bacillus subtilis*. Este bacilo produz diversas proteases, mas três estão presentes em maior quantidade (*aprE*, *nprE* e *epr*) e, destas, a enzima subtilisina é a mais estudada (He et al., 1991).

O mecanismo de esporulação é ativado quando o meio passa a exibir condições insatisfatórias de desenvolvimento como a depleção de nutrientes, desencadeando um processo em cascata que culmina com a fosforilação do fator SpoOA. O fator SpoOA fosforilado atua sobre o repressor AbrB o qual por sua vez

libera o gene *aprE*, permitindo a transcrição da protease subtilisina (Strauch *apud* Christiansen et al., 2002).

O *aprE* é regulado por diversos genes (*prtR*, *sacQ*, *sacU*, *sacV*) além dos genes diretamente envolvidos no processo de esporulação como o *spoOA*. O sistema de regulação através deste mecanismo vincula a produção da protease ao processo de esporulação (He et al., 1991).

Por este motivo, condições de cultivo que forneçam excesso de substratos como carboidratos podem apresentar baixa produção de proteases, pois as condições de desenvolvimento são satisfatórias.

Nos ensaios a síntese de proteases geralmente é verificada no estágio final da fase exponencial ou mesmo após a entrada na fase estacionária (Hanlon et al., 1981). Conforme constatou Christiansen et al. (2002) o surgimento da atividade enzimática é acompanhado pelo aumento na concentração de RNA ribossômico. Este fato indica um aumento na transcrição e tradução dos genes envolvidos na síntese de enzimas proteolíticas.

Por outro lado, Chu et al. (1992) constatou a produção de enzima apenas no final da fase exponencial e início da fase estacionária. Após ter atingido um ápice de atividade, foi observada a sua queda em poucas horas. As razões envolvidas nesta queda levantadas pelo autor foram desnaturação, autólise e desnaturação provocada por outras proteases. A constatação de que os sobrenadantes armazenados com células possuíam uma meia-vida menor do que o extrato livre levaram à hipótese de liberação de inibidores pelas células presentes no meio.

Beg et al. (2002) obteve maior atividade mediante a adição de glicose e casaminoácidos após o término da fase log, discriminando a fase de crescimento celular da fase de produção. O fornecimento de glicose propiciou um aumento na biomassa enquanto que o fornecimento de casaminoácidos algumas horas após estimulou a produção enzimática.

A concentração de enzimas produzidas também é consequência da biomassa presente (Beg et al., 2002). Porém, as condições que favorecem o crescimento celular (abundância de nutrientes) são opostas às condições que ativam a esporulação e, por consequência, a síntese de proteases.

De maneira oposta, a alteração de condições do meio pode acarretar em redução na atividade proteolítica sem necessariamente reduzir a biomassa. Isto foi constatado por Chu et al. (1992) onde o aumento da concentração de íons amônio e redução na concentração de amido levaram à queda na síntese de proteases embora a biomassa tenha permanecido constante.

Hanlon et al. (1981) também demonstrou que meios com excesso de cloreto de amônio apresentaram redução de atividade em relação a meios com excesso de glicose embora ambos os substrato tenham fornecido biomassa semelhante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A condução dos ensaios em biorreator e as determinações físico-químicas e microbiológicas destes ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.1 Obtenção e Manutenção do Microrganismo Utilizado

O microrganismo utilizado nas fermentações, *Bacillus cereus*, foi obtido de esporos conservados em microesferas de sílica. A partir da obtenção de colônias isoladas, realizou-se coloração de Gram e motilidade para verificação de contaminação, com posterior inoculação em caldo BHI. Após o crescimento, foi adicionada glicerina estéril ao meio, procedendo-se o seu fracionamento em tubos de microcentrífuga estéreis. Este material foi mantido sob refrigeração e denominado de "cultura estoque".

Da cultura-estoque foram semeadas subculturas em placas de ágar nutritivo e incubadas a 30°C para a obtenção de colônias isoladas. Com as colônias realizou-se microscopia com coloração de Gram e *a fresco* para confirmação da pureza e viabilidade do *Bacillus cereus*. Estas colônias foram utilizadas para inoculação do pré-inóculo. Após armazenagem de 20 dias a 4°C, as colônias foram repicadas para uma segunda placa de ágar nutritivo, a qual foi mantida pelo mesmo período.

4.2 Identificação do Microrganismo

A partir da placa de ágar nutritivo contendo a colônia pura realizou-se as provas bioquímicas para identificação da amostra (tabela 2). Foram realizadas as provas para metabolismo aeróbico/anaeróbico (Meio OF), catalase, fenilalanina, ensaio de Voges-Proskauer, indol, amido, segundo MacFaddin (2000). Além destes ensaios, foram realizadas provas para o metabolismo de tirosina, lactose, maltose, sacarose, trealose e lecitina, segundo Sneath et al. (1986). De acordo com os resultados procedeu-se à identificação do bacilo conforme a bibliografia recomendada (MacFaddin, 2000; Sneath et al., 1986).

TABELA 2: Provas bioquímicas realizadas para identificação do *Bacillus cereus*

Prova Bioquímica	Resultado	Referência
Morfologia/Coloração de Gram	+	a
Esporos	+	a
Metabolismo Aeróbico/Anaeróbico	+	a
Catalase	+	a
Fenilalanina	-	a
Voges-Proskauer	+	a
Indol	-	a
Hidrólise de Amido	+	a
Desenvolvimento a40°C	+	b
Tirosina	+	b
Lactose	-	b
Lecitina	+	b
Maltose	+	b
Trealose	+	b

a: Prova bioquímica realizada segundo MacFaddin (2000)

b: Prova bioquímica realizada segundo Sneath et al. (1986)

4.3 Matérias-primas Utilizadas

O meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth) utilizado por Silva (2001) e que demonstrou ser adequado para o cultivo de *B. cereus* foi, neste trabalho, denominado meio de Referência (meio MR), sendo formulado com peptona de caseína e de soja (Biobrás[®]) conforme a tabela 3.

TABELA 3: Composição do Meio Referência

Constituinte	Concentração (g.L ⁻¹)
Peptona de caseína	17,0
Peptona de Soja	3,0
Glicose	2,5
NaCl	5,0
Na ₂ HPO ₄	2,5
H ₂ O dest.	1000mL

FONTE: Microbiology Manual Merck (2000)

As fontes protéicas utilizadas foram a denominada PS60[®], produzida pela empresa Olvebra e a Samprosoy90[®], produzida pela Bunge Alimentos. A matéria-prima PS60[®] é obtida através da desidratação em "spray drier" da proteína após a extração do óleo da soja. A composição do meio formulado com 30g.L⁻¹ de proteína PS60[®] (MPS1) é fornecida na tabela 4.

TABELA 4: Composição do meio de proteína de soja MPS1

Constituinte	Concentração (g.L ⁻¹)
Umidade	1,8
Proteínas	18,0
Lipídeos	0,4
Cinzas	2,3
Fibras	0,4
Carboidratos	7,1
H ₂ O dest.	1000mL

FONTE: Olvebra S. A.

A matéria-prima samprosoy90[®] passa, após a extração do óleo, por uma etapa adicional para remoção de glicídeos redutores, sendo ao final também desidratada em "spray drier". A composição é fornecida na tabela 5:

TABELA 5: Composição da proteína de soja Samprosoy90[®].

Constituinte	Concentração (g%)
Proteína-base seca	92,0
Açúcares	"traços"
Carboidratos	3,54
Fibras solúveis	3,38
Lipídeos totais	0,4-1,57
Sódio	0,45-1,20
Magnésio	0,03-0,30
Zinco (mg)	2,0
Cobre (mg)	3,0
Ferro	0,020
Cálcio	0,02-0,50

FONTE: Bunge Alimentos

4.4 Parâmetros de Fermentação

Os parâmetros utilizados foram baseados nas condições de cultivo de *B. cereus* otimizadas por Silva (2001). Devido à dificuldade na manutenção da temperatura, os experimentos em biorreator foram conduzidos a 37°C.

4.4.1 Temperatura

A temperatura do meio de cultura foi regulada para 37°C diretamente no biorreator com o auxílio de um termômetro. O aquecimento do meio foi realizado mediante o acoplamento a um banho de água mantido a 50°C, o qual realizava o prévio aquecimento da água antes de sua passagem pelo sistema de troca de calor do

biorreator. A manutenção da temperatura adequada era realizada pelo termostato do próprio biorreator.

4.4.2 Agitação

A agitação do biorreator foi mantida em 200 r.p.m. durante o período de homogeneização do meio. Após o início do bioprocessamento, a agitação foi regulada para 400 r.p.m. e assim mantida até o final do ensaio.

4.4.3 Espuma

O controle de espuma foi realizado através da adição de 10 gotas de silicone DC Q2-3255[®] aos meios de cultura.

4.4.4 Volume

O volume de meio preparado para cada ensaio foi de 7L, sendo este volume considerado como padrão para regulagem da aeração do bioprocessamento.

4.4.5 Aeração

A aeração do biorreator foi regulada para 1vvm, sendo o volume de injeção de ar mantido durante todo o processo. A injeção de ar foi realizada mediante a utilização de uma bomba de ar, com filtragem prévia do ar por um filtro de partículas seguindo-se a passagem por um filtro esterilizante. Este segundo filtro era composto por lã de vidro previamente desinfetada em HCl 0,1M, seguida de esterilização juntamente com o biorreator. Ao final de cada ensaio, o material era descartado e substituído por um novo material filtrante.

A aeração é um parâmetro fundamental na condução de um processo fermentativo sendo que, ao contrário do demais nutrientes, o oxigênio possui uma solubilidade muito baixa. A concentração de oxigênio dissolvido a saturação em água a uma temperatura de 37°C e 1atm de pressão com a injeção de ar atmosférico é 6,71mgO₂.L⁻¹ (Teixeira, 1984).

O volume de trabalho no biorreator é de 7L sendo aplicada ao mesmo uma aeração de 1v.v.m. Como o teor de oxigênio atmosférico é de 21% (Netto, 1999), ao meio foi injetado 0,21v.v.m. de oxigênio sendo de 1,47L o seu volume total injetado no biorreator a cada minuto.

Apesar de ser conhecido o volume teórico de oxigênio fornecido ao biorreator a sua concentração não o é, pois a solubilidade do oxigênio é influenciada pela composição do meio de cultura, pressão do sistema, temperatura e agitação (Netto, 1999).

A concentração de oxigênio dissolvido deve ser avaliada diretamente nos dois meios de cultura utilizados sob as condições empregadas nas fermentações (1v.v.m., 400r.p.m., 37°C). A determinação pode ser realizada através do método de Winkler, o qual baseia-se na oxidação do manganês reduzido pelo oxigênio dissolvido (Teixeira, 1984). Esta avaliação é fundamental para trabalhos posteriores de escalonamento.

4.5 Seleção do Meio de Proteína de Soja

A avaliação foi realizada com a preparação de erlenmeyers de 125mL tendo 25mL de meio de cultura. Os meios foram preparados contendo concentrações crescentes de proteína de soja PS60[®] e Samprosoy90[®] de 6, 12 e 18g/L. Os meios de

cultura, preparados em triplicata, foram inoculados e incubados a 37°C durante 24 horas com agitação de 170 r.p.m. Ao término do período, realizou-se imediatamente a determinação da atividade enzimática para seleção da proteína de soja para os ensaios em biorreator (figura 1).

4.6 Ensaios em Biorreator

4.6.1 Preparação do Pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado semeando-se o isolado obtido da placa de cultura estoque em 10mL de caldo nutritivo (figura 1). O tubo inoculado foi incubado em estufa a 30°C por 24 horas e, após o crescimento, fez-se a avaliação da cultura por microscopia através de coloração de Gram e *a fresco*.

4.6.2 Preparação do Inóculo para o Biorreator

O inóculo de *B. cereus* foi produzido em erlenmeyer de 500mL, com um volume de 100mL de caldo nutritivo, conforme tabela 6. O meio, após ser semeado com o pré-inóculo, foi mantido em agitação de 150 r.p.m. por um período de 2 horas. Após esse período, o inóculo foi mantido em repouso por um período de 24 horas à temperatura de 25°C (figura 1). Para inoculação do biorreator, o volume do erlenmeyer foi transferido para um frasco de centrífuga de capacidade nominal de 500mL e centrifugado a 2000r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, ressuspendendo-se o precipitado em 20mL de caldo nutritivo. Esta suspensão foi inoculada imediatamente no biorreator (figura 1) com o auxílio de uma seringa de capacidade nominal de 20mL. Após um período de homogeneização de 10 minutos,

procedeu-se à coleta de um volume de 20mL, sendo esta alíquota denominada como hora inicial (0h), sendo a mesma considerada como o início do bioprocesso

TABELA 6 Composição do Caldo Nutritivo de Inóculo

Constituinte	Concentração (g.L ⁻¹)
Peptona de Soja	10,0
Extrato de Carne	3,0
Água dest.	1.000mL

4.6.3 Preparação do Meio Referência

Os constituintes do meio referência foram pesados e dissolvidos individualmente em água destilada. Após solubilização completa, adicionou-se o anti-espumante, o qual também foi previamente dispersado em água destilada. O meio completo, acrescido do volume total de água destilada, foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C.

4.6.4 Preparação do meio PS60[®] (meio MPS1)

Após a pesagem da proteína de soja, transferiu-se a massa para um becker com água destilada. O material foi em seguida colocado sob agitação magnética até a sua dispersão completa, correspondendo à eliminação visual de todo o material floculado e bolhas de ar. Após esta etapa a suspensão protéica foi transferida para o biorreator com a adição do antiespumante também previamente disperso. O meio acrescido do volume total de água foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C.

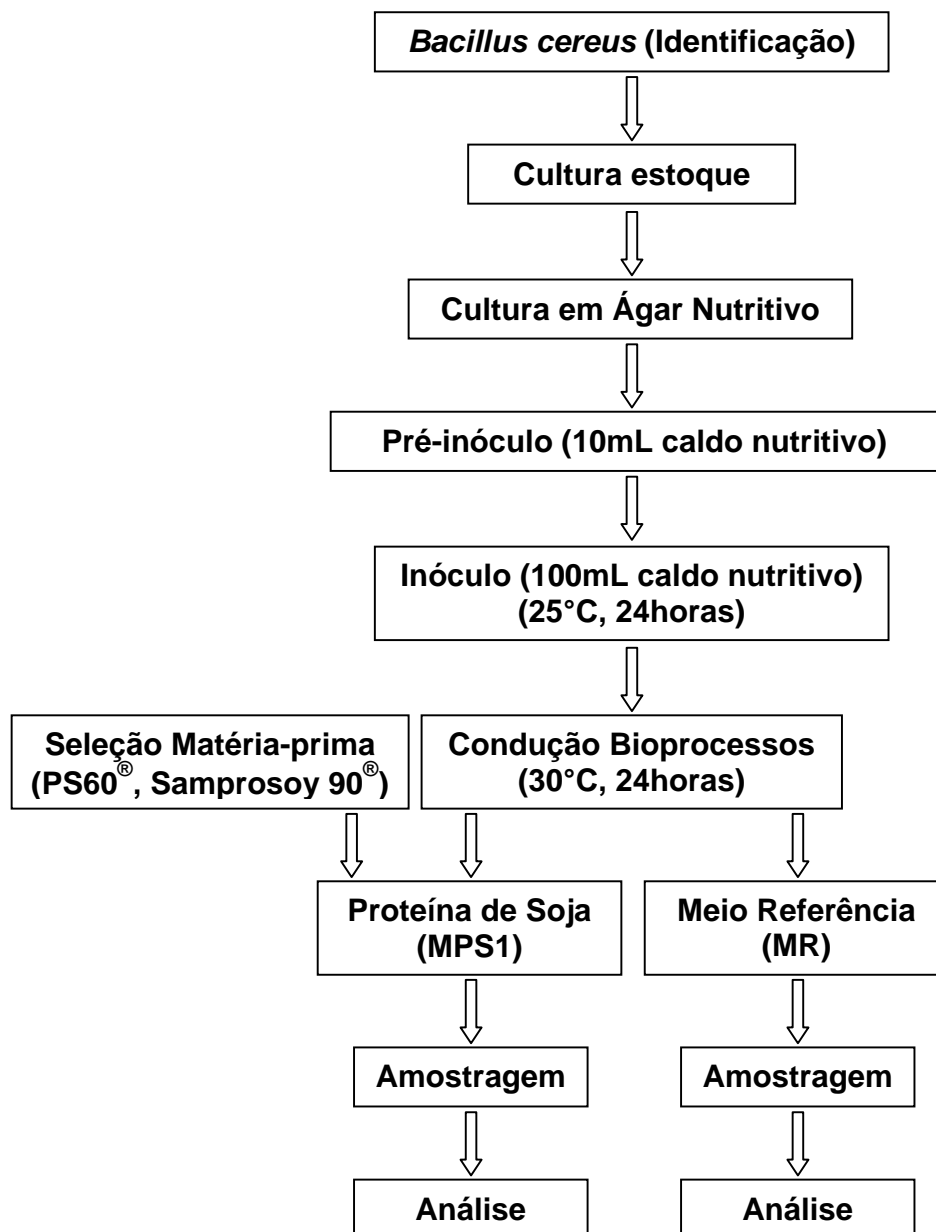


FIGURA 1: Fluxograma de cultivo do *Bacillus cereus*.

4.7 Avaliação dos Parâmetros de Fermentação

4.7.1 Amostra: Volume Coletado

Para a amostragem, foram desprezados os primeiros 20mL de cada coleta, a fim de garantir uma alíquota que representasse as características do meio. Seguiu-se então a coleta de 20mL em frascos previamente esterilizados, sendo o material

submetido imediatamente á análises físico-químicas e microbiológicas. Foram retiradas amostras a partir da denominada "hora inicial" (0h) em intervalos de 2 horas até a 12ª hora. A partir deste ponto, a amostragem foi realizada em intervalos de 3 horas até a 24ª hora de fermentação.

4.7.2 Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada diretamente na alíquota obtida do biorreator após a retirada da alíquota destinada ao plaqueamento em gota. Para a análise foi utilizado o aparelho Digimed, com um eletrodo combinado de vidro.

4.7.3 Determinação de Absortividade

A medida de absortividade foi realizada diretamente nas amostras após homogeneização em agitador de vórtice por um período de 10 segundos. Para esta análise foi utilizado o fotolorímetro Analyser 500, empregando-se tubo de vidro com caminho ótico de 10mm. O material foi previamente homogeneizado em agitador de vórtice por 10 segundos antes da realização da leitura a 630nm. As amostras que apresentaram valores de absortividade superiores a 0,8 foram diluídas com água destilada e homogeneizadas novamente por mais 10 segundos antes de proceder-se à leitura no comprimento de onda adequado.

4.7.4 Determinação de Células Viáveis Totais e Esporos

4.7.4.1 Preparação de Placas de Petri

As placas destinadas à determinação de Células Viáveis Totais (CVT) e esporos foram preparadas com ágar nutritivo. Em cada placa de Petri foi vertido um

volume de meio aproximado de 25mL, deixando-se a mesma entreaberta para permitir o escape de excesso de vapor. Após solidificação do meio, as placas foram acondicionadas em estufa a 40°C por um período de 5 dias, com o objetivo de redução da umidade presente.

4.7.4.2 Preparação das Amostras Para Contagem

As amostras obtidas da fermentação foram imediatamente transferidas para capela de fluxo laminar vertical. Após a homogeneização em agitador de vórtice por 10 segundos, retirou-se alíquotas de 1mL para posterior diluição e plaqueamento.

4.7.4.3 Determinação de Células Viáveis Totais

A determinação de células viáveis totais foi realizada através do plaqueamento em gota em placas de ágar nutritivo (Miles et al, 1938), através da divisão de cada placa em dez campos e inoculação de alíquotas de 25µL em cada campo. A partir da amostra procedeu-se à retirada asséptica de 1mL e sucessivas diluições decimais em água destilada estéril. Após a homogeneização em agitador de vórtice por 10 segundos, as diluições foram plaqueadas e incubadas em estufa a 37°C. A contagem das colônias formadas foi realizada após 7 e 15 horas de incubação

4.7.4.4 Determinação do Número de Esporos

A partir das diluições decimais realizadas para determinação de células viáveis totais foram retiradas alíquotas de 1mL e transferidas para frascos de eppendorff. As amostras foram imediatamente colocadas em aquecimento a 70°C durante 10 minutos. Após este período, foram retiradas do aquecimento e

homogeneizadas em agitador de vórtice por 10 segundos sendo então submetidas a plaqueamento em gota (25µL) em placas de ágar nutritivo (Miles et al, 1938) e incubadas a 37°C. A contagem das colônias formadas foi realizada após 10 horas e 15 horas de incubação.

4.7.5 Determinação de Massa Seca

A massa seca foi determinada em quadruplicata mediante transferência de 1mL de amostra para tubos de microcentrifuga previamente pesados. Após centrifugação durante 10 minutos a 13.000r.p.m., o sobrenadante foi retirado e 1mL de água destilada foi adicionada. Após homogeneização, realizou-se um segundo ciclo de centrifugação desprezando-se ao final o sobrenadante. Com o tubo aberto, manteve-se a amostra em estufa a 40°C por um período mínimo de 24 horas até peso constante.

4.7.6 Determinação de Proteína

A partir das amostras das fermentações obteve-se o sobrenadante através de centrifugação durante 10 minutos a 13.000r.p.m. armazenando-se o mesmo sob refrigeração. O método do biureto foi empregado a fim de dosar a proteína solúvel presente no sobrenadante obtido a partir desta operação. O método de Bradford foi utilizado para determinação de proteína durante o processo de precipitação com sulfato de amônio

4.7.6.1 Determinação de Proteína Segundo o Método do Biureto

Os sobrenadantes obtidos a partir do procedimento para obtenção de massa seca foram dosados quanto à concentração de proteína solúvel segundo

método de Lowri. O reagente de biureto foi preparado no momento do doseamento, através da dissolução de 150mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 600mg de tartarato duplo de sódio-potássio e 3g de NaOH em um volume de água recentemente destilada suficiente para 100mL de solução.

Para o doseamento, 300 μL de amostra foram utilizados, completando -se o volume a 2mL com água destilada e adicionando-se 2mL do reagente de Biureto. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em banho de água a 37°C por 15 minutos. Após este período, realizou-se as medidas de absorvância em espectrofotômetro a 540nm com cubeta de acrílico de caminho ótico de 10mm (Lemos et al., 1996).

4.7.6.2 Preparação da Curva-Padrão para Determinação de Proteína Segundo o Método do Biureto

Para a leitura da concentração protéica, foi preparada uma curva padrão com uma solução de albumina sérica bovina 22%, diluída a uma concentração final de 500mg%. Realizou-se a adição de volumes crescentes da solução estoque de albumina 500mg%, obtendo-se concentrações crescentes de 0,5mg, 1,0mg, 2,0mg, 3,0mg e 4,0mg de proteína. Todos os tubos foram completados a 2mL com o volume de água adequado.

Aos tubos foram adicionados 2mL do reagente de Biureto, homogeneizados e incubados em banho de água a 37°C por 15 minutos. Após este período, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro Femto a 540nm com cubeta de acrílico com 10mm de caminho ótico.

Para a preparação do branco adicionou-se 2mL de reagente de biureto a 2mL de água destilada, incubando-se a solução nas mesmas condições descritas anteriormente. A curva padrão, foi calculada pela regressão linear da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados (Lemos et al., 1996).

4.7.6.3 Determinação de Proteína Segundo Método de Bradford

Os sobrenadantes obtidos a partir do procedimento para obtenção de massa seca foram também dosados quanto à concentração de proteína através do Método de Bradford. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas ao aquecimento em banho de água para eliminação do precipitado formado durante o armazenamento.

Para a preparação do reagente de Bradford procedeu-se à diluição de uma parte do reagente em quatro partes de água destilada. A solução foi filtrada sob vácuo e armazenada sob refrigeração até o momento do uso.

Para o doseamento, diluiu-se 100 μ L da amostra em 1,9mL de água destilada. Após a homogeneização, a 20 μ L da amostra diluída foi adicionado 1mL do reagente de Bradford. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, realizou-se a leitura da absortividade em espectrofotômetro a 595nm (Bradford, 1976).

4.7.6.4 Preparação da Curva-Padrão para Determinação de Proteína Segundo Método de Bradford

Para a leitura da concentração protéica, foi preparada uma curva padrão com albumina sérica bovina, dissolvendo-se 10mg de proteína em 10mL de água. A solução, com concentração de 1mg.mL⁻¹, foi diluída com a adição de volumes

crescentes (100, 200, 300...900 μ L) em frascos de eppendorf, completado-se o volume a 1mL com água destilada. A partir destas diluições foram retirados 20 μ L de solução e adicionado 1mL do reagente de Bradford, obtendo-se concentrações crescentes de proteína (2 μ g, 4 μ g, 6 μ g, 8 μ g, 10 μ g, 12 μ g, 14 μ g, 16 μ g e 18 μ g). Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, realizou-se a leitura da absortividade em espectrofotômetro a 595nm.

4.7.7 Determinação de Açúcares Redutores: Método do Ácido Dinitrossalicílico

Os sobrenadantes obtidos a partir do procedimento para obtenção de massa seca foram dosados quanto à concentração de açúcares redutores totais com o uso do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). O reagente foi preparado através da dissolução de 3,53g de ácido 3,5-dinitrossalicílico, 6,0g de hidróxido de sódio e 102g de tartarato duplo de sódio e potássio em 472mL de água recentemente destilada. Após a solubilização, foram adicionados 2,53mL de fenol e 2,76mL de metabissulfito de sódio.

Para o doseamento, 200mL de amostra foram utilizados, adicionando-se 1,5mL do reagente DNS e incubando-se os tubos durante 5 minutos em banho de água a 100°C. Após a incubação, foram adicionados 17mL de água destilada, homogeneizados e realizada a leitura da absortividade em espectrofotômetro a 550nm (Miller, 1959).

4.7.7.1 Preparação da Curva-padrão para Determinação de Açúcar Redutor

A curva padrão foi realizada em duplicata com a preparação de uma solução de glicose 100mg%. Realizou-se a adição de volumes crescentes da solução estoque, obtendo-se concentrações de 100µg, 300µg, 500µg 700µg e 900µg de glicose, completando-se todos os tubos a 1mL com água. Adicionou-se 1,5mL do reagente DNS e incubou-se os tubos durante 5 minutos em banho de água a 100°C. Após a incubação, foram adicionados 17mL de água destilada, homogeneizado e realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 550nm.

4.7.8 Determinação da Atividade Proteolítica

A determinação da atividade proteolítica foi realizada empregando-se azocaseína como substrato. A azocaseína foi preparada em solução aquosa 2% e mantida sob refrigeração por um período máximo de três semanas.

À alíquota de 100µL de azocaseína 2% foram adicionados 200µL de solução tampão fosfato 0,2mM pH 8. Após 2 minutos de homogeneização na temperatura de 50°C em banho de água, foram adicionados 100µL de amostra. O ensaio foi conduzido com um período de incubação de 15 minutos. A reação foi finalizada com a adição de 800µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% (Mitidieri et al, 2002).

4.7.8.1 Preparação do Controle para Leitura de Atividade Proteolítica

Para cada ponto de amostragem preparou-se um branco mediante a adição de 100µL de azocaseína, 200µL de solução tampão fosfato e de 800µL de solução

TCA (20%). Por último, adicionou-se 100µL de amostra seguindo-se à incubação por 15 minutos (Mitidieri et al, 2002).

As amostras foram centrifugadas a 13000r.p.m. durante 5 minutos, realizando-se imediatamente a leitura de absorvidade do sobrenadante a 400nm. Para a leitura, foram utilizadas cubetas de acrílico de 1mL com caminho ótico de 10mm.

4.8 Obtenção do Extrato Proteolítico a partir do Meio de Produção

A obtenção do extrato foi realizada com separação de 1000mL de meio de cultura de uma fermentação com o meio de proteína de soja. O material foi submetido à centrifugação de 7.000r.p.m. durante 10 minutos. Após este período o sobrenadante foi separado e armazenado sob refrigeração desprezando-se o precipitado.

4.9 Precipitação com Sulfato de Amônio

O sobrenadante (denominado extrato bruto) obtido foi submetido à precipitação fracionada com concentrações crescentes de sulfato de amônio. Operando-se com um volume de trabalho inicial de um litro, foram realizadas cinco precipitações.

Para cada precipitação, procedeu-se a lenta adição da massa de sulfato de amônio sob agitação. Após a dissolução completa, a solução foi mantida sob refrigeração durante 24 horas em agitação. Após este período, procedeu-se a centrifugação a 7000r.p.m. durante 15 minutos.

Cada precipitado assim obtido foi ressuspenso em 100mL de tampão Tris-HCl 50mM pH 8 e armazenado sob refrigeração. Posteriormente, para cada fração

foi determinada a concentração protéica através do método de Bradford e atividade proteolítica através do método da azocaseína.

4.10 Diálise da Fração da Precipitação

O volume de 50mL da fração com maior atividade específica (fração III) foi submetida à diálise com membrana de acetato de celulose. Foram realizados três ciclos de diálise, sendo os dois primeiros de 24 horas em água destilada e um terceiro ciclo em tampão Tris-HCl 50mM pH 8.

4.11 Preparação das Colunas de Troca Iônica

As resinas das colunas (Q Sepharose[®] e SP Sepharose[®]) foram previamente submetidas a sucessivas lavagens com água destilada, hidróxido de sódio 0,1M e etanol 70% para a remoção de material orgânico.

As colunas foram preparadas com um volume equivalente a 20mL de resina, o qual foi suspenso em tampão Tris-HCl 50mM pH 8. Após a montagem da mesma, procedeu-se à lenta eluição do tampão Tris-HCl 50mM pH 8 até ser atingido o equilíbrio do eluente com o próprio tampão.

A velocidade de passagem na coluna foi regulada para 2mLmin⁻¹, sendo recolhidas alíquota de 5mL. Após a aplicação da amostra, procedeu-se à leitura da concentrações protéicas em espectrofotômetro a 280nm e determinação da atividade proteolítica através do método de azocaseína.

4.12 Avaliação do Crescimento, Esporulação e Produção

A avaliação das fermentações foi calculada em termos de eficiência, produtividade e rendimento (Lemos et al., 1996). Estes parâmetros foram calculados em função de massa seca, substrato protéico consumido, atividade enzimática, número de células e número de esporos utilizando-se os valores obtidos na 15ª hora de fermentação de ambos os meios, que corresponde à hora de atividade proteolítica máxima.

O cálculo de produtividade é obtido a partir da quantidade obtida de um determinado produto (x) em função do tempo total de fermentação segundo a fórmula abaixo:

$$P_x = \frac{\text{Concentração de x}}{\text{Tempo (horas)}}$$

O rendimento ou fator de conversão é determinado a partir da quantidade obtida de um determinado produto (x) em função do substrato consumido. Neste caso, o substrato considerado é a proteína fornecida, sendo o cálculo realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$R_x = \frac{\text{Concentração de x}}{\text{Proteína consumida (g.L}^{-1}\text{)}}$$

A eficiência determina o grau e conversão de substrato em produto, fornecendo o percentual obtido no experimento em relação ao total teórico caso a conversão fosse completa. É calculada de acordo com a fórmula:

$$E_x = \frac{\text{Concentração Obtida} \times 100}{\text{Concentração Total Teórica}}$$

Além destes cálculos de produção, realizou a avaliação do crescimento e esporulação de *B. cereus* nos meios calculando-se o tempo de geração médio (G) e a velocidade de crescimento específica (μ) (Lemos et al., 1996).

O tempo médio de geração é calculado na fase de crescimento exponencial, sendo considerado como o tempo necessário para que uma determinada célula divida-se em duas. O seu valor é obtido através de fórmula:

$$G = \frac{t}{3,322 (\log N_f - \log N_i)}$$

Onde:

t= intervalo de tempo entre as duas contagens (em minutos)
 Nf= número de células final (UFC. mL⁻¹)
 Ni= número de células inicial (UFC.mL⁻¹)

A velocidade específica de crescimento (μ) também é determinada na fase de crescimento exponencial, sendo obtida através de seu cálculo a velocidade de desenvolvimento do microrganismo nas condições da fermentação.

$$\mu = \frac{\ln N_f - \ln N_i}{t}$$

Onde:

t= intervalo de tempo entre as duas contagens (em horas)
 Nf= número de células final (UFC. mL⁻¹)
 Ni= número de células inicial (UFC.mL⁻¹)

Para a determinação de G e μ para o meio MR utilizou-se o intervalo compreendido entre a 2ª e 12ª hora enquanto que para o meio MPS1 o intervalo foi da 2ª a 8ª hora. Os diferentes intervalos correspondem ao período de intenso crescimento celular de cada um dos meios.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O acompanhamento dos bioprocessos foi realizado mediante a retirada de amostras para a avaliação de pH, absorvidade, massa seca, contagem de células e esporos. Os resultados individuais das análises físico-químicas e microbiológicas realizadas são apresentados nos respectivos apêndices do trabalho. Para cada meio utilizado no biorreator foram realizadas três fermentações e os valores médios das triplicatas estão apresentados sob a forma de gráfico ao final da discussão de cada parâmetro.

5.1 Seleção do Meio de Proteína de Soja

O experimento em agitador orbital dos meios de proteína de soja permitiu a seleção da fonte de matéria-prima e sua concentração a serem empregadas nos ensaios em biorreator. Nas condições utilizadas, os meios compostos por Samprosoy90[®] apresentaram baixa atividade, não sendo constatada diferença entre as três concentrações de proteína. Foram obtidas 1,64, 1,19 e 1,95U.mL⁻¹h⁻¹ para as concentrações protéicas de 6,12 e 18g/L, respectivamente.

O meio composto por PS60[®] apresentou atividade enzimática similar à do meio Samprosoy[®] na concentração de 6g/L. Entretanto, para concentrações de

12 e 18g/L, as atividades obtidas foram superiores, sendo de 5,67 e 12,13U.mL⁻¹h⁻¹, respectivamente. A partir dos resultados, foi selecionada a proteína de soja PS60 na concentração de 18g/L.

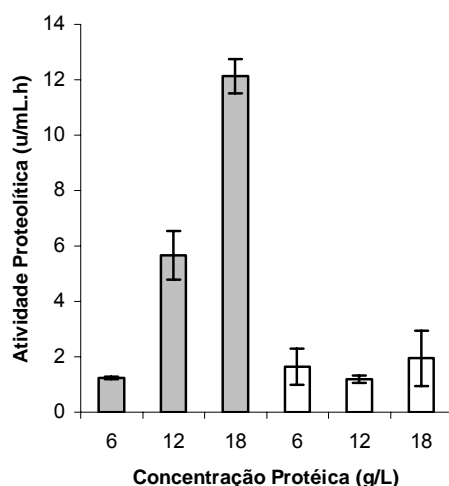


FIGURA 2: Gráfico de atividade proteolítica de *Bacillus cereus* em meio com proteína de soja durante 24 horas, a 37°C e 170r.p.m.. Cada barra refere-se a média de valores de doseamento realizado em triplicata. Meio com proteína de Soja PS60[®] (■); Meio com proteína de soja Samprosoy90[®] (□).

A seleção do meio composto por proteína de soja a partir do crescimento em erlenmeyer demonstrou grandes diferenças entre as duas matérias-primas empregadas. No meio contendo Samprosoy90[®] observa-se nos três ensaios uma atividade enzimática baixa, a qual não é influenciada pelo aumento da concentração de proteína. A baixa atividade observada nos três ensaios pode estar relacionada a ausência de açúcar, pois a proteína é obtida a partir de precipitação isoeletrica, sendo constatado apenas traços de carboidratos,

conforme tabela 5. Resultado semelhante foi encontrado por Hanlon et al. (1981), que demonstrou que a ausência de glicose pode ocasionar baixa atividade.

O meio composto por PS60[®], de maneira oposta, apresentou aumento de atividade enzimática com o aumento de concentração de matéria-prima. A proteína PS60[®], ao contrário da Samprosoy90[®], apresenta uma concentração de carboidratos de 23,5%. Estes possivelmente são utilizados como substrato, permitindo maior crescimento celular e posterior produção de protease.

A comprovação ou não deste fato deve ser realizada mediante a condução de ensaios por um período superior ao de 24 horas. Assim, seria possível verificar se o microrganismo, com um maior prazo para o desenvolvimento, produziria um extrato com atividade superior.

Apesar de ser apenas um dos parâmetros, o crescimento celular está diretamente relacionado com a maior atividade enzimática pois, em princípio, quanto mais elevado o número de células maior é o número de unidades produtoras de enzimas. Conforme foi demonstrado por Jonhvesly et al. (2001) ao analisar a influência de diversas fontes de carbono, nitrogênio e pH sobre as culturas em agitador orbital, a atividade enzimática foi diretamente proporcional à absorvidade do meio.

5.2 Determinação do pH.

As curvas de pH obtidas demonstram comportamentos semelhantes para ambos os meios, MR e MPS1, os quais apresentaram valores próximos a neutralidade no início dos bioprocessos. O pH médio inicial do meio MR foi de 7,05 enquanto que o do meio MPS1 foi de 6,73.

No meio MR, durante as duas primeiras horas de fermentação, não foram constatadas alterações, sendo o seu valor médio de 7,05 e 7,04 para hora inicial e 2ª hora, respectivamente. Na 4ª hora, porém, o pH desloca-se para valores mais ácidos, com um valor médio de 6,36, sendo este o valor inferior máximo obtido durante toda a fermentação. A partir da 6ª hora, o pH passa a deslocar-se gradualmente para valores mais altos. O seu valor médio é de 6,64, sendo este o último ponto com valores na faixa ácida. O aumento no pH do meio passa então a ocorrer de modo constante, não havendo qualquer oscilação para valores mais ácidos, atingindo o máximo de 9,06 na 24ª hora de fermentação (figura 3).

O meio MPS1 não demonstrou, nas duas primeiras horas, alteração no pH, apresentando o valor médio de 6,73 para a hora inicial e de 6,74 para a 2ª hora. Na 4ª hora, entretanto, verifica-se que o pH desloca-se para 6,93 sem apresentar, entretanto, qualquer queda para valores ácidos. Os valores de pH, a partir da 6ª hora, apresentam um comportamento semelhante à curva de pH do meio MR. O aumento ocorre gradualmente até atingir um valor máximo de 8,97 na 24ª hora. Pode-se verificar, porém, que a partir da 18ª hora, os valores atingem uma faixa de maior estabilidade, demonstrando uma oscilação menor de 8,82, 8,81 e 8,96 para as 18ª, 21ª e 24ª hora, respectivamente (figura 3).

A manutenção de pH do meio MR nas duas primeiras horas é conseqüência do fraco crescimento celular, conforme pode ser verificado pela contagem de células em placa. A queda de pH observada na 4ª hora ocorre pelo consumo de glicose, sendo também constatado o início do crescimento celular.

O intenso crescimento celular associado ao consumo de proteínas ocasiona uma grande elevação no pH, que passa de 6,36 (4ª hora) para 8,06 na 10ª hora. Ao final da fase log e com a aproximação da fase estacionária e a estabilização do crescimento celular, observa-se também que os valores de pH iniciam uma gradual estabilização.

O meio MPS1 também demonstra manutenção de pH nas duas horas iniciais devido à estabilização na população bacteriana neste período. Entretanto, ao contrário do meio MR, que apresenta na 4ª hora uma considerável queda de pH, não constata-se no meio PS60 a acidificação do meio.

A partir da 4ª hora o pH passa a elevar-se, mudando de 6,93 (4ª hora) para 7,94 na 6ª hora e aumento coincide com o início da fase exponencial de crescimento celular.

A utilização de glicose, sob condições aeróbicas, inicia-se na glicose e é finalizada no Ciclo de Krebs, com a total oxidação dos átomos de carbono a CO_2 Çalik et al (2002). Porém, este processo bioquímico é interrompido, pois na 6ª hora observa-se a elevação do pH no meio MR. Este aumento decorre da utilização de fonte proteica como substrato através de uma rota bioquímica completamente diversa à anterior. Neste caso, os aminoácidos oriundos da clivagem dos peptídeos são metabolizados após a remoção do grupo amino, sob a forma de NH_3 . Em meio aquoso, a amônia formada capta um próton de uma molécula de água, com formação de hidróxido de amônio e conseqüente alcalinização do meio (Morrison et al, 1972).

A queda de pH observada apenas no meio MR pode estar relacionada ao pH inicial mais alcalino deste meio (7,05) em relação ao pH do MPS1 (6,73). A

taxa de consumo de glicose, segundo Çalik et al. (2003), é maior em meios cujo pH externo aproxima-se do pH interno do microrganismo. O maior gradiente (pH mais ácido) força o microrganismo a um processo de manutenção de pH mais dispendioso em termos metabólicos.

As fermentações foram conduzidas sob condições que permitiram a livre oscilação de pH. Entretanto, na literatura geralmente são relatados experimentos sob condições controladas de pH (Beg et al., 2002; Christiansen et al., 2002; Chu et al., 1992; Kanekar et al., 2002; Putten et al., 1995) que impossibilitam observar a influência da oscilação durante o processo.

Porém, os poucos experimentos realizados sob condições de pH livre (Çalik et al., 2003; Çalik et al., 2002) relatam que a atividade enzimática é mais alta em relação a experimentos sob controle de pH. Segundo o autor, a eliminação de interferentes como sulfato seria um dos motivos para esta maior atividade.

O deslocamento do pH para valores alcalinos pode também influenciar na estabilidade da própria enzima ocasionando sua degradação. Proteases estáveis sob pH alcalino são secretadas pela maioria dos microrganismos alcalófilos (Kumar et al, 1999) mas mesmo os não alcalófilos podem, no entanto, secretar diferentes enzimas estáveis sob condições de pH ácidas, neutras ou alcalinas (He et al, 1991). A verificação desta influência sobre a estabilidade das enzimas secretadas por *B. cereus* deve ser realizada mediante determinação da atividade enzimática do extrato proteolítica sob diversos valores de pH.

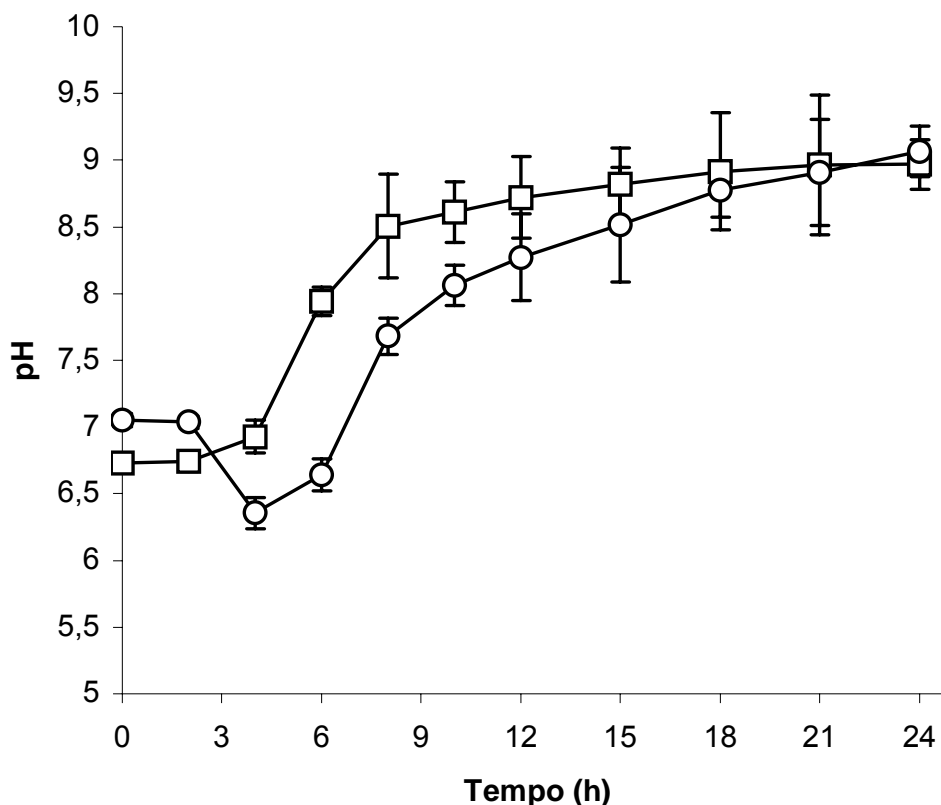


FIGURA 3: Curvas de pH em função do tempo de crescimento do *Bacillus cereus*. Cada ponto da curva de pH refere-se a média de valores de três ensaios realizados no mesmo meio e sob as mesmas condições de fermentação. meio MR (○); meio MPS1 (□).

5.3 Determinação de Absortividade

A determinação da absortividade foi realizada com o fotolorímetro Analyser 500, empregando-se tubo de vidro com caminho ótico de 10mm. Os resultados demonstraram que ambos os meios utilizados apresentaram tendência similar no decorrer das fermentações até a 12^a hora, embora com valores distintos. No entanto, as amostras posteriores a este ponto mostraram grande diferença entre os dois meios.

No meio MR verifica-se o aumento na absorvidade desde o início do bioprocesso, ainda que nas primeiras duas horas este não seja muito elevado. Nesta etapa, os valores obtidos foram de 0,010 e 0,062 para a hora inicial e 2ª hora, respectivamente.

A partir da 4ª hora ocorre uma elevação mais acentuada na absorvidade. Este aumento ocorre de maneira uniforme até a 10ª hora, crescendo rapidamente de 0,42 (4ª hora) para 3,68 (10ª hora). Entre a 10ª e 12ª continua a ocorrer a elevação menos acentuada, demonstrando uma desaceleração no aumento dos valores. A 12ª hora foi o ponto que apresentou a maior absorvidade média, atingindo o valor de 3,76 (figura 4).

Entre a 12ª e a 18ª hora, os valores médios demonstram uma diminuição decaindo de 3,76 (hora 12) para 2,96 (hora 18). No intervalo da 18ª a 24ª a absorvidade apresenta valores estáveis, sem as alterações observadas nas etapas anteriores.

No meio MPS1, observa-se uma absorvidade semelhante aos valores do meio referência em relação à hora inicial (0,090) e 2ª hora (0,060). A partir da 4ª hora constata-se um aumento, embora com valores inferiores aos obtidos no meio MR.

O aumento ocorre de maneira acentuada no intervalo compreendido entre a 4ª hora (0,22) e a 8ª hora (0,97). Após este período, os valores de absorvidade continuam elevando-se, mas de maneira mais suave até atingirem o valor médio máximo de 2,16 na hora 18. Os valores da 21ª e 24ª hora demonstram pouca alteração, indicando porém uma suave diminuição.

A absorvidade do meio MR apresenta grande alteração nos valores no decorrer da fermentação. O aumento nos valores está diretamente relacionado ao crescimento celular pois o meio, composto praticamente por material solúvel, não apresenta grande absorvidade no comprimento de onda utilizado.

Nas duas primeiras horas, a absorvidade permanece sem grande alteração, refletindo o fraco desenvolvimento da população bacteriana. A 4ª hora, porém, marca o início de um forte aumento nos valores, o qual relaciona-se diretamente com o crescimento celular, pois o valor de UFC passa de $1,34 \times 10^8$ para $2,03 \times 10^9$ neste intervalo (Apêndice 12). A manutenção dos valores, ocorrida entre a 10ª e 15ª hora, ocorre pela estabilização na população, que neste intervalo encerra o período de divisão celular e entra na fase estacionária.

A redução de absorvidade ao final ocorre pela esporulação celular pois a célula bacteriana forma o endósporo e ao liberá-lo no meio, gera um corpúsculo com um volume inferior ao da célula original. O esporo possui, portanto, menor capacidade de bloqueio do feixe luminoso levando à diminuição na absorvidade.

A absorvidade do meio MPS1 não apresenta o mesmo comportamento observado anteriormente. Neste caso, constata-se um aumento menos acentuado em relação ao meio MR seguindo-se então uma estabilização nos valores até o final da fermentação (figura 4).

Esta diferença ocorre porque o meio MPS1, ao contrário do meio MR, apresenta uma alta absorvidade devido à presença de partículas insolúveis em suspensão. Como esta absorvidade inicial é descontada, as primeiras horas de fermentação apresentam um comportamento com valores muito semelhantes aos do meio MR mas as posteriores indicam um aumento menos acentuado (figura 3).

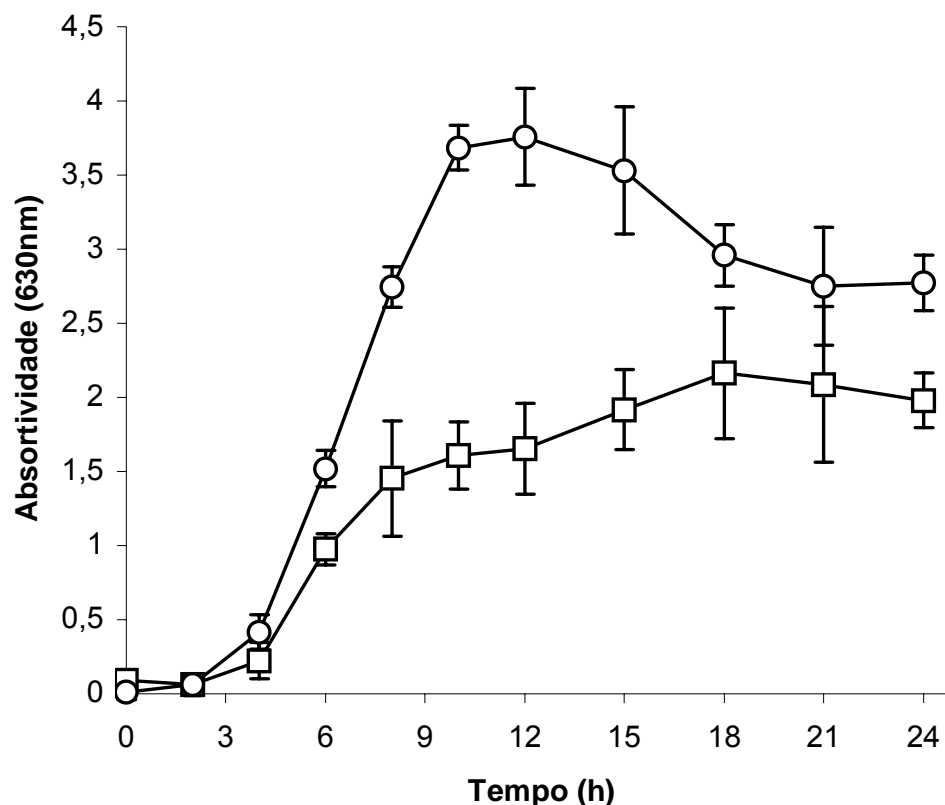


FIGURA 4: Curvas de absortividade em função do tempo de crescimento do *Bacillus cereus*. Cada ponto da curva de absorvância refere-se a média de valores de três ensaios realizados no mesmo meio e sob as mesmas condições de fermentação. meio MR (○); meio MPS1 (□).

Este comportamento deve-se ao fato de que no decorrer do processo a atividade enzimática aliada ao aquecimento e agitação causam uma solubilização dos constituintes do meio, com a conseqüente diminuição na absortividade. Assim, a queda nos valores devido a esta solubilização dificulta verificar o aumento devido ao crescimento celular

A alteração do meio MPS1 pode ser verificada inclusive pela mudança nas características do próprio sobrenadante obtido por centrifugação. No início da fermentação, este possui uma leve turbidez e apresenta uma coloração branca.

No decorrer do processo, a turbidez desaparece e a coloração se altera, obtendo-se após algumas horas um sobrenadante límpido e de cor âmbar clara.

Por esta característica, a utilização apenas da absortividade como parâmetro de crescimento por diversos autores (Johnvesly et al., 2001; Hanlon et al., 1981) geralmente é empregada em meios constituídos por nutrientes inteiramente solúveis nas condições dos ensaios.

5.4 Determinação de Massa Seca

A determinação da massa seca revelou para o meio MR a ocorrência de uma grande variação durante o bioprocessamento, com valores bastante reduzidos nas primeiras horas seguindo-se de um grande aumento e posterior estabilização. O meio MPS1, de modo oposto, apresentou valores iniciais relativamente altos, com um aumento bem menos pronunciado no decorrer do processo.

O meio MR apresentou, para a hora inicial e 2^a hora os valores médios de $0,16\text{gL}^{-1}$ e $0,29\text{gL}^{-1}$ respectivamente. A partir da 4^a hora, os valores de massa seca aumentam acentuadamente até a 8^a hora, alterando-se de $1,13\text{gL}^{-1}$ para $4,91\text{gL}^{-1}$. Após este ponto, o aumento continua a ocorrer de maneira mais suave. O valor médio máximo obtido é de $6,75\text{gL}^{-1}$, o qual é atingido na 15^a hora. Posteriormente, até o final da fermentação, houve uma estabilização da massa seca, não havendo alteração significativa em seus valores (figura 5).

O meio MPS1 apresentou valores iniciais elevados e estáveis, não havendo variação da hora inicial ($4,47\text{gL}^{-1}$) até a 4^a hora ($4,14\text{gL}^{-1}$). Durante o intervalo compreendido entre a 6^a e 10^a hora há elevação, alterando-se de $5,69\text{gL}^{-1}$

¹ para $7,46\text{gL}^{-1}$. A partir da hora 12 até o final do processo, ocorre a estabilização dos valores, obtendo-se na 24^a hora o valor de $6,54\text{gL}^{-1}$ (figura 5).

No meio MR a massa seca obtida refletiu diretamente o crescimento celular porque o meio de cultura, sendo formado apenas por constituintes solúveis, foi removido completamente após o segundo ciclo de centrifugação.

Nas duas horas iniciais, os valores permaneceram estáveis, demonstrando apenas um pequeno aumento na massa seca da células. Esta estabilidade, observada também na absorvidade, indica que o microrganismo encontra-se na fase lag do processo, o que pode ser comprovado pela contagem de células em placa.

A massa seca aumenta rapidamente a partir da 4^a hora, refletindo a entrada do microrganismo na fase logarítmica de crescimento, com conseqüente aumento no número de células. O aumento torna-se mais suave a partir da 8^a hora ($4,91\text{g/L}^{-1}$) devido à aproximação da fase estacionária do ciclo. A massa seca permanece estável a partir da 15^a hora, refletindo o término do crescimento celular.

Os valores de massa seca para o meio MPS1 apresentam comportamento um pouco diferenciado. Valores elevados podem ser observados desde o início da fermentação, seguido por um aumento devido ao crescimento celular. Entretanto, no decorrer de todo o experimento são verificados valores médios sempre superiores aos do meio MR (figura 5).

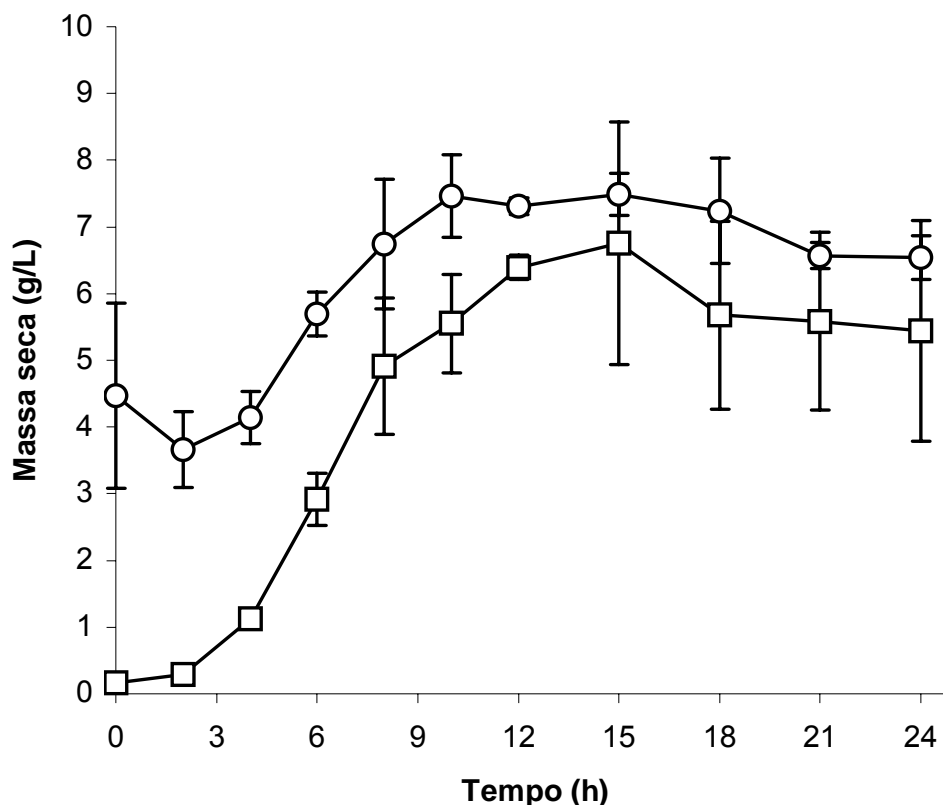


FIGURA 5: Curvas de massa seca em função do tempo de crescimento do *Bacillus cereus*. Cada ponto da curva de massa seca refere-se a média de valores de três ensaios realizados no mesmo meio e sob as mesmas condições de fermentação. meio MR (□); meio MPS1 (○).

Estes eventos ocorrem porque uma grande quantidade de material pouco solúvel no meio precipita durante a centrifugação e, assim, os compostos insolúveis do meio de cultura são responsáveis por praticamente toda a massa seca obtida nas quatro horas iniciais. O meio MR, de modo oposto, é composto praticamente por material solúvel e tem sua massa seca influenciada apenas pelo crescimento celular.

Estes valores elevados impedem até mesmo a constatação do início do crescimento celular, o qual é verificado na 4ª hora pela contagem de células em

placa. A massa seca, porém, só evidencia um sensível aumento a partir da 6ª hora de fermentação.

O aumento de massa seca entre a 6ª e a 10ª hora é devido ao crescimento celular, como pode ser verificado pela contagem de células. Porém, é inferior ao observado no meio MR, embora ambos possuam contagem de células com valores semelhantes.

Esta menor variação possivelmente deve-se à solubilização de parte do meio no decorrer da fermentação, conforme foi observado na determinação da absorvidade. Portanto, paralelamente ao aumento na massa celular ocorre diminuição na quantidade de massa precipitada do meio, tendo-se como resultado final um aumento de massa inferior.

As mudanças nas características do meio MPS1 também podem ser observadas diretamente na biomassa, após a remoção da água por secagem em estufa. A biomassa formada nas primeiras horas é composta exclusivamente por um precipitado branco, que adere fortemente às paredes dos tubos de microcentrífuga.

A biomassa obtida nas horas posteriores, por sua vez, demonstra a redução na quantidade deste material associada ao aumento de um segundo precipitado. Este mostra-se com uma coloração mais escura, mais compacto e menos aderente, sendo o mesmo atribuído à massa celular.

Assim, devido à co-precipitação do meio, a determinação de massa seca para o meio de proteína de soja oferece pouca informação a respeito do bioprocessamento. O acompanhamento do crescimento celular no meio MPS1 deve ser realizado, portanto, através da determinação das células viáveis totais.

Os valores obtidos com o meio MR, do contrário, permitem o acompanhamento dos eventos da fermentação com razoável segurança. Este mesmo comportamento foi constatado em relação aos dados fornecido pela absorvibilidade, onde apenas os dados obtidos do meio MR foram condizentes com os resultados de outras determinações.

5.5 Determinação de Proteína Solúvel

A determinação de proteína solúvel, realizada através do método de biureto, permitiu verificar a mesma tendência em ambos os meios. Eles demonstraram nas primeiras quatro horas do processo fermentativo uma concentração protéica estável. Após este período, inicia-se uma queda na concentração com posterior estabilização nas horas finais do processo.

O meio MR apresentou na hora inicial uma concentração protéica de $5,94\text{gL}^{-1}$. Este valor passou a oscilar nas horas seguintes da fermentação mostrando na 6ª hora uma concentração protéica de $5,67\text{gL}^{-1}$. A partir da 8ª hora, verifica-se neste meio o início da queda de proteína, que passa a apresentar uma concentração de $4,29\text{gL}^{-1}$. Na 10ª hora, a concentração protéica têm como valor médio $3,18\text{gL}^{-1}$. Este valor estabiliza-se até o final da fermentação, não se verificando diminuição até a 24ª hora, quando apresenta uma concentração final de $2,28\text{gL}^{-1}$ (figura 6).

O meio MPS1 apresenta estabilidade nas primeiras quatro horas de fermentação, com uma concentração de $14,61\text{gL}^{-1}$ para a hora inicial e $14,05\text{gL}^{-1}$ para a 4ª hora. Na 6ª hora ocorre uma queda acentuada na proteína, a qual apresenta uma concentração de $10,53\text{gL}^{-1}$. A hora 8 indica ainda uma queda na

concentração, com um valor de $8,88\text{gL}^{-1}$. Entretanto, após este ponto, verifica-se a estabilização dos valores de proteína solúvel, que permanece estável até a finalização da fermentação encontrando-se, na 24^a hora, um valor de $7,46\text{gL}^{-1}$ (figura 6).

No meio MR, a estabilidade da concentração protéica nas seis horas iniciais decorrem das características do próprio meio. Nas duas primeiras horas, há apenas um fraco desenvolvimento celular, conforme indicam a contagem de células, densidade ótica e massa seca.

Na 4^a hora verifica-se o início do crescimento celular, mas a queda de pH indica a metabolização de glicose e não de peptídeos. Apenas a partir da 6^a hora verifica-se o começo da elevação de pH e de atividade proteolítica, como consequência do consumo protéico.

O não-decréscimo nos valores de proteína solúvel verificado após a 10^a hora ocorre devido à estabilização do crescimento celular (figura 9) e redução no metabolismo protéico. Nas horas posteriores, o processo de esporulação também pode influenciar a determinação devido à liberação de proteínas no meio de cultura.

O meio MPS1, de modo semelhante, apresenta valores de concentração de proteína estáveis nas horas iniciais. Porém, na 4^a hora, com o início do crescimento celular, verifica-se o deslocamento do pH para valores mais altos, o que indica a metabolização de proteínas. A queda na concentração, entretanto, passa a ser constatada a partir da 6^a hora de fermentação (figura 6).

É possível verificar que no meio MPS1 os valores médios apresentam redução a partir da 6ª hora, enquanto que o mesmo processo é constatado no meio MR apenas a partir da 8ª hora. Nas horas posteriores, porém, ambos os meios apresentam estabilização na concentração protéica.

A atividade enzimática mais elevada verificada com proteína de soja condiz com os resultados obtidos por Banerjee et al. (1999) em comparação a meios com peptonas, mas vai de encontro aos valores obtidos por Beg et al. (2002).

A indução enzimática por constituintes do meio parece necessitar da presença de aminoácidos e peptídeos livres (Wandersman *apud* Ellouz et al. 2001). Este poder indutor foi verificado por Beg et al. (2002) através da adição de casaminoácidos após a entrada na fase estacionária.

A adição de ácido tricloroacético (TCA) ao meio MR com formação de pouco precipitado (dados não demonstrados) indicam que a fonte protéica utilizada no meio é bastante hidrolizada, sendo constituída em sua maior parte por aminoácidos e peptídeos que mantêm-se solúveis sob alta concentração de ácido. O meio MPS1 também apresenta hidrólise, mas em menor extensão (conforme o mesmo experimento permitiu verificar).

Conforme demonstrado por Beg et al. (2002) o substrato protéico não é o único fator a influenciar a produção de enzimas. Este autor constatou, ao adicionar casaminoácidos no meio e ao final da fase log que o período no qual a cultura recebe complementação é crucial na produção enzimática.

Os experimentos realizados, porém, apresentaram a totalidade do substrato protéico presente desde o início das fermentações ao invés de sua

introdução no final da fase estacionária. Foi verificado que o meio MR apresentou atividade enzimática inferior ao meio MPS1 apesar do primeiro possuir um maior conteúdo hidrolisado.. Isto demonstra que a síntese de protease está submetida a outros mecanismos de regulação além da simples presença de substatos.

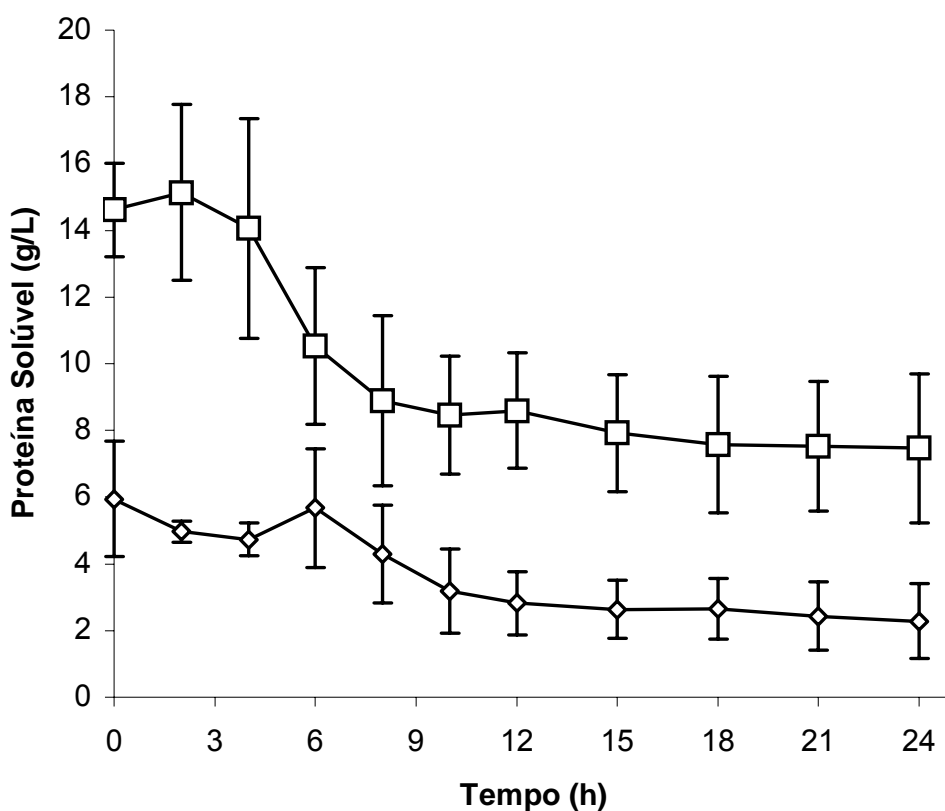


FIGURA 6: Curvas de proteína solúvel em função do tempo de crescimento do *Bacillus cereus*. Cada ponto da curva curva de proteína solúvel refere-se a média de valores de três ensaios realizados no mesmo meio e sob as mesmas condições de fermentação. meio MR (○); meio MPS1 (□).

5.6 Determinação de Açúcar Redutor

Os meios apresentaram diferentes comportamentos em relação à concentração de açúcar redutor. No meio MR foi constatado a rápida queda na concentração de glicose, enquanto o meio MPS1 apresentou uma concentração constante no decorrer de toda a fermentação.

No meio MR constata-se nas horas iniciais uma manutenção nos valores de açúcar redutor, com $2,46\text{g.L}^{-1}$ e $2,37\text{g.L}^{-1}$ para hora inicial e 2ª hora, respectivamente. A partir da 4ª hora pode-se observar o início da queda, o qual ocorre pelo metabolismo da glicose e tem como consequência direta a queda de pH.

A redução continua a ocorrer rapidamente, verificando-se que a partir da 8ª hora a concentração de glicose é extremamente baixa ($0,13\text{g.L}^{-1}$). As horas posteriores da fermentação demonstram que o substrato foi completamente consumido (figura 7).

O efeito de fontes de carbono é um dos fatores mais estudados com os ensaios realizados apresentando resultados contraditórios em relação a esta influência. O efeito inibidor de glicose sobre a atividade enzimática parece estar relacionado à inibição de sua síntese e não sobre a atividade da enzima propriamente dita, pois os ensaios conduzidos em agitador orbital empregam excesso de nutrientes (Kanekar et al. 2002; Joo e tal., 2002). Este excesso inibiria a síntese de proteases porque o mecanismo de esporulação é suprimido sob condições favoráveis de crescimento (He et al., 1995).

O meio MPS1 demonstra valores praticamente constantes durante todo o bioprocessamento, obtendo-se $3,14\text{g.L}^{-1}$ para a hora inicial e $2,85\text{g.L}^{-1}$ para a 24ª hora

(figura 7). Estes valores de açúcar redutor são inferiores à concentração teórica adicionada ao meio ($7,1\text{g.L}^{-1}$), conforme tabela 4.

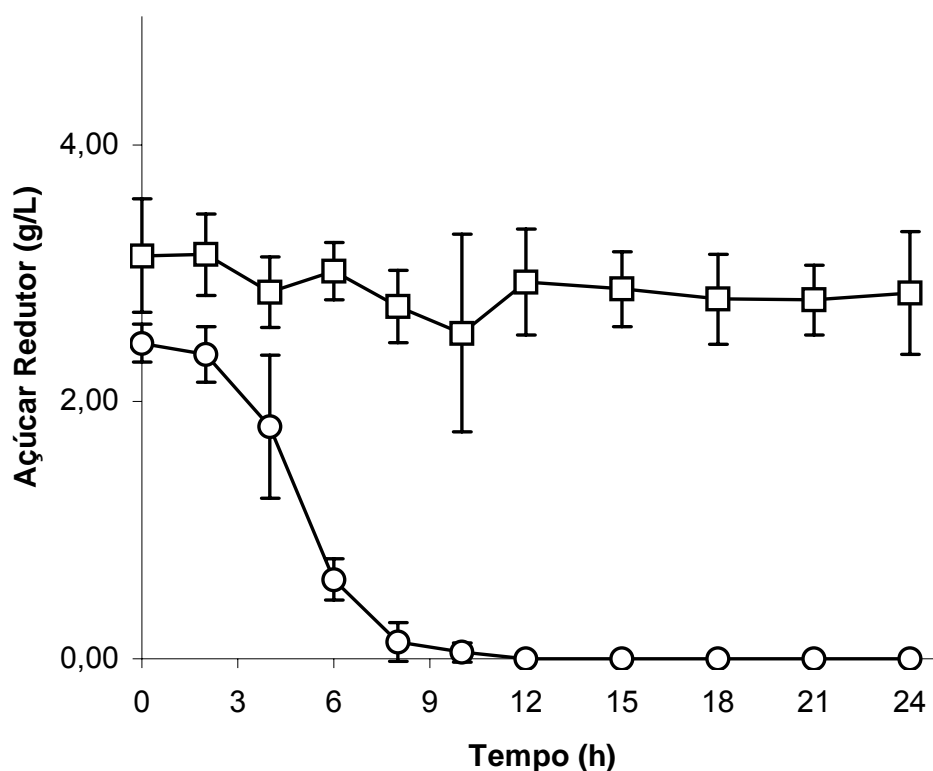


FIGURA 7: Curvas de açúcar redutor total em função do tempo de crescimento do *Bacillus cereus*. Cada ponto da curva curva de proteína solúvel refere-se a média de valores de três ensaios realizados no mesmo meio e sob as mesmas condições de fermentação. meio MR (○); meio MPS1 (□).

Os valores para meio MPS1 indicaram a presença de açúcar redutor no decorrer de todo o experimento com concentração constante. Não é possível verificar o consumo do substrato durante o processo porque a determinação foi realizada sem a hidrólise do carboidrato.

Isto ocorre porque no amido presente no meio MPS1 apenas as moléculas de glicose das extremidades do polímero são oxidadas pelo reagente DNS. As demais moléculas têm o grupo funcional responsável pela reação ligado à molécula seguinte não sendo, portanto, detectadas. A liberação destas moléculas deve ser realizada antes do doseamento mediante a hidrólise do amido em meio ácido.

A queda do pH durante o processo, que é um indicador de metabolismo de carboidratos, não foi verificada. Estudos realizados por Mitidieri (1998) em meio composto por proteína de soja PS60[®], entretanto, constataram a acidificação do meio de cultura assim como o completo consumo dos carboidratos nas primeiras horas de fermentação.

É importante realizar a determinação de carboidratos no meio MPS1 porque sua presença pode influenciar de maneira positiva a atividade enzimática conforme indicam estudos realizados sobre o extrato de cultura. Merjri et al. (2001) constatou aumento de atividade da termolisina na presença de açúcares como glicose e sacarose enquanto Chu et al. (1992) verificou um efeito protetor do amido em relação a extratos armazenados sem o carboidrato.

5.7 Determinação da Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica, determinada pela medida da hidrólise da azocaseína em caseína a 400nm, foi semelhante para ambos os meios. Tanto o meio MR como o meio MPS1 apresentaram atividade enzimática, mas em praticamente todo o bioprocessamento, esta foi mais intensa no meio contendo a proteína de soja.

A determinação das unidades enzimáticas considerou como uma unidade a quantidade de enzima presente em 1mL de amostra necessária para promover uma absorção equivalente a 1,0 durante uma hora de atividade (Mitidieri et al, 2002). Como o tempo de incubação foi de 15 minutos (0,25 horas) e o volume de amostra foi de 100 μ L (0,1mL), a seguinte fórmula foi utilizada para a conversão onde \bar{A} corresponde à absorvância média da triplicata:

$$\text{Atividade Proteolítica} = \bar{A} \times 4 \text{h}^{-1} \times 10 \text{mL}^{-1}$$

O meio MR não apresenta na hora inicial indícios de ação proteolítica. Porém, a partir da 2ª hora, é possível verificar o surgimento de uma fraca atividade (0,42 U.mL⁻¹.h⁻¹), sendo que a mesma se mantém estável até a 4ª hora (0,41 U.mL⁻¹.h⁻¹). A partir da 6ª hora, verifica-se uma maior atividade proteolítica (2,22 U.mL⁻¹.h⁻¹), que passa a subir gradualmente até estabilizar-se em doze horas com 9,29 U.mL⁻¹.h⁻¹. A atividade mantém-se estável atingindo valor máximo na 15ª hora (11,82 U.mL⁻¹.h⁻¹), passando em seguida por uma suave queda até o final do processo, que encerra-se com uma atividade final de 9,56 U.mL⁻¹.h⁻¹ (figura 8).

O meio MPS1, de maneira semelhante, não demonstra qualquer indício de atividade enzimática durante a hora inicial. Na 2ª hora, a atividade passa a ser detectada, ainda que relativamente baixa (0,80 U.mL⁻¹.h⁻¹) Na hora 4 há um forte aumento em comparação ao intervalo anterior (2,03 U.mL⁻¹.h⁻¹). A partir deste ponto, a atividade enzimática passa a aumentar gradualmente até começar a estabilizar-se na 12ª hora, com 15,37 U.mL⁻¹.h⁻¹.

Após apresentar um pico de $18,67 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na 15ª hora, a atividade no meio MPS1 permanece estável até a 18ª hora, com $14,53 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Nas horas finais de fermentação, verificou-se uma diminuição na atividade, com queda para $12,92 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $10,98 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$, nas 21ª e 24ª hora, respectivamente (figura 8). Apesar de ambos os meios apresentarem valor máximo na 15ª hora, a atividade neste ponto é significativamente superior no meio MPS1 ($\alpha=0,05$).

A atividade enzimática passa a aumentar sensivelmente na 6ª hora ($2,22 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$), o que leva diretamente ao aumento no pH do meio, que passa de 6,36 (4ª hora) para 6,64. A partir deste ponto, verifica-se que a atividade passa a elevar-se rapidamente, simultaneamente ao aumento no número de células, conforme verifica-se na contagem de células em placa.

A estabilização na produção de proteases ocorre na 12ª hora, juntamente com o advento da fase estacionária. Paralelamente, verifica-se o sistemático aumento no pH do meio, como resultado da alcalinização promovida pela amônia formada durante a metabolização protéica. A diminuição na concentração protéica, observada na 8ª hora, também é consequência da ação hidrolítica das proteases sobre os peptídeos.

O meio MPS1 demonstra a mesma tendência do meio MR, com o aumento da atividade proteolítica ocorrendo paralelamente ao aumento no número de células. A entrada na fase estacionária leva à estabilização da atividade

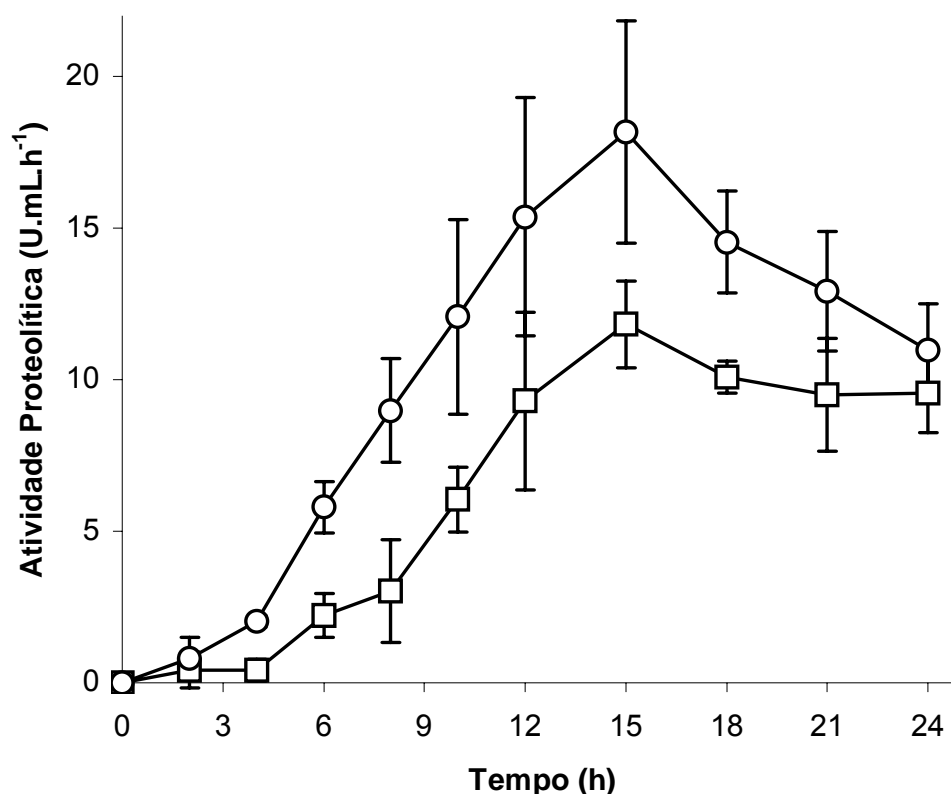


FIGURA 8: Curvas de atividade proteolítica em função do tempo de crescimento do *Bacillus cereus*. Cada ponto da curva de atividade proteolítica refere-se à média de valores de três ensaios realizados no mesmo meio e sob as mesmas condições de fermentação: meio MR (□); meio MPS1 (○).

Porém, no meio MPS1 verifica-se um pequeno aumento de pH e atividade enzimática na 4^a hora de fermentação, ou seja, duas horas antes em relação ao meio MR. Esta antecipação ocorre também em relação à concentração de proteína, pois na 6^a hora já é possível verificar a queda em seus valores.

Os valores de atividade obtidos em ambos os meios são inferiores aos relatados na literatura. As atividades determinadas por Çalik et al. (2003), Beg, et al. (2002) e Johnvesly et al. (2001) são superiores a 400U.mL⁻¹. Estes autores

utilizaram caseína como substrato impedindo uma comparação direta dos valores, a qual poderia ser realizada mediante a condução dos ensaios sob os mesmos parâmetros. Mesmo a utilização de azocaseína sob diferentes condições pode produzir dados de difícil comparação como, por exemplo, Banerjee et al. (1999) que obteve valores de atividade superiores 2000U.mL^{-1} .

O perfil da atividade enzimática após o pico ser atingido foi semelhante aos obtidos por Mehrotra et al. (1999), Putten et al. (1995) e Chu et al. (1992), onde constata-se a queda nos valores de atividade. Outros autores (Gessesse et al, 1997; Hanlon et al., 1981), de maneira oposta, verificaram uma estabilidade nestes valores.

Banerjee et al. (1999) relatam que determinados constituintes do meio de cultura como acetato de sódio e cloreto de cálcio podem estabilizar as enzimas diminuindo a autólise. A menor queda de atividade observada no meio MR poderia em parte ser atribuída a este efeito mas apesar de ensaios com meios com fosfato de potássio também apresentarem maior atividade enzimática (Joo et al., 2002; Banerjee et al., 1999), não está esclarecido pelos autores se esta deve-se à estabilização enzimática ou por aprimoramento das condições de produção.

Beg et al. (2003), ao contrário, comprovaram que amido e outros açúcares como sacarose e manitol aumentam a meia-vida de proteases sob aquecimento. Entretanto, apesar dos carboidratos em sua composição o meio MPS1 apresentou uma queda de atividade enzimática superior à queda no meio MR, que consumiu completamente a glicose nas primeiras hora de fermentação.

A queda de atividade foi atribuída à autólise por Putten et al. (1995) enquanto Chu et al. (1992) avaliou a influência de células. Os dados deste

segundo autor demonstraram a estabilização da atividade em valores muito próximos apesar da velocidade de queda ser aparentemente maior para extratos enzimáticos armazenados com células mais antigas.

Esta característica pode indicar, indiretamente, a influência de componentes liberados durante o processo de esporulação, pois nas fermentações realizadas observou-se que a queda na atividade enzimática foi mais acentuada para o meio MPS1, que apresentou tanto um maior número de esporos como uma antecipação em relação ao meio MR.

Os valores finais de atividade dos meios MR e MPS1 foram bastante semelhantes, fato que também foi observado nos resultados obtidos por Çalik et al. (2003). Este autor, ao realizar fermentações sob diversos valores de pH com e sem controle, constatou a estabilização da atividade em valores bastante próximos apesar dos diferentes perfis de atividade verificados no decorrer dos experimentos.

5.8 Determinação do Número de Células Viáveis Totais e de Esporos Viáveis

Na determinação do número de células viáveis totais o Meio MR apresentou na hora inicial $5,93 \times 10^6 \text{ UFCmL}^{-1}$ sendo verificada pouca alteração até a 2ª hora de fermentação ($2,30 \times 10^7 \text{ UFCmL}^{-1}$). Entretanto, a partir da 4ª hora, o crescimento passa a ser evidenciado pelo aumento no número de células, com um incremento para $2,20 \times 10^8 \text{ UFCmL}^{-1}$ (Apêndice 12).

No intervalo compreendido entre a 6ª e 12ª hora, ocorre intenso crescimento celular, com um aumento de $8,51 \times 10^8 \text{ UFCmL}^{-1}$ a $3,68 \times 10^9 \text{ UFCmL}^{-1}$.

Após este intervalo, há estabilização no crescimento, o qual mantém-se estável até a 24^a hora ($1,19 \times 10^9$ UFCmL⁻¹).

O número de esporos no meio referência inicia-se com $7,94 \times 10^2$ UFCmL⁻¹, saltando para $1,65 \times 10^4$ UFCmL⁻¹ na 2^a hora. No intervalo entre a 2^a e 12^a hora, a esporulação mantém-se estável, apresentando suaves oscilações. Entre a 15^a e a 18^a hora, entretanto, verifica-se um rápido aumento na esporulação, com um salto de $3,30 \times 10^4$ UFCmL⁻¹ para $4,37 \times 10^6$ UFCmL⁻¹, respectivamente (Apêndice 12). No intervalo posterior, os valores permanecem estáveis até o final da fermentação.

No meio MPS1, o número de células viáveis totais na hora inicial é de $7,82 \times 10^6$. Este valor pouco altera-se na 2^a hora, a qual apresenta $2,50 \times 10^7$ UFCmL. Na 4^a hora, pode-se verificar o rápido aumento no número de células, o qual salta para $9,64 \times 10^8$ UFCmL⁻¹. O crescimento celular mantém-se intenso na hora seis, passando a reduzir o crescimento na 8^a hora. A partir deste ponto, os valores permanecem estáveis até o final da fermentação, obtendo-se um valor máximo na 12^a hora, com $1,97 \times 10^9$ UFCmL⁻¹.

O número de esporos para o meio MPS1 iniciou-se em $1,66 \times 10^3$ UFCmL⁻¹. Os valores permanecem estáveis até a 12^a hora. Porém, no intervalo posterior, observa-se um forte aumento na esporulação, com valores de $1,95 \times 10^5$ UFCmL⁻¹ e $6,12 \times 10^7$ UFCmL⁻¹ para a 12 e a 15^a hora, respectivamente. Estes valores mantêm-se estáveis e elevados até o final da fermentação, obtendo-se na 24^a hora $4,70 \times 10^7$ UFCmL⁻¹ para esporos (figura 9).

Ambos os meios empregados apresentaram crescimento semelhantes. No meio referência, porém, verifica-se que os parâmetros observados (massa

seca, absorvidade) sofrem influência direta dos crescimento celular, conforme foi discutido anteriormente.

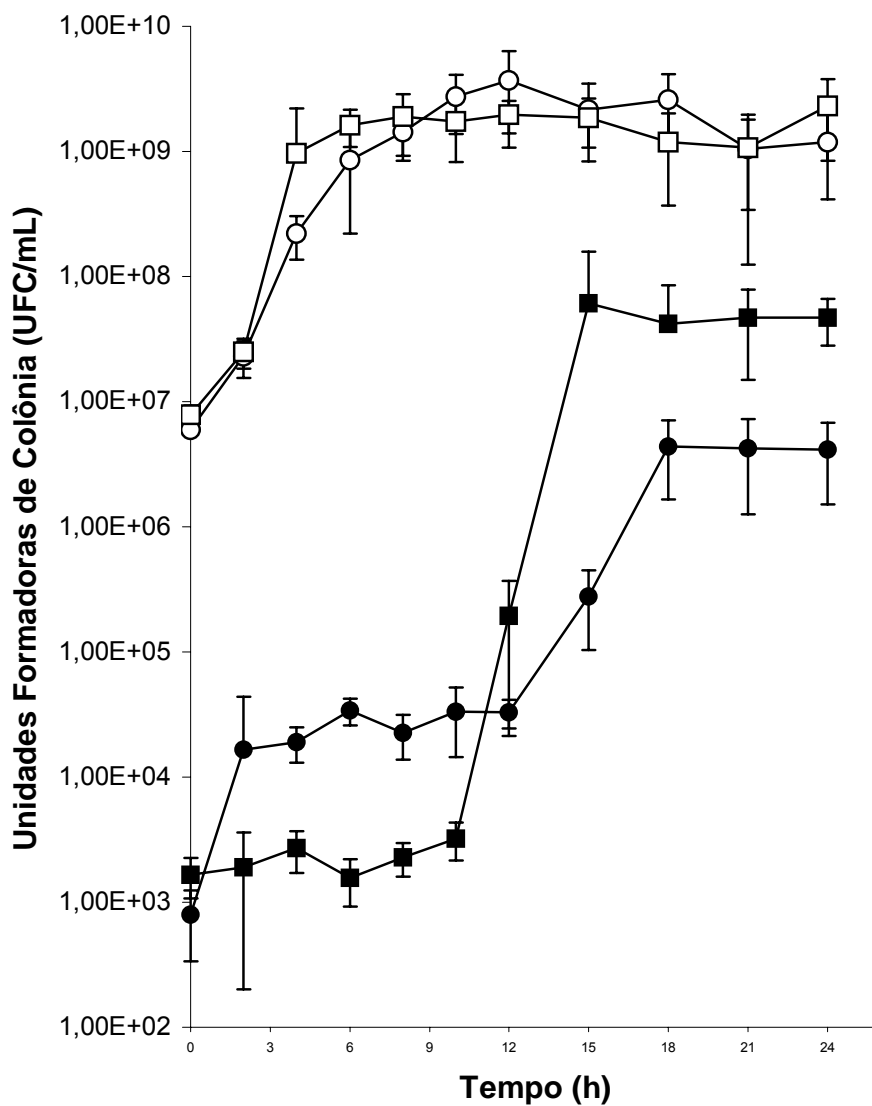


FIGURA 9: Curvas de células viáveis totais (CVT) e esporos em função do tempo de crescimento do *Bacillus cereus*. Cada ponto da curva de crescimento refere-se a média de valores de três ensaios (cada ensaio com n=10) realizados no mesmo meio e sob as mesmas condições de fermentação. meio MR: CVT(○), esporos (●); meio MPS1: CVT (□), esporos (■).

A atividade enzimática verificada está diretamente relacionada com o desenvolvimento celular. Nas horas iniciais das fermentações do meio MR, a atividade é nula ou praticamente inexistente. No entanto, pode-se observar que a 4ª hora apresenta aumento nos valores de UFC enquanto que a atividade só passa a aumentar a partir da 6ª hora.

Isto ocorre em razão do meio em questão apresentar glicose em sua composição. Conforme discutido anteriormente e observado nos próprios valores de pH, nas horas iniciais a utilização de glicose possivelmente inibe a metabolização de proteína, fato que reflete-se diretamente na baixa atividade enzimática, apesar de ocorrer crescimento celular.

No decorrer do restante do processo, o crescimento celular no MR é acompanhado pelo aumento na atividade proteolítica. A entrada na fase estacionária leva à estabilização e posterior queda na síntese de enzimas, conforme observa-se na figura 8.

O meio MPS1 apresenta crescimento semelhante o qual não é tão nítido quando observado a partir dos valores de massa seca e absorvidade. Neste meio, a relação entre crescimento celular e atividade enzimática é ainda mais visível, pois o aumento de unidades formadoras de colônias verificado na 4ª hora foi imediatamente acompanhado por aumento na atividade proteolítica.

A produção enzimática verificada em ambos os meios apresentou um perfil diferente daquele constatado em diversos outros trabalhos. Estudos realizados por Çalik et al. (2003), Çalik et al. (2002), Beg et al. (2002) e Gessesse et al. (1997) demonstram que na fase logartítmica a atividade enzimática está

ausente ou é relativamente baixa. O aumento da produção nestes trabalhos foi constatado ou no final da fase log ou no decorrer da fase estacionária.

Os meios MR e MPS1, porem, demonstram que o aumento da atividade enzimática ocorre desde o início da fase logarítmica e se mantém apenas por um curto período após o fim do crescimento, atingindo valores máximos em 15 horas. Este perfil também foi verificado por Mehrotra et al. (1999).

O forte crescimento celular observado em ambos os meios indicam que as condições nutricionais foram favoráveis para o bacilo. A atividade enzimática determinada no meio MPS1 foi superior à do meio MR assim como o índice de esporulação. Segundo He et al (1991), a síntese de proteases está vinculada à desrepressão do mecanismo de esporulação.

A realização das fermentações com a quantidade total de nutrientes desde o início do bioprocessamento pode não ter propiciado condições de cultura que estimulasse a produção de enzimas. Ensaio conduzido por Beg et al. (2002) demonstraram claramente que o fornecimento de nutrientes (glicose e casaminoácidos) durante a fase estacionária ocasionaram o aumento da atividade proteolítica.

Deve-se salientar que o crescimento celular obtido não é um fator indesejável, pois o mesmo está diretamente relacionado com a quantidade de enzima produzida. Conforme demonstrado por Johnvesly et al. (2001) a produção de enzimas foi afetada pelas fontes de carbono, nitrogênio e pH sendo diretamente proporcional ao crescimento celular.

A otimização da produção deve ser obtida através da redução do crescimento celular sob condições que permitam a formação de células em

número razoável. Às células presentes devem então ser apresentadas condições que favoreçam a síntese de enzimas proteolíticas.

5.9. Tratamento do Complexo Proteolítico

A precipitação fracionada com cloreto de amônio levou à remoção de 75% da enzima na 1ª fração. A fração correspondente a 3ª precipitação (fração III) reteve 24,5% da atividade e apresentou a maior atividade específica sendo por isto destinada à coluna de Q Sepharose®.

Na 4ª fração, apesar de ocorrer precipitação proteica, não foi detectada qualquer atividade enzimática. Na 5ª e última fração de precipitação, foi novamente detectada atividade, a qual correspondeu a 7% do total.

A fração III foi submetida à coluna de Q Sepharose® sendo seus resultados apresentados na figura 10. A maior parte da atividade enzimática foi detectada na porção da coluna anterior ao início do gradiente de cloreto de sódio. A proteína, ao contrário, permaneceu praticamente retida e foi liberada após o início do gradiente.

As frações iniciais da coluna de Q Sepharose® foram reunidas e aplicadas a uma coluna de SP Sepharose®, sendo seu resultado observado na figura 11. Nesta segunda coluna, parte da atividade enzimática foi obtida antes do início do gradiente de cloreto de sódio assim como parte da proteína.

Nas frações posteriores, a enzima foi detectada no decorrer do aumento do gradiente, sendo interrompida por frações com ausência de atividade proteolítica. O restante da proteína, de modo semelhante, foi liberada com o

aumento do gradiente, sendo interrompida por intervalos onde sua presença não foi detectada (figura 10).

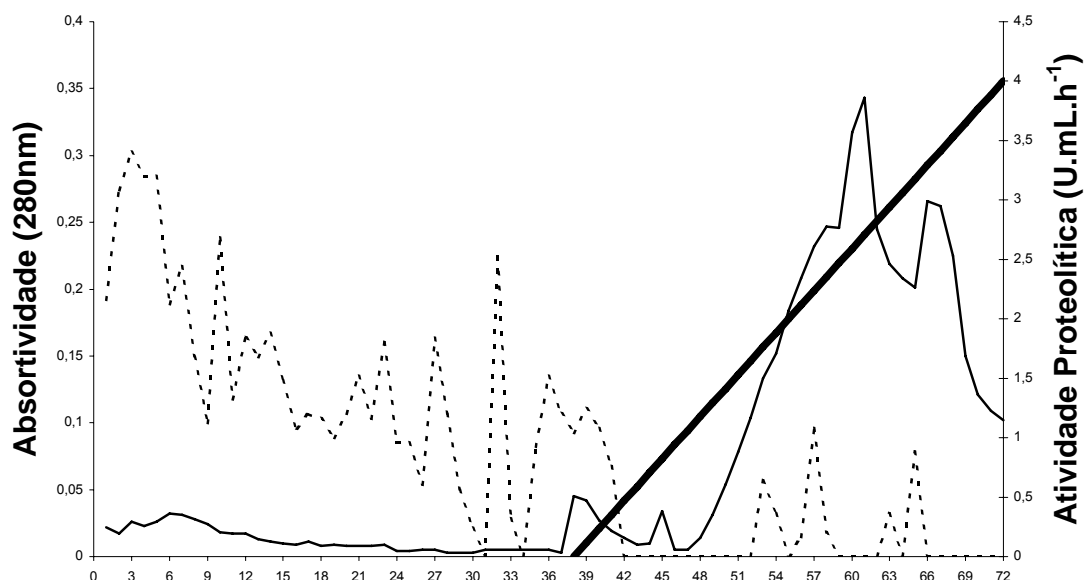


FIGURA 10: Gráfico de purificação em coluna de Q Sepharose[®] do extrato proteolítico dialisado do *Bacillus cereus* em meio MPS1. Concentração protéica em A280 (—); atividade proteolítica (---); gradiente de NaCl (—).

A atividade enzimática foi detectada no decorrer de ambas as colunas, mas não de modo uniforme. Na coluna de Q Sepharose[®], embora sua maior parte tenha sido liberada na etapa inicial, é possível detectar atividades posteriores entre as 53^a e 66^a fração (figura 10).

Na coluna de SP Sepharose[®] também há liberação de enzima na etapa inicial e após o início do gradiente. A enzima detectada entre a 37^a e 62^a fração foi irregular, sendo obtido alguns picos seguidos por frações com queda e ausência completa de atividade (figura 11). Este comportamento pode ser consequência da baixa atividade enzimática determinada. Para verificar a atividade nestas frações,

o tempo de incubação deve ser aumentado a fim de permitir que a enzima atue por um período superior sobre a azocaseína.

A presença de substrato do meio MPS1 prejudicou o processo de purificação devido a co-precipitação de grande parte do conteúdo enzimático com a matéria-prima durante a fração I. O meio MPS1 também apresenta índice de esporulação superior ao do meio MR. A liberação de componentes celulares internos durante este processo pode levar também à presença de proteases que normalmente estariam retidas no interior da célula bacteriana. Para *B. subtilis* são reconhecidas até o momento seis proteases, sendo que destas duas são intracelulares (He et al., 1991).

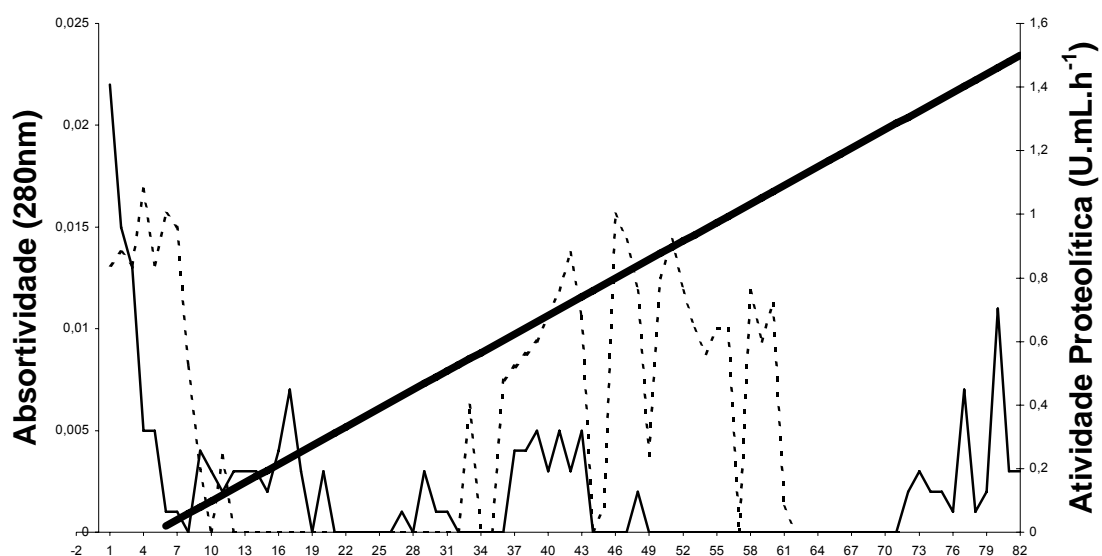


FIGURA 11: Gráfico de purificação em coluna de SP Sepharose® do extrato proteolítico dialisado do *Bacillus cereus* em meio MPS1. Concentração proteica em A280 (—); atividade proteolítica (---); gradiente de NaCl (—).

5.10 Avaliação do Crescimento, Esporulação e Produção

Os dados obtidos do crescimento do *Bacillus cereus* demonstram que o tempo médio de geração calculado a partir da contagem de células viáveis totais foi inferior no meio MPS1 com valor de 57,8 minutos enquanto que no meio MR obteve-se 81,94 minutos. Em relação à velocidade específica de crescimento, verifica-se para o meio MR $0,51\text{h}^{-1}$ enquanto que o meio MPS1 o valor observado é de $0,72\text{h}^{-1}$ (apêndice 18).

Através dos valores de produtividade em relação à atividade enzimática constata-se que o meio MPS1 é superior em comparação ao meio MR, apresentando valor de $1,24\text{U.mL.h}^{-1}$ contra $0,79\text{U.mL.h}^{-1}$ do meio MR. Em termos de células viáveis totais a produtividade em ambos os meios é semelhante com valores de $1,24 \times 10^8 \text{UFC.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o meio MPS1 e de $1,44 \times 10^8 \text{UFC.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para o meio MR. De modo oposto, quando calculada a partir dos valores de esporos viáveis totais o meio MPS1 é muito superior, obtendo-se $4,08 \times 10^6 \text{UFC.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ enquanto que para o meio MR obtém-se $1,84 \times 10^4 \text{UFC.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (apêndice 18).

O cálculo de produtividade em relação à massa seca apresenta valores bastante próximos entre os meios, sendo de $0,50\text{mg.mL.h}^{-1}$ para o meio MPS1 e de $0,45\text{mg.mL.h}^{-1}$ para o meio MR. Porém, apesar deste resultado estar condizente com o obtido através da contagem de células viáveis totais, deve-se considerar que as características do meio MPS1, formado por material pouco solúvel, podem comprometer este dado.

Em relação ao rendimento, os dados indicam a superioridade do meio MR quanto à massa seca ($2,04\text{g.L}^{-1}$), atividade enzimática ($3,58\text{U.mL}^{-1}.\text{g}^{-1}$) e

células viáveis totais ($6,54 \times 10^8 \text{ U.F.C.g}^{-1}$) em relação aos valores de $1,12 \text{ g.L}^{-1}$ (massa seca), $2,80 \text{ U.mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (atividade enzimática) e de $2,79 \times 10^8 \text{ U.F.C.g}^{-1}$ (células viáveis totais) do meio MPS1 (apêndice 18). O meio MR apresenta rendimento inferior ao meio MPS1 apenas quanto à formação de esporos onde observa-se $8,39 \times 10^4 \text{ U.F.C.g}^{-1}$ (meio MR) e $9,17 \times 10^6 \text{ U.F.C.g}^{-1}$ (meio MPS1).

Como a determinação do rendimento foi realizada considerando a proteína consumida, a avaliação foi comprometida devido à dificuldade de doseamento através do método do biureto da proteína do meio MR, a qual é altamente hidrolisada. Esta característica pode ocasionar distorções na avaliação de rendimento para o meio MR, pois o cálculo pode estar sendo realizado com dados subestimados de consumo protéico.

Pelo mesma razão, a determinação de eficiência das fermentações é comprometida. Embora os dados do meio MR (55,5%) e do meio MPS1 (45,7%) indiquem, aparentemente, a superioridade do meio MR, este pode estar tendo sua eficiência superestimada devido à determinação de proteína.

6. CONCLUSÕES

1. Os meios de cultura utilizados no biorreator, MR e MPS1, proporcionaram condições nutricionais adequadas para o desenvolvimento de *Bacillus cereus*, com crescimento celular semelhante.

2. O meio MPS1 propiciou maior atividade enzimática produzindo um extrato com atividade 60% superior ao do meio MR.

3. Em ambos os meios de cultura utilizados verificou-se a produção de complexo de enzimas proteolíticas, obtendo-se a máxima atividade enzimática na 15ª hora.

PERSPECTIVAS DE PESQUISA

1. Estabelecer parâmetros de cultura mais adequados à produção de complexos proteolíticos.
2. Avaliar a influência do fracionamento no fornecimento de substrato protéico de ambos os meios sobre a produção de enzimas.
3. Estabelecer condições nutricionais diferenciadas para a fase de crescimento e estacionária de *B. cereus*.
4. Selecionar e utilizar metodologias com maior rapidez que permitam o imediato acompanhamento das taxas de consumo dos substratos.
5. Realizar o isolamento e caracterização da(s) enzima(s) proteolítica(s) do *B. cereus* a partir de extratos obtidos do Meio MR.

7. REFERÊNCIAS

ANDERSSON, M. A.; MIKKOTA, R.; HELIN, R. A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.1338-1343, 1998.

AGATA, N.; OHTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.73, p.23-27, 2002.

ARAN, N. The effect of calcium and sodium lactates on growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in a 'sous-vide' beef goulash under temperature abuse. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.63, p.117-123, 2001.

ASANO, Y.; ITO, H.; DAIRI, T.; KATO, Y. An alkaline D-stereospecific endopeptidase with beta-lactamase activity from *Bacillus cereus*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, n.47, p.30256-30262, 1996.

BANERJEE, U. C.; SANI, R. K.; AZMI, W. et al. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, Oxford, v.35, p.213-219, 1999.

BAUM, B.; TENORIO, E. M.; ENSS, M. L. et al. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *Toyoii* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. **Gastroenterology**, Almere, v.5, n.40, p.277-284, 2002.

BEG, Q. K.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. **Process Biochemistry**, Oxford, v.37, p.1103-1109, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.

BUNGE ALIMENTOS. **Samprosoy 90**: Produtos Cárnicos Processados. Esteio, 2001. 8p.

ÇALIK, P.; BILIR, E.; ÇALIK, G. et al. Influence of pH conditions on metabolic in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.31, p.685-697, 2002.

ÇALIK, P.; BILIR, E.; ÇALIK, G. et al. Bioreactor operation parameters as tools for metabolic regulations in fermentation process: influence of pH conditions. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v.58, p.759-766, 2003.

CHOMA, C.; GRANUM, P. E. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.217, p.115-119, 2002.

CHRISTIANSEN, T.; NIELSEN, J. Production of extracellular protease and glucose uptake in *Bacillus clausii* in steady-state and transient continuous cultures. **Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.97, p.265-273, 2002.

CHU, I. M.; LEE, C.; LI, T. S. Production and degradation of alkaline protease in batch of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v.14, p.755-761, 1992

COUVERT, O.; LEGUERINEL, I.; MAFART, P. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.49, p.57-62, 1999.

ELLOUZ, Y.; BAYOUDH, A.; KAMMOUN, S. et al. Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.80, p.49-51, 2001.

ESPADA, M.; AVENDAÑO, C. Inhibidores enzimáticos II: Inhibidores enzimáticos como farmacodinámicos. In AVENDAÑO, C.(ed.). **Introducción a la Química Farmacéutica**. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, 1997. p.278-282.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FEDER, J.; KEAY, L.; GARRET, R. et al. *Bacillus cereus* neutral protease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, Amsterdam, v.251, n.26, p.74-78, 1971.

FERMANIAN, F.; LAPEYRE, C.; FRÉMY, J. C. et al. Production of diarrheal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.30, p.345-358, 1996.

FINLAY, W. J.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D. *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. **Food Microbiology**, London, v.19, p.423-430, 2002.

FRICKE, B.; DRÖBLER, K.; WILLHARDT, I. et al. The cell envelope-bound metalloprotease (camelysin) from *Bacillus cereus* is a possible pathogenic factor. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1537, p.132-146, 2001.

GESSESSE, A.; HATTI-KAUL, R.; GASHE, B. A. et al. Novel alkaline proteases from Alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, article in press, 2002.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzymology**. 2 ed. New York: Stockton Press, 1996. 609p.

GONZÁLEZ, I.; LÓPEZ, M.; MAZAS, M. et al. Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.31, p.341-347, 1996.

GONZÁLEZ, I.; LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ, S. et al. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.51, p.81-84, 1999.

HANLON, G. W.; HODGES, N. A. Requirement for glucose during production of extracellular serine protease by cultures of *Bacillus licheniformis*. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v.11, p.50-54, 1981.

HARDY, S. P.; LUND, T.; GRANUM, P. E. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.197, p.47-51, 2001.

HE, X. S.; BRÜCKNER, R.; DOI, R. H. The protease genes of *Bacillus subtilis*. **Research in Microbiology**, Paris, v.142, p.797-803, 1991.

ISOBE, M.; ISHIKAWA, T.; SUWAN, S. et al. Synthesis and activity of cereulide, a cyclic dodecadepsipeptide ionophore as emetic toxin from *Bacillus cereus*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.5, n.23, p.2855-2858, 1995.

JADAMUS, A.; VAHJEN, W.; SCHAFFER, K. et al. Influence the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. **Journal of Animal Nutrition**, Haryana, v.86, n.1-2, p.42-54, 2002.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, Oxford, v.37, p.139-144, 2001.

JOO, H. S.; KUMAR, C. G.; PARK, G. C. et al. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**, Oxford, v.38, p.55-59, 2002.

KANEKAR, P. P.; NILEGAONKAR, S. S.; SARNAIK, S. S. et al. Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.82, p.87-93, 2002.

KIM, Y. K.; BAE, J. H.; OH, B. K. et al. Enhancement of proteolytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearothermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.82, p.157-164, 2002.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, p.189-198, 2000.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, New York, v.17, p.561-594, 1999.

KURAKAKE, M.; YOU, S.; NAKAGAWA, K.; SUGIHARA, M.; KOMAKI, T. Properties of chitosanase from *Bacillus cereus*. **Current Microbiology**, Heidelberg, v.40, p.6-9, 2000.

LANCIOTTI, R.; SINIGAGLIA, M.; GARDINI, F. et al. Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. **Food Microbiology**, London, v.18, p.659-668, 2001.

LEGHERINEL, I.; COUVERT, O.; MAFART, P. Relationship between the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery medium. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.55, p.223-227, 2000.

LEGUERINEL, I.; MAFART, P. Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.63, p.29-34, 2001.

LEMOS, W.P.C.; GERMANI, J.C.; RECH, S.B. **Manual de Laboratório de Tecnologia Bioquímica**. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, 1996. 225p.

LUND, T.; GRANUM, P. E. The 105-kDa protein component of *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and collagenolytic activity. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.15, n.178, p.355-361, 1999.

MACFADDIN, J. C. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins, 2000.

MAKINEN, K.K.; MAKINEN, P.L. Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium *Bacillus cereus*

(strain Soc 67). **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.262, n.26, p.12488-12495, 1987.

MAY, B.; ELLIOT, W. Characteristics of extracellular protease formation by *Bacillus subtilis* and its control by amino acid repression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Nucleic Acids and Protein Synthesis**, Amsterdam, v.157, n.21, p.607-615, 1968.

MEHROTRA, S.; PANDEY, P. K.; GAUR, R. et al. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.67, p.201-203, 1999.

MERJRI, M.; MATHLOUTHI, M. Effect of small carbohydrates on the catalytic activity of a protease and two glycohydrolases. **Carbohydrates Polymers**, Oxford, v.45, p.161-167, 2001.

MICROBIOLOGY Manual Merck. Barnstadt: Merck, 2000. p.250.

MILES, A. A.; MIRSA, S. S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Higiene**, Cambridge, v.38, p.732-749, 1938.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MITIDIERI, S. **Produção de *Bacillus thuringiensis* biovar *israelesis* com matérias-primas regionais e avaliação de sua atividade larvicida em *Culex quinquefasciatus* Say.** 105 f., Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

MITIDIERI, S. et al. Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.26, p.56-60, 2002.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 1061p. Cap.1:Estrutura e Propriedades.

MYOSHI, S.; SHINODA, S. Microbial metalloproteases and pathogenesis. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, p.91-98, 2000.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Ed) **Proteolytic Enzymes: a practical approach**. New York: IRL Press: Oxford University Press, 1996. p.1-14.

NETTO, W. S. **Transferência de Oxigênio em Processos Fermentativos**. Florianópolis: [s.n.],1999. 39p. Curso Fermentation Technology.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.77, p.11-18, 2002.

PETERS, A. C.; THOMAS, L.; WIMPENNY, W. T. Effects of salt concentration on bacterial growth on plates with gradients of pH and temperature. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.77, p.309-314, 1991.

PINNA, A.; SECHI, L. A.; ZANETTI, S. et al. *Bacillus cereus* keratitis associated with contact lens wear. **American Academy of Ophthalmology**, San Francisco, p.1830-1833, 2001.

PUTTEN, A. B.; SPITZENBERGER, F.; KRETZMER, G. et al. on-line and off line monitoring of the production of alkaline serine protease by *Bacillus licheniformis*. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.317, p.247-258, 1995.

RASO, J.; NIETO, M. M.; CÁNOVAS, G. B. et al. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.44, p.125-132, 1998.

REED, G. Proteolytic Enzymes. In REED, G.; UNDERKOFER, L. A. **Enzymes in Food Processing**. New York: Academic Press, 1966. p.109-148.

ROSSETTO, O.; BERNARD, M.; PELLIZZARI, R. et al. Bacterial toxins with intracellular protease activity. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.291, p.189-199, 2000.

ROZS, M.; MANCCZINGER, C.; VÁGVÖLGYI, F. et al. Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.205, p.221-224, 2001.

SHINAGAWA, K.; KONUMA, H.; SEKITA, H. et al. Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.130, p.87-90, 1995.

SIERECKA, J.K.; Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*. **International Journal Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v.30, n.5, p.579-595, 1998.

SILVA, A. S. **Otimização do Cultivo de Linhagens Industriais de *Bacillus cereus* sp. em Diferentes Meios de Cultura**. 115 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001

SNEATH, P. H. A. Endospore forming gram-positive rods and cocci. In SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPER, M. E.(eds.): **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.2, p.1104-1153, 1986.

TEIXEIRA, A. R. Análises Químicas In: MANUAL Técnico para Análises Físicas, Químicas e Biológicas em Águas e Resíduos Líquidos. Porto Alegre:DMAE, 1984. 319p.

TORROME, A. P. **Bioquímica Técnica**. Zaragoza: Acribia, 1980. p.95-123.

TRAVIS, J.; POTEMPA, J.; MAEDA, H. Are bacterial proteinases pathogenic factors? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.3, 10, p.405-407, 1995.

TURNES, C. G.; SANTOS, A. F.; CRUZ, F. W. et al. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, n.1, 1999.

VALERO, M.; FERNÁNDEZ, P. S.; SALMERÓN, M. C. Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.82, p.71-79, 2002.

WANG, S. Y.; MOYNE, A. L.; THOTTAPPILLY, G. et al. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.28, p.492-498, 2001.

8. APÊNDICES

APÊNDICE 1: Valores de atividade proteolítica do *Bacillus cereus* referentes aos ensaios em agitador orbital com meio de proteína de soja PS60[®] e Samprosoy90[®].

Matéria-prima	Concentração Protéica (g/L)	Atividade Enzimática (unidadesmL ⁻¹)
PS60 [®]	6	1,23 ± 0,05
PS60 [®]	12	5,67 ± 0,88
PS60 [®]	18	12,13 ± 0,62
Samprosoy90 [®]	6	1,64 ± 0,64
Samprosoy90 [®]	12	1,19 ± 0,14
Samprosoy90 [®]	18	1,95 ± 1,00

APÊNDICE 2: Valores de pH referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio de MR. Os dados correspondem às amostras retiradas durante a fermentação nos tempos indicados.

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média \pm EP média
0	7,11	7,05	x	7,08 \pm 0,04
2	7,04	7	7,07	7,07 \pm 0,03
4	6,61	6,31	6,15	6,36 \pm 0,23
6	6,2	6,69	7,04	6,64 \pm 0,42
8	7,65	7,71	7,68	7,68 \pm 0,03
10	8,13	8,15	7,9	8,06 \pm 0,14
12	8,33	8,44	8,05	8,27 \pm 0,20
15	8,65	8,65	8,25	8,51 \pm 0,23
18	8,76	8,8	8,77	8,77 \pm 0,02
21	8,98	8,95	8,8	8,91 \pm 0,10
24	9,01	9,1	9,08	9,06 \pm 0,05

APÊNDICE 3: Valores de pH referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MPS1 dados correspondem às amostras retiradas durante a fermentação nos tempos indicados

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média \pm EP média
0	6,93	6,46	6,79	6,73 \pm 0,24
2	6,80	6,71	6,71	6,74 \pm 0,05
4	6,90	7,03	6,85	6,93 \pm 0,09
6	7,80	8,06	7,97	7,94 \pm 0,13
8	8,68	8,37	8,47	8,51 \pm 0,16
10	8,72	8,51	8,60	8,61 \pm 0,11
12	8,84	8,60	8,72	8,72 \pm 0,12
15	8,90	8,80	8,76	8,82 \pm 0,07
18	9,00	8,92	8,83	8,92 \pm 0,09
21	9,02	9,04	8,85	8,97 \pm 0,10
24	8,91	9,10	8,90	8,97 \pm 0,11

APÊNDICE 4: Valores de densidade ótica referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MR. Os dados correspondem à leitura de absorvância a 630nm das amostras retiradas durante a fermentação nos tempos indicados

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média \pm EP média
0	0,01	0,01	x	0,01 \pm 0,00
2	0,02	0,02	0,15	0,06 \pm 0,00
4	0,28	0,48	0,50	0,42 \pm 0,14
6	1,40	1,58	1,58	1,52 \pm 0,13
8	3,12	2,77	2,34	2,74 \pm 0,25
10	3,86	3,43	3,76	3,68 \pm 0,30
12	3,66	4,10	3,51	3,76 \pm 0,31
15	3,82	3,49	3,28	3,53 \pm 0,23
18	3,20	3,23	2,45	2,96 \pm 0,02
21	3,00	3,11	2,15	2,75 \pm 0,08
24	2,92	2,83	2,56	2,77 \pm 0,06

APÊNDICE 5: Valores de densidade ótica referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MPS1. Os dados correspondem à leitura de absorvância a 630nm das amostras retiradas durante a fermentação nos tempos indicados.

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média \pm EP média
0	0,15	0,07	0,06	0,09 \pm 0,05
2	0,05	0,11	0,02	0,06 \pm 0,05
4	0,12	0,35	0,2	0,22 \pm 0,12
6	0,9	1,11	0,91	0,97 \pm 0,10
8	1,3	1,5	1,56	1,45 \pm 0,14
10	1,44	1,73	1,66	1,61 \pm 0,15
12	1,31	1,69	1,96	1,65 \pm 0,33
15	1,71	1,63	2,41	1,92 \pm 0,43
18	2,03	2,06	2,4	2,16 \pm 0,21
21	1,92	1,8	2,54	2,09 \pm 0,40
24	1,82	1,93	2,19	1,98 \pm 0,19

APÊNDICE 6: Valores de massa seca (g.L^{-1}) referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MR. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; os valores para cada ponto de amostragem correspondem a média de quatro determinações.

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média \pm EP média
0	0,13	0,20	x	0,16 \pm 0,12
2	0,26	0,28	0,37	0,28 \pm 0,13
4	1,12	1,13	1,13	1,13 \pm 0,18
6	2,83	3,35	2,58	2,92 \pm 0,47
8	4,45	6,08	4,20	4,91 \pm 1,12
10	6,15	5,78	4,73	5,55 \pm 0,81
12	6,25	6,60	6,33	6,39 \pm 0,58
15	6,13	8,80	5,33	6,75 \pm 1,66
18	5,75	7,05	4,23	5,03 \pm 1,92
21	5,05	7,10	4,60	5,58 \pm 1,33
24	5,53	7,05	3,75	5,44 \pm 1,60

APÊNDICE 7: Valores de massa seca (g.L^{-1}) referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MPS1. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; os valores para cada ponto de amostragem correspondem a média de quatro determinações.

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média \pm EP média
0	6,08	3,63	3,70	4,47 \pm 1,66
2	3,65	3,10	4,23	3,66 \pm 0,69
4	3,75	4,13	4,53	4,13 \pm 0,42
6	6,00	5,35	5,73	5,66 \pm 0,33
8	6,03	6,35	7,85	6,74 \pm 0,98
10	6,95	7,28	8,15	7,46 \pm 0,65
12	7,43	7,33	7,18	7,31 \pm 1,65
15	7,30	7,30	7,85	7,50 \pm 0,33
18	6,37	7,45	7,85	6,93 \pm 2,61
21	6,73	6,63	6,35	6,56 \pm 0,54
24	6,89	6,50	6,23	6,53 \pm 0,56

APÊNDICE 8: Valores de atividade proteolítica referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MR. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; os valores para cada ponto de amostragem correspondem a média de três determinações.

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação I	Fermentação III	Média ± EP média
0	0	0,00		0,00 ± 0,00
2	0,85	0,00		0,43 ± 0,48
4	0,53	0,69	0	0,41 ± 0,52
6	1,77	1,85	3,04	2,22 ± 0,68
8	2,08	2,03	4,98	3,15 ± 1,54
10	5,17	5,73	7,24	6,05 ± 1,09
12	12,32	6,48	9,08	9,29 ± 2,58
15	11,85	13,24	10,38	11,83 ± 1,35
18	10,09	9,56	10,6	10,08 ± 0,77
21	11,57	8,96	7,97	9,50 ± 1,73
24	10,85	9,64	8,2	9,74 ± 1,36

APÊNDICE 9: Valores de atividade proteolítica referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MPS1. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; os valores para cada ponto de amostragem correspondem a média de três determinações.

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média \pm EP média
0	0	0	0	0,00 \pm 0,00
2	0,66	1,07	0	0,62 \pm 0,64
4	2,12	1,81	2,09	2,01 \pm 0,31
6	6,34	4,82	6,24	5,74 \pm 0,77
8	7,08	10,23	9,45	9,15 \pm 1,37
10	8,52	14,78	12,91	12,52 \pm 2,63
12	11,50	19,38	15,37	15,91 \pm 3,32
15	14,04	21,08	19,35	18,67 \pm 3,00
18	12,72	14,84	16,04	14,76 \pm 1,47
21	11,50	12,08	15,18	13,10 \pm 1,80
24	9,42	11,04	12,48	11,18 \pm 1,35

APÊNDICE 10: Valores de Proteína Solúvel (g/L) referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MR. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; os valores para cada ponto de amostragem correspondem a média de duas determinações.

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média \pm EP média
0	4,72	7,16		5,94 \pm 1,40
2	4,86	5,33	4,71	4,97 \pm 0,38
4	5,23	4,72	4,24	4,68 \pm 0,50
6	5,00	7,69	4,32	5,66 \pm 1,60
8	3,83	5,93	3,11	4,29 \pm 1,32
10	2,50	4,63	2,41	3,18 \pm 1,12
12	2,27	3,92	2,26	2,82 \pm 0,86
15	2,11	3,64	2,14	2,64 \pm 0,79
18	2,11	3,71	2,14	2,66 \pm 0,82
21	1,79	3,62	1,89	2,43 \pm 0,92
24	1,52	3,57	1,75	2,28 \pm 1,01

APÊNDICE 11: Valores de Proteína Solúvel (g/L) referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MPS1. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; os valores para cada ponto de amostragem correspondem a média de duas determinações.

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média \pm EP média
0	13,72	13,88	16,23	14,61 \pm 1,83
2	17,21	12,17	16,03	15,14 \pm 2,54
4	17,17	10,62	14,37	14,05 \pm 3,05
6	11,33	7,88	12,38	10,53 \pm 2,15
8	10,40	5,94	10,31	8,74 \pm 2,21
10	9,94	6,52	8,92	8,46 \pm 1,58
12	10,10	6,71	8,97	8,60 \pm 1,55
15	9,11	5,91	8,74	7,94 \pm 1,59
18	8,97	5,23	8,55	7,59 \pm 1,84
21	8,55	5,29	8,76	7,54 \pm 1,74
24	8,26	4,94	9,20	7,47 \pm 2,02

APÊNDICE 12: Valores de Contagem de Células Viáveis Totais referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MR. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; a determinação para cada ponto de amostragem foi realizada com N igual a 10 contagens.

Tempo (h)	Fermentação I \pm EP	Fermentação II \pm EP	Fermentação III \pm EP	Média \pm EP
0	$5,92 \times 10^6 \pm 9,39 \times 10^4$	$6,00 \times 10^6 \pm 1,46 \times 10^6$		$5,93 \times 10^6 \pm 5,66 \times 10^5$
2	$2,36 \times 10^7 \pm 4,55 \times 10^5$	$1,53 \times 10^7 \pm 2,51 \times 10^6$	$3,02 \times 10^7 \pm 2,28 \times 10^6$	$2,30 \times 10^7 \pm 7,47 \times 10^6$
4	$1,95 \times 10^8 \pm 2,83 \times 10^7$	$3,14 \times 10^8 \pm 3,55 \times 10^7$	$1,52 \times 10^8 \pm 3,16 \times 10^7$	$2,20 \times 10^8 \pm 8,38 \times 10^7$
6	$7,80 \times 10^8 \pm 1,62 \times 10^8$	$1,52 \times 10^9 \pm 3,12 \times 10^8$	$2,58 \times 10^8 \pm 5,84 \times 10^7$	$8,51 \times 10^8 \pm 6,31 \times 10^7$
8	$1,79 \times 10^9 \pm 3,33 \times 10^8$	$1,73 \times 10^9 \pm 2,75 \times 10^8$	$7,56 \times 10^8 \pm 2,16 \times 10^8$	$1,42 \times 10^9 \pm 5,80 \times 10^8$
10	$3,98 \times 10^9 \pm 5,84 \times 10^8$	$2,98 \times 10^9 \pm 6,39 \times 10^8$	$1,28 \times 10^9 \pm 3,78 \times 10^8$	$2,75 \times 10^9 \pm 1,36 \times 10^9$
12	$5,82 \times 10^9 \pm 1,82 \times 10^9$	$4,47 \times 10^9 \pm 7,05 \times 10^8$	$7,64 \times 10^8 \pm 1,91 \times 10^8$	$3,68 \times 10^9 \pm 2,62 \times 10^9$
15	$2,75 \times 10^9 \pm 4,08 \times 10^8$	$3,09 \times 10^9 \pm 6,40 \times 10^8$	$6,36 \times 10^8 \pm 1,57 \times 10^8$	$2,16 \times 10^9 \pm 1,33 \times 10^9$
18	$1,21 \times 10^9 \pm 2,59 \times 10^8$	$2,26 \times 10^9 \pm 4,41 \times 10^8$	$4,28 \times 10^9 \pm 5,02 \times 10^8$	$2,58 \times 10^9 \pm 1,56 \times 10^9$
21	$9,24 \times 10^8 \pm 1,55 \times 10^8$	$2,03 \times 10^9 \pm 3,67 \times 10^8$	$1,92 \times 10^8 \pm 5,63 \times 10^7$	$1,05 \times 10^9 \pm 9,24 \times 10^8$
24	$1,56 \times 10^9 \pm 3,43 \times 10^8$	$1,70 \times 10^9 \pm 2,47 \times 10^8$	$2,96 \times 10^8 \pm 3,93 \times 10^7$	$1,19 \times 10^9 \pm 7,73 \times 10^8$

APÊNDICE 13: Valores de Contagem de Células Viáveis Totais referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MPS1. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; a determinação para cada ponto de amostragem foi realizada com N igual a 10 contagens.

Tempo (h)	Fermentação I \pm EP	Fermentação II \pm EP	Fermentação III \pm EP	Média \pm EP
0	$8,18 \times 10^5 \pm 1,06 \times 10^5$	$9,08 \times 10^5 \pm 1,99 \times 10^5$	$6,20 \times 10^6 \pm 2,05 \times 10^6$	$7,82 \times 10^6 \pm 1,47 \times 10^6$
2	$1,75 \times 10^7 \pm 2,06 \times 10^6$	$2,70 \times 10^7 \pm 3,97 \times 10^6$	$3,06 \times 10^7 \pm 6,08 \times 10^6$	$2,50 \times 10^7 \pm 6,76 \times 10^6$
4	$2,40 \times 10^8 \pm 6,93 \times 10^7$	$2,93 \times 10^8 \pm 5,43 \times 10^7$	$1,96 \times 10^8 \pm 5,13 \times 10^7$	$9,64 \times 10^8 \pm 4,90 \times 10^7$
6	$1,20 \times 10^9 \pm 2,12 \times 10^8$	$1,44 \times 10^9 \pm 2,97 \times 10^8$	$2,22 \times 10^9 \pm 4,33 \times 10^8$	$1,62 \times 10^9 \pm 5,34 \times 10^8$
8	$1,26 \times 10^9 \pm 2,21 \times 10^8$	$1,41 \times 10^9 \pm 2,54 \times 10^8$	$3,01 \times 10^9 \pm 5,21 \times 10^8$	$1,89 \times 10^9 \pm 9,72 \times 10^8$
10	$1,38 \times 10^9 \pm 3,28 \times 10^8$	$1,06 \times 10^9 \pm 2,41 \times 10^8$	$2,77 \times 10^9 \pm 6,30 \times 10^8$	$1,74 \times 10^9 \pm 9,09 \times 10^8$
12	$2,44 \times 10^9 \pm 4,60 \times 10^8$	$1,33 \times 10^9 \pm 2,41 \times 10^8$	$2,13 \times 10^9 \pm 4,13 \times 10^8$	$1,97 \times 10^9 \pm 5,72 \times 10^8$
15	$2,75 \times 10^9 \pm 4,04 \times 10^8$	$1,21 \times 10^9 \pm 3,22 \times 10^8$	$1,63 \times 10^9 \pm 4,69 \times 10^8$	$1,86 \times 10^9 \pm 7,93 \times 10^8$
18	$6,85 \times 10^8 \pm 2,00 \times 10^8$	$7,47 \times 10^8 \pm 2,17 \times 10^8$	$2,13 \times 10^9 \pm 3,86 \times 10^8$	$1,19 \times 10^9 \pm 8,16 \times 10^8$
21	$7,38 \times 10^8 \pm 1,33 \times 10^8$	$5,68 \times 10^8 \pm 1,43 \times 10^8$	$1,91 \times 10^9 \pm 5,79 \times 10^8$	$1,07 \times 10^9 \pm 7,31 \times 10^8$
24	$3,77 \times 10^9 \pm 5,04 \times 10^8$	$8,32 \times 10^8 \pm 1,68 \times 10^8$	$2,34 \times 10^9 \pm 4,79 \times 10^8$	$2,31 \times 10^9 \pm 1,47 \times 10^9$

APÊNDICE 14: Valores de Esporos Viáveis Totais referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MR. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; a determinação para cada ponto de amostragem foi realizada com N igual a 10 contagens.

Tempo (h)	Fermentação I \pm EP	Fermentação II \pm EP	Fermentação III \pm EP	Média \pm EP
0	$4,71 \times 10^2 \pm 9,75 \times 10^1$	$1,12 \times 10^3 \pm 2,41 \times 10^2$	x	$7,94 \times 10^2 \pm 4,56 \times 10^2$
2	$8,36 \times 10^2 \pm 2,72 \times 10^2$	$7,96 \times 10^2 \pm 1,53 \times 10^2$	$4,78 \times 10^4 \pm 5,42 \times 10^3$	$1,65 \times 10^4 \pm 2,71 \times 10^4$
4	$2,39 \times 10^4 \pm 4,30 \times 10^3$	$1,24 \times 10^4 \pm 1,64 \times 10^3$	$2,08 \times 10^4 \pm 3,21 \times 10^3$	$1,90 \times 10^4 \pm 5,96 \times 10^3$
6	$4,23 \times 10^4 \pm 7,13 \times 10^3$	$2,58 \times 10^4 \pm 4,23 \times 10^3$	$3,42 \times 10^4 \pm 5,24 \times 10^3$	$3,41 \times 10^4 \pm 8,26 \times 10^3$
8	$3,24 \times 10^4 \pm 7,05 \times 10^3$	$2,00 \times 10^4 \pm 4,56 \times 10^3$	$1,54 \times 10^4 \pm 2,66 \times 10^3$	$2,26 \times 10^4 \pm 8,79 \times 10^3$
10	$5,18 \times 10^4 \pm 5,89 \times 10^3$	$1,43 \times 10^4 \pm 3,13 \times 10^3$	$3,36 \times 10^4 \pm 4,67 \times 10^3$	$3,32 \times 10^4 \pm 1,88 \times 10^4$
12	$2,89 \times 10^4 \pm 5,22 \times 10^3$	$2,74 \times 10^4 \pm 3,96 \times 10^3$	$4,28 \times 10^4 \pm 5,36 \times 10^3$	$3,30 \times 10^4 \pm 8,52 \times 10^3$
15	x	$4,00 \times 10^5 \pm 6,97 \times 10^4$	$1,54 \times 10^4 \pm 2,62 \times 10^4$	$2,77 \times 10^5 \pm 1,73 \times 10^5$
18	$3,70 \times 10^6 \pm 6,24 \times 10^5$	$2,06 \times 10^6 \pm 2,80 \times 10^5$	$7,35 \times 10^6 \pm 2,21 \times 10^6$	$4,37 \times 10^6 \pm 2,71 \times 10^6$
21	$2,16 \times 10^6 \pm 4,39 \times 10^5$	$2,93 \times 10^6 \pm 5,42 \times 10^5$	$7,68 \times 10^6 \pm 1,26 \times 10^6$	$4,25 \times 10^6 \pm 2,99 \times 10^6$
24	$1,38 \times 10^6 \pm 3,47 \times 10^5$	$4,41 \times 10^6 \pm 5,36 \times 10^5$	$6,62 \times 10^6 \pm 1,27 \times 10^6$	$4,14 \times 10^6 \pm 2,63 \times 10^6$

APÊNDICE 15: Valores de Esporos Viáveis Totais referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MPS1. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; a determinação para cada ponto de amostragem foi realizada com N igual a 10 contagens.

Tempo (h)	Fermentação I \pm EP	Fermentação II \pm EP	Fermentação III \pm EP	Média \pm EP
0	$9,96 \times 10^2 \pm 2,16 \times 10^2$	$1,88 \times 10^3 \pm 2,88 \times 10^2$	$2,11 \times 10^3 \pm 5,32 \times 10^2$	$1,66 \times 10^3 \pm 5,91 \times 10^2$
2	$1,26 \times 10^3 \pm 1,78 \times 10^2$	$3,84 \times 10^3 \pm 5,22 \times 10^2$	$6,20 \times 10^3 \pm 2,04 \times 10^2$	$1,90 \times 10^3 \pm 1,70 \times 10^3$
4	$1,60 \times 10^3 \pm 1,87 \times 10^2$	$2,97 \times 10^3 \pm 4,34 \times 10^2$	$3,53 \times 10^3 \pm 6,53 \times 10^2$	$2,70 \times 10^3 \pm 9,93 \times 10^2$
6	$1,12 \times 10^3 \pm 1,58 \times 10^2$	$1,27 \times 10^3 \pm 2,01 \times 10^2$	$2,29 \times 10^3 \pm 4,61 \times 10^2$	$1,56 \times 10^3 \pm 6,34 \times 10^2$
8	$1,86 \times 10^3 \pm 4,53 \times 10^2$	$1,92 \times 10^3 \pm 4,19 \times 10^2$	$3,08 \times 10^3 \pm 5,74 \times 10^2$	$2,29 \times 10^3 \pm 6,86 \times 10^2$
10	$2,16 \times 10^3 \pm 4,14 \times 10^2$	$3,21 \times 10^3 \pm 4,70 \times 10^2$	$4,33 \times 10^3 \pm 4,89 \times 10^2$	$3,23 \times 10^3 \pm 1,09 \times 10^3$
12	$2,91 \times 10^3 \pm 2,34 \times 10^2$	$2,41 \times 10^5 \pm 4,31 \times 10^4$	$3,41 \times 10^5 \pm 6,03 \times 10^5$	$1,95 \times 10^5 \pm 1,73 \times 10^5$
15	$1,72 \times 10^8 \pm 2,94 \times 10^7$	$1,07 \times 10^7 \pm 1,93 \times 10^6$	$4,09 \times 10^5 \pm 2,59 \times 10^5$	$6,12 \times 10^7 \pm 9,65 \times 10^7$
18	$9,15 \times 10^7 \pm 2,04 \times 10^7$	$2,28 \times 10^7 \pm 4,31 \times 10^6$	$1,13 \times 10^7 \pm 2,72 \times 10^6$	$4,18 \times 10^7 \pm 4,34 \times 10^7$
21	$8,36 \times 10^7 \pm 1,39 \times 10^7$	$2,64 \times 10^7 \pm 4,13 \times 10^6$	$3,04 \times 10^7 \pm 4,71 \times 10^6$	$4,68 \times 10^7 \pm 3,19 \times 10^7$
24	$6,68 \times 10^7 \pm 2,23 \times 10^7$	$4,50 \times 10^7 \pm 7,69 \times 10^6$	$2,92 \times 10^7 \pm 6,38 \times 10^6$	$4,70 \times 10^7 \pm 1,89 \times 10^7$

APÊNDICE 16: Valores de Açúcar Redutor referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no Meio MR. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; os valores para cada ponto de amostragem correspondem a média de duas determinações.

Tempo (h)	Fermentação MR 18-11	Fermentação MR 21-11	Fermentação MR 05-12	Média \pm EP média
0	2,37	2,41	2,60	2,46 \pm 0,15
2	2,24	2,25	2,62	2,37 \pm 0,22
4	1,39	1,51	2,52	1,81 \pm 0,56
6	0,43	0,65	0,79	0,62 \pm 0,16
8	0,00	0,08	0,32	0,13 \pm 0,15
10	0,00	0,00	0,15	0,05 \pm 0,08
12	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00
21	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,00	0,00	0,00

APÊNDICE 17: Valores de Açúcar Redutor (g/L) referentes aos ensaios de fermentação do *Bacillus cereus* no meio MPS1. Os dados correspondem às amostras dos tempos indicados; os valores para cada ponto de amostragem correspondem a média de duas determinações.

Tempo (h)	Fermentação I	Fermentação II	Fermentação III	Média ± EP média
0	2,72	3,57	3,12	3,14 ± 0,15
2	2,86	3,11	3,47	3,15 ± 0,32
4	2,91	2,66	3,00	2,86 ± 0,28
6	2,84	3,19	3,02	3,02 ± 0,22
8	2,54	2,76	2,94	2,74 ± 0,28
10	2,78	2,93	1,90	2,53 ± 0,77
12	2,74	2,67	3,39	2,93 ± 0,41
15	2,77	3,17	2,69	2,88 ± 0,29
18	2,78	3,12	2,51	2,80 ± 0,35
21	3,02	2,69	2,67	2,79 ± 0,27
24	2,72	2,53	3,31	2,85 ± 0,48

APÊNDICE 18: Resultados dos tempos médios de geração em células viáveis totais (Gc), das velocidades específicas de crescimento em células viáveis totais (μc), os rendimentos em massa seca celular (Rm), atividade enzimática (Rae), células viáveis totais (Rc) e em esporos (Re), das produtividades em massa seca celular (Pm), atividade enzimática (Pae), substrato consumido (Ps), células viáveis totais (Pc) e em esporos (Pe) e eficiência das fermentações de *Bacillus cereus*.

PARÂMETRO	Meio MR	Meio MPS1
Gc (min)	81,94	57,78
μc (h ⁻¹)	0,51	0,72
Rm (g.l ⁻¹)	2,04	1,12
Rae (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	3,58	2,80
Rc (U.F.C./ g.l ⁻¹)	6,54x10 ⁸	2,79x10 ⁸
Re (U.F.C./ g.l ⁻¹)	8,39x10 ⁴	9,17x10 ⁶
Pm (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	0,45	0,50
Pae (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	0,79	1,24
Ps (mg.mL ⁻¹)	0,22	0,44
Pc (U.F.C. g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	1,44x10 ⁸	1,24x10 ⁸
Pe (U.F.C. g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	1,84x10 ⁴	4,08x10 ⁶
Eficiência (%)	55,5	45,7