

CELULASES DE *Bacillus* sp. SMIA-2: SECAGEM E USO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES ECOLÓGICAS DE
LIMPEZA

ERICA CRUZ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2021

CELULASES DE *Bacillus* sp. SMIA-2: SECAGEM E USO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES ECOLÓGICAS DE
LIMPEZA

ERICA CRUZ

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof^a Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C957

Cruz, Erica.

Celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2 : Secagem e uso para o desenvolvimento de formulações ecológicas de limpeza / Erica Cruz. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

117 f. : il.

Bibliografia: 92 - 101.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.
Orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

1. *Bacillus*. 2. Celulases. 3. Esporos. 4. Biofilme. 5. Detergentes. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

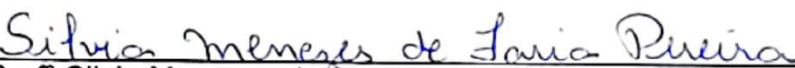
CELULASES DE *Bacillus* sp. SMIA-2: SECAGEM E USO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES ECOLÓGICAS DE
LIMPEZA

ERICA CRUZ

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”


Aprovada em 17 de março de 2021.

Comissão Examinadora:


Prof^a Silvia Menezes de Faria Pereira (D.Sc., Eng. e Ciências dos Materiais) UENF


Prof^a Silvania Alves Ladeira (D.Sc., Produção Vegetal) IFAL Campus Piranhas


Prof. João Batista Barbosa (D.Sc., Produção Vegetal) IFS Campus Glória


Prof^a Meire Lelis Leal Martins (Ph.D., Molecular Biology and Biotechnology) UENF
(Orientadora)

A Deus,
Ao meu pai Hermes in memoriam,
À minha mãe Isméria,
Aos meus filhos Tarsis e Pedro.

Dedico com carinho

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por mostrar-me o caminho certo e por ser o Senhor da minha vida; “Porque Ele vive eu posso crer no amanhã”!

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso de Doutorado;

A Coordenação de aperfeiçoamento de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

À prof^a. Ph.D. Meire Lelis Leal Martins pela orientação, profissionalismo, conduta e apoio durante o curso;

Aos professores integrantes da banca examinadora, Sílvia Menezes de Faria Pereira, Silvania Alves Ladeira e João Batista Barbosa, por terem aceitado contribuir com este trabalho;

Aos meus filhos Tarsis e Pedro, pelo amor, pelo carinho, pelo respeito, pelo apoio e pela paciência em todos os momentos. Mamãe ama vocês!

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos: Samara, Vanessa, Selsiane, Raphael, Larissa Ferreira, Larissa da Cruz, Paulo, pela colaboração, troca de experiência e amizade;

Em especial agradeço às amigas Aninha, Silvia e Samara que incansavelmente estiveram comigo em todos esses 4 anos de curso; como foi bom conhecer e conviver com pessoas como vocês!

A todos os funcionários da UENF e do LTA, em especial Paulo, Valdinéia, Fatinha, Patrícia e Gina, Nina e Solange do Laboratório de Sanidade Animal pela

disponibilidade em sempre nos atender bem e pela gentileza;

À minha amiga D. Ariema que há três anos está presente em minha vida me dando todo apoio que preciso;

A minha mãe, irmãs pelo imenso incentivo, respeito e amor sempre demonstrado. Agradeço por acreditarem em mim; Amor incondicional!

Ao meu pai, Hermes, (*in memoriam*) que, infelizmente apesar de não ter vivenciado essa conquista, tenho certeza de que se orgulharia de mim!

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	5
2.2 Secagem de enzimas.....	6
2.3 Enzimas em formulações de detergentes	8
2.4 Detergentes biodegradáveis	10
2.5 Adjuvantes de limpeza	11
2.5.1 Surfactantes	11
2.6 Biossurfactantes.....	14
2.6.1 Produção de biossurfactantes pelo gênero <i>Bacillus</i>	16
2.7 Esporos de <i>Bacillus</i>	17
2.8 Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes	19
2.9 Biofilmes microbianos	20
3. TRABALHOS	23
3.1 OPTIMIZATION OF SPRAY DRYING CONDITIONS FOR OBTENTION OF DURABLE CELLULASES POWDER	23

3.2 COMPATIBILITY STUDY WITH DETERGENT INGREDIENTS AND WASHING PERFORMANCE BY <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 CELLULASES	42
3.3 USO DE ENZIMAS E ESPOROS DE <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS BIODEGRADÁVEIS PARA LIMPEZA, DESINFECÇÃO E HIGIENIZAÇÃO	61
4. RESUMO E CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Molécula que constitui um surfactante (Martins, 2009).....	12
Figura 2: Representação esquemática da estrutura do esporo de <i>B. subtilis</i> . As múltiplas camadas do esporo servem para proteger o genoma, que está localizado no núcleo do esporo (core). O core encontra-se protegido pelo córtex (verde), pela camada basal (azul), capa interna (laranja), capa externa (roxo) e crosta (vermelho). Modificado de McKenney; Driks; Eichenberger, 2013.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais tipos de biossurfactantes produzidos pelo gênero *Bacillus* .16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMCase	Carboximetilcelulase
BHI	Brain Heart Infusion
GRAS	Generally Recognized as Safe
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
LAS	Alquil benzeno sulfonato linear
ABS	Alquilbenzeno sulfonato
CMC	Concentração micelar crítica
ATCC	American Type Culture Collection
ES	Extrato seco
TSY	Agar triptona extrato de levedura
TSA	Agar triptona de soja
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
SMIA-2	<i>Bacillus</i> sp. SMIA-2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

RESUMO

CRUZ, Erica; D.Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2021. Celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2: Secagem e uso para o desenvolvimento de formulações ecológicas de limpeza. Orientadora: Profª Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

As celulases microbianas têm potencial biotecnológico em vários setores, incluindo alimentos, cervejarias e vinhos, resíduos industriais para matérias-primas químicas, rações para animais, papel e celulose, agricultura, têxtil e também em detergentes. Neste trabalho, após a produção de celulases por *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo bagaço de cana-de-açúcar, licor de maceração de milho e farinha de casca de maracujá e separação dos sólidos do caldo de fermentação, as enzimas foram secas na presença de adjuvantes e sua estabilidade durante a atomização e posterior armazenamento foi estudada. Celulases com maior termoestabilidade e estabilidade alcalina tornaram-se a principal escolha como aditivos para detergentes. Assim, após a secagem, as celulases do SMIA-2 foram avaliadas quanto à sua estabilidade na presença de componentes de detergentes, a fim de desenvolver produtos de limpeza biodegradáveis. Finalmente a ação das celulases juntamente com outras enzimas e esporos do SMIA-2, sobre a remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) de tecidos de algodão manchados artificialmente com sangue foi estudada. Os resultados mostraram que a combinação de 1,0% (p/v) de goma arábica com 1,0% (p/v) de celulose microcristalina e à temperatura de entrada do spray drier de 70°C foi eficaz na preservação das atividades das avicelases (enzimas hidrolisantes de avicel) e

carboximetilcelulases (enzimas hidrolisantes da carboximetilcelulose). A avicelase seca preservou completamente sua atividade, quando armazenada a 5°C, enquanto a CMCase perdeu apenas 11% de sua atividade. Embora as celulases foram estáveis em uma ampla faixa de concentração dos três componentes utilizados na formulação de solução de limpeza, seu desempenho em hidrolisar a fibra de celulose de tecidos de algodão foi maior que qualquer um dos componentes (Triton X-100, Renex 95 ou hidrogênio peróxido) utilizados em concentrações mais baixas. Isso foi importante porque pode evitar a adição desnecessária de componentes na solução de limpeza. Estudos sobre a eficácia das soluções de limpeza contendo enzimas (celulases e proteases) e esporos do SMIA-2 mostraram que as mesmas foram capazes, não só de remover manchas de sangue dos tecidos como também foram eficientes para remover biofilmes de *S. aureus*.

Palavras-chave: *Bacillus*, celulases, esporos, biofilme, detergentes.

ABSTRACT

CRUZ, Erica; D.Sc. Vegetal Production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2021. Cellulases from *Bacillus* sp. SMIA-2: Drying and use for the development of ecological cleaning formulations. Advisor: Prof^a Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

Microbial cellulases have biotechnological potential in several sectors, including food, breweries and wines, industrial residues for chemical raw materials, animal feed, paper and cellulose, agriculture, textiles and also in detergents. In this work, after the production of cellulases by *Bacillus* sp. SMIA-2 in submerged cultures containing sugar cane bagasse, corn maceration liquor and passion fruit husk flour and separation of the solids from the fermentation broth, the enzymes were dried in the presence of adjuvants and their stability during atomization and subsequent storage was studied. Cellulases with greater thermostability and alkaline stability have become the main choice as additives for detergents. Thus, after drying, the cellulases of SMIA-2 were evaluated for their stability in the presence of detergent components, in order to develop biodegradable cleaning products. Finally, the action of cellulases together with other SMIA-2 enzymes and spores, on the removal of *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) biofilms from cotton fabrics artificially stained with blood was studied. The results showed that the combination of 1.0% (w / v) of gum arabic with 1.0% (w / v) of microcrystalline cellulose and at the inlet temperature of the 70 ° C drier spray was effective in preserving the activities of avicelases (avicel hydrolyzing enzymes) and carboxymethylcellulases (hydrolyzing enzymes of carboxymethylcellulose). Dry avicelase completely preserved its activity when

stored at 5°C, while CMCase lost only 11% of its activity. Although cellulases were stable over a wide concentration range of the three components used in the formulation of cleaning solution, their performance in hydrolyzing the cellulose fiber of cotton fabrics was greater than any of the components (Triton X-100, Renex 95 or hydrogen peroxide) used in lower concentrations. This was important because it can prevent the unnecessary addition of components to the cleaning solution. Studies on the effectiveness of cleaning solutions containing enzymes (cellulases and proteases) and spores from SMIA-2 have shown that they were able, not only to remove blood stains from tissues, but also to remove *S. aureus* biofilms.

Keywords: *Bacillus*, cellulases, spores, biofilm, detergents.

1. INTRODUÇÃO

A valorização das questões ambientais no segmento industrial encontra-se em expansão e atende as novas exigências legais de mercado como também da sociedade em geral. O enfoque econômico, antes preponderante no planejamento, vem sendo substituído por um conceito mais amplo de desenvolvimento sustentável, no qual as metas de crescimento estão associadas aos esforços de redução dos efeitos nocivos ao meio ambiente (Strobel et al., 2004).

A crescente conscientização do consumidor sobre os produtos de limpeza “verdes” levou a um aumento no número de produtos ecológicos de limpeza, responsabilizando, o mercado global de produtos para limpeza por US\$ 3,9 bilhões em 2019 e estimando para US \$ 11,6 bilhões até 2029 (Global Green Cleaning Products Market, 2020).

Portanto, a necessidade de desenvolver produtos sustentáveis em função de pressões legais e de mercado, incentivou as empresas de produtos de limpeza a adotarem a sustentabilidade como uma estratégia competitiva, que traz benefícios econômicos e promove a melhoria da imagem corporativa (Kara et al., 2005).

De acordo com a literatura, a poluição de recursos hídricos tornou-se um problema nos últimos anos, devido à alta toxicidade e biodisponibilidade de produtos químicos como detergentes (Pandey e Gopal, 2010; Mousavi et al., 2010). Em geral, um dos problemas causados pela alta concentração de detergentes no ambiente aquático é a produção de espuma na superfície das águas, causando

redução na taxa de penetração de oxigênio, do ar para a água, ocasionando déficit na adsorção de oxigênio dissolvido pelos organismos aquáticos (Rejeki e Rahmat, 2013).

Desta forma, a demanda por enzimas microbianas para utilização em formulações de limpeza é progressiva, uma vez que estas são, surfactantes naturais capazes de aumentar o desempenho de lavagem, pois substituem parcialmente surfactantes químicos, builders e outros agentes auxiliares, assim como, polímeros e agentes branqueadores, diminuindo portanto, o impacto ambiental (Brumano et al., 2016).

As enzimas podem ser obtidas de fontes renováveis, ser biodegradáveis e não oferecer riscos à vida marinha (Rodríguez et al., 2006). Assim, viabilizam processos mais sustentáveis e ambientalmente corretos. Em processos industriais de limpeza, as enzimas atuam na remoção de sujidades (manchas), sendo as mais utilizadas, as proteases, amilases, celulasas e pectinases (Quattara, 2017). As proteases agem em manchas provenientes de compostos proteínicos, tais como sangue, ovo e carne (Kamoun et al., 2008). As amilases são voltadas para manchas de amidos, como, massas, arroz, batatas e molhos, entre outros. Já as celulasas proporcionam branqueamento e manutenção da cor (Kiran e Chandra, 2008). As enzimas degradadoras de pectina (componente de células de plantas) atuam em manchas de frutas e pectina de tomates, bananas e iogurtes.

Em decorrência da eficiência das enzimas nos processos industriais de limpeza, a demanda por enzimas microbianas para uso na indústria de detergentes tem aumentado continuamente, uma vez que são surfactantes naturais capazes de melhorar o desempenho da lavagem e são ecologicamente corretos e totalmente biodegradáveis (Hmidet et al., 2009).

A descoberta que o *Bacillus* sp. SMIA-2 é capaz de produzir níveis satisfatórios das enzimas proteases (Ladeira et al., 2010; Barbosa et al., 2014), amilases (Côrrea et al., 2011) e celulasas (Ladeira et al., 2015, Costa et al., 2017), quando cultivado em culturas submersas contendo resíduos agroindustriais disponíveis localmente, como o bagaço de cana e cascas de frutas, abriu perspectivas para sua utilização no desenvolvimento de produtos sustentáveis de grande interesse industrial. A boa atividade apresentada pelas enzimas a valores de pH alcalinos, boa estabilidade e atividade a temperaturas relativamente elevadas, compatibilidade com compostos detergentes tais como surfactantes e

oxidantes indicou a possibilidade das enzimas em formulações de detergentes (Ladeira et al., 2015).

O *Bacillus* sp. SMIA-2 está inserido no grupo de organismos reconhecidos como seguros no Generally Recognized as Safe (GRAS – generally regarded as safe), e é uma espécie formadora de esporos resistentes em condições ambientais adversas tais como calor e dessecação e a partir da análise do genoma, foi evidenciado a presença de genes responsáveis pela produção de compostos bioativos como a lichenisina, que tem propriedades biossurfactantes (Bernardo et al., 2020).

Para aumentar a vida útil, facilitar o armazenamento e o transporte, reduzir o custo de transporte e proteger a atividade biológica das enzimas, muitas vezes são preservadas na forma seca. Apesar da liofilização ser preferida para produtos como enzimas, a secagem por spray dryer é muito mais econômica, pois pode processar volumes maiores e operar com maior eficiência energética. No entanto, os esporos microbianos são pouco injuriados pelo calor e pelo choque osmótico causado por este processo, devido à alta desidratação do material genético presente no núcleo do esporo.

Portanto, devido à sua estabilidade e segurança, o esporo é uma ferramenta biotecnológica ideal com diversas aplicações potenciais, incluindo uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos alimentos probióticos, veículos para entrega de antígenos vacinais e moléculas bioativas (Tavassoli et al., 2013).

Esporos de *Bacillus* germinam quando condições de nutrição e umidade se tornam favoráveis ao desenvolvimento, gerando células vegetativas ativas capazes de inibir o crescimento de patógenos e formação de biofilmes.

Nesse sentido, a inclusão de enzimas nos produtos de limpeza facilita o destacamento do biofilme, que protege os microrganismos, permitindo uma maior eficácia dos agentes de limpeza. Com o aumento da prevalência da resistência aos antibióticos, enzimas antimicrobianas que visam à ruptura da maquinaria celular bacteriana e à formação de biofilme estão sob intensa investigação (De Cesare et al., 2019).

Considerando que *Bacillus* sp. SMIA-2 produz uma ampla gama de sistemas enzimáticos hidrolíticos e metabólitos, que têm efeitos antagônicos em outros microrganismos e é capaz de formar esporos extremamente resistentes, o

objetivo deste trabalho foi desenvolver um produto sustentável a partir de esporos e celulases secas de *Bacillus* sp. SMIA-2, para aplicação em formulações de limpeza para tecidos de roupas e remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, oferecendo ao mercado um produto com tecnologia inovadora e sustentável.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bacillus* sp. SMIA-2

Bacillus sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica, que foi isolada de solos do município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Souza e Martins, 2001). A cepa encontra-se inserida no grupo de organismos reconhecidos como seguros no Generally Recognized as Safe (GRAS – generally regarded as safe), e com base em toda a análise de re-sequenciamento do genoma 16S rRNA, Bernardo et al. (2020), revelaram que o SMIA-2 se agrupou com a cepa do tipo *Bacillus licheniformis* Gibson 46 (ATCC 14580T) com 100% de similaridade. Segundo esses autores, a análise do genoma do SMIA-2 mostrou que ele codifica inventários de genes que suportam a produção de enzimas, incluindo cinco genes para amilase, treze locais para o metabolismo da xilose, cinquenta e cinco locais associados à degradação de proteínas, três locais de enzimas celulolíticas (por exemplo, endoglucanase) sob um complexo de celulosoma e cinco grupos de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas. O complexo de celulosoma corrobora com o que foi revelado do SMIA-2 por (Souza e Martins, 2001; Silva et al., 2007; Carvalho et al., 2008 a,b ; Andrade et al., 2011; Oliveira et al., 2014; Ladeira et al., 2010; Ladeira et al., 2013, Barbosa et al., 2014; Ladeira et al., 2015; Costa et al., 2017; Cruz et al., 2019) como uma espécie capaz de produzir níveis satisfatórios de várias enzimas hidrolíticas termoestáveis, tais como: amilases, pectinases, xilanases, celulases e proteases, quando cultivada em culturas submersas contendo resíduos agroindustriais tais

como soro de leite, bagaço de cana, farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho, abrindo novas perspectivas para utilização desta cepa para a produção de enzimas em escala industrial utilizando substratos de baixo custo. A presença de três clusters de genes pertencentes à síntese de peptídeos não ribossômicos (NRPs) (Lichenysin, Fengycin, Bacillibactin) e dois clusters de genes pertencentes à síntese de peptídeos ribossômicos (Lichenicidin e Lasso peptide) foi detectada no genoma do SMIA-2. Esses compostos antimicrobianos são tipicamente ativos contra patógenos bacterianos Gram-positivos, mas alguns exibem atividade contra patógenos bacterianos Gram-negativos, bem como patógenos fúngicos (Bernardo et al., 2020).

Bacillus sp. SMIA-2 é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia, formadora de esporos, capaz de produzir enzimas termoestáveis, como celulases (Oliveira et al., 2014; Ladeira et al., 2015). Essa cepa foi capaz de expressar um nível promissor de celulases em culturas submersas empregando subprodutos agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar e farinha de casca de maracujá (Costa et al., 2017; Cruz et al., 2019), e essas celulases são capazes de funcionar em altas temperaturas e níveis de pH, mantendo boa estabilidade na presença de diversos surfactantes, agentes oxidantes e detergentes disponíveis localmente (Ladeira et al., 2015; Cruz et al., 2019), que indica o potencial de utilização dessa bactéria e de suas celulases para diversas aplicações industriais, como na indústria de detergentes.

2.2 Secagem de enzimas

As enzimas são muito mais estáveis no estado seco do que em solução. Uma formulação de enzima sólida pode ser obtida por liofilização ou por secagem por pulverização do caldo concentrado. A secagem por spray pode ser considerada uma alternativa superior à liofilização ao desidratar uma grande quantidade de amostras, pois o processo levaria menos tempo e seria mais econômico (Libard et al., 2020). No entanto, a desidratação de enzimas por secagem por pulverização pode causar desnaturação térmica levando à perda da atividade enzimática (Selivanov, 2005). Nesse contexto, a adição de aditivos pode minimizar a desnaturação da proteína durante esse processo.

Os avanços obtidos nos processos de obtenção de enzimas, a consolidação da aplicação em processos tecnológicos depende de produtos

apresentarem-se altamente ativos e estáveis por longos períodos, mesmo quando armazenados fora das condições ideais (Samborska et al., 2005). Extratos enzimáticos aquosos, além do espaço que ocupam no transporte e armazenamento, têm como outros inconvenientes a possibilidade de contaminação por microrganismos e maior suscetibilidade a deteriorações físicas. (Namaldi et al., 2006). Neste sentido, formulações enzimáticas desidratadas apresentam vantagens em relação aos extratos enzimáticos aquosos, proporcionando aumento da vida útil e praticidade no manuseio, mesmo à temperatura ambiente (Liao et al., 2003). A remoção de água fracamente ligada ao conteúdo sólido do extrato bruto reduz o movimento livre das proteínas, minimizando mudanças conformacionais e desnaturação (Belghith et al., 2001; Samborska et al., 2005; Anandharamakrishnan et al., 2007). A desidratação é considerada eficiente quando as moléculas de água são retiradas de tal maneira que a estrutura tridimensional das moléculas permaneça a mais intacta possível, pois, quanto mais uma enzima consegue manter o balanço iônico, melhor a preservação de suas funções biocatalíticas (Ó'Fagáin, 1997; Aehle, 1990).

A secagem por atomização ou spray drying tem sido frequentemente aplicada a materiais termossensíveis de setores industriais variados, tais como alimentos (leite, soro de leite, chá, sopas e café) e farmacêutica (fármacos e produtos funcionais – vitaminas, enzimas, sangue e microrganismos), e também na agricultura (fungos entomopatogênicos) (Peighambardoust, et al., 2011). Caracteriza-se por ser um método de desidratação contínuo, rápido e de baixo custo, além de proporcionar materiais com propriedades físicas desejadas, e condições assépticas de processamento (Nalmandi et al., 2006; Alloue et al., 2007; Costa e Silva, 2010).

De acordo com Belghith e colaboradores (2001), é necessário para secagem por spray dryer aplicar protetores para evitar a degradação das enzimas durante a secagem, e estabilizadores para manter as condições ideais para a manutenção da atividade enzimática durante a estocagem.

Encontra-se na literatura a aplicação de diversos aditivos como maltodextrina, açúcares, celobiose, glicose, lactose, sucrose e trealose, os polímeros carboximetilcelulose, celulose micro-cristalina, dextrana e goma arábica, os polióis, glicerol, manitol, propileno glicol, sorbitol e xilitol, dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200), comumente aplicado na indústria farmacêutica. (Sloth et

al., 2009; Costa-Silva, 2010).

A goma arábica (GA) é o exsudato gomoso dessecado dos troncos e dos ramos da Acácia, em sua grande maioria da *A.senegal* ou *A.seyal*, um heteropolissacarídeo complexo com uma estrutura altamente ramificada de galactose, arabinose, ramnose e ácido glicurônico, contendo cerca de 2% de um componente proteico ligado covalentemente a esse arranjo molecular. (Azeredo,2005). Tem sido usada como um material de parede em microencapsulação por secagem por pulverização, principalmente por causa da sua boa capacidade de emulsificação e de baixa viscosidade em solução aquosa, o que auxilia o processo de secagem por pulverização. Além disso, proporciona uma boa retenção de substâncias voláteis e que confere proteção eficaz contra a oxidação (Alloue et al., 2007).

A Celulose Microcristalina (MC) ($C_6H_{10}O_5$)_n, uma forma despolimerizada parcialmente purificada de celulose, apresentando-se como pó branco, inodoro, insípido, cristalino composto por partículas porosas, comumente utilizada como excipiente na indústria farmacêutica pelas características supracitadas e por produzir comprimidos rígidos que desintegram rapidamente em água, devido ao inchamento das partículas de MC e destruição das forças de ligação que as mantêm juntas (Adel et al., 2011). A MC pode ser obtida por meio de hidrólise com ácidos minerais diluídos, a temperaturas elevadas, de qualquer material que é rico em celulose, como polpa de madeira, algodão, soja, bagaço e sabugo de milho, casca de arroz e amendoim (Adel et al., 2011). A celulose, obtida como uma polpa a partir de materiais de plantas fibrosas, consiste em áreas de celulose amorfa e, regiões ordenadas, cristalinas. A MCC é descrita como celulose purificada e parcialmente despolimerizada, com um grau de polimerização (DP) abaixo de 350 (Adel et al., 2011).

2.3 Enzimas em formulações de detergentes

Através dos anos, a indústria mundial tem investido cada vez mais na produção de matérias-primas a partir de fontes renováveis (Cherry; Fidantsef, 2003, Silva; Lacerda; Jones Jr, 2005; Both; Fischer, 2017). A busca por inovações tecnológicas, não só do ponto de vista de produto, mas também de soluções que sejam ambientalmente corretas, tem acarretado um desenvolvimento acelerado e constante, especialmente na área biotecnológica. Além destes fatores, existe outro

igualmente importante, que é a necessidade de se adequar às legislações dos países. Isso também tem provocado uma procura incansável de novas enzimas que possam substituir o efeito de ingredientes importantes na formulação de detergentes, como, por exemplo, o perborato de sódio, que é proibido em formulações de detergentes e o fosfato, que desencadeia o processo de eutrofização nos lagos e mares. Assim, as enzimas têm se tornado ingredientes fundamentais na indústria de detergentes (Corteza; Castro; Andradeb, 2017; Lund et al., 2012; Rahman, 2013; Souza et al., 2017; Varanazi et al., 2001; Zhang, et al., 2014).

As enzimas utilizadas e aprovadas pela Resolução Normativa ANVISA RDC Nº 55, DE 14 DE NOVEMBRO DE 2012, que regulamenta a aplicação de detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde e com indicação de uso para limpeza de dispositivos médicos são as enzimas hidrolíticas, proteolíticas e lipolíticas, obtidas a partir de fontes diversas. A maioria das enzimas de uso comercial são produzidas por variadas espécies de *Bacillus* sp. em sistemas de fermentação submersa, sendo que as específicas para uso em detergentes possuem pH ótimo de ação alcalina e podem ser utilizadas em temperaturas relativamente altas, até 60⁰C (Mokashe, et al., 2017; Naganthran, et al., 2017).

As enzimas mais comumente utilizadas em detergentes para tecidos são as proteases, que atuam em manchas de proteínas; as amilases, que atuam em manchas de carboidratos; as lipases, que atuam em manchas de gordura e as celulases, que removem as bolinhas de celulose que se formam em alguns tipos de tecidos e, em consequência, têm um efeito positivo sobre a cor dos mesmos. Outros pontos positivos são que esses biocatalisadores diminuem o uso de produtos químicos, como solventes e substâncias cáusticas, tornando os detergentes menos agressivos ao meio ambiente; e reduzem o consumo de água e de energia (Castro et al., 2004).

Um parâmetro importante na escolha das enzimas em detergentes é o valor do seu ponto isoelétrico (pI), porque as enzimas agem melhor quando o valor do pH das soluções de detergentes é aproximadamente o mesmo do pI da enzima. Contudo, existem outros parâmetros envolvidos na escolha de uma enzima para detergentes, tais como: pH, tempo de reação e temperatura, força iônica, composição do detergente, dureza da água e até a força mecânica à qual a reação é submetida durante o processo de lavagem, compatibilidade com os componentes

do detergente (surfactantes, perfumes e branqueadores), boa atividade à temperatura de lavagem e eficiência na remoção de manchas (Naganthran, et al., 2017).

Uma enzima para ser adicionada à formulação de um detergente precisa ser também estável na presença de agentes oxidantes e branqueadores. Esta demanda tem direcionado o interesse industrial para o uso da engenharia de proteínas, que envolve a mutação sítio-dirigida ou randômica, para a obtenção de enzimas modificadas com uma maior estabilidade (Maurer, 2004).

A aplicação de enzimas no mercado de detergentes para tecido visa melhorar a eficiência no processo de remoção de manchas específicas. As enzimas, por serem biodegradáveis e reduzirem os impactos ambientais dos detergentes, podem ser consideradas surfactantes naturais. A alta eficiência dos detergentes com enzimas também pode proporcionar o uso de ciclos de lavagem mais curtos e em mais baixas temperaturas, com consequente redução no uso de energia e de água (Souza; et al., 2017).

2.4 Detergentes biodegradáveis

Biodegradável foi definido como o processo de decomposição rápida como resultado da ação de microrganismos (Jan, 2007). Como resultado das preocupações com o meio ambiente, há um interesse crescente no uso de materiais biodegradáveis. A baixa biodegradabilidade de alguns surfactantes (por exemplo, alquil benzeno sulfonato linear, tradicionalmente usado para a produção de detergente) sob a condição anaeróbia pode as vezes resultar em uma alta carga de lodo de surfactante (Leon, et al., 2006). Portanto, a necessidade de fonte de um detergente facilmente biodegradável é primordial. Um detergente biodegradável é aquele obtido de recursos biologicamente renováveis e é capaz de se decompor pela ação de agentes como bactérias (Bhairi, 2001). As principais fontes de detergentes biodegradáveis são gorduras e óleos naturais polímeros. Pesquisas sobre a biodegradabilidade de detergentes à base de alquila mostraram que as moléculas são indigeríveis para as bactérias da decomposição. Detergentes derivados de óleo vegetal contêm alquilsulfonato linear de cadeia direta, tornando-os adequados para a produção de detergentes (Isah, 2006). No começo, a substância ativa mais comum entre os detergentes era alquilbenzeno sulfonato

(ABS) como uma substância química não biodegradável (Chio et al., 1992). De acordo com a literatura, a estabilidade em longo prazo de substâncias não biodegradáveis na composição de detergentes cria espuma no ambiente que se expande com recursos hídricos e eólicos e, em última análise, pode transmitir poluição para caminhos longos (Sutili et al., 2009).

Na Europa e nos Estados Unidos a proibição do uso de detergentes sintéticos de cadeia ramificada começou em 1965, desde então os problemas relacionados às estruturas ramificadas nas suas moléculas (Kogawa et al., 2017). No Brasil, apenas em 1977, foi apresentado um decreto que proibia a fabricação, comercialização ou importação de saneantes de qualquer natureza, contendo tensoativo aniônico, não biodegradável (Brasil, 1977). Em 1985, surgiu uma lei na qual as indústrias só poderiam produzir detergentes não poluentes, e nela também contém a proibição de importação de detergentes não biodegradáveis (Brasil, 1985 e DeSimone 2002).

O alquilbenzeno sulfonato (ABS), principal surfactante aniônico sintético foi substituído em vários países por surfactantes biodegradáveis como o sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS) que é um surfactante aniônico biodegradável somente em condições aeróbicas (Penteado et al., 2006). Na literatura mencionada, a degradabilidade do LAS é de 97% a 99% (Henau et al., 1989). O mecanismo de separação de LAS envolve a degradação direta de grupos alquil e sulfonato e, finalmente, anel de benzeno (Perales et al., 1999). As cadeias lineares de alquilbenzenossulfonato de sódio são os componentes mais comuns de detergentes sintéticos aniônicos. A maior parte desses compostos é sulfonato de dodecilbenzeno de sódio, que é aceito como um detergente aniônico biodegradável padrão (Kemmeri et al., 2007).

2.5 Adjuvantes de limpeza

2.5.1 Surfactantes

Surfactante é uma abreviação de “surface active agent”, termo que significa, literalmente, agente de atividade superficial. Outro termo em português que designa o mesmo tipo de substância é tensoativo. São utilizados em larga escala por diversos setores industriais além da indústria de detergentes, tais como

a indústria têxtil, alimentar, tintas, e na biotecnologia, como auxiliares de biocatálise e métodos bioquímicos de análise e purificação (Martins, 2009). Em detergentes domésticos, o surfactante talvez seja o ingrediente mais importante, abrangendo entre 15% e 40% do total de uma formulação. De acordo com o grupo da cabeça polar, os surfactantes podem ser classificados como aniônicos, não-iônicos e catiônicos (Yangxin, Jin e Bayly, 2008). Porém, a indústria não utiliza somente um tipo de surfactante específico, mas sim uma mistura das diferentes categorias para reforçar a sua capacidade de desempenho, melhores propriedades antirredeposição, tolerância à dureza da água e para diminuir a agressividade à pele das mãos, quando lavadas manualmente (Yangxin, Jin e Bayly, 2008). Independente de sua classificação, todos têm uma semelhança molecular comum. Uma das extremidades da molécula tem uma cadeia longa não polar que é atraída pelo óleo e sujidades (hidrofóbico), enquanto a outra extremidade é atraída pela água (hidrófilo), como mostrado na Figura 1.

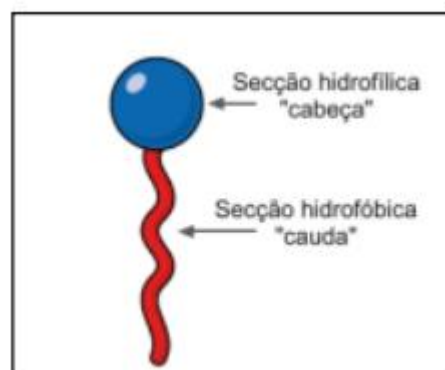


Figura 1. Molécula que constitui um surfactante (Martins, 2009).

Deve-se notar que um agente tensoativo pode ser um sabão ou surfactante sintético. Os sabões são usados há séculos por serem feitos de materiais naturais, como gorduras animais e soda cáustica. Surfactantes sintéticos são os tensoativos de escolha para quase todos os agentes de limpeza (Essential Industries, 2013).

Outra característica fundamental é a formação de agregados denominados micelas. A concentração mínima para que isto ocorra chama-se Concentração Micelar Crítica (CMC). A partir dessa concentração, ocorre a formação de agregados, onde a porção hidrofóbica da molécula se posiciona para o interior do

agregado, enquanto a porção hidrofílica permanece no exterior. Abaixo da CMC, o surfactante encontra-se na forma de monômeros. Ao se aproximar da CMC, já ocorre um equilíbrio entre monômeros e micelas e em concentrações superiores a CMC o diâmetro das micelas aumenta (3-6 nm), sendo estas formadas por 30 a 200 monômeros. A CMC depende da estrutura do surfactante, do tamanho de sua cadeia do hidrocarboneto e de condições experimentais (força iônica, temperatura, etc.) (Barros et al., 2007; Behring et al., 2004; Maniasso, 2001). Suas propriedades fazem com que sejam aplicados amplamente na indústria como agentes detergentes, emulsificantes, lubrificantes, espumantes, molhantes, solubilizante e de dispersor de fases (Penteado et al., 2006; Nitschke e Pastore, 2002).

Os surfactantes aniônicos apresentam em sua cadeia hidrofílica componentes aniônicos, normalmente sulfato, sulfonato e carboxilato (Maniasso, 2001), são muito utilizados na indústria de detergentes de uso doméstico, lavanderias, indústrias têxtil e de papel e funcionam muito bem em pH alcalino (entre 9 e 11) (Novozymes, 2002).

Os surfactantes catiônicos possuem moléculas carregadas positivamente na sua porção hidrofílica, são aminas primárias, secundárias e terciárias e os sais de amônio quaternário. São utilizados na indústria têxtil, no revestimento de estradas, no amaciante de roupas e condicionadores de cabelo. Tem como exemplo o brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) e o brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) (Luz, 2007; Preté, 2006).

Os surfactantes anfóteros possuem componentes catiônico e aniônico, em sua porção hidrofílica, são suaves e compatíveis com enzimas, mas apresentam alto custo. São utilizados em produtos de higiene pessoal, a indústria de automóveis e limpeza industrial. Tem como exemplo as betaínas (Luz, 2007; Preté, 2006).

Os surfactantes não iônicos possuem seu componente hidrofílico não ionizado e apresentam valores de CMC menores, em comparação com surfactantes aniônicos. São utilizados em cosméticos, defensivos agrícolas, no tratamento de metais, nas indústrias têxtil e de petróleo como exemplo, o Renex e o Triton (Luz, 2007).

Desde o seu desenvolvimento nos anos 60, o alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) tem sido um excelente surfactante aniônico obtido sinteticamente, que além de barato é absolutamente fundamental para detergentes. Porém, é

biodegradável somente em condições aeróbicas (Science in the Box, 2013).

RENEX 95 é um tensoativo não iônico cuja parte hidrófoba da molécula é proveniente do nonilfenol e a parte hidrófila é resultante da cadeia de óxido de etileno. Com o aumento do grau de etoxilação, aumenta-se a hidrofilia da molécula (maior HLB4), alterando-se sua solubilidade em água, seu poder espumante, sua molhabilidade e detergência, permitindo que o produto seja utilizado como emulsionante, detergente, solubilizante, umectante e desengraxante (Galembek, 1996).

O Triton X-100 é um surfactante não-iônico (sem cargas elétricas), resistente à dureza da água e excelente desengordurante. Responsável também pela reação de impedimento estérico, evitando a redeposição de sujeira nos tecidos durante a lavagem. São considerados baixos ou moderados geradores de espuma (Science in the Box, 2013).

2.6 Biossurfactantes

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (Banat et al., 2000).

Os biossurfactantes possuem as mesmas propriedades dos surfactantes convencionais, com o diferencial de serem unicamente produzidos por organismos vivos. As bactérias são destaque nessa produção, principalmente aquelas encontradas em lugares considerados extremos em relação à sobrevivência, como por exemplo as bactérias que se desenvolvem em ambientes contaminados por poluentes. Isso trouxe uma nova possibilidade na aplicação desses surfactantes de origem biológica dentro da área de biorremediação, já que possuem os benefícios das suas propriedades ao acelerar a reação de degradação dos contaminantes. Podem ser produzidos com o auxílio das tecnologias de produção de microrganismos propiciadas pela biotecnologia (Mulligan et al., 2005).

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídios) e também no organismo humano (sais biliares), sendo considerados biossurfactantes (Nitschke e Pastore 2002).

Nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que nos países em desenvolvimento os compostos de origem natural predominam. Entretanto, nos países industrializados existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Esta tendência é movida pela necessidade de produtos mais brandos, pela necessidade de substituição de compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados) e pelo aumento da especificidade dos produtos (Bognolo, 1999).

Os biossurfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (Cameotra; Makkar, 1998).

É importante salientar que biossurfactantes são produzidos geralmente na forma de uma mistura de homólogos, cuja composição depende da cepa utilizada, das condições e da idade da cultura. Assim como a sua composição pode variar, as propriedades físico-químicas também são bastante variáveis e dependem diretamente da composição da mistura de homólogos (Krieger et al., 2010). Tem sido demonstrado que diversas cepas de *B. licheniformis* são capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana (Tabela 1).

Tabela 1: Principais tipos de biossurfactantes produzidos pelo gênero *Bacillus*

Tipo de biossurfactante	Microrganismo	Referências
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>	SUZUKI <i>et al.</i> , 1965
Surfactina	<i>B. subtilis</i>	ARIMA <i>et al.</i> , 1968
Subtilisina	<i>B. subtilis</i>	BERNHEIMER <i>et al.</i> , 1970
Cerexina	<i>B. cereus</i>	SHOJI <i>et al.</i> , 1975
Gramicidina	<i>B. brevis</i>	MARAHIEL <i>et al.</i> , 1979
Liquenisina	<i>B. licheniformis</i>	JAVAHERI <i>et al.</i> , 1985
Fengicina	<i>B. subtilis</i>	VANITTANAKOM <i>et al.</i> , 1986
Surfactina	<i>B. pumilus</i>	MORIKAWA <i>et al.</i> , 1992
Surfactina	<i>B. coagulans</i>	HUSZCZA <i>et al.</i> , 2003
Ramnolípídeo	<i>B. subtilis</i>	CHRISTOVA <i>et al.</i> , 2004
Surfactina	<i>B. atropheus</i>	NEVES <i>et al.</i> , 2007
Bamilocina	<i>B. amyloliquefaciens</i>	LEE <i>et al.</i> , 2007
Lipopeptídeo	<i>B. circulans</i>	DAS <i>et al.</i> , 2008
Glicolípídeo	<i>B. megaterium</i>	THAVASI <i>et al.</i> , 2008

2.6.1 Produção de biossurfactantes pelo gênero *Bacillus*

Bactérias produtoras de biossurfactantes têm sido isoladas do solo, da água marinha, de sedimentos do mar e áreas contaminadas por óleos. Diversas evidências indicam que os biossurfactantes são produzidos em grande quantidade nestes ambientes. Uma delas é a presença de espuma e emulsões em áreas de derramamento de óleos em oceanos (Barros *et al.*, 2007).

Bacillus licheniformis, sob circunstâncias aeróbicas e anaeróbicas, na presença de elevada salinidade e temperatura, produz um lipopeptídeo com atividade surfactante (lichenisina) com excelentes propriedades interfaciais (Folmsbee *et al.*, 2006; Batrakov *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 1998). A produção deste biossurfactante ocorre durante a fase exponencial de crescimento das células tanto aeróbica quanto anaerobicamente (Mohammad *et al.*, 1985).

De acordo com Bernardo *et al.*, 2020, o *Bacillus* sp. SMIA-2 a partir da análise do genoma foi evidenciado a presença de genes responsáveis pela produção de compostos bioativos como a lichenisina, que tem propriedades biossurfactantes e através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes.

2.7 Esporos de *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias aeróbicas e gram-positivas que formam endósporos, resistentes a condições ambientais adversas tais como calor e dessecação, sendo tipicamente representados por células aeróbicas móveis por flagelos, mas podem também crescer em ambientes anaeróbicos (Madigan et al., 2010). A maioria é mesófila, com temperatura ótima entre 30 e 45°C, porém o gênero contém um número de termofílicos representativos que crescem a temperaturas de 65°C ou mais altas. Além disso, também são capazes de crescer sob condições extremas de pH e, por isso, originam produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (Madigan et al., 2010).

O gênero *Bacillus* quando expostos a condições não favoráveis, como calor, dessecação e falta de nutrientes, formam esporos que podem aumentar a sua sobrevivência e conseqüentemente aumentar a sua resistência no meio ambiente (Polonca, 2020). Podem ser classificados em três grupos, segundo a morfologia do esporo e do esporângio em: grupo 1 (formado por bacilos Gram-positivos que apresentam esporo central ou terminal; esféricos ou ovoides; não deformam a célula; grupo 2 (constituído de espécies Gram-variáveis; apresenta esporo oval, central ou terminal que deformam a parede celular); e grupo 3 (caracterizado por bacilos Gram-variáveis; apresentam um esporo esférico terminal ou subterminal que deformam a parede celular) (Gomes, 2013). Geralmente são encontrados no solo e apresentam amplas habilidades fisiológicas, permitindo que o organismo cresça em todos os ambientes e dispute com outros organismos devido à sua capacidade de formar esporos extremamente resistentes e produzir metabólitos com efeitos antagônicos para outros microrganismos (Amin et al., 2015).

Esporos são estruturas metabolicamente quiescentes e extremamente resistentes, produzidas pelas células vegetativas em resposta a condições ambientais adversas. Eles podem sobreviver neste estado de dormência por longos períodos de tempo, resistindo a diversas condições estressantes, como radiação ultravioleta, produtos químicos tóxicos (como peróxido e hipoclorito), altas temperaturas, desidratação e falta de nutrientes (Dricks, 1999; Henriques; Moran, 2000; Nicholson et al., 2000). Embora o tempo de vida útil do esporo seja desconhecido, alguns pesquisadores encontraram esporos viáveis em amostras com idade variando entre décadas há milhares de anos (Kennedy; Reader;

Swierczynski, 1994).

A esporulação consiste em um processo de diferenciação celular que, inicia-se na fase estacionária quando os nutrientes encontram-se esgotados: a célula vegetativa replica seu DNA e se divide assimetricamente, distribuindo as cópias do seu genoma nos dois compartimentos. O menor dos compartimentos (o pré-esporo) é engolfado pela célula mãe, produzindo uma estrutura de membrana dupla. Ao longo do processo, ocorre a formação do córtex e a síntese e deposição de proteínas que formaram a capa do esporo. Após 8 a 10 horas, o esporo maduro pode ser liberado para o ambiente por meio da lise da célula mãe e, na presença de nutrientes, será capaz de germinar rapidamente, originando uma célula vegetativa (Duc et al., 2004; Mckenney; Driks; Eichenberger, 2013).

A habilidade do esporo de sobreviver em condições ambientais drásticas está relacionada, em parte, com a presença de uma estrutura proteica, a capa, que envolve o esporo (Figura 2). Ao menos 70 proteínas diferentes (as proteínas Cot) formam esta estrutura de múltiplas camadas, composta pela parte basal, interna, externa e pela crosta, sendo que esta última foi apontada como a camada mais externa do esporo (Imamura et al., 2011; Mckenney; Driks; Eichenberger, 2013).

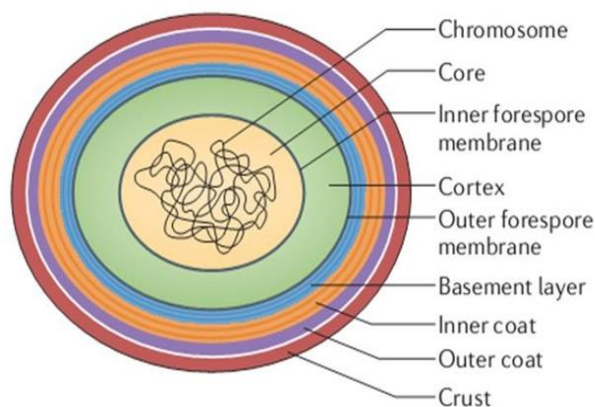


Figura 2. Representação esquemática da estrutura do esporo de *B. subtilis*. As múltiplas camadas do esporo servem para proteger o genoma, que está localizado no núcleo do esporo (core). O core encontra-se protegido pelo córtex (verde), pela camada basal (azul), capa interna (laranja), capa externa (roxo) e crosta (vermelho). Modificado de McKenney; Driks; Eichenberger, 2013.

2.8 Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria mesófila gram-positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa. O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcae, juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. O gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Geralmente, esse gênero faz parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos. As cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH = 7, à temperatura ótima de 37°C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes. A coloração dessas colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado, não chegando a ser formada nos casos de crescimento em condições anaeróbicas, ou na cultura em caldo. Em placas de ágar sangue, um halo de hemólise desenvolve-se em torno das colônias formadas (Cassettari et al., 2005, Trabulsi; Altherthum, 2005). Outro meio importante para a identificação do *S. aureus* é o ágar manitol-sal, seletivo para essa espécie, uma vez que o *S. aureus* consegue fermentar o manitol, produzindo ácido láctico. Essa espécie se desenvolve também na presença de 7,5% de NaCl, que estimula a produção de coagulase, enzima que caracteriza a espécie (Cassettari et al., 2005, Koneman et al., 2005).

Em alimentos, a presença do *S. aureus* pode indicar contaminação pela pele, boca, fossas nasais dos manipuladores do alimento, introduzidos diretamente por lesões infectadas nas mãos e braços ou por tosse e espirros, comuns nas infecções respiratórias (Fueyo, 2005). O *S. aureus*, apesar de não sobreviver aos tratamentos térmicos, é um conhecido produtor de enterotoxinas termoestáveis causadoras de toxinfecções alimentares. Os sintomas decorrentes de intoxicações costumam aparecer poucas horas após a ingestão e são caracterizados por náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia sem febre (Dinges; Orwin; Schlievert, 2000). Podem ocorrer também dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, ainda, febres, quando a quantidade de toxina for elevada. Quando há choque e desidratação, é necessária a hospitalização para a reposição de fluidos e eletrólitos (Herrera et al., 2007).

O *S. aureus* tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares, como coagulase, termonuclease e lipase, consideradas fatores de virulência, sendo

também empregadas para a sua identificação entre outras espécies de *Staphylococcus*. O *S. aureus* é um microrganismo constituinte da microbiota humana e a contaminação ocorre, principalmente, por fonte humana, animal ou ambiental (Madani, 1998).

A resistência do *S. aureus* aos antibióticos tem sido desenvolvida por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie (ou até de outras). Geralmente, a resistência que ocorre por mutação gera uma alteração no sítio de ação do antibiótico, enquanto a resistência por aquisição de genes de resistência frequentemente envolve a inativação ou a destruição da droga, sendo transmitida por plasmídeos e transposons (Bernard et al., 2004, Lima et al., 2005, Tavares, 2002).

2.9 Biofilmes microbianos

Biofilmes são arquiteturas microbianas complexas que se fixam em superfícies e envolvem microrganismos em uma matriz composta de substâncias poliméricas extracelulares hidratadas autoproduzidas. Os biofilmes são grupos de células, aderidas a uma superfície e entre si, embebidas por uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas produzidas pelos próprios microrganismos. Com a finalidade de aumentar as chances de sobrevivência em um determinado meio, agem como uma barreira de filtragem, gerando uma penetração reduzida de agentes antimicrobianos (Azevedo e Cerca, 2012). As células do biofilme se comunicam entre si (quorum sensing) por meio de moléculas químicas, estimulando o processo de multiplicação e crescimento do grupo. Quando o ambiente é favorável e há nutrientes suficientes ou, determinando a redução do metabolismo celular, quando há ausência de nutrientes ou excesso de metabólitos tóxicos (McDougald et al., 2012).

O biofilme pode apresentar uma ou mais espécies de microrganismos, dependendo do tempo de duração e localização. Entretanto, quando o local da colonização está normalmente exposto a vários microrganismos, é comum biofilme multiespécie, tal como acontece em lugares com baixa higiene podendo envolver bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, vírus ou outros elementos celulares (Arciola et al., 2015).

O biofilme tem um papel importante na patogênese das infecções

estafilocócicas. Os estafilococos aderem, colonizam e infectam superfícies bióticas, como tecidos ou superfícies abióticas, que podem atuar como um substrato para adesão microbiana causando disseminação bacteriana, formando biofilme que é um glicocálice semelhante a limo, no qual uma comunidade sésil de microrganismos se insere. Esta substância polimérica extracelular que é constituída por matriz de polissacarídeo, ácidos teicoicos, DNA extracelular (eDNA) e proteínas estafilocócicas é produzida por microrganismos produtores de biofilme (Archer et al., 2011). O biofilme faz com que as bactérias sobrevivam em condições de estresse, como danos UV, toxicidade de metais, condições anaeróbicas, exposição a ácidos, salinidade, gradientes de pH, dessecação, bacteriófagos e amebas e resistem a antibióticos, antimicrobianos e defesa imunológica do hospedeiro (Archer et al., 2012).

Quando a colonização acontece em um local que normalmente é estéril, mas foi exposto ao microrganismo, provavelmente irá ocorrer a formação de biofilme de uma única espécie (Azevedo e Cerca, 2012).

A formação de biofilme bacteriano é um processo complexo e multifatorial. O processo de formação do biofilme consiste na fase de aderência, agregação e dispersão (Otto, 2013). A formação de biofilme começa com a aderência da bactéria a uma superfície que atua como um substrato para a adesão microbiana com a agregação formada pela adesão célula-célula (Kuroda, 2008). A agregação é mediada pela síntese de adesão intercelular de polissacarídeo e é formada em aglomerados de células até a formação de biofilmes estruturados em múltiplas camadas. A fase de dispersão de microrganismos do biofilme pode ser causada pelas próprias bactérias, como a degradação enzimática da matriz do biofilme, como a dissolução de adesinas por proteases, nucleases e um grupo de pequenos peptídeos anfifílicos α -helicoidais, conhecidos como modulinas solúveis em fenol funcionando como surfactantes (Speziale et al., 2014) e detecção de quorum ou por forças externas, como forças de cisalhamento de fluido, corrosão e intervenção humana (Kaplan, 2010).

As enzimas presentes nos produtos de limpeza têm um papel importante na remoção de biofilmes microbianos, uma vez que desestabilizam as proteínas, polissacarídeos, lipídios e outras substâncias que fazem parte da sua composição. Em biofilmes, os microrganismos se tornam muito mais resistentes a tratamentos antimicrobianos, condições ambientais adversas e imunidade do hospedeiro (Li e

Lee, 2017). Portanto, a inclusão de enzimas nos produtos de limpeza facilita a remoção do biofilme, que protege os microrganismos, permitindo uma maior eficácia dos agentes de limpeza. Com o aumento da prevalência da resistência aos antibióticos, enzimas antimicrobianas que visam à ruptura da maquinaria celular bacteriana e a formação de biofilme estão sob intensa investigação (De Cesare et al., 2019).

3. TRABALHOS

3.1 OPTIMIZATION OF SPRAY DRYING CONDITIONS FOR OBTENTION OF DURABLE CELLULASES POWDER*

Erica Cruz^a, Meire Lelis Leal Martins^a

* Parte da tese de doutorado a ser apresentada à UENF e que será submetida à publicação na Applied Biochemistry and Biotechnology.

^a Food Technology Laboratory, Universidade Estadual Do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil.

ABSTRACT

Microbial cellulases have biotechnological potential in various industries, including food, brewery and wine, industrial waste to chemical feedstock, animal feed, pulp and paper, agriculture, textile and as well as in detergent. In this work, after production by *Bacillus* sp. SMIA-2 submerged cultures containing sugar cane bagasse, corn steep liquor and passion fruit rind flour and separation of solids from the fermentation broth, cellulases were dried in order to investigate its stabilization during spray drying and subsequent storage. In this context, the statistical design of the experiment was used to study the combined interactive effect of different concentrations of arabic gum and microcrystalline cellulose and the spray drier inlet temperature on the spray drier process of the cellulases. The results showed that the combination of 1.0 % (w/v) arabic gum with 1.0% (w/v) microcrystalline cellulose and at inlet temperature of 70°C was effective in preserving the activities of both avicelases (avicel-hydrolyzing enzymes) and carboxymethylcellulases (carboxymethylcellulose- hydrolyzing enzymes). The spray-dried avicelase was completely preserved when it was stored at 5 °C, while the CMCase lost about 11% of its activity showing thus, promising capability for industrial uses, especially in detergent formulations.

Keywords: Additives, avicelase, *Bacillus*, carboxymethylcellulase, spray drying.

1.0 INTRODUCTION

Thermophilic cellulases are ideal biocatalysts for modern biotechnology because of their thermostability and better yields under extreme operational conditions (Anbar and Bayer, 2012; Azizi et al., 2015). The wide range of applications of thermophilic cellulases include the food, textile, chemical, pulp and paper industries, laundry detergents, and second generation ethanol production (Singh et al., 2017, Li et al., 2018; Listyaningrum et al., 2018).

Bacillus sp. SMIA-2, a thermophilic and thermostable enzyme-producing bacterium was able to express a promising level of cellulases in submerged cultures employing agricultural byproducts such as sugar cane bagasse and passion fruit rind flour (Costa et al., 2017; Cruz et al., 2019), which opened perspectives to generate high-value products from sustainable production processes. The cellulases from *Bacillus* sp. SMIA-2 has both CMCase (carboxymethylcellulose-hydrolyzing enzymes) and avicelase (avicel-hydrolyzing enzymes) activity; however, the 'cellulases' had a higher activity with avicels (Ladeira et al., 2015).

Cellulases are a heterogeneous group of enzymes that synergistically catalyze the hydrolysis of cellulose, the major component of plant biomass. They can form an enzyme complex known as the cellulosome, in which they are anchored to a common scaffold or they can also act as non-complexed extracellular free cellulase systems (Escuder-Rodríguez et al., 2018). Recently, Bernardo et al., (2020) reported that in the SMIA-2 genome were encoded 5 amylase genes, 13 loci for xylose metabolism, 55 protein degradation-associated loci, and 3 cellulolytic enzyme loci under a putative cellulosome complex. This complexed enzyme system from the SMIA-2 strain may provide great potential for the degradation of plant biomass.

The cellulases produced by *Bacillus* sp. SMIA-2 were capable of functioning at high temperatures and pH levels, retained good stability in the presence of several surfactants, oxidizing agents and locally available detergents (Ladeira et al., 2015; Cruz et al., 2019), which indicated the potential for the use of this bacterium and their cellulases for various industrial applications, such as in the detergent industry.

In order to increase the shelf life, ease storage and transport, reduce

transportation cost and protect the biological activity of enzymes, they are often preserved in dry form. Despite freeze drying (lyophilization) is preferred for products such as enzymes, spray drying is much more economical, as it can process larger volumes and operate with greater energy efficiency (Schutyser et al., 2012; Jesus and Maciel, 2014). Therefore, many attempts are being made to optimize spray dried enzyme formulations with minimal loss of activity. Carbohydrates and polymers are often used as bulking agents and protective additives in this context.

The aim of the present work was to study the combined interactive effect of the gum arabic and microcrystalline cellulose concentrations and the spray drier inlet temperature on the spray drier process of the cellulases produced by cultures of *Bacillus* sp. SMIA-2 containing sugar cane bagasse, passion fruit rind flour and corn steep through Response Surface Methodology (RSM) and strike a balance between them to avoid loss of cellulases activities. In addition, the long-term stability tests were performed during 180 days at 4°C

2.0 MATERIAL AND METHODS

2.1 Organism

The present study used a thermophilic *Bacillus* sp. strain SMIA-2, previously isolated from a soil sample collected in the city of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. (Souza and Martins, 2001).

2.2 Enzyme Production

The culture medium used in this work for cellulases production contained (g/L): KCl - 0.3, MgSO₄ - 0.5, K₂HPO₄ - 0.87, CaCl₂ - 0.29, ZnO - 2.03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O - 2.7x10⁻², MnCl₂.4H₂O - 1.0x10⁻², CuCl₂.2H₂O - 8.5x10⁻⁴, CoCl₂.6H₂O - 2.4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O - 2.5x10⁻⁴, H₃BO₃ - 3.0x10⁻⁴, sugar cane bagasse (SCB) (81.05% cellulose, 18.75% hemicellulose, 5.45% lignine) - 0.3%, commercial corn steep liquor (Sigma Aldrich) - 0.3% and passion fruit rind flour (obtained from a local

market) - 0.3% (Paixão et al., 2016).

The pH was adjusted to 7.2 with 1.0 M NaOH and the medium was sterilized by steam-autoclaving at 121°C, 1 atm for 15 minutes. The medium (50 mL in 250 mL Erlenmeyer flasks) was inoculated with 1 mL of a standard overnight culture (initial number of cells 10^4) and incubated at 50°C in an orbital shaker (Thermo Forma, Ohio, USA) operated at 150 rpm. After 168 h the flasks were withdrawn and the contents were then centrifuged (HERMLEZ 382K, Wehingen, Germany) at 15,500 g for 15 min, at 4 °C, and the cell free supernatant was used as crude enzyme preparation.

2.3 Enzyme Assay

The cellulolytic enzyme activities were determined using the dinitrosalicylic acid method (Miller, 1959), which measures reducing sugars. The reaction mixture containing 0.5 mL of 1% (w/v) substrate solution (carboxymethylcellulose sodium salt or avicel, PH-101) prepared in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, and 0.5 mL of appropriate concentration of enzyme solution, was incubated at 70°C. After 10 min of reaction, 1 mL of dinitrosalicylic acid reagent was added and boiled in water bath for 5 min. The resulting samples were then cooled to room temperature, and the absorbance was measured at 540 nm. When the activity was tested using avicel as substrate, the assay tubes were agitated during the course of the assay to keep the substrate suspended. One unit (U) of activity toward the substrates mentioned above was defined as 1 μ mole of glucose equivalent released per minute under the above assay conditions, by using a glucose standard curve. Appropriate controls were conducted in parallel with all assays. Enzyme blank containing 0.5 mL of 10 mM sodium phosphate buffer and 0.5 mL of 1% (w/v) substrate solution were run. To exclude the background of reducing sugars found in the enzyme supernatant from the results, a substrate blank containing 0.5 mL of 10 mM sodium phosphate buffer and 0.5 mL enzyme solution was also run. The absorbance of the enzyme blank sets and the substrate blank were subtracted from the absorbance of the activity assay. All of the samples were run in triplicate, while the blanks were run in duplicate.

2.4 Spray drying of crude enzyme solution

Spray-dried powders were produced through the atomization of crude cellulase preparation in a lab-scale spray dryer (LAB-PLANT, MODELO SD-04, England). During operation, 100 ml prepared solution was fed at constant rate, 0.44 ml/min with a peristaltic pump to a nozzle, where atomization occurred by means of a pressurized air stream. Drying air entered the drying chamber in the same direction as the descending spray droplets. The process variable was the drier air inlet temperature and the adjuvants concentration (gum arabic and microcrystalline cellulose) as showed in Table 1. The outlet air temperature could not be controlled directly but was a function of the drier inlet temperature and solution feed rate. In all of the experiments the air flow rate was constant. All drying experiments were carried out in duplicates. Gum Arabic (GA) and microcrystalline cellulose (MC) were incorporated into the enzyme solution before spray drying. The dried particles were collected and stored at refrigeration temperature (15°C).

The avicelase and CMCase activities were measured before and after drying. The activity measurement of the cellulases after drying operation was accomplished by dissolving enzymes powder (0.01g.mL⁻¹) and the residual activities (%) determined and compared with the activities of the crude enzymes solutions before drying and without any adjuvants.

2.5 Experimental Design and Statistical Analysis

A central composite design (CCD) 2³ was constructed to evaluate the effects of gum arabic (GA) and microcrystalline cellulose (MC) concentration and the spray drier inlet temperature on Residual cellulases activities (%). The factorial planning had three central points and yielded a total of 17 treatments for each experiment. The factors and factors levels studied are described in Table 1. Optimization of condition was performed using CCD and surface-response was produced with fixed central points of 70°C, 1.0 % (w/v) GA and 1.0% (w/v) MC.

The results were analyzed using the Statistica software system, version 10.0. In this context, the F test was used as a validation criterion of statistical significance of the models obtained at a confidence level of 95%.

The experimental model can be expressed as follows: The experimental model can be expressed as follows: (Equation 1).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^4 \sum_{j=1}^4 b_{ij} x_i x_j$$

equation 1

Where b_0 , b_i , b_{ii} and b_{ij} are the intercept terms, linear, quadratic coefficient and interactive coefficient, respectively, and x_i and x_j are coded independent variables.

2.6 Stability of cellulase powder (%)

After drying, the storage stability of cellulase powders obtained at room temperature and at 5°C was investigated for up to 180 days. Cellulase stability was determined by measuring cellulase activities immediately after drying and every 30 days for up to six months of storage.

2.7. Water activity (a_w)

The water activity was determined in the dried samples by direct reading in an apparatus (water activity meter, HygroLab C1 Bench-Top Indicator, Rotronic AG, Switzerland) after 6 months of storage.

3.0 RESULTS

3.1 Effect of some adjuvants on activity of spray dried cellulases from *Bacillus* sp. SMIA-2

The effect of protective additives, AG, MC and maltodextrin on cellulases activities are showed in Table 1. The spray drier inlet temperature was set to 70°C. The highest avicelase and CMCCase activity preservation was observed at 1% (w/v) MC and 1% maltodextrin, respectively. Although the avicelase presented higher retention of its activity when 1% MC was incorporated to crude enzyme solutions, this adjuvant had a negative effect on CMCCase.

Table 1. Effect of some adjuvants on activity of spray dried cellulases.

Adjuvants (w/v)	Residual activity (%)	
	Avicelase	CMCase
1.0% Maltodextrin	81	134
1.0% Arabic gum	111	85
3.5% Arabic gum	102	72
4.0% Arabic gum	77	70
1.0% Microcrystalline cellulose	119	57

Enzymes activities were expressed as a percentage of the activity level in the crude enzymes extract. (100% avicelase activity = 1.92 U mL⁻¹; 100% CMCase activity= 0.5384 U mL⁻¹).

3.2 Experimental Design and Statistical Analysis

A central composite design (CCD) 2³ was constructed to evaluate the Residual activities (%) of crude cellulases solutions containing different AG and MC concentrations and submitted to spray drying process using different spray drier inlet temperature. According to Table 2, a variation in Residual avicelase activity (%) was observed from 61.40 (Treatment 2) to 104.10 % (Treatments 15, 16 and 17). Similar results were found to CMCase in that the Residual activity of this enzyme was lowest in treatment 2 and highest in treatments 15, 16 and 17. Comparing the parameters studied in these experiments, it seems that the maximum retention of activity for both avicelase and CMCase was obtained when 1.0 % (w/v) AG, 1.0% (w/v) MC and spray drier inlet temperature of 70°C were used.

Table 2. Matrix of CCD 2³ (real and coded values) used and its response (% Residual avicelase and CMCase activity).

Essays	Spray drier inlet temperature (°C)	AG (% w/v)	MC (% w/v)	Residual Activity (%)	
				Avicelase	CMCase
1	58 (-1)	0.4 (-1)	0.4 (-1)	65.30	64.50
2	82 (+1)	0.4 (-1)	0.4 (-1)	61.40	50.00
3	58 (-1)	1.6 (+1)	0.4 (-1)	70.80	66.50
4	82 (+1)	1.6 (+1)	0.4 (-1)	69.40	58.30
5	58 (-1)	0.4 (-1)	1.6 (+1)	81.90	73.40
6	82 (+1)	0.4 (-1)	1.6 (+1)	83.10	78.20
7	58 (-1)	1.6 (+1)	1.6 (+1)	80.60	65.40
8	82 (+1)	1.6 (+1)	1.6 (+1)	85.00	91.30
9	50 (-1.68)	1.0 (0)	1.0 (0)	76.50	61.00
10	90 (+1.68)	1.0 (0)	.0 (0)	83.70	79.40
11	70 (0)	0 (-1,68)	1.0 (0)	69.80	63.10
12	70 (0)	2.0 (+1,68)	1.0 (0)	80.40	65.40
13	70 (0)	1.0 (0)	0 (-1.68)	65.10	52.80
14	70 (0)	1.0 (0)	2.0 (+1.68)	80.60	75.00
15	70 (0)	1.0 (0)	1.0 (0)	103.70	99.80
16	70 (0)	1.0 (0)	1.0 (0)	104.10	101.40
17	70 (0)	1.0 (0)	1.0 (0)	103.90	99.60

Residual activity is expressed as a percentage of crude enzyme solution before drying operation (100% of the avicelase activity = 1.92 U mL⁻¹ and 100% of the CMCase activity = 0.5384 U mL⁻¹).

The statistical significance of the model equation was assessed by an F-test (ANOVA) and the data are shown in Table 2. An equation for Residual avicelase activity (Eq. 2) and Residual CMCase activity (Eq. 3) was developed based on a regression analysis of the following experimental data:

$$Y = 103.8597 + 0.9188 x_1 - 8.3359 x_1^2 + 2.3388 x_2 - 10.0861 x_2^2 + 6.5769 x_3 - 10.8819 x_3^2 + 0.6995 x_1.x_2 + 1.3418 x_1.x_3 - 1.6323 x_2.x_3$$

equation 2

$$Z = 99.9511 + 2.8451 x_1 - 9.6407 x_1^2 + 1.4047 x_2 - 11.7487 x_2^2 + 7.7940 x_3 - 11.8702 x_3^2 + 3.4082 x_1.x_2 + 6.6818 x_1.x_3 - 0.6594 x_2.x_3$$

equation 3

Where x_1 is the Temperature ($^{\circ}\text{C}$), x_2 is the GA and x_3 is the MC concentration.

The outcome of ANOVA analysis revealed that the adjusted model was significant, according to the analysis of the F test. The regression model for Residual activity for both avicelase and CMCCase was highly significant ($p < 0.05$), with a satisfactory value of determination coefficient ($R^2 = 0.9793$ for Residual avicelase activity and $R^2 = 0.9587$ for Residual CMCCase activity) according to Table 3. Thus, it is possible to state that 97.93% and 95.87% of the variability in the Residual avicelase and CMCCase activity response, respectively could be accounted by the model and that it was suitable to represent the real relationship among the independent variables studied (Rodrigues and Lemma, 2014)

Table 3. ANOVA for the variables of response surface quadratic model for Residual activity of avicelase and CMCase.

Variable	Sum of squares	(Degrees of freedom)	Mean square	Fcal	Ftab0.05
Residual avicelase activity					
Regression	3981.75	9	442.41	52.243	3.68
Residues	59.28	7	8.47		
Lack of adjustment	59.18	5	11.83	234.36	19.3
Pure error	0.101	2	0.050		
Total error	4041.02	16			
				R ² =	97.93%
Residual CMCase activity					
Regression	5612.98	9	623.66	24.848	3.68
Residues	175.70	7	25.10		
Lack of adjustment	173.73	5	34.75	35.257	19.3
Pure error	1.97	2	0.98		
Total error	5788.68	16			
				R ² =	95.87%

The response surface and contour plot figures obtained by the analysis of the experimental data of CCD showed a relationship between two variables at time. The non-explicit variables were fixed at the central point (level 0) for the surface construction.

The effect of the interaction between GA concentration and spray drier inlet temperature when the MC concentration remained constant at level 0 (1.0%, w/v) on Residual enzymes activities was depicted in the response surface plot of Fig. 1a and Fig. 1b. The maximal retention of avicelase and CMCase activities were observed when concentrations between 0.75-1.25% (w/v) GA were incorporated to enzymes solutions and spray drier inlet temperature between 65-75°C was used at fixed MC concentration (1.0%, w/v). Higher retention in avicelase and CMCase activity was found when concentrations of MC between 0.75-1.25% (w/v) and spray drier inlet temperature between 65-75°C were used in spray drying process. In addition, when concentrations between 0.75-1.25% (w/v) of both adjuvants, GA and

MC were incorporated at enzymes solutions prior the spray drying process, it was found the maximal retention of avicelase and CMCase activity.

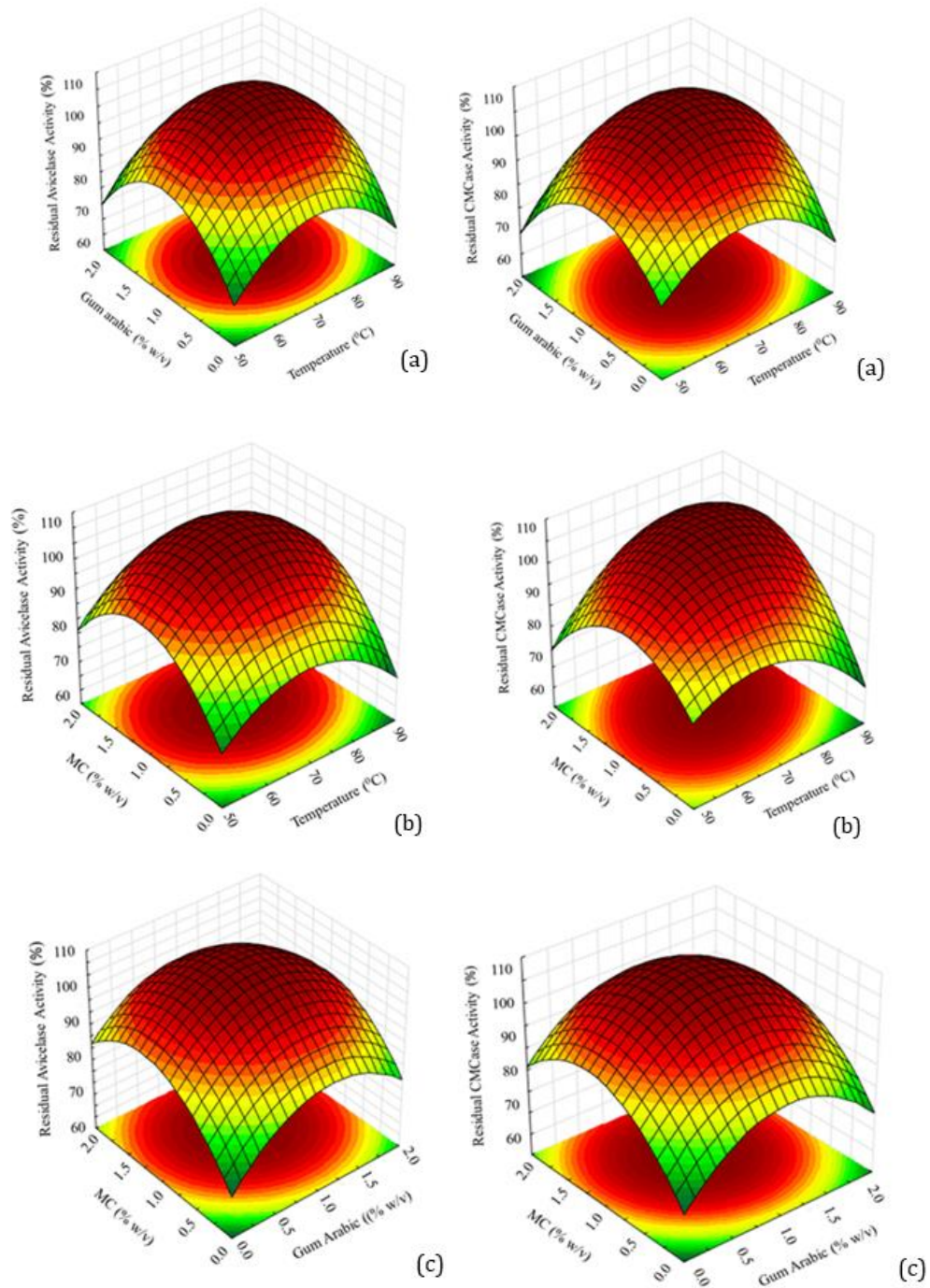


Figure 1. Three-dimensional response surface plots representing effects of (a) - AG concentration (% w/v) and spray drier inlet temperature (°C) on Residual avicelase activity (%) and Residual CMCCase activity (%) at a fixed MC concentration (1.0%, w/v); (b) - Spray drier inlet temperature (°C) and MC concentration (% w/v) on Residual avicelase activity (%) and Residual CMCCase activity (%) at a fixed AG concentration (1%, w/v); (c) - MC concentration (% w/v) and AG concentration (% w/v) on Residual avicelase activity (%) and Residual CMCCase activity (%) at a fixed spray drier inlet temperature (70°C). Dark red color indicates high Residual enzyme activity (%), while green and yellow indicate low Residual enzyme activity (%).

3.3 Effect of storage time on activity of cellulases powder from *Bacillus* sp. SMIA-2

The stability of obtained avicelase and CMCase powders during storage at 5°C and 26°C for up to six months was investigated. The effect of storage time on activity of cellulases after the spray drying process in the presence of 1% (w/v) AG and MC and at spray drier inlet temperature of 70°C is showed in Table 4. The activity of avicelase powder was completely preserved when it was stored at 5 °C, while the CMCase lost about 11% of its activity. When the enzymes powders were stored at 26°C, the avicelase and CMCase lost about 4 % and 16% of their activities, respectively.

Table 4. Effect of storage time on activity of cellulase powders at 5°C and 26°C for up to 6 months.

Time (days)	Residual activity (%)			
	5°C		26°C	
	Avicelase	CMCase	Avicelase	CMCase
0	100 ±0,10	100 ±0,10	100 ±0,10	100 ±0,10
30	99.1* ±0,10	99.3* ±0,10	96 ±0,10	99.7* ±0,10
60	99.1* ±0,12	92.1 ±0,10	95.9 ±0,10	89.3 ±0,10
90	104.0* ±0,15	92.1 ±0,10	96.5 ±0,10	89.6 ±0,10
120	103.5* ±0,10	92.2 ±0,10	96.9 ±0,10	89.6 ±0,10
150	103.1* ±0,14	90.8 ±0,10	96.0 ±0,10	89.1 ±0,10
180	103.1* ±0,12	89.3 ±0,10	96.0 ±0,10	83.9 ±0,10

* (No Activity Loss).

3.4 Water activity (aw) of the cellulase dried formulations

The water activity (aw) of the cellulase dried formulations is also showed in Fig. 2. Values below 0.6 were obtained for all formulations, indicating their potential for storage. The values of aw could indicate the possibility of microorganism growth and toxin production. According to Beuchat (1981) water activity values above 0.6 could promote microorganism growth and above 0.8 facilitate toxin production.

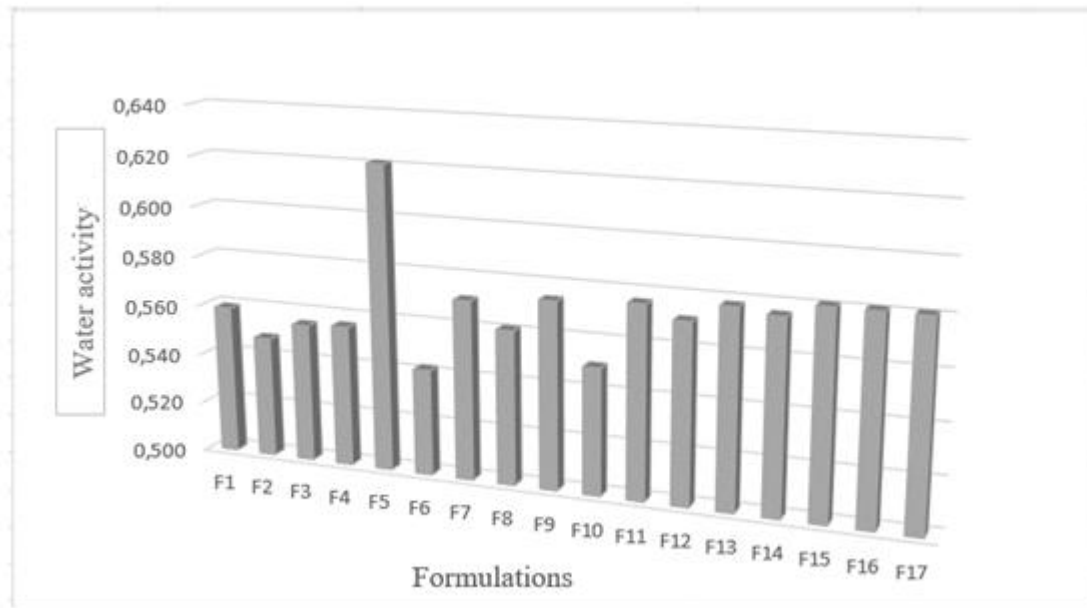


Figure 2. Effect of six months of storage on the cellulase the water activity (aw) of the powder.

4.0 DISCUSSION

Considering the great industrial relevance of thermostable cellulases produced by *Bacillus* sp. SMIA-2, an attempt was done to increase their shelf life by using the spray drying process. The cellulases produced by *Bacillus* sp. SMIA-2 presented suitable properties to be used as an additive in detergent formulation such as to be active and stable at alkaline pH and high temperatures, with surfactants and organic solvents (Ladeira et al., 2015). However, for application in detergent industry the cellulases also should be suitable for long term storage.

The cellulases recovered from SMIA-2 strain were not purified before spray drying process because of their high cost. During the purification process ligand and/or proteins that have a protective effect on the crude enzyme could be removed and consequently, the enzyme properties could modify in such way that their kinetic and thermodynamic behaviour could also be different (Cavalcante et al., 2013). In addition, several industrial processes are carried out using enzymes in the presence

of impurities that originate from culture supernatants, as its use for detergent formulations (Niyonzima, 2018).

The response surface methodology (RSM) is a convenient method for obtaining the optimized condition when dealing with multiple variables as it minimizes the number of trials. In the present work, the combined interactive effect of different concentrations of AG and MC and the spray drier inlet temperature on the spray drier process of the cellulases was optimized through Response Surface Methodology (RSM) in order to obtain maximal retention of the enzymes. The range and levels of the AG and MC were chosen based on preliminary studies and taking into account the best condition for avicelase (avicel-hydrolyzing enzymes), since this enzyme was present in the supernatant in higher amounts than the CMCCase. According to Ladeira et al. (2015), the cellulases secreted by the strain SMIA-2 were categorized as predominantly exoglucanases with complementary and lower endoglucanases activities.

The spray drying of cellulases was affected by the AG and MC concentrations and air inlet temperature. It has been reported that the enzyme activity is partially lost during spray drying may be due to thermal denaturation. According to Ladeira et al. (2015), the optimum temperature for avicelase and CMCCase activity was 70°C, and at 80°C, the activity of avicelase was still suitable, but CMCCase activity decreased sharply. Thus, it seems that only at higher temperatures the cellulases activities will be lost. In fact, when higher temperatures (> 90 °C) were used in the spray drying process, there was a loss in the activities of cellulases. To reduce the degree of activity loss of an enzyme during drying, stabilizing agents e.g. carbohydrates can be used (Alloue et al., 2007). In this context, in an attempt to minimize the thermal denaturation leading to the loss of cellulases activities, a combination of different concentrations of microcrystalline cellulose and arabic gum was added to enzymes solutions prior to spray drying process. When concentrations between 0.75-1.25% (w/v) of both adjuvants, AG and MC were incorporated at enzymes solutions and the inlet temperature was fixed at 70°C the maximal retention of avicelase and CMCCase activity was obtained. Microcrystalline cellulose is often used in spray drying enzymes due to its low cost and volume properties (Bae and Lee, 2008). As microcrystalline cellulose has low emulsifying capacity, usually it is combined with other additives such as gum arabic due to its excellent emulsification properties (Lee et al., 2018).

The spray drying process of cellulases in the presence of 1.0 % (w/v) AG, 1.0% (w/v) MC and at inlet temperature of 70°C preserved the activities of the enzymes. The activity of avicelase powder was completely preserved when it was stored at 5 °C for up to six months and lost only 4% when stored at 26°C. However, the CMCCase activity dropped (16%) when the spray-dried enzyme was kept at 26°C. Therefore, by storing the enzymes at low temperatures it was possible to extend the shelf life of both avicelase and CMCCase.

5.0 CONCLUSION

The study showed that the spray drying process used in this work was effective to dehydrate the cellulases recovered from the submerged cultures of *Bacillus* sp. SMIA-2, maintaining good enzymatic activity when storage at 5°C for 180 days, which will be very useful for industrial uses, especially in detergent formulations.

6.0 REFERENCES

- Anbar, M., Bayer, E. A. (2012). Approaches for improving thermostability characteristics in cellulases. *Methods in Enzymology*, 510, 261–271. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00014-8>.
- Azizi, M., Hemmat, J., Seifati, S. M., Torktaz, I., Karimi, S. (2015). Characterization of a thermostable endoglucanase produced by *Isosphaera variabilis* sp. IDAH9. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4) , 1225-1234. doi:<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246420140846>.
- Bae, E. K., Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(2) ,549-560. doi:[https://dx. doi:10.1080/02652040802075682](https://dx.doi.org/10.1080/02652040802075682).
- Bernardo, S.P.C., Rosana, A.R.R, Souza, A.N., Chiorean, S., Martins, M.L.L., Vederasb, J.C. (2020). Draft Genome Sequence of the Thermophilic

Bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an Antimicrobial- and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil. *Microbiology Resource Announcements*, 1-3. doi:http://doi:10.1128/MRA.00106-20.

- Beuchat, L.R. (1981). Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World*, 26(7), 345-349.
- Costa, E. A., Fernandes, R. N., Cruz, E., Moraes, L. P., Carvalho, R. V., Martins, M. L. L. (2017). Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2, 1-8. doi:https://doi:10.23880/OAJMB-16000115.
- Cruz, E., Moraes, L.P., Costa, E.A., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2019). Optimization of Food-Waste Based Culture Medium for Cellulase Production by Thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and effect of Divalent Metal Ions on Activity and Stability of the Enzyme at Higher Temperatures. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS)* , 6, 331-337. doi:https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.6741.
- Escuder-Rodríguez, J. J., DeCastro, M. E., Cerdán, M. E., Rodríguez-Belmonte, E., Becerra, M., González-Siso, M. I. . (2018). Cellulases from Thermophiles Found by Metagenomics. *Microorganisms*, 6 (3), 66. doi:https://doi.org/10.3390/microorganisms6030066.
- Jesus, S. S., Maciel Filho, R. . (2014). Drying of α -amylase by spray drying and freeze-drying - a comparative study. . *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(3), 625-631. doi: https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002642.
- Ladeira, S. A., Cruz, E., Delatorre, A. B., Barbosa, J. B., Martins, M. L.L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 110-115. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008.
- Lee, J.K.M, Taip, F.S., Abdullah, Z. . (2018). Effectiveness of additives in spray drying performance: a review. . *Food Research* , 486 - 499. doi: https://doi:10.26656 / fr.2017.2 (6) .134.
- Li, W., Ji, P., Zhou, Q., Hua, C., Han, C. (2018). Insights into the Synergistic Biodegradation of Waste Papers Using a Combination of Thermostable Endoglucanase and Cellobiohydrolase from *Chaetomium thermophilum*. *Molecular Biotechnology*, 60(1), 49-54. doi:https://doi.org/10.1007/s12033-017-0043-6.
- Listyaningrum, N. P., Sutrisno, A., Wardani, A. K. (2018). Characterization of thermostable cellulase produced by *Bacillus* strains isolated from solid waste of carrageenan. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.*, pp. 1 – 7. doi:https://DOI:10.1088/1755-1315/131/1/012043.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426-428. doi:https://DOI:10.1021/ac60147a030.
- Niyonzima, N.F. (2018). Detergent-compatible bacterial cellulases. *Journal of Basic Microbiology*, 1-14. doi:https://doi.org/10.1002/jobm.201800436.

- Paixão, S.M., Ladeira, S.A., Silva, T.P., Arez, B.F., Roseiro, J.C., Martins, M.L.L., Alves, L. (2016). Sugarcane Bagasse Delignification with Potassium Hydroxide for Enhanced Enzymatic Hydrolysis. *Royal Society of Chemistry - RSC Advances*, 6, 1042–1052. doi:<https://doi.org/10.1039/C5RA14908H>.
- Rodrigues, M.I., Lemma, A.F. (2014). *Planejamento de Experimentos e Otimização de processos*. (3. Ed., Ed.) Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade, Fé e Amor. Fonte: ISBN:85-98389-03-X.
- Schutyser, M.A.I., Perdana, J., Boom, R.M. (2012). Single droplet drying for optimal spray drying of enzymes and probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 27(2), 73-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.05.006>.
- Singh, B., Bala, A., Dahiya, S., Satyanarayana, T. (2017). Production, characteristics and potential applications of the cellulolytic enzymes of thermophilic moulds. *Kavaka*, 48(2), 47-58. doi:ISSN: 0379-5179.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 271-275. doi:<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>.

3.2 COMPATIBILITY STUDY WITH DETERGENT INGREDIENTS AND WASHING PERFORMANCE BY *Bacillus* sp. SMIA-2 CELLULASES*

Erica Cruz¹, Meire Lelis Leal Martins¹

* Parte da tese de doutorado a ser apresentada à UENF e que será submetida à publicação na *Biochemical Engineering Journal*.

¹ Food Technology Laboratory, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil.

ABSTRACT

Enzymes with greater thermostability and alkaline stability have become the main choice as detergent additives. Microbial cellulases, especially from *Bacillus* spp., are being used as supplements compatible with detergents by several industries to improve the softness of the fabric and preserve its quality. The process is environmentally friendly and the use of cellulases decreases the use of toxic detergents that are dangerous to humans. In this work, the statistical design of the experiment was used to determine the range of the best the concentrations of a mixture of three components: *Bacillus* sp. SMIA-2 cellulase, Triton X-100, Renex 95, and Hydrogen peroxide (H₂O₂), in an attempt to formulate an environmentally correct additive in detergent formulation. The results showed that the combination of 1% (w / v) cellulase with 10% (w / v) Triton X-100, Renex 95 and H₂O₂ was effective in removing grease from pieces of tissue, demonstrating that cellulase from *Bacillus* sp. SMIA -2 can be effectively incorporated into cleaning formulations together with Triton X-100, Renex 95 and hydrogen peroxide to formulate more sustainable detergents.

Keywords: *Bacillus*; cellulase; detergent compatibility.

1.0 INTRODUCTION

Bacillus sp. SMIA-2 is a Gram-positive, aerobic, thermophilic, spore-forming bacterium capable of producing thermostable enzymes such as proteases (Silva et al., 2007), amylases (Carvalho et al., 2008a, b), pectinases (Andrade et al., 2011) and cellulases (Oliveira et al., 2014; Ladeira et al., 2015). The bacterium was isolated from a soil sample collected in Campos dos Goytacazes city, Rio de Janeiro, Brazil. Phylogenetic analysis showed that this strain is a member of the *Bacillus* rRNA group 5 (Souza and Martins, 2001). However, Bernardo et al. (2020) based on the whole genome sequence analysis revealed that SMIA-2 clustered with the type strain *Bacillus licheniformis* Gibson 46 (ATCC 14580T) at 100% similarity. According to these authors, the thermostable enzymatic activities of SMIA-2 could be supported by gene inventories including five amylase genes; 13 loci for xylose metabolism, 55 protein degradation-associated loci, and three cellulolytic enzyme loci (e.g. endoglucanase) under a putative cellulosome complex.

Bacillus sp. SMIA-2 was able to express a promising level of cellulases in submerged cultures employing agricultural byproducts such as sugar cane bagasse and passion fruit rind flour (Costa et al., 2017; Cruz et al., 2019), which opened perspectives to generate high-value products from sustainable production processes. The cellulosomal cellulases from *Bacillus* sp. SMIA-2 have both carboxymethylcellulase (CMCase) (carboxymethylcellulose - hydrolyzing enzymes) and avicelase (avicel-hydrolyzing enzymes) activity; however, the 'cellulases' had a higher activity with avicels (Ladeira et al., 2015).

Cellulases have biotechnological potential in various industries, including food, brewery and wine, industrial waste to chemical feedstock, animal feed, pulp and paper, agriculture, textile and as well as in detergent (Li et al., 2012; Singhania et al., 2010; Behera et al., 2016; Jayasekara and Ratnayake, 2019).

Cellulases are used in detergents as softening, anti-pilling, and color-reviving agents. The process is environmentally friendly, and the use of cellulases and other detergent compatible enzymes diminish the utilization of toxic detergent constituents that are hazardous to humans (Niyonzima, 2018). Most commercial cellulase used in detergents is mainly of fungal origin, but fungal cellulases have poor pH characteristics for washing purposes. However, a major disadvantage for

industrial applications is that most cellulases from the fungal origin lack thermal stability at high temperature. Since most industrial processes are carried out at high temperatures, there is a clear need for thermophilic enzymes. Despite fungal cellulases are more promising from a commercial point of view, since they can generally be produced in rather higher yields, bacteria have also been considered as robust and versatile enzyme producers because of their high growth rate, stability at extreme conditions and, presence of multi-enzyme complexes.

The use of alkaline cellulase attracted the industrial sector as a potential detergent additive due to its ability to selectively contact cellulose inside the fibers and remove the soil in the interfibrillar spaces in the presence of the most conventional detergent ingredients (Kuhad et al., 2011).

Bacillus sp. SMIA-2 produced cellulases capable of functioning at high temperatures and pH levels, retained good stability in the presence of several surfactants, oxidizing agents and locally available detergents (Ladeira et al., 2015; Cruz et al., 2019), which indicated the potential for the use of this bacterium and their cellulases for various industrial applications, such as in the detergent industry.

In this article, we study the compatibility of cellulases recovered from a thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 in the presence of the surfactants Triton-100 and Renex 95 and the oxidant hydrogen peroxide. Besides, the impact of the cellulases in the presence of these three components to hydrolyze cellulosic fabrics was studied to define general parameters for cellulases applications in detergents.

2.0 MATERIAL AND METHODS

2.1. Organism

The present study used a thermophilic *Bacillus* sp. strain SMIA-2, previously isolated from a soil sample collected in the city of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. (Souza and Martins, 2001).

2.2. Enzyme Production

The culture medium used in this work for cellulase production contained (g/L of distilled water) : KCl - 0.3, MgSO₄ - 0.5, K₂HPO₄ - 0.87, CaCl₂ - 0.29, ZnO - 2.03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O - 2.7x10⁻², MnCl₂.4H₂O - 1.0x10⁻², CuCl₂.2H₂O - 8.5x10⁻⁴, CoCl₂.6H₂O - 2.4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O - 2.5x10⁻⁴, H₃BO₃ - 3.0x10⁻⁴, sugar cane bagasse (SCB) (81.05% cellulose, 18.75% hemicellulose, 5.45% lignine)- 0.3%, commercial corn steep liquor (Sigma Aldrich) - 0.3% and passion fruit rind flour (obtained from a local market) - 0.3% (Paixão et al., 2016).

The pH was adjusted to 7.2 with 1.0 M NaOH and the medium was sterilized by steam-autoclaving at 121°C, 1 atm for 15 minutes. The medium (50 mL in 250 mL Erlenmeyer flasks) was inoculated with 1 mL of a standard overnight culture (initial number of cells 10⁴) and incubated at 50°C in an orbital shaker (Thermo Forma, Ohio, USA) operated at 150 rpm. After 168 h the flasks were withdrawn and the contents were then centrifuged (HERMLEZ 382K, Wehingen, Germany) at 15,500 g for 15 min, at 4°C, and the cell-free supernatant was used as crude enzyme preparation.

2.3. Spray-drying of the enzyme

The culture supernatant of *Bacillus* sp. SMIA-2 was spray-dried using a mini spray dryer model SD-04 Lab-Plant Spray Dryer (inlet air temperature = 70±2°C, outlet air temperature = 100±1°C, pressure 5 Kgf /cm² and flow rate = 2 mL/min). Arabic Gum (1%, w/v) and microcrystalline cellulose (1%, w/v) were incorporated into the enzyme solution before spray drying. The feed solution was constantly stirred using a magnetic stirrer to maintain homogeneity and introduced into the spray dryer by a peristaltic pump operating from 1 to 100 rpm with a 4 mm diameter silicone tube. The dried particles were collected and stored at room temperature.

2.4. Enzyme Assay

The cellulolytic enzyme activities were determined using the dinitro salicylic acid method (Miller, 1959), which measures reducing sugars. The reaction mixture containing 0.5 mL of 1% (w/v) substrate solution (Carboxymethylcellulose sodium salt or avicel, PH-101) prepared in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, and 0.5 mL of the appropriate concentration of enzyme solution, was incubated at 70 °C.

After 10 min of reaction, 1 mL of dinitro salicylic acid reagent was added and boiled in a water bath for 5 min. The resulting samples were then cooled to room temperature, and the absorbance was measured at 540 nm. When the activity was tested using avicel as a substrate, the assay tubes were agitated during the assay to keep the substrate suspended. One unit (U) of activity toward the substrates mentioned above was defined as 1 μ mole of glucose equivalent released per minute under the above assay conditions, by using a glucose standard curve. Appropriate controls were conducted in parallel with all assays. Enzyme blank containing 0.5 mL of 10 mM sodium phosphate buffer and 0.5 mL of 1% (w/v) substrate solution was run. To exclude the background of reducing sugars found in the enzyme supernatant from the results, a substrate blank containing 0.5 mL of 10 mM sodium phosphate buffer and 0.5 mL enzyme solution was also run. The absorbance of the enzyme blank and the substrate blank was subtracted from the absorbance of the activity assay. All of the samples were run in triplicate, while the blanks were run in duplicate.

2.5. Cleaning solution

The cleaning solutions were prepared by mixing the components in this order: Triton X-100, Renex 95 and hydrogen peroxide, alkalinity agent, *Bacillus* sp. SMIA-2 cellulase, and water (up to 100%, w/v). The alkalinity agent contained Na_2CO_3 was used at a fixed concentration of 8% (w/v) of the total formulated cleaning solution volume. The cleaning solution components and their quantities are summarized in Table 1.

2.6. Compatibility of cellulases with surfactants, oxidants and bleaching agents

The surfactants (Triton X-100, Renex 60, Renex 95 and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS)), oxidants (hydrogen peroxide and sodium perborate) and bleaching agents (Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and sodium carbonate) were incorporated into the reaction mixture (1, 4 and 8 %, w/v) and the reaction was carried out under standard assay conditions. The activity of the enzyme assayed in the absence of surfactants, oxidizing and bleaching agents was taken as 100% (Table 2).

2.7. Stability of cellulases with the Cleaning solution

The stability of cellulases was determined by incubating the enzyme solution (1%, w/v) with the cleaning solutions at 45°C. Aliquots (0.5 mL) were taken after 1 hour incubation and the residual activity determined under standard assay conditions and compared with the control sample incubated at 50°C without any ingredient. The cleaning solution components and their quantities are summarized in Table 1.

2.8 Performance of cellulases to hydrolyze a cellulose fiber from the cotton fabrics

The cleaning solution (25mL) containing Triton X-100, Renex 95, hydrogen peroxide, alkalinity agent, *Bacillus* sp. SMIA-2 cellulases was added to 125mL erlenmeyer flasks at the required concentration in each assay. Small cotton fabrics (3.0 x 3.0 cm, standardly stained EMPA fabrics i.e. EMPA 111, TEXCONTROL) was added to the flasks containing the cleaning solution and the flasks were incubated at 45°C under 150 rpm shaking on a Thermo Forma orbital shaker (Ohio, USA) for 60 minutes. After incubation, aliquots (0.5 mL) were taken and 1 mL of dinitro salicylic acid reagent (Miller, 1959) was added and boiled in a water bath for 5 min. The resulting samples were then cooled to room temperature, and the absorbance was measured at 540 nm. The reducing sugars (mg/mL) were measured by using a glucose standard curve. Appropriate control was conducted in parallel with all assays. To exclude the background of reducing sugars found in the cotton fabrics from the results, a blank containing 0.5 mL of the water solution containing only the cotton fabrics was also run. The absorbance of the control blank set was subtracted from the absorbance from the Reducing sugar assay. After incubation, the pieces of cloth were taken out, rinsed three times with water (5 min each) performed on a mechanical stirrer at 45°C and 150 rpm and subsequently dried and visually examined for its softness.

2.9. Experimental Design and Statistical Analysis

The surface-response methodology (SRM) was used to obtain a model for Residual CMCase activity (Experiment 1), Residual avicelase activity (Experiment 2), and Reducing sugar groups released during the washing of test fabric (EMPA

106) with the cleaning solutions (Experiment 3). Initially, a central composite design (CCD) 2³ was constructed to evaluate the stability of the cellulases (CMCase and Avicelases) in the presence of Triton X-100, Renex 95, and hydrogen peroxide (Experiment 1 and Experiment 2). Thereafter, a central composite design (CCD) 2³ was also constructed to evaluate the performance of the cellulases in the presence of these three components to hydrolyze a cellulose fiber from the cotton fabrics (Experiment 3). The factorial planning had three central points and yielded a total of 17 treatments for each experiment. The factors and factor levels studied are described in Table 1.

Table 1. Factors and Levels studied in CCD.

Factors	Factor Level				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
X1/Y1/Z1	0	4	10	16	20
X2/Y2/Z2	0	4	10	16	20
X3/Y3/Z3	0	4	10	16	20

Experiment 1/2/3; X1/Y1/Z1: Triton X-100 (% w/v), Experiment 1/2/3; X2/Y2/Z2: Renex 95 (% w/v), Experiment 1/2/3; X3/Y3/Z3: Hydrogen peroxide (% w/v).

The results were evaluated using the Statistica software system, version 7.0. In this context, the F test was used as a validation criterion of statistical significance of the models obtained at a confidence level of 95% (Experiment 1), 95 % (Experiment 2) and 95% (Experiment 3).

Condition optimization was performed using CCD, and surface-response was produced for three experiments. The model of the experiment can be expressed as follows:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^4 \sum_{j=1}^4 b_{ij} x_i x_j \quad \text{Equation 1}$$

Where b_0 , b_i , b_{ii} and b_{ij} are the intercept terms, linear, quadratic coefficient, and interactive coefficient, respectively, and x_i and x_j are coded independent variables.

3.0 RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Compatibility of cellulases with surfactants, oxidants and bleaching agents

It is known that washing of cotton-containing fabrics under normal conditions will generally cause a pronounced, unpleasant harshness in the fabric. Currently, the cellulases are supplemented to the detergents to improve the fabric smoothness and soil removal without damaging them. The process is environmentally friendly, since diminishes the utilization of toxic detergent constituents that are hazardous to humans. In this context, the suitability of the *Bacillus* sp. SMIA-2 crude cellulases to be incorporated in a detergent formulation was investigated by testing its impact in the presence of detergent components to hydrolyze cellulosic fabrics.

The compatibility of the cellulases with surfactants, oxidants, and bleaching agents is shown in Table 2. The avicelase showed good compatibility with the surfactants Renex 95 and Triton X-100 to all concentrations tested (1.0, 4.0, and 8.0% w/v), but was drastically inhibited in the presence of Renex 60 and LAS. The CMCCase showed good compatibility with Triton X-100 and lost about 20-30% of its activity in the presence of Renex 95. In the presence of Renex 60 and LAS the enzyme lost about 60% of its activity.

The cellulases from *Bacillus* sp. SMIA-2 were compatible with hydrogen peroxide to all concentrations tested (1.0, 4.0, and 8.0% w/v). In the presence of sodium perborate, the compatibility of both avicelase and CMCCase decreased as the oxidant concentration increased from 1 to 8% (w/v).

The CMCCase maintained its activity when incubated in the presence of EDTA to all concentrations tested, but the activity of avicelase was inhibited at higher concentrations. In the presence of sodium carbonate, the avicelase activity was stimulated in all three concentrations tested. The CMCCase maintained about 72% of its activity when incubated in the presence of 1% (w/v) sodium carbonate.

Table 2. Effect of surfactants, oxidizing, and bleaching agents on cellulases powder activities.

Agents	1 % (w/v)		4% (w/v)		8% (w/v)	
	CMCase	Avicelase	CMCase	Avicelase	CMCase	Avicelase
Surfactants						
Triton X-100	92.1	99.3	93.7	100.1	96	95.8
Renex 95	79.1	104.0	70.2	101.1	75.7	96.2
Renex 60	45.5	38.9	42.5	21.5	46.5	12.0
LAS	44.7	9.2	42	12.9	47.3	8.7
Oxidizing agents						
H ₂ O ₂	113.7	102.4	111.7	106.9	113.3	100.6
Sodium perborate	102.4	75.4	73.2	62.6	57.9	57.4
Bleaching agents						
EDTA	124.6	102.0	124.4	49.1	127.0	46.0
Sodium carbonate	71.6	110.3	58.1	113.7	52.0	113.0

Residual activity is expressed as a percentage of the maximum (100% of the avicelase activity = 2.3541 U. mL⁻¹ and 100% of the CMCase activity = 0.624 U.mL⁻¹).

The combined of concentrations of Renex 95, Triton X-100, and hydrogen peroxide on cellulases activities using a central composite design (CCD) 2³ was studied to strike a balance between them to enhance the residual cellulases activities in the formulate solutions and evaluate the performance of the cellulases in cellulose fiber from the cotton fabrics.

According to the results, the amounts of Triton X-100, Renex 95, and hydrogen peroxide in the cleaning solution strongly affected the residual activities of both, CMCase and avicelase (Table 3).

Table 3. Matrix of CCD 2³ (real and coded values) used and its response (CMCase and Avicelase activity and Reducing sugar).

Treatments	X1/Y1/Z1	X2/Y2/Z2	X3/Y3/Z3	Residual activity (U mL ⁻¹)		Reducing sugar groups (mg/mL)
				CMCase	Avicelase	
1	(-1)	(-1)	(-1)	0.55	1.04	0.36
2	(+1)	(-1)	(-1)	0.40	2.32	0.95
3	(-1)	(+1)	(-1)	0.63	1.12	1.29
4	(+1)	(+1)	(-1)	0.34	2.32	1.18
5	(-1)	(-1)	(+1)	0.40	1.52	0.61
6	(+1)	(-1)	(+1)	0.35	1.04	1.05
7	(-1)	(+1)	(+1)	0.53	1.08	1.11
8	(+1)	(+1)	(+1)	0.33	2.30	0.17
9	(-1.68)	(0)	(0)	0.46	0.97	0.30
10	(+1.68)	(0)	(0)	0.31	1.19	0.54
11	(0)	(-1.68)	(0)	0.53	1.99	0.52
12	(0)	(+1.68)	(0)	0.51	2.61	1.22
13	(0)	(0)	(-1.68)	0.54	2.37	0.87
14	(0)	(0)	(+1.68)	0.57	2.07	1.18
15	(0)	(0)	(0)	0.63	2.35	0.54
16	(0)	(0)	(0)	0.65	2.33	0.57
17	(0)	(0)	(0)	0.64	2.40	0.60

Experiment 1/2/3: X1/Y1/Z1: Triton X-100 (% , w/v), Experiment 1/2/3; X2/Y2/Z2: Renex 95 (% ,w/v), Experiment 1/2/3; X3/Y3/Z3: Hydrogen peroxide (% , w/v).

The highest Residual CMCase (0.65 U.mL⁻¹) and avicelase (2.61 U.mL⁻¹) were observed in the treatments 16 and 12, respectively. Surfactants are known to enhance the activity of enzymes (Barberis et al., 2013). They facilitate the reactivity of the enzyme by increasing the solubility of the reaction components (Buxbaum, 2011). The effect of surfactants on enzyme activity varies depending on the type of enzyme, but in general, nonionic surfactants are more benign to an enzyme than anionic surfactants (Saraswat et al., 2017).

Regarding the amount of reducing sugar released into the cleaning solution after cotton fabric washing, the highest value was found in the Run 3 (1.29 mg/mL) and the lowest in the Run 8, (0.17 mg/mL).

The statistical significance of the model equation was assessed by an F-test (ANOVA) and the data are shown in Table 4.

Table 4. ANOVA for the variables of response surface quadratic model for residual CMCase activity and residual avicelase activity and reducing sugar.

Variable	Sum of squares	(Degrees of freedom)	Mean square	Fcal	F statistic
Residual CMCase activity					
Regression	0.210	9	0.023	8.228	3.68
Residues	0.019	7	0.003		
Lack of adjustment	0.019	5	0.004	25.760	19.3
Pure error	0.0003	2	0.0001		
Total error	0.229	16			
				R ² =	90.87%
Residual avicelase activity					
Regression	5.196	9	0.577	4.158	3.68
Residues	0.972	7	0.139		
Lack of adjustment	0.969	5	0.194	164.293	19.3
Pure error	0.0024	2	0.0012		
Total error	6.1685	16			
				R ² =	83.99%
Reducing sugar (mg/mL)					
Regression	1.774	9	0.197	5.448	3.68
Residues	0.253	7	0.036		
Lack of adjustment	0.251	5	0.050	49.032	19.3
Pure error	0.0020	2	0.0010		
Total error	2.027	16			
				R ² =	87.68%

An equation for Residual CMCase activity (Eq. 2), Residual avicelase activity (Eq. 3) and for Reducing sugar (Eq. 4) was developed based on a regression analysis of the following experimental data:

$$X = 0.639322 - 0.068152 x_1 - 0.097204 x_1^2 + 0.006267 x_2 - 0.050288 x_2^2 - 0.017915 x_3 - 0.036977 x_3^2 - 0.037337 x_1 x_2 + 0.023463 x_1 x_3 + 0.010812 x_2 x_3$$

Equation 2

$$Y = 2.373116 + 0.261635 x_1 - 0.507103 x_1^2 + 0.140951 x_2 - 0.073240 x_2^2 - 0.099740 x_3 - 0.103787 x_3^2 + 0.201250 x_1 x_2 - 0.218225 x_1 x_3 + 0.092600 x_2 x_3$$

Equation 3

$$Z = 0.566321 + 0.028654 x_1 - 0.040319 x_1^2 + 0.144571 x_2 + 0.118120 x_2^2 - 0.023516 x_3 + 0.173116 x_3^2 - 0.259427 x_1 x_2 - 0.123623 x_1 x_3 - 0.192118 x_2 x_3$$

Equation 4

Where x_1 is the Triton X-100, x_2 is the Renex 95 and x_3 is the Hydrogen peroxide concentration.

The outcome of ANOVA analysis revealed that the adjusted model was significant, according to the analysis of the F test. The regression model for Residual activity for both CMCase and avicelase and for Reducing sugar was highly significant ($p < 0.05$), with a satisfactory value of determination coefficient ($R^2 = 0.9087$ for Residual CMCase activity, $R^2 = 0.8399$ for Residual avicelase activity and 0.8768 for Reducing sugar). Thus, it is possible to state that 90.87%, 83.99%, and 87.68 of the variability in the Residual CMCase activity, Residual avicelase activity and Reducing sugar response respectively, could be accounted by the model and that it was suitable to represent the real relationship among the independent variables studied. The response surface was produced according to (Rodrigues and Lemma, 2014).

The response surface and contour plot figures obtained by the analysis of the experimental data of CCD showed a relationship between two variables at a time. The non-explicit variables were fixed at the central point (level 0) for the surface construction.

The interaction between Renex-95 and Triton X-100 concentration when the Hydrogen peroxide concentration remained constant at level 0 (10%, w/v) on Residual cellulases activities and Reducing sugar levels was reported in the response surface plot of Fig. 1A, 1D, and 1G. The maximal CMCase activity was observed when concentrations between 5-15% (w/v) Triton X-100 and 10-15% (w/v) Renex-95 were incorporated into enzymes solutions. As for Avicelase, any Renex-95 concentration within the studied range and concentrations between 5-15% (w/v) Triton X-100, allowed to obtain good levels of enzyme activity. Fig. 1B and Fig. 1E shows the response surface plot of Hydrogen peroxide and Triton X-100 concentration and the interaction on the Residual cellulases activities at Renex-95 concentration constant at level 0 (10%, w/v). Higher residual CMCase activity was found when concentrations of Triton X-100 between 5-10% (w/v) and Hydrogen peroxide concentrations between 5-15% (w/v) were incorporated into enzymes. As for Avicelase, any Hydrogen peroxide concentration within the studied range and concentrations of Triton X-100 between 5-10%, allowed to obtain good levels of enzyme activity. Fig. 1C and Fig. 1F presents the interactive effect between Hydrogen peroxide and Renex-95 concentrations when the Triton X-100 concentration remained constant at level 0 (10%, w/v). Higher residual CMCase

activity values were found when H₂O₂ and Renex 95 concentrations between 5-15% (w/v) were incorporated into enzymes. Regarding Avicelases, higher levels of residual activity values were found when Renex 95 concentrations between 10-15% (w/v) and Hydrogen peroxide between 5-10% (w/v) were incorporated into enzymes.

The effect of the interaction between Renex-95 and Triton X-100 concentration when the Hydrogen peroxide concentration remained constant at level 0 (10%, w/v) on Reducing sugars levels as depicted in the response surface plot of Fig. 1G. Higher amounts of Reducing sugar were found when the cleaning solution contained between 15-20% (w/v) Renex 95 and lower concentrations of Triton X-100 (<5%, w/v) or when the cleaning solution contained between 15-20% (w/v) Triton X-100 and lower concentrations of Renex-95 (< 5%, w/v). Fig. 1H shows the response surface plot of the effect of Hydrogen peroxide and Triton X-100 concentration and their mutual effect on the Reducing sugar levels at Renex-95 concentration constant at level 0 (10%, w/v). Higher values of Reducing sugar were obtained when higher concentrations of Hydrogen peroxide (20%, w/v) and lower concentrations of Triton X-100 (<5%, w/v) were used to formulate the cleaning solution or when higher concentrations of Triton X-100 and lower concentrations of Hydrogen peroxide were used in the cleaning solution. Fig. 1I presents the interactive effect between Hydrogen peroxide and Renex-95 concentrations when the Triton X-100 concentration remained constant at level 0 (10%, w/v). Higher Reducing sugar values were found when higher concentrations of Hydrogen peroxide in combination with very low concentrations of Renex 95 were used in the cleaning solution or when higher concentrations of Renex 95 were used in combination with lower concentrations of Hydrogen peroxide.

Therefore, making a general analysis of the results that were found in this work, it is suggested that the experimental design approach used in this study was found to be efficient for the rapid optimization of Triton X-100, Renex 95 and hydrogen peroxide concentration in the cleaning solution to obtain higher levels of both CMCase and Avicelases activities. It was observed that although the cellulases were stable over a wide concentration range of the three components used to formulate the cleaning solution, its performance to hydrolyze a cellulose fiber from the cotton fabrics was higher when any of the three components (Triton X-100, Renex 95 or hydrogen peroxide) in the cleaning solution was used in lower

concentrations. This was important because it avoids the unnecessary addition of the components in the cleaning solution.

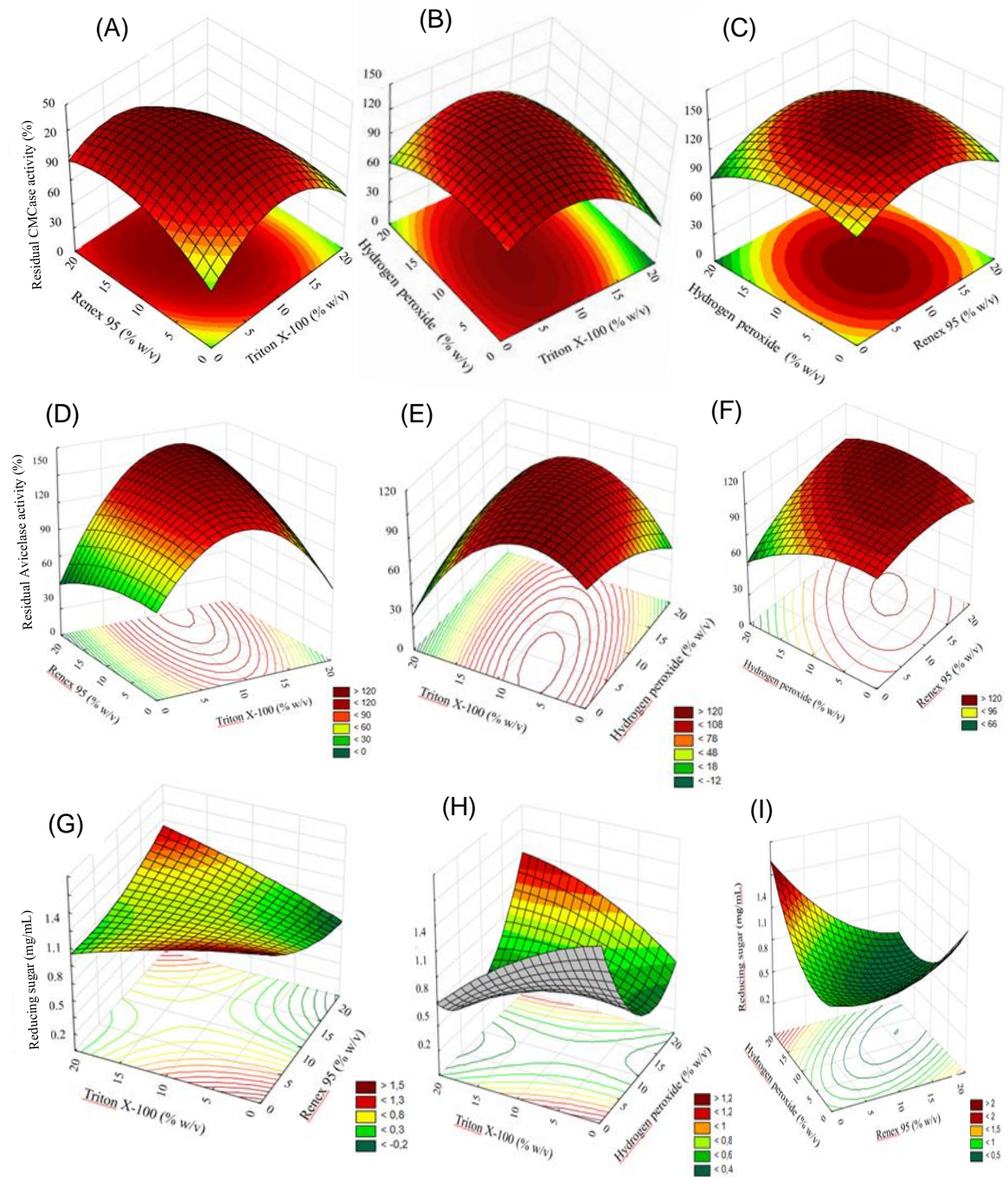


Figure 1. Three-dimensional response surface plots representing effects of (A, D) - Renex-95 and Triton X-100 concentration (% w/v) on Residual CMCase activity (%) and Residual avicelase activity (%) at a fixed Hydrogen peroxide concentration (10%, w/v); (B, E) - Hydrogen peroxide and Triton X-100 concentration (% w/v) on Residual CMCase activity (%) and Residual avicelase activity (%) at a fixed Renex-95 concentration (10%, w/v); (C, F) - Hydrogen peroxide and Renex-95 concentration (% w/v) on Residual CMCase activity (%) and Residual avicelase activity (%) at a fixed Triton X-100 concentration (10%, w/v); (G) - Renex-95 and Triton X-100 concentration (% w/v) on Reducing sugar (%) at a fixed Hydrogen peroxide concentration (10%, w/v); (H) - Hydrogen peroxide and Triton X-100 concentration (% w/v) on Reducing sugar (%) at a fixed Renex-95 concentration (10%, w/v); (I) Hydrogen peroxide and Renex-95 concentration (% w/v) on Reducing sugar (%) at a fixed Triton X-100 concentration (10%, w/v). Dark red color indicates high Residual enzyme activity (%), while green and yellow indicate low Residual enzyme activity (%).

4.0 CONCLUSIONS

The cellulases (CMCase and avicelase) of *Bacillus* sp. SMIA-2 can be combined with Triton X-100, Renex 95 and hydrogen peroxide in a single composition so that the benefits of these three components in the hydrolysis of cellulose fiber in cotton fabrics can be achieved by improving the quality of the fabric, maintaining whiteness, brightening the colors and the rough lumps of cotton.

The central rotational composite design (CCD) 2³ was used to evaluate the performance of using cellulases as an additive in detergent formulation. As there is an uninterrupted demand for enzymes for use in the detergent industry and few reports of stable bacterial cellulases compatible with detergents, the information developed here will help other researchers to discover new technologies contributing to improve and accelerate the performance of the detergency process.

6. REFERENCES

- Andrade M.V.V., Delatorre, A.B., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2011). Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 204-208. doi:<https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100031>.
- Behera, B.C., Sethi, B.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N. (2016). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal Gen Eng Biotechnol* , 15, 197-210. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>.
- Bernardo, S.P.C., Rosana, A.R.R, Souza, A.N., Chiorean, S., Martins, M.L.L., Vederasb, J.C. (2020). Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an Antimicrobial- and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil. *Microbiology Resource Announcements*, 1-3. doi:<http://doi:10.1128/MRA.00106-20>.
- Buxbaum, E. (2011). *Biophysical Chemistry of Proteins: An Introduction to Laboratory Methods*. New York, USA: Springer. doi:<http://doi.org/10.1007/978-1-4419-7251-4>.

- Carvalho, R.V., Corrêa, T.L.R., Vianna, A.P., Martins, M.L.L. (2008a). Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 380-386. doi:<https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000200017>.
- Carvalho, R.V., Côrrea, T.L.R., Silva, J.C.M., Mansu, L.R.C.O. (2008b). Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 102-107. doi:<https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100023>.
- Costa, E. A., Fernandes, R. N., Cruz, E., Moraes, L. P., Carvalho, R. V., Martins, M. L. L. (2017). Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2, 1-8. doi:<https://doi:10.23880/OAJMB-16000115>.
- Cruz, E., Moraes, L.P., Costa, E.A., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2019). Optimization of Food-Waste Based Culture Medium for Cellulase Production by Thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and effect of Divalent Metal Ions on Activity and Stability of the Enzyme at Higher Temperatures. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS)*, 6, 331-337. doi:<https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.6741>.
- Jayasekara, S., Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. *IntechOpen*, 1-21. doi:<http://doi:10.5772/intechopen.84531>.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 1-11. doi:<https://doi:10.4061/2011/280696>.
- Ladeira, S. A., Cruz, E., Delatorre, A. B., Barbosa, J. B., Martins, M. L.L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 110-115. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008>.
- Li, X., Yu, H.Y. (2012). Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus* sp. L1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39, 1117–1124. doi:<https://doi:10.1007/s10295-012-1120-2>.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426-428. doi:<https://doi:10.1021/ac60147a030>.
- Niyonzima, N.F. (2018). Detergent-compatible bacterial cellulases. *Journal of Basic Microbiology*, 1-14. doi:<https://doi.org/10.1002/jobm.201800436>.
- Oliveira, L.R.C., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L., Martins, M.A. (2014). Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 36, 215-222. doi:<https://doi:10.4025/actascibiols.v36i2.17827>.
- Paixão, S.M., Ladeira, S.A., Silva, T.P., Arez, B.F., Roseiro, J.C., Martins, M.L.L., Alves, L. (2016). Sugarcane Bagasse Delignification with Potassium Hydroxide for Enhanced Enzymatic Hydrolysis. *Royal Society of Chemistry - RSC Advances*, 6, 1042–1052. doi:<https://doi:10.1039/C5RA14908H>.

- Rodrigues, M.I., Lemma, A.F. (2014). *Planejamento de Experimentos e Otimização de processos*. (3ª Ed.), Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade, Fé e Amor. ISBN:85-98389-03-X.
- Saraswat, R., Verma, V., Sistla, S., Bhushan, I. (2017). Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *Bacillus* strain for detergent formulation. *Electron Journal Biotechn*, 30, 33-38. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.08.007>.
- Silva, C.R., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. (2007). Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of enzymatic activity. *Brazilian Journal Microbiol*, 38, 253-257. doi:<http://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200012>.
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microbial Technology*. *Enzyme Microbial Technology*, 46, 541-549. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L (2001). Isolation, properties, and Kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 271-275. doi:<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>.

3.3 USO DE ENZIMAS E ESPOROS DE *Bacillus* sp. SMIA-2 PARA O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS BIODEGRADÁVEIS PARA LIMPEZA, DESINFECÇÃO E HIGIENIZAÇÃO*

Erica Cruz¹, Meire Lelis Leal Martins¹

* Parte da tese de doutorado a ser apresentada à UENF e que será submetida à publicação no *Journal of Surfactants and Detergents*.

¹ Food Technology Laboratory, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil.

RESUMO

A preocupação com a higienização está no centro das discussões. Isso porque a pandemia do coronavírus, que se instaurou em toda sociedade, está bastante associada à limpeza e à higiene. Esse fato, junto com a conscientização do consumidor sobre a importância de usar produtos de limpeza verdes, levou a um aumento na demanda por produtos de limpeza ecológicos. Os produtos de limpeza ecológicos são aqueles que contêm microrganismos como substâncias ativas e podem conter além de bactérias viáveis e esporos, enzimas e produtos químicos. Neste trabalho foi estudada a eficácia de dois extratos secos constituídos de enzimas e esporos de *Bacillus* sp. SMIA-2, para remover biofilmes de *Staphylococcus aureus* de tecidos de algodão sujos artificialmente de sangue. Um dos extratos secos utilizados rico em celulases (2,08 U/mL de avicelase e 0,5 U/mL de carboximetilcelulase), enquanto o outro rico em proteases (11,5 U/mL) e em ambos os extratos o número de esporos foi maior ou igual a 6,1 Log/mL. O processo de adesão do *S. aureus* ao tecido foi satisfatório. Os tecidos apresentaram ao final do processo de adesão uma contagem de $3,14 \times 10^8$ UFC/mL (8,49 log células/mL). A lavagem dos tecidos utilizando diferentes soluções de limpeza mostrou que nos tratamentos com maior número de esporos do SMIA-2 a contagem de *S. aureus* foi mais baixa ou nula. Em relação à remoção de manchas de sangue dos tecidos, foi verificado que os tratamentos em que as formulações de limpeza foram adicionadas dos extratos secos, apresentaram maior desempenho de lavagem.

Palavras chave: *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, biofilme, têxteis, detergentes.

ABSTRACT

The concern with hygiene is at the center of the discussions. This is because the coronavirus pandemic, which has taken hold in every society, is closely associated with cleanliness and hygiene. This fact, together with consumer awareness of the importance of using green cleaning products, has led to an increase in demand for environmentally friendly cleaning products. Ecological cleaning products are those that contain microorganisms as active substances and may contain in addition to viable bacteria and spores, enzymes and chemicals. In this work, the effectiveness of two dry extracts constituted of enzymes and spores of *Bacillus* sp. SMIA-2 was studied, to remove *Staphylococcus aureus* biofilms from cotton fabrics soiled artificially with blood. One of the dry extracts used was rich in cellulases (2.08 U/mL of avicelase and 0.5 U/mL of carboxymethyl cellulase), while the other rich in proteases (11.5 U/mL) and in both extracts the number of spores was greater than or equal to 6.1 Log/mL. The adhesion process of *S. aureus* to the cotton cloth was satisfactory. At the end of the adhesion process, the cotton cloth counted 3.14×10^8 CFU/mL (8.49 log cells/mL). The washing of the cotton cloth using different cleaning solutions showed that in treatments with a higher number of spores of SMIA-2, the count of *S. aureus* was lower or zero. Regarding the removal of blood stains from the cotton cloth, it was found that the treatments in which the cleaning formulations were added to the dry extracts, showed greater washing performance.

1.0 INTRODUÇÃO

A demanda por enzimas para utilização em formulações de limpeza é crescente, uma vez que são surfactantes naturais capazes de aumentar o desempenho de lavagem e diminuir o impacto ambiental, uma vez que substitui parcialmente surfactantes, builders e outros agentes auxiliares como polímeros e agentes branqueadores (Anjum et al., 2016).

As enzimas presentes nos produtos de limpeza, além de ter um papel importante na remoção de sujidades (manchas) são importantes na remoção de biofilmes microbianos, uma vez que desestabilizam as proteínas, polissacarídeos, lipídios e outras substâncias que fazem parte da sua composição. Biofilmes são arquiteturas microbianas complexas que se fixam em superfícies e envolvem microrganismos em uma matriz composta de substâncias poliméricas extracelulares hidratadas autoproduzidas (Flemming, et al, 2016). Em biofilmes, os microrganismos se tornam muito mais resistentes a tratamentos antimicrobianos, condições ambientais adversas e imunidade do hospedeiro (Li e Lee, 2017). Com o aumento da prevalência da resistência aos antibióticos, enzimas antimicrobianas que visam à ruptura da maquinaria celular bacteriana e à formação de biofilme estão sob intensa investigação (De Cesare et al., 2019).

Produtos para limpeza e higienização de superfícies conhecidos com o nome comercial "Probiotic Cleaning Hygien System" (PCHS), são conhecidos, no qual esporos de bactérias probióticas, em particular do gênero *Bacillus*, são apresentados em mistura com ação detergente, sanitizante e higienizante. Tais produtos utilizam uma abordagem de "biocontrole" baseada no fato de que o microrganismo probiótico (não patogênico) pode colonizar as superfícies a serem limpas e higienizadas, competindo assim com a proliferação de outras espécies potencialmente perigosas para a saúde das pessoas (Canadiam Patent Application, 2016). Os esporos formados pela bactéria *Bacillus* podem permanecer vitais por longos períodos, devido a sua resistência à secagem, ao calor e a muitas substâncias químicas e, portanto, são ideais para aplicações probióticas no campo da sanificação (Vasudevan, 2014). Além disso, a capacidade dos *Bacillus* de esporular permite o processamento posterior e a formulação de produtos sob forma

de esporos estáveis em prateleira. É importante ressaltar que, do ponto de vista da segurança, o risco patogênico da espécie de *Bacillus* presente nos produtos utilizados na aplicação de PCHS é considerado baixo/nulo (não patogênico) (Majeed et al., 2016). Muitos *Bacillus* formadores de esporos são vendidos em todo o mundo como componentes de produtos para uso humano e animal, incluindo *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus* e *B. toyoi* (Bader et al., 2012, Elshaghabee et al., 2017, Mazkour et al., 2019).

Os produtos de limpeza que contêm microrganismos como substâncias ativas são considerados ecológicos e podem conter além de bactérias viáveis e esporos, enzimas e produtos químicos (Canadain Patent Application, 2016). A composição microbiana exata nos produtos muitas vezes não é identificada em detalhes e a rotulagem do produto muitas vezes não é fornecida. Até o momento não há regulamentos internacionais comuns ou padrões de qualidade, regulando a produção e o uso de limpadores microbianos (Madslien et al., 2019).

As fibras têxteis são um excelente meio para a proliferação de microrganismos patogênicos, que podem comprometer a estética, a higiene e funcionalidade do material têxtil, além de provocar doenças no consumidor (Gao e Cranston, 2008; Walentowska e Flaczyk, 2013). Os têxteis estão presentes em diversas áreas como unidades de saúde e alimentação, podendo ser uma importante fonte de contaminação de funcionários, pacientes e consumidores (Ahmed et al., 2014; Walter et al., 2014).

A adesão microbiana é a primeira etapa para os microrganismos iniciarem a degradação das fibras têxteis gerando a formação de biofilmes, que constitui uma proteção para a multiplicação das bactérias, sendo, portanto, difícil a sua eliminação (Niyonzima, 2018).

Considerando que a cepa *Bacillus* sp. SMIA-2 é um potente produtor de enzimas extracelulares de grande interesse comercial, a partir de resíduos agroindustriais, um processo para a secagem das enzimas foi desenvolvido para a manutenção de suas atividades, quando estocadas por longos períodos de tempo. Portanto, este trabalho tem como objetivo demonstrar que enzimas e esporos do SMIA-2, podem ser utilizados para o desenvolvimento de produtos de limpeza eficazes na remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus* de têxteis, com impacto ambiental extremamente limitado.

2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi o *Bacillus* sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica, isolada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a partir de amostras de solo do município de Campos dos Goytacazes-RJ (Souza e Martins, 2001).

2.2. Germinação do microrganismo

A bactéria, mantida em meio de manutenção, foi semeada em placas de Petri contendo o meio Triptona-solução salina e Ágar de extrato de levedura (TSY(g.L⁻¹) de água destilada): triptona-20; NaCl-10; extrato de levedura-10 e ágar-20. Posteriormente, as placas foram incubadas a 50°C por 18 h.

2.3. Meios de crescimento

O meio mineral básico utilizado foi a seguinte composição (g.L⁻¹ de água destilada): KCl-0,3; MgSO₄-0,5; K₂HPO₄-2,0; CaCl₂-0,29, ZnO-2.03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O-2.7x10⁻², MnCl₂.4H₂O-1.0x 10⁻², CuCl₂.2H₂O-8.5x10⁻⁵, CoCl₂.6H₂O-2.4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O-2.5x10⁻⁴, e H₃BO₃-3.0x10⁻⁴. A fonte de nitrogênio utilizada foi a água de maceração de milho. Este subproduto da indústria do processamento do amido de milho é uma fonte de carboidratos, aminoácidos, peptídeos, vitaminas, fosfato e íons metálicos e foi usado no meio de cultura em substituição ao extrato de levedura e peptona, fontes de nitrogênio de alto custo. As fontes de carbono foram selecionadas de acordo com a enzima que será produzida. Para a produção de proteases e dos esporos foi utilizado o meio descrito por Côrrea et al. (2011) e para a produção de celulasas foi utilizado o meio descrito por Costa et al. (2017). O pH do meio foi ajustado para 7,2 com NaOH 1,0 M e posteriormente esterilizado por autoclave a vapor a 121°C, 1 atm durante 15 minutos. O meio (50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 1 mL do inóculo (número inicial de células por ml de 10⁴) e incubado a 50°C em um agitador orbital (Thermo Forma, Ohio, EUA), operado a 150 rpm durante 36h (produção de proteases, amilases e

esporos) e 168h (produção de celulases).

2.4. Preparação de inóculo

O meio mineral básico (10 mL) foi transferido para as placas contendo o meio TSY para ressuspender as células, que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril e inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de crescimento. Os frascos foram incubados a 50°C em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando 150 rpm por 18 h.

2.5. Recuperação dos complexos enzimáticos e dos esporos

Para a separação das células do meio de crescimento, o caldo foi centrifugado a 4500g por 15 minutos a 4°C (Centrífuga HERMLE Z32HK) e o sobrenadante livre de células foi submetido à secagem por atomização em um mini spray dryer (BÜCHI, MODELO B-191), operando em condições otimizadas para manutenção da atividade e estabilidade das soluções enzimáticas e dos esporos. Goma arábica (1,0 %, m/v) e celulose microcristalina (1,0 %, m/v) foram incorporadas à solução de celulases antes da secagem e 0,5% (m/v) carboximetilcelulose e 1,0% (m/v) maltodextrina foram incorporadas à solução de proteases. As partículas secas foram coletadas e armazenadas à temperatura ambiente.

O esquema geral do processo de obtenção das enzimas e esporos de *Bacillus* sp. SMIA-2 está esquematizado na Figura 1.

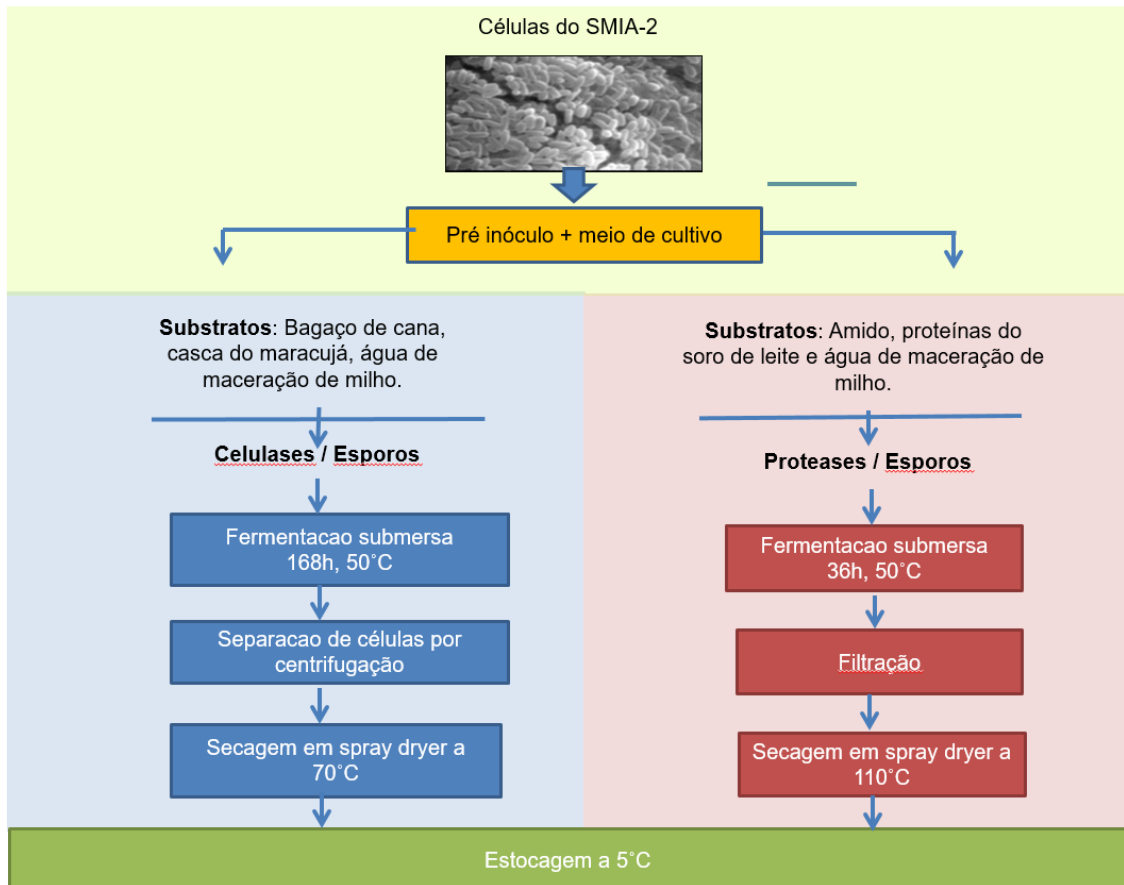


Figura 1. Processo de obtenção de enzimas e esporos de *Bacillus* sp. SMIA-2.

2.6. Avaliação das atividades enzimáticas

A atividade proteásica das amostras secas ($0,01\text{g.mL}^{-1}$) foi determinada (em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15% (Johnvesly e Naik, 2001). Para análise das amostras foi adicionado, em tubos eppendorff, 1 mL de azocaseína 0,2% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05 M – pH 8,5) e 0,5 mL do extrato seco ($0,01\text{g.mL}^{-1}$). Esse material foi incubado em banho-maria a 70°C por 10 minutos. Após, foi adicionado 0,5 mL de TCA 15% e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de NaOH (1M). A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-mini 1240), onde a leitura de absorbância foi feita em 420nm (Janssen et al. 1994). Em paralelo foi realizado um controle contendo todos os reagentes do ensaio anterior, porém, 0,5 mL do extrato seco ($0,01\text{g.mL}^{-1}$) foi adicionado após o TCA 15%. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420

nm igual a 1,0 em 60 minutos.

As atividades das celulasas foram determinadas nas amostras secas em triplicata, pela quantificação de açúcares redutores (glicose) através do método de Miller (1959). Uma unidade da atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose por minuto a partir do respectivo substrato (avicel/carboximetilcelulose) nas condições do ensaio. Atividade dos extratos secos para diferentes substratos (1%, m/v), soluções de xilana (oalt spelts xylan), amido solúvel e pectina foi preparada em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,5. Volumes de 1,0 mL de cada substrato foram incubados separadamente com 0,5 mL do extrato seco ($0,01\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a 70°C (exceto para amilase, onde o extrato foi incubado a 90°C) durante 10 min. As atividades foram expressas como μmole de açúcar redutor (glicose ou xilose) equivalente liberado por minuto. As colorações desenvolvidas foram medidas em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-mini 1240), onde as leituras de absorbância foram feitas em 540nm (Janssen et al. 1994). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicatas, e os resultados expressos como valor médio.

2.7. Enumeração dos esporos e células viáveis

As amostras secas ($0,01\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram submetidas a um choque térmico ($80^{\circ}\text{C}/10$ min) utilizando-se banho-maria (Quimis modelo Q334M-28, São Paulo, Brasil) e resfriadas imediatamente em banho de gelo (Rabinovitch e Oliveira, 2015). A seguir, foram realizadas diluições decimais seriadas empregando-se água peptonada 1% (m/v). A partir das diluições preparadas, alíquotas do material foram semeadas em meio TSY, incubadas a 50°C por 24h e os resultados das contagens obtidas foram expressos como UFC/mL de esporos e células viáveis. A etapa do choque térmico é somente realizada para contagem de números de esporos. Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio de teste Tukey em 1% de significância utilizando o programa SAEG – Sistema para Análises Estatísticas, versão 9.1.

2.8. Remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por esporos e enzimas de *Bacillus* sp. SMIA-2

Todas as etapas foram realizadas em câmara de fluxo laminar previamente lavada com água e sabão, seguida de aplicação de solução germicida de alto nível de glutaraldeído 2%. Condições assépticas foram garantidas pelo uso de material esterilizado, lavagem das mãos, uso de luvas e máscara. Todo procedimento de coleta e plaqueamento foi realizado em zona asséptica.

2.9. Remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em têxteis por esporos e enzimas de *Bacillus* sp. SMIA-2

2.9.1. Preparo e limpeza dos tecidos

Tecidos de algodão manchados artificialmente com sangue (TEXCONTROL EMPA 111) com dimensões de 2,0 cm de diâmetro foram utilizados nesse trabalho. Os tecidos foram limpos com água destilada sem detergente e posteriormente secos em estufa (Fanem LTDA Modelo 002CB) por 2 horas e autoclavados a 121°C/15 min. A confirmação da esterilização foi feita incubando um tecido em caldo BHI e verificando a turvação do meio após 24 h a 37 °C e contagem de células viáveis em placas de petri contendo TSA.

2.9.2. Preparo da suspensão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram cultivadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo BHI a 37 °C por 18 h em aerobiose sob agitação em uma incubadora orbital (Thermo Forma, Ohio, USA) operando a 150 rpm. Em seguida, inóculos foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo caldo BHI, ajustando-se a densidade óptica inicial a 600 nm (DO_{600nm}) para 0,1. Os frascos foram incubados a 37°C a 150 rpm e o crescimento foi monitorado em espectrofotômetro Shimadzu UV-mini 1240 até as culturas atingirem a DO_{600nm} de 0,2 ($3,0 \times 10^8$ por mL).

A fim de verificar a pureza das colônias, a suspensão bacteriana foi semeada por esgotamento com auxílio de uma alça bacteriológica em placas de Petri contendo os meios de cultura de Ágar triptona de soja (TSA), Muller Hinton (Becton Dickinson and Company, BD Diagnostic Systems, USA) e Ágar Sangue (sangue de carneiro). A presença de um halo de hemólise em torno das colônias formadas indicou a pureza das colônias.

2.9.3. Processo de adesão e formação do biofilme

As amostras dos tecidos devidamente preparadas foram imersas assepticamente aos frascos contendo a suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (10^7 UFC/mL) e posteriormente foram incubados a 37°C a 150 rpm. O crescimento bacteriano foi monitorado em espectrofotômetro Densimat até as culturas atingirem a DO_{550nm} de 0,3 de absorbância ($3,0 \times 10^9$ por mL). Posteriormente, os tecidos foram retirados e colocados individualmente em placas de petri forradas com papel filtro estéril e incubados em estufa de secagem (Tecnal Modelo TE-391) a 37°C/20h e submetidos à lavagem usando as diferentes soluções de limpeza (Tabela 1).

2.9.4. Contagens das células viáveis do biofilme

Para a contagem de células viáveis, os tecidos foram colocados em erlenmeyers de 50 mL de água peptonada a 0,1% e agitados vigorosamente. Um volume de 20µL homogeneizado foi inoculado diretamente em placas de Petri contendo TSA para a enumeração presumível de *S. aureus* e foram feitas diluições seriadas. Todas as contagens foram realizadas em triplicatas, após a incubação em 37°C, por 24-48 h e os resultados das contagens obtidas foram expressos como UFC/mL de células viáveis.

2.9.5. Avaliação da eficiência das soluções de limpeza

As soluções de limpeza foram preparadas misturando os componentes na seguinte ordem: peróxido de hidrogênio, Na_2CO_3 / glicina (30:70), surfactantes, extrato seco contendo proteases, celulasas e esporos de *Bacillus* sp. SMIA-2 e água (até 100%, m/v). Os componentes da solução de limpeza e suas quantidades estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Componentes e concentrações utilizados para formular as soluções de limpeza

Componentes	Formulação 1 (% m/v)	Formulação 2 (% m/v)
LAS	-	1,5
H ₂ O ₂	10,0	1,0
Triton X-100	10,0	-
Renex 95	20,0	-
Na ₂ CO ₃ /glicina (30:70)	1,0	1,0
Enzimas		
Celulases	1,0	1,0
Proteases	1,0	1,0

Os seguintes tratamentos foram avaliados quanto à eficiência na remoção do biofilme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e na remoção de manchas de sangue dos tecidos:

- T1 - Lavagem apenas com Água estéril - Controle;
- T2 - Lavagem apenas com a solução de enzimas e esporos do SMIA-2 (extratos secos 1 e 2) - Controle positivo;
- T3 - Lavagem com a Formulação 1 adicionada de enzimas e esporos do SMIA-2 (extratos secos 1 e 2);
- T4 - Lavagem com a Formulação 2 adicionada de enzimas e esporos do SMIA-2 (extratos secos 1 e 2);
- T5 - Lavagem apenas com a Formulação 1 - Controle negativo;
- T6 - Lavagem apenas com a Formulação 2 - Controle negativo.

As soluções de limpeza (25 mL) foram preparadas imediatamente antes da realização dos experimentos e foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL estéreis. Após a imersão dos tecidos contaminados, frascos foram incubados a 45°C em um agitador orbital Thermo Forma (Ohio, EUA) por 25 minutos operando a 130 rpm. As etapas de pré-lavagem, lavagem e enxague final foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL estéreis contendo 25 mL de água estéril incubados em um agitador mecânico a 45°C por 5 min e 100 rpm. Após a realização

dos procedimentos de limpeza, desinfecção e sanitização, os tecidos foram transferidos para uma placa de petri estéril, secos em estufa a 50°C e colocados em frascos Erlenmeyer de 125 mL estéreis contendo 50 mL de água peptonada a 0,1% e agitados vigorosamente. Um volume de 50µL do homogeneizado foi inoculado diretamente em placas de Petri contendo TSA para a enumeração presumível de *S. aureus* e quando necessário foram feitas diluições seriadas. Todas as contagens foram realizadas em triplicatas, após a incubação em 37°C, por 24-48 h.

Para cada condição de adesão e formação de biofilme, um tecido foi utilizado como controle da população inicial de *S. aureus* ATCC 25923 e não foi submetido a nenhum procedimento de limpeza, desinfecção e sanitização. O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados e o experimento completo foi repetido três vezes. O efeito dos procedimentos de limpeza e sanitização na remoção dos biofilmes formados pelo *S. aureus* nos tecidos foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias a um nível de significância de 1%.

2.9.6. Avaliação do desempenho da lavagem (Remoção do Sangue)

O desempenho de lavagem (ΔE) foi avaliado por meio de um colorímetro Miniscan XE Plus (HUNTER Lab), escala CIELAB (L *, a *, b *). Na escala de Hunter, o índice “L” mede a luminosidade variando de 0 (para amostra perfeitamente preta – mínima refletância) e 100 (para amostra perfeitamente branca – máxima refletância). O parâmetro “a” mede variações na faixa de cor verde (sinal negativo -a *) ao vermelho (sinal positivo + a *) e o parâmetro “b” mede variações na faixa de cor azul (sinal negativo -b *) ao amarelo (sinal positivo + b *). As amostras foram medidas em ambos os lados e em triplicata e observado o Parâmetro “L”, o Chroma, que identifica a luminosidade e a intensidade da cor, e a diferença de cor total (ΔE). As medidas de cor foram expressas em diferença colorimétrica, antes e após a lavagem das peças de tecido.

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

$$Chroma = \sqrt{\Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Equação (1)

Onde $\Delta L = L$ antes - L depois, $\Delta a = a$ antes - a depois e $\Delta b = b$ antes - b depois.

Todos os dados dos parâmetros “L” e “Chroma” foram tabulados em uma planilha do Microsoft Excel®, que em seguida foi exportada para o programa de análise estatística utilizado, IBM SPSS Statistics 19 (Armonk, NY, USA). O efeito dos procedimentos na remoção dos biofilmes formados pelo *S. aureus* nos tecidos foi expresso como média \pm desvio padrão. Para análise dos dados foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e como foi detectada a diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade de erro e confirmado que existe diferença significativa entre os tratamentos. Para todas as análises realizadas o nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$. O teste de Dunnett foi realizado para comparar o tratamento de referência (controle) com os demais e todos deram diferença significativa em 5% de probabilidade de erro.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividades enzimáticas e quantidade de esporos nos extratos

A atividade das enzimas e o número de esporos presentes nos extratos secos (ES) obtidos de culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2 estão mostrados na Tabela 2. O ES 1 foi obtido a partir de culturas do SMIA-2 contendo água de maceração de milho, proteínas do soro de leite e pectina. O ES 2 foi obtido a partir de culturas do SMIA-2 contendo água de maceração de milho, bagaço de cana e farinha da casca de maracujá.

Tabela 2. Atividades enzimáticas e número de esporos nos extratos secos

	EXTRATO SECO 1	EXTRATO SECO 2
Atividade Enzimática (U/mL)		
Avicelase	1,10	2,08
CMCase	0,13	0,50
Protease	11,46	1,77
Amilase	0,29	0,28
Xilanase	0,30	0,33
Poligalacturonase	0,23	0,36
Log esporos/mL	7,3	6,1

A atividade das proteases foi maior no ES 1 e a atividade das celulasas foi maior no ES 2, devido aos substratos utilizados nos meios de crescimento para a produção das enzimas. Níveis de atividade de celulasas de culturas submersas do SMIA-2 contendo o mesmo meio de cultura foram encontrados por Costa et al. (2017). Em relação aos níveis de proteases, Barbosa et al., (2014), Ladeira et al. (2010) e Ladeira et al., 2012 relataram atividades superiores às encontradas nesse trabalho.

O uso de enzimas em soluções de limpeza não exige que as mesmas estejam na forma pura (Niyonzima e More, 2015). Considerando o alto custo, as enzimas presentes nos extratos antes do processo de secagem, não foram submetidas a nenhum processo de purificação. Dessa forma, os dois extratos brutos contendo subprodutos do processo de fermentação (outras proteínas, carboidratos e sais) foram submetidos aos processos de atomização e utilizados para formular as soluções de limpeza. Como mostrado na Tabela 2, os extratos secos também apresentaram atividade com amido (amilases), xilana (xilanase) e ácido poligalacturônico (pologalacturonases), embora em níveis bem menores que as celulases e proteases.

Em relação à quantidade de esporos, o extrato seco 1, que apresentou maior atividade de proteases, apresentou também o maior número de esporos. De acordo com Ward (1985), a produção de proteases está correlacionada com uma elevada taxa de renovação de proteínas durante a esporulação. Entretanto, o extrato seco 2 apresentou níveis satisfatórios de esporos quando comparados com resultados da literatura, que relata uma produção de esporos de *Bacillus* de $1,0 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹ (Cayuela et al., 1993; Baril et al., 2012) a $2,8 \times 10^{10}$ esporos.mL⁻¹ (Khardziani et al., 2017; Trunet et al., 2020) com o uso de diferentes cepas de *Bacillus* e diferentes processos de cultivo.

3.2. Eficiência das soluções de limpeza na remoção de biofilmes de cepas de *Staphylococcus aureus* em têxteis

A confirmação da esterilização dos tecidos de algodão manchados artificialmente com sangue (TEXCONTROL EMPA 111) utilizados neste trabalho pode ser observada na Figura 2, onde não foi detectado nenhum crescimento nas placas contendo o meio BHI após a incubação das amostras, a 37°C por 24 horas.



Figura 2. Contagem bacteriana em tecidos TEXCONTROL EMPA 111.

Imagens da coloração de Gram e das colônias desenvolvidas nos meios Ágar triptona de soja (TSA), Muller Hinton e Ágar Sangue (Fig. 3) confirmaram a pureza das culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 utilizadas nesse trabalho.

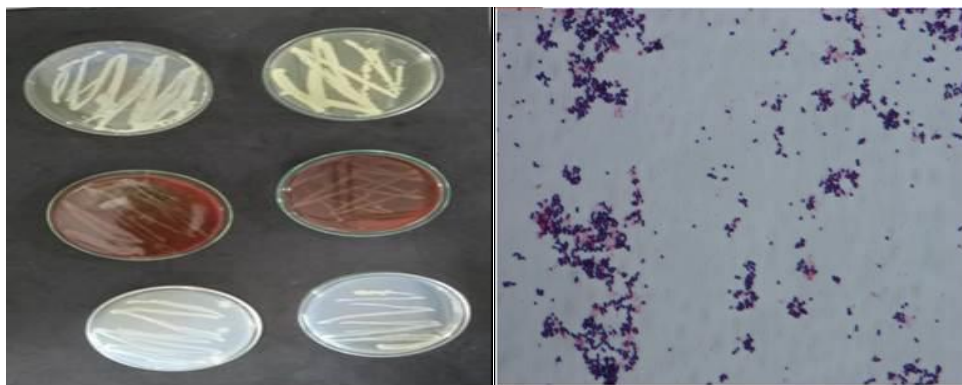


Figura 3. Colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nos meios TSA, Muller Hinton e Ágar Sangue (a) e coloração de Gram das colônias (b).

As amostras dos tecidos apresentaram após o processo de adesão uma contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de $3,14 \times 10^8$ UFC/mL (8,49 log células/mL), demonstrando que a adesão do microrganismo ao tecido foi satisfatória. A adesão bacteriana é um processo altamente complexo, influenciada por vários fatores incluindo as características bacterianas e dos materiais, assim como as propriedades do meio (Moraes et al., 2013).

A escolha do meio de cultura e das condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do *Staphylococcus aureus* foi determinante para a formação do

biofilme. O BHI é um meio de cultura rico em nutrientes, que é amplamente utilizado para o crescimento de uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos, mesmo daqueles mais exigentes (Kadam et al., 2013; Yang et al., 2018). Outro fator muito importante que pode ter relação direta com a adesão dos microrganismos nas amostras dos tecidos foi o tipo do tecido e da sua fibra. Nos tecidos compostos de fibras de algodão, como foi o tecido usado neste trabalho, os patógenos podem sobreviver por tempo superior aos tecidos compostos de fibras sintéticas. Isso se deve à hidrofobicidade dos tecidos sintéticos, que dificulta a sobrevivência de patógenos. (Oliveira et al., 2012). Contudo, Lee et al. (2007), ressaltaram que apesar da sua hidrofobicidade, as fibras sintéticas não são imunes ao ataque microbiano, uma vez que o acúmulo de sujidades sobre a superfície dos tecidos pode constituir substratos para os microrganismos.

Muitos estudos têm avaliado a ação de agentes antimicrobianos para impedir a adesão bacteriana e formação de biofilmes (Marsch et al., 2014). Neste trabalho, foi avaliada a eficácia de soluções de limpeza contendo esporos e enzimas de *Bacillus* sp. SMIA-2 para remover biofilmes de *Staphylococcus aureus* já consolidados. As formulações 1 e 2 utilizadas na remoção do biofilme foram selecionadas a partir de estudos realizados previamente por Ferreira (2018) e por Cruz (2021) (resultados não publicados, mas apresentados no Cap. 2 desta tese), respectivamente. De acordo com estes autores, as proteases e celulasas do SMIA-2 foram estáveis em ambas as formulações. De fato, como mostrado na Tabela 2, tanto na formulação 1 quanto na formulação 2 as proteases e celulasas apresentaram níveis satisfatórios de atividade enzimática.

Após a limpeza usando diferentes tratamentos, a contagem do número de esporos do SMIA-2 e do número de células viáveis do *S. aureus* nos tecidos foi determinada (Tabela 3). O número de esporos do SMIA-2 foi maior no Tratamento dois (2), que consistiu de uma solução de limpeza contendo apenas o extrato seco com as enzimas e os esporos, ou seja, sem a adição de nenhum surfactante ou oxidante. Quando a solução de limpeza foi preparada adicionando, além dos extratos secos, os surfactantes e os oxidantes, foi observada uma redução do número de esporos do SMIA-2, sendo que essa redução foi mais acentuada para o Tratamento três (3), onde foi utilizada na lavagem a formulação contendo uma combinação de 10% (m/v) do peróxido de hidrogênio, 10% (m/v) Triton-X100 e 20%

(m/v) Renex. Embora os esporos de espécies de *Bacillus* sejam conhecidos por serem resistentes a várias substâncias químicas incluindo o peróxido de hidrogênio, a concentração mais alta deste componente na formulação pode ter contribuído para a redução mais acentuada do número de esporos encontrados nas amostras dos tecidos. O peróxido de hidrogênio é utilizado em soluções de limpeza para descolorir as moléculas das sujidades durante a lavagem, e também como agentes descontaminantes (DeQueiroz e Day, 2008). Os resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,01$) dos Tratamentos 2, 3 e 4 e dos Tratamentos 1, 5 e 6 as médias foram significativamente ($p < 0,01$) iguais.

Tabela 3. Contagem de esporos do *Bacillus* sp. SMIA-2 e de células viáveis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em amostras de tecidos após a limpeza com diferentes tratamentos

TRATAMENTOS	SMIA-2 <i>Log Esporos/mL</i>	<i>S. aureus</i> <i>Células Viáveis</i> <i>Log/mL</i>
T1 (Água estéril)	0,00 d \pm 0,0001	8,47 a \pm 0,0029
T2 (Extrato seco)	9,89 a \pm 0,0100	0,00 f \pm 0,0001
T3 (Formulação 1 + ES)	3,20 c \pm 0,0017	1,30 e \pm 0,0017
T4 (Formulação 2 + ES)	3,65 b \pm 0,0020	1,60 d \pm 0,0020
T5 (Formulação 1)	0,00 d \pm 0,0001	6,99 c \pm 0,0018
T6 (Formulação 2)	0,00 d \pm 0,0001	8,11 b \pm 0,0015

Legenda: Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente a $p < 0,01$, segundo o teste de Tukey.

Em relação ao número de células viáveis do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, foi observado que a limpeza utilizando apenas a solução Na_2CO_3 / glicina (30:70) e o extrato seco (Tratamento 2) foi capaz de remover totalmente o biofilme. Embora tenha sido observado células viáveis nos tecidos após a lavagem usando as formulações dos Tratamentos 3 e tratamento 4, o número foi bem menor que o encontrado para o controle, isto é, lavagem apenas com água de torneira (Tratamento 1). Comparando os valores encontrados para o número de esporos do SMIA-2 e o número de células viáveis do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

pode-se observar que os tratamentos em que não foram observadas células viáveis do *Staphylococcus aureus* ou que a contagem foi mais baixa, foram aqueles que apresentaram maior número de esporos do SMIA-2. Todos esses resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,01$) e demonstraram a eficácia do extrato seco contendo enzimas e esporos do SMIA-2 na remoção de biofilmes de *S. aureus*.

Em relação aos tratamentos em que o extrato seco não foi adicionado às formulações, observou um menor número de células viáveis na formulação com mais alta concentração do peróxido de hidrogênio. Segundo Volkart et al. (2017), dos agentes químicos testados para inibir o crescimento do *S. aureus*, o peróxido de hidrogênio foi o que apresentou maior efeito (83,3% de ação antimicrobiana total). A concentração inibitória mínima de peróxido de hidrogênio foi de 5%, sendo 10% o limite máximo permitido pela (ANVISA, 2007).

3.3. Eficiência das soluções de limpeza na remoção de sujidades de tecidos padrões manchados artificialmente de sangue

Em uma solução de limpeza, o principal componente é o surfactante (ou tensoativo), que tem a função de quebrar a tensão superficial da água, no processo da lavagem, fazendo com que a água penetre mais facilmente nos tecidos, conseqüentemente, melhorando a limpeza (Daltin, 2011). Devido às questões ambientais, as soluções de limpeza contendo insumos totalmente biodegradáveis como as enzimas, são as mais procuradas pelos consumidores. As enzimas, além de melhorar a eficiência das soluções de limpeza, respeitam o meio ambiente (Rodríguez et al., 2006). Desta forma, o desempenho das soluções de limpeza (ΔE) contendo o extrato seco rico em celulasas e proteases produzido pelo SMIA-2, na remoção de sangue de tecidos padrões, EMPA 111, foi avaliado. EMPA 111 é um tecido de algodão artificialmente sujo de sangue comumente usado para determinar o desempenho de limpeza de detergentes e processos de lavagem.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4, o melhor desempenho da lavagem (ΔE) foi observado para o Tratamento 3 (Formulação 1 mais ES) seguido do Tratamento 4 (Formulação 2 mais ES). Embora o desempenho da lavagem usando o Tratamento 2 (solução de glicina/ Na_2CO_3 contendo o ES) tenha sido bom, ele foi menor que o Tratamento 3 e Tratamento 4. Considerando que os Tratamentos em que não foram adicionadas as enzimas (ES)

tiveram os piores desempenhos na lavagem dos tecidos, os resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e demonstraram a eficácia do ES na remoção de manchas de sangue dos tecidos.

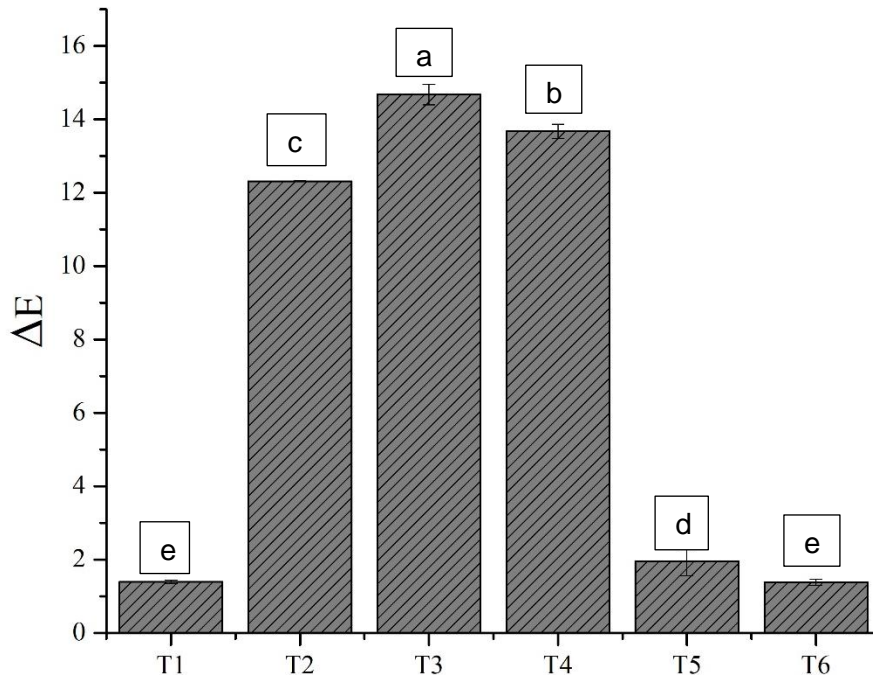


Figura 4. Parâmetros “ ΔE ” observados utilizando soluções de limpeza T1 (Água estéril sem enzimas), T2 (Tampão Na_2CO_3 / Glicina + enzimas) T3 (Formulação 1 + enzimas), T4 (Formulação 2 + enzimas), T5 (Formulação 1 sem enzimas), T6 (Formulação 2 sem enzimas). Legenda: Médias com letras iguais não diferem significativamente a $p < 0,05$, segundo o teste de Tukey.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5, exceto quando efetuada a lavagem sem as enzimas, todos os tratamentos T2, T3 e T4, apresentaram um aumento no parâmetro “L”, demonstrando uma boa eficiência no clareamento do tecido. Ressalta-se, entretanto que os maiores valores deste parâmetro foram obtidos para os tratamentos T3 e T4 (maiores valores indicam coloração mais clara), sugerindo que este produto contém componentes mais eficazes na remoção desse tipo de sujidade, com a mesma concentração de enzimas. A análise de variância (ANOVA) revelou que os resultados foram estatisticamente significativos, e de acordo com a análise de Tukey ($p < 0,05$) existe diferença entre os tratamentos.

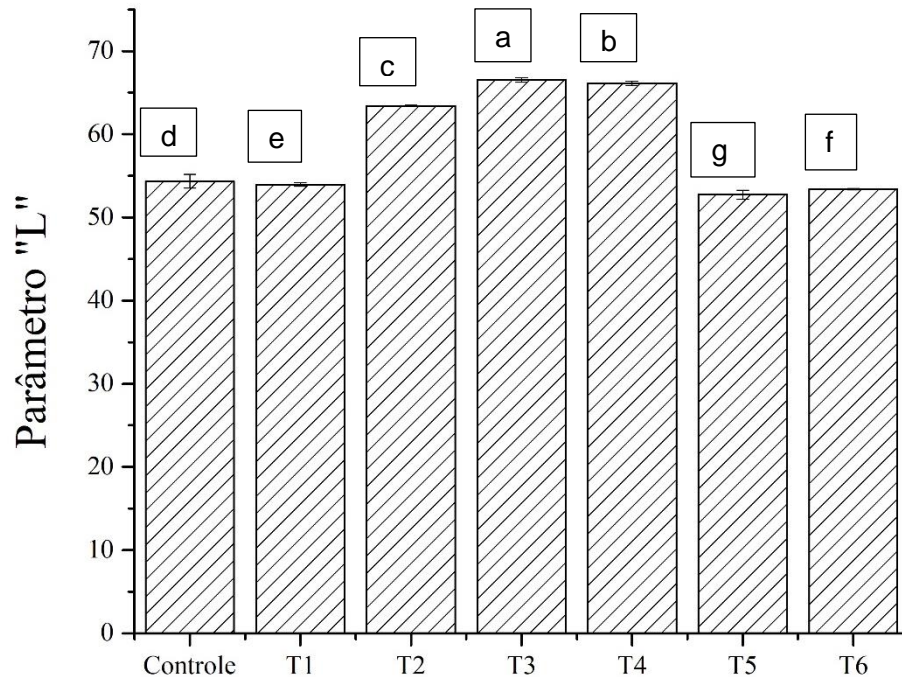


Figura 5. Parâmetros “L” observados utilizando o controle (tecido EMPA TEXCONTROL 111) e soluções de limpeza T1 (Água estéril sem enzimas), T2 (Tampão Na_2CO_3 / Glicina + enzimas) T3 (Formulação 1 + enzimas), T4 (Formulação 2 + enzimas), T5 (Formulação 1 sem enzimas), T6 (Formulação 2 sem enzimas). Legenda: Médias com letras iguais não diferem significativamente a $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.

Em relação ao parâmetro Chroma (Figura 6), o tratamento T2 apresentou o menor valor (cores mais claras), indicando que essa formulação foi a mais eficiente na remoção das sujidades de sangue dos tecidos. Entretanto, os tratamentos T3 e T4 apresentaram valores similares ao tratamento T2 testado, demonstrando a eficiência dos mesmos nas lavagens dos tecidos. A análise de variância (ANOVA) revelou que os resultados foram estatisticamente significativos, e de acordo com a análise de Tukey ($p < 0,05$) existe diferença entre os tratamentos.

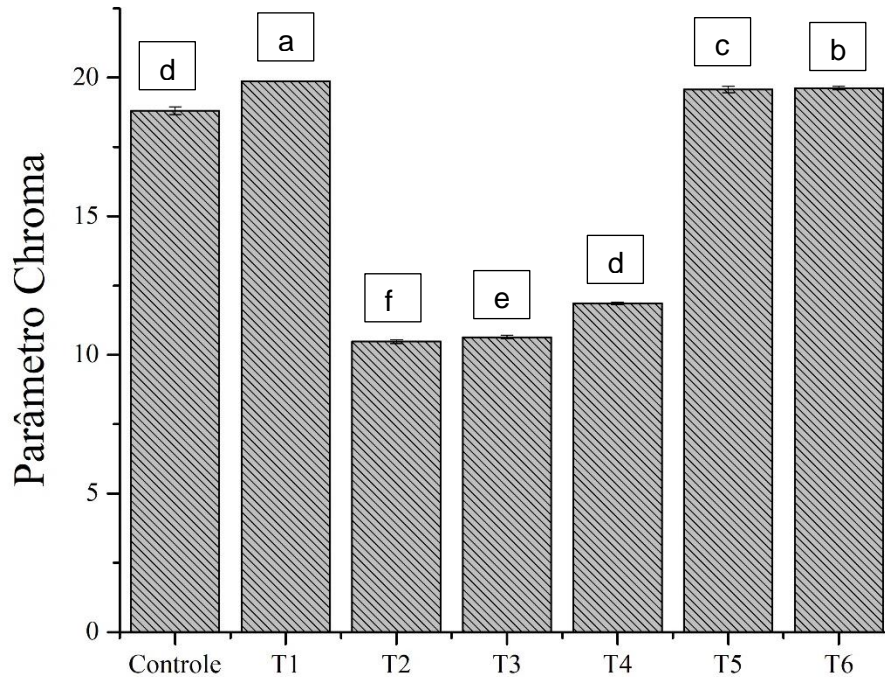


Figura 6. Parâmetros “Chroma” observados utilizando o controle (tecido EMPA TEXCONTROL 111) e as soluções de limpeza T1 (Água da torneira estéril sem enzimas), T2 (Tampão Na_2CO_3 / Glicina + enzimas) T3 (Formulação 1 + enzimas), T4 (Formulação 2 + enzimas), T5 (Formulação 1 sem enzimas), T6 (Formulação 2 sem enzimas). Legenda: Médias com letras diferentes diferem significativamente a $p \leq 0,05$, segundo o teste de Tukey.

Imagens de tecido manchado com sangue (EMPA 111) lavado com a solução de limpeza contendo soluções de limpeza T1 (Água da torneira estéril sem enzimas), T2 (Tampão Na_2CO_3 / Glicina + enzimas) T3 (Formulação 1 + enzimas), T4 (Formulação 2 + enzimas), T5 (Formulação 1 sem enzimas), T6 (Formulação 2 sem enzimas). As enzimas são 1% (p/v) de celulase e protease do *Bacillus* sp. SMIA-2 (Fig. 7). As imagens confirmam o desempenho das soluções na remoção de sangue do tecido de teste.

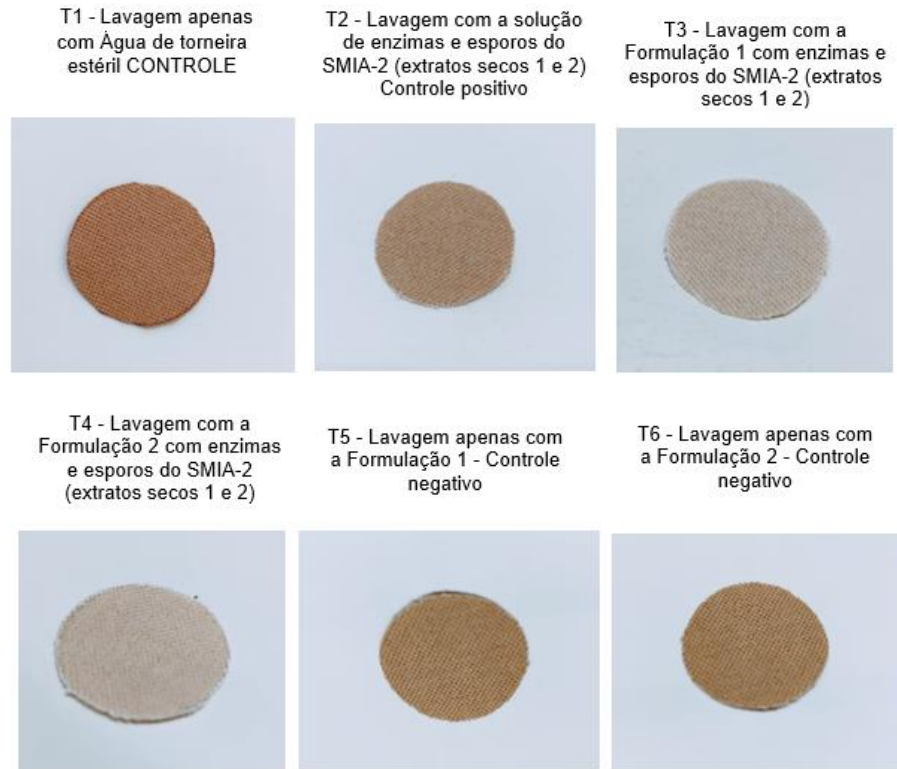


Figura 7. Imagens de amostras de tecido sujo de sangue (EMPA 111).

4.0 CONCLUSÃO

Esporos e enzimas de *Bacillus* sp. SMIA-2 foram eficazes na remoção de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e melhoraram o desempenho de soluções de limpeza na remoção de sujidades de sangue de tecidos padrões (EMPA 111).

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, F., Shaikh, I.A., Ahmad, I., Munir, S., Zameer, M., Hussain, T. (2014). Developments in health care and medical textiles - A mini Review 1. *Pak J Nutr*, 13, 780-783.
- Anjum, F., Gautam, G., Gnansounou, E., Negi, S. (2016). Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource Technology*. V.213, p. 262-269.
- Bader, J., Albin, A., Stahl, U. (2012). Spore-forming bacteria and their utilisation as probiotics. *Benef Microbes*, 3, 67-75. doi: <http://doi:10.3920/BM2011.0039>. PMID: 22348911.
- Barbosa, J.B., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2014). Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalise & Biotransformation*, 244-250. doi:<https://doi.org/10.3109/10242422.2014.934363>.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Mafart, P. (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and aw. *Food Microbiology*, 32(1), 79–86. doi:10.1016/j.fm.2012.04.011.
- ANVISA. Agência de Vigilância Sanitária (2007). Resolução RDC Nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução ao GMC, nº 50/0.
- Canadain Patent Application. (2016). Office de la propriété intellectuelle du Canada. *Un organisme d'industrie Canadá*, CA2883075 A1.
- Cayuela, C., Kai, K., Park, Y. S., Iijima, S., & Kobayashi, T. (1993). Insecticide production by recombinant *Bacillus subtilis* 1A96 in fed-batch culture with control of glucose concentration. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(5), 383–386. doi:10.1016/0922-338X(93)90139-Y .
- Côrrea T. L. R, Moutinho S. K. S., Martins M. L. L., Martins, M. .A. (2011). Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. *Food Scienc and Technology*, 31, 843-848. doi:<https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000400003>.

- Costa, E. A., Fernandes, R. N., Cruz, E., Moraes, L. P., Carvalho, R. V., Martins, M. L. L. (2017). Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2, 1-8. doi:<https://doi.org/10.23880/OAJMB-16000115>.
- Cruz, E. (2021). Compatibility study with detergent ingredients and washing performance by *Bacillus* sp. SMIA-2 cellulases. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 24 p.
- Daltin, D. (2011). *Introdução e primeiros conceitos. Tensoativos: química, propriedades e aplicações*. (Vols. Cap. 1, p. 1-44). São Paulo: Blucher.
- De Cesare, A. D., Caselli, E., Lucchi, A., Sala, C., Parisi, A., Manfreda, G., Mazzacane, S. (2019). Impact of a probiotic-based cleaning product on the microbiological profile of broiler litters and chicken caeca microbiota. *Poultry Science*, 98, 3602-3610. doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pez148>
- DeQueiroz. G. A., Day, D. F. (2008). Disinfection of *Bacillus subtilis* spore-contaminated surface materials with a sodium hypochlorite and a hydrogen peroxide-based sanitizer. . *Lett Appl Microbiol*, 46, 176-80. doi: [doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02283.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02283.x). PMID: 18215.
- Elshaghabee, F. M. F. et al. (2017). *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8. doi:<http://Doi:10.3389/fmicb.2017.01490>
- Ferreira, L.P. (2018). Estudos para o desenvolvimento de formulações de limpeza contendo protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 usando a metodologia de superfície de resposta. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. *Tese de Mestrado*, 65 p. Campos dos Goytacazes.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: na emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 563-575.
- Gao, Y., Cranston, R. (2008). Recent advances in antimicrobial treatments of textiles. *Textile Research Journal*, 60–72.
- Janssen,P. H., Peek, K., Morgan, H. W. (1994). Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. *Applied Microbiology and Biotechnology*., 41, 400-406.
- Johnvesley, B., Naik, G.R. (2001). Study on Production of Thermostable Alkaline Protease From Thermophilic And Alkaliphilic *Bacillus* sp. JB99 in a Chemically Defined Medium. *Journal Process Biochemistry*, 37, 139-144.

- Kadam, S.R., Den Besten, H. M., Van Der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int J Food Microbiol.*, 165, 259-264. doi:doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025.
- Khardziani, T., Sokhadze, K., Kachlishvili, E., Chistyakov, V., & Elisashvili, V. (2017). Optimization of enhanced probiotic spores production in submerged cultivation of *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(2), 132–136. doi:10.15414/jmbfs.2017.7.2.132-136.
- Ladeira, S. A., Delatorre, A. B., Andrade, M. V. V., Martins, M. L. L. (2012). Nota Científica: Utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus* sp. termofílico. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15, 92–98.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V.H., Martins, M.L.L. (2010). Protease production using agroindustrial residues by thermophilic *Bacillus* sp. in submerged fermentation: Optimization of the culture medium using an experimental design approach. *Revista Química Nova*, 33, 324–328. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000200018.
- Lee, S. C., Kim, S. H., Park, I. H., Chung, S. Y., Choi, Y. L. (2007). Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Archives of Microbiology*, 307-312.
- Li,X.H., Lee, J.H. (2017). Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. . *J Microbiol.* , 55, 753-766. doi:http://doi: 10.1007/s12275-017-7274-x. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28956348
- Madslien, V. K. M., Asare, E. H., Øivind, B. N., Erik, J., Pål, T., Siamak, Y., Ole, M. E., Kaare, M. N., Bjørnar, Y., Yngvild, W. (2019). *Current knowledge of the health and environmental risks of microbialbased cleaning products. Scientific opinion of the Panel on Microbial Ecology of the Norwegian Scientific Committee for Food and Environment.* Norwegian Scientific Committee for Food and Environment , Oslo, Norway. doi:ISBN: 978- 82-8259-325-0, ISSN: 2535-4019.
- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Natarajan, S., Sivakumar, A., Ali, F.(2016). Evaluation of the stability of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 during processing and storage of functional foods. *Int. J. Food Sci. Technol*, 51 894–901. 10.1111/ijfs.13044.
- Marsch, G, Mashaqi, B., Burgwitz, K., Bisdas, T., Knigina, L., Stiesch, M., et al. (2014). Prevention of pacemaker infections with perioperative antimicrobial treatment: an in vitro study. *Europace*, 16(4), 604-611.

- Mazkour, S., Shekarforoush, S.S., Basiri, S. (2019). The effects of supplementation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* spores on the intestinal microflora and growth performance in rat. *Iran J Microbiol.*, 11, 260-266. doi: PMID: 31523411; PMCID: PMC671187
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426-428. doi:https://DOI: 10.1021/ac60147a030.
- Moraes, M. N., Da Silveira, W. C., Teixeira, L. E. M., Araújo, I. D. . (2013). Mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials. *Rev Med Minas Gerais*, 23, 96-101. doi:DOI: 10.5935/2238-3182.20130015.
- Niyonzima, F. N., More, S. S. (2015). Microbial detergent compatible lipases. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 74 , 105-113.
- Niyonzima, N.F. (2018). Detergent-compatible bacterial cellulases. *Journal of Basic Microbiology*, 1-14. doi:https://doi.org/10.1002/jobm.201800436.
- Oliveira, A. C, Silva, M. D. M., Garbaccio, J. L. . (2012). Vestuário de profissionais de saúde como potenciais reservatórios de microrganismos: uma revisão integrativa. *Florianópolis*, 21, 685, 688-689.
- Rabinovitch, L., Oliveira, E. J. . (2015). Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos, – 1. Ed. – Rio de Janeiro: . *Montenegro Comunicação*.
- Rodríguez, V. B., Alameda, E. J., Gallegos, J. F. M., Requena, A. R., López, A. I. G. (2006). Thermal deactivation of a commercial α -amylase from *Bacillus licheniformis* used in detergents. *Biochemical Engineering Journal.*, 27, 299-304.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 271-275. doi:https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003.
- Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A. G., Postollec, F., Leguerinel, I., Couvert, O., ... 130 Coroller, L. (2020). Suboptimal *Bacillus licheniformis* and *Bacillus weihenstephanensis* spore incubation conditions increase heterogeneity of spore outgrowth time. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(1), 1–14. doi:10.1128/AEM.02061-19.
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1 , 84-98.
- Volkart, P. A., Spagiari, M. S., Bizani, D. . (2017). Estresse e lesões em atletas de esportes coletivos. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR, Umuarama*, 20, 25-32.

- Walentowska, J., Flaczyk, J.F. (2013). Thyme essential oil for antimicrobial protection of natural textiles. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2013;84:407–11.
- Walter, N., McQueen, R.H., Keelan, M. (2014). In vivo assessment of antimicrobial-treated textiles on skin microflora . *Int J Cloth Sci Technol*, 330-342.
- Ward, O. P. (1985). Proteolytic enzymes. *Comprehensive Biotechnology Oxford*,, v. 3, n. 7, p. , 789-818.
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., Walker, B. . (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. . *AMB Express*, 8, 10. doi:doi:10.1186/s13568-018-0536-0.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O efeito interativo combinado de diferentes concentrações de Goma arábica e Celulose microcristalina e da temperatura de entrada do secador por spray no processo de secagem das celulases foi otimizado por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) para obter a retenção máxima das atividades das enzimas. O processo de atomização das celulases na presença de 1,0% (p/v) de Goma arábica e 1,0% (p/v) de Celulose microcristalina e a temperatura de entrada de 70°C preservaram as atividades das enzimas. A atividade da avicelase em pó foi completamente preservada quando armazenada a 5°C por até seis meses e perdeu apenas 4% quando armazenada em temperatura ambiente. No entanto, a atividade CMCase caiu (16%) quando a enzima seca foi mantida em temperatura ambiente. Portanto, ao armazenar as enzimas em baixas temperaturas, foi possível estender a vida útil tanto da avicelase quanto da CMCase.

O delineamento composto rotacional central (CCD) 2³ foi utilizado para avaliar o desempenho do uso de celulases como aditivo na formulação de detergentes. As celulases (CMCase e avicelase) de *Bacillus* sp. SMIA-2 podem ser combinadas com Triton X-100, Renex 95 e peróxido de hidrogênio em uma única composição para que os benefícios desses três componentes na hidrólise da fibra de celulose em tecidos de algodão possam ser alcançados melhorando a qualidade do tecido, iluminando as cores e os grumos ásperos do algodão. Embora as celulases fossem estáveis em uma ampla faixa de concentração dos três componentes utilizados para formular a solução de limpeza, seu desempenho em hidrolisar uma fibra de celulose dos tecidos de algodão foi maior quando qualquer

um dos três componentes (Triton X-100, Renex 95 ou peróxido de hidrogênio) na solução de limpeza foi usado em concentrações mais baixas. Isso foi importante porque evita a adição desnecessária de componentes na solução de limpeza. As enzimas podem substituir ou diminuir os níveis de surfactantes utilizados nas formulações de detergentes. Pequenas quantidades podem substituir grandes quantidades de químicos, tais como os surfactantes e oxidantes. Além de trazer maior poder de limpeza aos detergentes, já que os tensoativos não conseguem emulsionar (solubilizar) eficazmente a matéria orgânica, as enzimas contribuem de forma positiva para a questão da sustentabilidade.

A formação de biofilme em diversos tipos de têxteis leva a uma crescente situação de perigo sanitário, uma vez que pode provocar doenças crônicas, tornando os tratamentos com antimicrobianos usualmente necessários. Criar uma superfície antimicrobiana que iniba a adesão de biofilmes é um objetivo muito desejado. A tecnologia para a produção das enzimas e dos esporos do *Bacillus* sp. SMIA-2 já foi desenvolvida e neste trabalho foi demonstrado a viabilidade da aplicação destes bioativos para o desenvolvimento de formulações de detergentes biodegradáveis, oferecendo ao mercado produtos com tecnologia inovadora e sustentável.

A busca por um detergente novo (Biossurfactante) com esporos e enzimas deve continuar a aumentar a eficiência e economia de vários processos de preparação de detergentes. Os estudos intensivos ainda são necessários para obter o detergente compatível com melhores propriedades. Para conseguir isso, a forte ligação entre as indústrias e a academia é muito importante e necessária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adel, A. M., El-Wahab, Z. H. A., Ibrahima, A. A.; Al-Shemya, M. T. (2011). Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part II: Physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 83, 676–687.
- Aehle, W. (1990). *Enzymes in Industry: Production and Application*. Wiley – VCH, The Netherlands.
- Alloue, W.A.M., Destain, J, Amighi, K., Thonart, P. . (2007). Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in the presence of additives. . *Process Biochemistry* , 42(9), 1357–1361. doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.05.024.
- Amin, M., Rakhisi, Z., Ahmady, A.Z. (2015). Isolation and Identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna J Clin Microb Infec*. doi:https://doi.org/10.17795/ajcmi-23233.
- Anandharamakrishnan, C., Rielly, C. D., Stapley, A. G. F. (2007). Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. *Drying Technology*, 25 , 799–807.
- Andrade M.V.V., Delatorre, A.B., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2011). Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 204-208. doi:https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100031.
- ANVISA. (2012). RESOLUÇÃO - RDC Nº 55, DE 14 DE NOVEMBRO DE 2012. *Uso de detergentes enzimáticos*.
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E, Shirtliff, M.E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*, 5, 445–459.

- Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S., Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 1–10.
- Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31, 488–494.
- Azevedo, N.F., Cerca, F. (2012). *Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria. Produção de Comunicação*. Porto: Publindustria.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 495-508.
- Barbosa, J.B., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L. (2014). Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatalise & Biotransformation*, 244-250. doi:<https://doi.org/10.3109/10242422.2014.934363>.
- Barros, F. Q. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, 30 , 409-414.
- Barros, F.F.C., Quadros, C.P., Júnior, M. R. M., Pastore, G.M. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, 30.
- Batrakov, S. G., Rodionova, T. A., Esipov, S. E., Polyakov, N. B., Sheichenko, V. I., Shekhovtsova, N. V., Lukin, S. M., Panikov, N. S., Nikolaev, Y. A. (2003). A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1634, 107-115
- Behring, J. L. (2004). Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. *Química Nova*, 27, 492-495.
- Belghith, H., Chaabouni, S. E., Gargouri, A. . (2001). Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 253–258.
- Bernard, L., Vaudaux, P., Rohner, P., Huggler, E., Armanet, M., Pittet, D., Lew, P.J., Schrenzel, J. (2004). Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant *S. aureus* strains. *Journal of Microbiological Methods*, 57, 231-239. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.01.012>.
- Bernardo, S.P.C., Rosana, A.R.R, Souza, A.N., Chiorean, S., Martins, M.L.L., Vederasb, J.C. (2020). Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an Antimicrobial- and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil. *Microbiology Resource Announcements*, 1-3. doi:<http://doi:10.1128/MRA.00106-20>.
- Bernheimer, A. W., Avigad, L. S. . (1970). Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 61, 361–369.

- Bhairi, S. (2001). Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. *Calbiochem-Novabiochem Corporation*, 3-29.
- Bognolo, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 41-52.
- Both, F., Fischer, A. (2017). *Gestão e contabilidade ambiental* (Vol. 8). 49-57: Unoesc & Ciência – ACSA.
- Brazil, Decreto n.7.9095, de 05 de janeiro de, 1977. , Diário Oficial da União. Brasília, (1977).
- Brazil, Lei n .7.365, de 13 de setembro de, 1985., Dispõe sobre a fabricação de detergentes não biodegradáveis (Diário Oficial da União 1985).
- Brumano, L.P., SolerOLER, M.F.; DA SILVA, S.S. (2016). Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. *Industrial Biotechnology*, 12, 31-39.
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 520-529. doi:doi: 10.1007/s002530051329.
- Carvalho, R.V., Corrêa, T.L.R., Vianna, A.P., Martins, M.L.L. (2008a). Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 380-386. doi:https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000200017.
- Carvalho, R.V., Côrrea, T.L.R, Silva, J.C.M., Mansu, L.R.C.O. (2008b). Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 102-107. doi:https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100023.
- Cassettari, V.C., Strabelli, T., Medeiros, E.A.S. . (2005). *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? . *Braz J Infect Dis*, 70-76. doi:https://doi.org/10.1590/S1413-867020050001000.
- Castro, H.F., Mendes, A.A., Santos, J.C. (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quimica Nova*, 27, 146-156.
- Cherry, J. R., Fidantsef, A.L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 14, 438-443.
- Chio, J.T., Dayrit, F.M., Ocampo, P.P., Ocampo, V.R. (1992). A study on the environmental impact of detergents, III: toxicity of alkylbenzene sulfonates (ABS) and coconut fatty alcohol sulfates towards fish and rats. . *Philipp J Sci*, 39–50.
- Christova, N., Tuvela, B., Nikolova-Damyanova, B. (2004). Enhanced hydrocarbon biodegradation by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. . *Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, 59, 205-208.
- Côrrea T. L. R, Moutinho S. K. S., Martins M. L. L., Martins, M. .A. (2011). Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. *Food Scienc and Technology*, 31, 843-848. doi:https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000400003.

- Corteza, D.V., Castroa, H. F., Andradeb, G.S.S. (2017). Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Quimica Nova*, 1-12.
- Costa, E. A., Fernandes, R. N., Cruz, E., Moraes, L. P., Carvalho, R. V., Martins, M. L. L. (2017). Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for cellulase production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2, 1-8. doi:<https://doi.org/10.23880/OAJMB-16000115>.
- Costa-Silva, T.S.; Said,S.; Souza, C.R.F.; Oliveira, W.P. Stabilization of Endophytic Fungus *Cercospora kikuchii* lipase by Spray Drying in the Presence of Maltodextrin and β -Cyclodextrin. (2010). *Drying Technology*, 28, 1245 – 1254.
- Cruz, E., Moraes, L.P., Costa, E.A., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2019). Optimization of Food-Waste Based Culture Medium for Cellulase Production by Thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and effect of Divalent Metal Ions on Activity and Stability of the Enzyme at Higher Temperatures. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS)* , 6, 331-337. doi:<https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.6741>.
- Das, P., Mukherjee, S., Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1675-1684.
- De Cesare, A. D., Caselli, E., Lucchi, A., Sala, C., Parisi, A., Manfreda, G., Mazzacane, S. (2019). Impact of a probiotic-based cleaning product on the microbiological profile of broiler litters and chicken caeca microbiota. *Poultry Science*, 98, 3602-3610. doi:<https://doi.org/10.3382/ps/pez148>.
- DeSimone, J.M. (2002). Practical approaches to green solvents. *Science*, 799–803.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, M. . (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* , 16-34.
- Driks, A. (1999). *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 63, 1-20.
- Duc, L.H. et al. (2004). Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. *Vaccine*, 22, 1873-1885.
- ESSENTIAL Industries. Essential Industries, Inc., 2013. Disponível em: . Acesso em: 05 Fevereiro 2021. (2013).
- Folmsbee, M., Duncan,, K., Han, S. O. Nagle, D., Jennings, E., McInerney, M. (2006). Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojavensis* strain JF-2. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 645-649.
- Fueyo, J. M., Mendonza, M. C., Martín, M. C. (2005). Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recoveres from nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microbes and Infection*, 7, 187-194.
- Galembeck, Eduardo. (1996). Propriedades Físico-Químicas e Interação com membranas biológicas dos surfactantes não-iônicos da série Renex (Nonifenol etoxilado).

- Gomes, M.J.P. (2013). Gênero *Bacillus* spp. In: Tópicos em Bacteriologia Veterinária. Porto Alegre –RS. *Faculdade de Veterinária (UFRGS)*.
- Global Green Cleaning Products Market. (2020). Divulgado pela Prophecy Market Insights em junho de 2020.
- Henau, H., Matthijs, E., et al. (1989). Trace analysis of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by HPLC. Detailed results from two sewage treatment plants. In: Quaghebeur D, Temmerman I, Angeletti G (eds) Organic contaminants in waste water, sludge and sediment. *Elsevier Applied Scienc.*
- Henriques, A. O., Moran, C. P. Jr. (2000). Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods*, 20, 95-110.
- Herrera, J. J. R. et al. (2007). Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. aureus under three different experimental conditions. *Food Microbiology*, 24, 585-591.
- Hmidet, N., Bayoudh, A., Berrin, J. G., Kanoun, S., Juge, N., Nasri, M. (2009). Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1: Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 43, 499-510.
- Huszczka, E., Burczyk, B. (2003). Biosurfactant production by *Bacillus coagulans*. *Journal of Surfactants and Detergents*, 6, 61-64.
- Imamura D. et al. (2011). Proteins involved in formation of the outermost layer of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 193, 4075-4080.
- Isah, A.G. (2006). Production of Detergent from Castor Oil. *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*, 9, 153-160.
- Jan, W.G. (2007). Encyclopedic Dictionary of Polymers. *New York, Springer Science*, 108-109.
- Javaheri, M.; Jenneman, G.E.; Mcinerner, M.J; Knapp, R.M. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. (1985). *Applied Environmental Microbiology*, 50, 698–700.
- Kara, A., Spillan, J., Deshields, O.W. (2005). The Effect of a Market Orientation on Business Performance: A Study of Small-Sized Service Retailers Using MARKOR Scale. *Journal of small business Management*. doi:[https://doi:10.1111/j.1540-627x.2005.00128.x](https://doi.org/10.1111/j.1540-627x.2005.00128.x).
- Kamoun, A. S., Haddar, A., Ali, N.E.H., Frikha, B. G., Kanoun, S., Nasri, M. (2008). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*, 163: 299-306.
- Kaplan, J.B. (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*.89:205–218.
- Kemmi, T., Kodama, S., Yamamoto, A., Inoue, Y., Hayakawa, K. (2007). Determination of sequestering agents in cosmetics and synthetic detergents by high-performance liquid chromatography with ultra violet detection. *J Chromatogr A*, 63–68.

- Kennedy, M. J., Reader, S. L., Swierczynski, L. M. (1994). Preservation records of micro-organisms: evidence of the tenacity of life. . *Microbiology*, 140, 2513- 2529.
- Kiran, K. K., Chandra, T. S. (2008). Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 1023–1031.
- Kogawa, A. C. (2017). Synthetic detergents: 100 years of history. *Saudi Pharm J*, 25, 934–938.
- Koneman, E. et al. (2001). *Diagnóstico microbiológico* (Vol. 5). Rio de Janeiro:: Guanabara.
- Kuroda, M., Ito, R., Tanaka, Y., Yao, M., Matoba, K., Saito, S. (2008). Staphylococcus aureus surface protein SasG contributes to intercellular autoaggregation of Staphylococcus aureus. *Biochem Biophys Res Commun*, 377: 1102-1106.
- Krieger, N., Camilios Neto, D., Mitchell, D. A. (2010). Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. *Adv Exp Med Biol*, 672, 203-210.
- Ladeira, S. A., Cruz, E., Delatorre, A. B., Barbosa, J. B., Martins, M. L.L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 110-115. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008>.
- Ladeira, S.A. (2013). Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas e xilanases por espécies de *Bacillus* sp. *Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF*, 1-164.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V.H., Martins, M.L.L. (2010). Protease production using agroindustrial residues by thermophilic *Bacillus* sp. in submerged fermentation: Optimization of the culture medium using an experimental design approach. *Revista Química Nova*, 33, 324–328. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000200018>.
- Lee, S. C., Kim, S. H., Park, I. H., Chung, S. Y., Choi, Y. L. (2007, 307-312). Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Archives of Microbiology*, 188.
- Leon, V.M., Lopez, C., Lara-Martin, P. D., Varo, P., Gonzalez-Mazo, P. (2006). Removal of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates at low temperatures during activated sludge treatment. *Chemosphere*, 64, 1157-1166.
- Li,X.H., Lee, J.H. (2017). Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. . *J Microbiol.* , 55, 753-766. doi:<http://doi: 10.1007/s12275-017-7274-x>. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28956348.
- Liao, Y. H., Brown, M. B., Abdul, Q., Martin, G. P. (2003). Investigation of the physical properties of spray-dried stabilized lysozyme particles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55, 1213-1223.
- Libardi, N., Soccol, C. R., Tanobe, V.O., de Souza Vandenberghe, L.P. (2020). Definition of liquid and powder cellulase formulations using domestic wastewater

- in bubble column reactor. *Appl Biochem Biotech*, 190, 113-128. <http://doi.10.1008/s12010-019-03075-1>.
- Lima, D.C., Abreu, P.A., Freitas, C.C., Santos, D.O., Borges, R.O., Santos, T.C., Cabral, L.M., Rodrigues, C.R., Castro, H.C. (2005). Snake venom: any clue for antibiotics and cam? Evid Based Complement. *Alternat Med*(2), 39-47.
- Lin, S. C., Lin, K. G., LO, C. C., Lin, Y. M. (1998). Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. *Enzyme and Microbial Technology*, 23 , 267-273.
- Lund, H., Kaasgaard, S.G., Skagerlind, P., Jorgensen, L., Jorgensen, C.I., Van de Weert, M. (2012). Protease and Amylase Stability in the Presence of Chelators Used in Laundry Detergent Applications: Correlation Between Chelator Properties and Enzyme Stability in Liquid Detergents. *J Surfact Deterg*, 15, 265-276.
- Madani, N. B., Greenland, T., Richard, Y. (1998). Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk. *Veterinary Microbiology*, 59, 139-145.
- Madigan, M.T., Mart Inko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2010). *Microbiologia de Brock* (Vol. 12). Porto Alegre: Artmed.
- Maniasso, N. (2001). Ambientes micelares em química analítica. *Quimica Nova*, 24 , 87-93.
- Marahiel, M. A., Danders, W., Krause, M. Kleinkauf, H. (1979). Biological role of gramicidin-S in spore functions. Studies on gramicidin-S negative mutants of *Bacillus brevis* 9999. *European Journal of Biochemistry*, 99, 49–52.
- Martins, M.B.D.O. (2009). Avaliação do potencial de formação de AOX na indústria de detergentes. *Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa*.
- Maurer, K.H. (2004). Detergents proteases. *Current opinion in Biotechnology*. 15, 330-334.
- McDougald D, e. a. (2012). Should we stay or should we go mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.*, 10, 39-50.
- Mckenney, P., Driks, A., Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews of Microbiology*, 11, 33-44.
- Mohammad, J., Jenneman, G. E., Mcinerney, M. J., Knapp, R. M. (1985). Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 698-700.
- Mokashe, N., Chaudhari, B., Patil, U. (2017). Detergent-Compatible Robust Alkaline Protease from Newly Isolated Halotolerant Salinicoccus sp. UN-12. *J Surfact Deterg*, 20, 1377-1393.
- Morikawa, M., Ito, M., Imanaka, T. . (1992). Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 255-261.

- Mousavi, M.E., Irish, J.L., Frey, A.E., Olivera, F., Edge, B.L. (2010). Global warming and hurricanes: the potential impact of hurricane intensification and sea level rise on coastal flooding . *Springer*. doi:<https://doi.org/10.1007/s10584-009-9790-0>.
- Mulligan, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>.
- Naganrthran, A., Masomian, M., Rahman, R.N.Z.R.A., Ali, M.S.M., Nooh, H.M. (2017). Improving the Efficiency of New Automatic Dishwashing Detergent Formulation by Addition of Thermostable Lipase, Protease and Amylase. *Molecules* ., 22, 1-18.
- Namaldi, A., Çalik, P., Uludag, Y. (2006). Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. *Drying Technology*, 4 , 1495–1500.
- Neves, L. C. M., Oliveira, K. S., Kobayashi, M. J., Penna, T. C. V., Converti, A. (2007). Biosurfactant production by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semidefined Glucose/casein-based media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137, 539-554.
- Nicholson, W. J. et al. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. . *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 64, 548-572.
- Nitschke, M., Pastore, G. M. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicações. . *Química Nova [online]*, 25, 772-776. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>.
- Novozyme (2002). Disponível em: <<http://novozyme.com>>. Acessado em: dezembro de 2020. (n.d.).
- Ó'Fágáin, C. . (1997). Stabilizing Protein Function. *Springer, Ireland*.
- Oliveira, L.R.C., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L., Martins, M.A. (2014). Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 36, 215-222. doi:<https://doi.org/10.4025/actascibiols.v36i2.17827>.
- Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation. *Annu Rev Med*, 64:175-188.
- Pandey, P., Gopal, B. (2010). Effect of Detergents on the Growth of Two Aquatic Plants: *Azolla pinnata* and *Hydrilla verticillata*. *Environment We Int. J. Sci. Tech*, 5 , 107-114.
- Peighambardoust, S. H., Tafti, A. G., Hesari, J. (2011). Applicationa of spray-drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*,, 22, 215 – 224.
- Penteado, J. E. (2006). Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. *Química Nova [online]*, 29 , 1038-1046.
- Perales, J.A., Manzano, M., Sales, D., Quiroga, J.M. (1999). Linear alkylbenzene sulphonates: biodegradability and isomeric composition. . *Bull Environ Contam Toxicol*, 63, 94–100.

- Polonca, S. (2020). Environment Shapes the Intra-species Diversity of *Bacillus subtilis* Isolates. . *Microb Ecol*, 79: 853–864.
- Preté, Paulo Sérgio Castilho. (2006). Solubilização de membranas eritrocitárias: análise quantitativa do efeito hemolítico induzido por surfactantes. *Tese. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas.*, 123 f.
- Quattara, H.G., Revercon, S., Niamke, S.L., Nasser, W. (2017). Regulation of the synthesis of pulp degrading enzymes in *Bacillus* isolated from cocoa fermentation. *Food Microbiol*, 63:255-262
- Rahman, I.A., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B., Basri, M. (2013). Formulation and Evaluation of an Automatic Dishwashing Detergent Containing T1 Lipase. *J Surfact Deterg*, 16 , 427-434.
- Rejeki, S., Rahmat, A. (2013). Chronic effects of detergent surfactant (linear alkylbenzene sulfonate/LAS) on the growth and survival rate of Sea bass (*Lates calcalifor* Bloch) larvae. *Journal of Coastal Development*, 8 , 207–226.
- Rodríguez, V.B., Alameda, E.J., Gallegos, J.F.M., Requena, A.R., López, A.I.G. (2006). Thermal deactivation of a commercial α -amylase from *Bacillus licheniformis* used in detergents. *Biochemical Engineering Journal.* , 27, 299-304.
- Samborska, K., Witrowa-Rajchert, D., Gonçalves, A. (2005). Spray drying of amylase—The effect of process variables on the enzyme inact Spray drying of amylase—The effect of process variables on the enzyme inactivation. *Drying Technology*, 23, 941 – 953.
- Selivanov, A. (2005). Stabilization of cellulases using spray drying. *Eng Life Sci*, 5, 78 – 80. <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.200400053>.
- SCIENCE in the Box. Procter & Gamble Co. Disponível em: . Acesso em: 10 jan. 2021. (2013).
- Shoji, J., Kato, T. . (1975). Studies on antibiotics from Genus *Bacillus* 7 amino-acid sequence of cerexin-A. *Journal of Antibiotics*, 28, 764-769.
- Silva, C.R., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. (2007). Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of enzymatic activity. *Brazilian Journal Microbiol*, 38, 253-257. doi:<http://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200012>.
- Silva, F.M., Lacerda, P.S.B., Jones Junior, J. (2005). Desenvolvimento sustentável e química verde. *Química Nova*, 28, 103-110.
- Sloth, J., Jørgensen, K., Bach, P., Jensen, A. D., Kiil, S., Dam-Johansen, K. (2009). Spray drying of suspensions for pharma and bio products: drying kinetics and morphology. *Industrial and Engineering Chemical Research*, 48, 3657–3664.
- Strobel, J.S., Coral, E., Selig, P.M. (2004). Indicadores de sustentabilidade corporativa: uma análise comparativa. . ENCONTRO ANUAL DA ANPAD - Curitiba.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 271-275. doi:<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>.

- Souza, T.F.O., Oliveira, S.D., Santos, A.F., Freire, D.M.G., Lima do Carmo, F. (2017). Cad. Prospec. Salvador. *Mapeamento tecnológico da aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza*, 10, 226-236.
- Souza, T.F.O., Oliveira, S.D., Santos, A.F., Freire, D.M.G., Lima do Carmo, F. (2017). Mapeamento tecnológico da aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza. . , 10, 226-236.
- Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T.J., Geoghegan, J.A. (2014). Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol*, 4:171. doi:10.3389/fcimb.2014.00171.
- Sutili, F.K., Miotto, N., Rigoti, E., Pergher, S.B.C., Penha, F.G. (2009). Aplicação de zeólitas sintéticas como coadjuvante em formulação de detergente. *Química Nova*, 32, 879-883.
- Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K., Tsukamoto, K. . (1965). The chemical structure of polymyxin E. The identities of polymyxin E1 with colistin A and polymyxin E2 with colistin B. *Journal Biochemistry*, 57, 226–227.
- Tavares, W. (2002). *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. Rio de Janeiro: Editora Atheneu.
- Tavassoli et al. (2013). Investigation of spore coat display of *Bacillus subtilis* β -galactosidase for developing of whole cell biocatalyst. *Archives of Microbiology*, 195, 197-202.
- Trabulsi, L.R., Altherthum, F. (2005). *Microbiologia. Staphylococcus aureus. cap. 20*. São Paulo: Atheneu.
- Vanittanakom, N.; Loeffler, W.; Koch, U.; Jung, G. Fengycin – A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. (1986). *Journal of Antibiotics*, 39, 888-901.
- Varanasi, A., Obendorf, S.K., Pedersen, L.S., Mejdal, R. (2001). Lipid distribution on textiles in relation to washing with lipases. *J Surfact Deterg*, 4, 135-146.
- Yangxin, Y., Jin, Z., Bayly, A. E. (2008). Development of Surfactants and Builders in Detergent Formulations. . *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 517-527.
- Zhang, J., Zhang, Y., Li, W., Li, X.; Lian, X. (2014). Optimizing detergent formulation with enzymes. *J Surfact Deterg*, 17, 1059-1067.