

PROTOCOLO DE FERMENTAÇÃO (Genérico para todos os produtos)

1 – Fluxograma

- A. Cada cepa de bactéria é retirada dos nossos bancos de culturas liofilizados em tanques esterilizados.
- B. Elas são então colocadas em crescimento independente via frascos vibratórios ou sementes de inicialização.
- C. Cada uma é introduzida independente em um de nossos reservatórios esterilizados de fermentação.
- D. Cada cultura é então desenvolvida em seus meios de crescimento até a sua meta de curva dinâmica de população.
- E. As culturas são então recolhidas via uma centrífuga de placas de fluxo contínuo.
- F. Cada cultura é então secada independente por pulverização para preservar sua integridade genética e evitar contaminações cruzadas.

2 – Pureza da matéria prima e preparação do produto.

- A. Cada matéria prima que é usada em nossos processos de produção / fermentação é então colocada em embalagens independentes e satisfazendo os padrões ISO mínimos impostos para matérias primas pelas indústrias (clientes).

Todas as culturas discutidas aqui crescem em algumas variações mínimas de meios em glucose com sais específicos para indução de esporulações e todo meio de fermentação é adquirido como Classe de Alimento e é considerado de excelente pureza e concentração.

3- Cepas e protocolo de fermentação

- A. As cepas utilizadas são todas do gênero *Bacillus* e as espécies listadas em anexo.
- B. Cada cultura foi isolada de uma cultura de inicialização. Cada cultura cresceu individualmente em frascos de agito para aumentar o rendimento e o número de células. Cada cepa foi então concentrada em centrífugas e então secadas por pulverização. O isolamento obtido é então nossas sementes de culturas de fermentação dos frascos de agito para cada cultura independente. Cada frasco é Autoclavado completamente com caldos nutrientes para assegurar esterilização. A Autoclave fica a 250 Graus Fahrenheit por 15 minutos (15 psi). Os frascos são então semeados sob proteção de fluxo laminar e também usando técnicas de esterilização por fogo para eliminar contaminações cruzadas. Os frascos são agitados por 24 a

48 horas para estabelecer uma boa população de base. As culturas são então adicionadas independentemente no fermentador principal que foi previamente esterilizado usando vapor à 250 graus F. por 90 minutos. O fermentador contém meios específicos de crescimento esterilizado para cada cepa. A fermentação começa por agitação e aspersão de ar esterilizado (o ar é esterilizado depois de duas filtragens com filtros de carvão e de cartuchos de papel esterilizados que filtram partículas com tamanho abaixo de 1 micrôn). Algumas vezes pode ser necessário adicionar oxigênio purificado dependendo dos níveis de oxigênio dissolvidos presentes dentro do fermentador. A fermentação acaba quando a curva de crescimento da população intercede com a curva máxima de esporulação. A esporulação é alcançada usando várias técnicas. Tanto um sal inorgânico de esporulação induzida devido a um gradiente eletro-químico inapropriado através da membrana da célula, depleção de oxigênio devido a diminuição da respiração ou limitação de hidrocarbonos devido a diminuição da fagocitose. Culturas de células são então armazenadas utilizando processo controlado de centrifuga de fluxo contínuo a qual deve ser também esterilizadas por vapor pelo protocolo mencionado acima. Cada cultura é então coletada e secada por pulverização. Assim que cada cultura é seca ela é armazenada em nossas salas frias até a mistura final.

A mistura final é alcançada pela combinação das cepas em várias proporções dependendo da aplicação. As cepas são removidas dos seus containers originais e colocadas em vasilhame misturador de aço inoxidável. Os vasilhames de mistura são limpos antes que cada batelada com 4000 ppm de solução de alvejante para evitar contaminação cruzada de esporos. Cada cepa é adicionada a um diluidor com graduação de alimento e permitida a mistura até que uma consistência uniforme seja alcançada. O resultado do produto é inspecionado por um controle de qualidade, embalado e despachado ao cliente.

4- Fermentação e Meio de mistura final e preparação

- A. Dependendo da cepa envolvida os seguintes meios são usados em diferentes concentrações e taxas de adição em conjunto com o fluxo de ar necessários a fermentação.
 - a. Hidrolosato de soja isolado (Isolate Soy hydrolysate) (grau alimentar)
 - b. Fermento hidrolizado isolado (Isolate yeast hydrolysate) (grau alimentar)
 - c. Pepsina de porco (grau alimentar)
 - d. Glucose
 - e. Sucrose
 - f. Glicose
 - g. Licor saturado de milho (grau alimentar)

- h. Óleo de soja (grau alimentar)
- i. Óleo de linhaça (grau alimentar)
- j. Fermento autolisado (Yeast autolysate) (grau alimentar)
- k. KCl2
- l. Óxido de zinco
- m. FeCl2
- n. MnCl2
- o. MgSo4
- p. CaCl2
- q. Ácido Cítrico
- r. Fosfato Buffer 9 (grau de reagente)
- s. PPG anti-espumante (grau alimentar).

O país de origem de todos os materiais mencionados acima é os USA exceto o ácido cítrico que é produzido originalmente em fábricas na China e importados via Univar químicos. Estes produtos atendem todas as exigências americanas de farmácia em adição aos padrões ISO da Univar.

A pureza final é verificada usando nossos padrões de contagem de Controle de Qualidade, conteúdo de esporos e verificação de que não existe presença de contaminação cruzada. Nós alcançamos isto através de placas estriadas de Mackonkey, grama da mancha, mancha de esporo e contagem final em placas usando a metodologia AOAC. Entretanto, cada batelada final é certificada de estar livre de Salmonela, Shigella e E.Coli e livre de contaminações gram-negativas.