

UTILIZAÇÃO DE *BACILLUS* sp. SMIA-2 E SUAS ENZIMAS NA  
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

**RAPHAEL PIRES BOLZAN**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO - 2021

UTILIZAÇÃO DE *BACILLUS* sp. SMIA-2 E SUAS ENZIMAS NA  
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

**RAPHAEL PIRES BOLZAN**

“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<sup>a</sup> Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2021

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

B694

Bolzan, Raphael Pires.

Utilização de *Bacillus* sp. SMIA-2 e suas enzimas na alimentação de frangos de corte / Raphael Pires Bolzan. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

100 f. : il.  
Inclui bibliografia.

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. Proteases. 2. Bacillus. 3. Adjuvantes. 4. Estabilidade. 5. pH. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

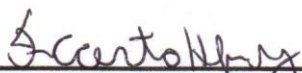
UTILIZAÇÃO DE *BACILLUS* sp. SMIA-2 E SUAS ENZIMAS NA  
ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

**RAPHAEL PIRES BOLZAN**

“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”

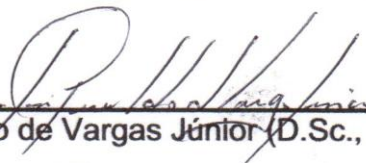
Aprovada em 31 de março de 2021

Comissão Examinadora



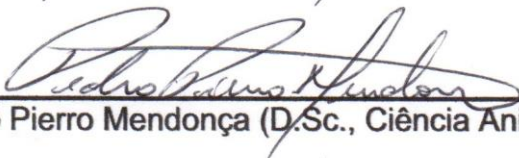
---

Prof. Fábio da Costa Henry (D.Sc., Ciência Animal) UENF



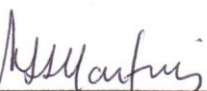
---

Prof. José Geraldo de Vargas Júnior (D.Sc., Zootecnia) UFES



---

Prof. Pedro Pierro Mendonça (D.Sc., Ciência Animal) IFES



---

Profª. Meire Leis Leal Martins (Ph.D., Molecular Biology and Biotechnology)  
UENF (Orientadora)

À minha esposa Thays,  
À minha mãe Izaura,  
Ao meu pai Judson,  
Ao meu irmão Júnior,  
Ao meu sobrinho Igor.

Dedico com carinho

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grande Arquiteto do Universo pela oportunidade de crescimento a cada dia, por ter conquistado mais um degrau nessa escada que é a vida, cheia de desafios, obstáculos, incertezas e surpresas;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Instituto Federal do Espírito Santo – IFES pela oportunidade de realização do curso de Doutorado Institucional – DINTER;

À prof<sup>a</sup>. Ph.D. Meire Leis Leal Martins pela orientação, apoio e por ter me proporcionado uma linha de pesquisa prazerosa para se aprender e trabalhar ao longo desses anos durante o curso;

Aos professores integrantes da banca examinadora Fábio da Costa Henry, José Geraldo de Vargas Júnior, Pedro Pierro Mendonça, por terem aceitado a contribuir com esse trabalho;

À minha esposa Thays, pelo amor, companheirismo, por estar sempre presente e entender essa correria das nossas vidas nesses últimos anos;

Aos meus pais e irmão, em especial à minha mãe, que pelos seus esforços do passado me proporcionou oportunidade em estudar e que hoje, em uma condição favorável estou colhendo os frutos;

A todos os meus amigos de Laranjeiras e Alegre – ES, que independente da distância e contratempos da vida sempre se fizeram presentes quando possível em momentos de alegria e descontração;

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, em especial a Aninha e Érica por terem me ensinado e ajudado tudo que foi necessário nesses

anos no laboratório e por terem contribuído para meu aprendizado em uma área completamente nova para mim;

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Microrganismos termofílicos e o <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	4
2.2 Microencapsulação e secagem por spray dryer.....	7
2.2.1 Adjuvantes na produção de enzimas.....	11
2.2.1.1 Carboximetilcelulose.....	12
2.2.1.2 Maltodextrina .....	12
2.2.1.3 Aerosil ®.....	13
2.3 Enzimas e sua utilização na avicultura .....	14
3. TRABALHOS .....	19
3.1. Optimization of spray-drying conditions for obtaining <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 protease powder .....	19
3.2 EFFECTIVENESS OF MALTODEXTRIN AND AEROSIL® IN SPRAY DRYING PERFORMANCE OF PROTEASE FROM <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 .....	36
3.3 USO DE PROTEASES DE <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE .....	53
4. RESUMO E CONCLUSÕES .....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMC	Carboximetilcelulose
SiO <sub>2</sub>	Dióxido de silício
DE	Dextrose equivalente
MD	Maltodextrina
SIS	Sílica Amorfa Sintética
BHI	Brain Heart Infusion
GRAS	Generally Recognized as Safe
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
ES	Extrato seco
TSY	Ágar triptona extrato de levedura
TSA	Ágar triptona de soja
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Sódio
SMIA-2	<i>Bacillus</i> sp. SMIA-2

## RESUMO

BOLZAN, Raphael Pires; D.Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2021. Utilização de *Bacillus* sp. SMIA-2 e suas enzimas na alimentação de frangos de corte. Orientadora: Profª Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

As proteases são enzimas industriais importantes, mas têm aplicação limitada devido ao seu curto tempo de vida. Em sua forma líquida são suscetíveis à desnaturação durante o armazenamento e os métodos de secagem podem minimizar a perda de atividade enzimática. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da carboximetilcelulose com maltodextrina e do Aerosil® com maltodextrina no desempenho de secagem por atomização da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 com o objetivo de preparar uma formulação seca destinada à aplicação industrial - ração animal. O pó de protease gerado pela combinação de carboximetilcelulose com maltodextrina apresentou atividade de protease residual e recuperação de massa em torno de 86% e 17,5%, respectivamente, e ficou estável após 180 dias de armazenamento em temperatura ambiente de 24 a 32 ° C. O pó de protease gerado pela combinação de Aerosil® com maltodextrina apresentou atividade de protease residual e recuperação de massa em torno de 80% e 31%, respectivamente, e ficou estável após 180 dias de armazenamento em temperatura ambiente de 24 a 32 ° C. Estas são características promissoras quando se considera sua aplicação industrial. As proteases microbianas, especialmente de *Bacillus* spp. têm sido amplamente exploradas para variadas aplicações, como na melhoria da digestibilidade das proteínas da dieta animal. No

trabalho voltado para produção animal, foi avaliada a viabilidade de aplicação de um extrato seco rico em proteases produzidas por culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2, na suplementação de dietas de frangos para melhorar o desempenho produtivo. O efeito do pH (ácido e neutro) com e sem pepsina e de íons metálicos sobre a atividade das enzimas foi primeiramente estudado. Posteriormente, foi avaliado o desempenho dos frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com a protease de 8 a 21 dias de idade. As proteases do SMIA-2 foram resistentes à degradação pela pepsina em valores de pH igual ou superiores a 4,0. A pH 4,0, a protease manteve mais de 80% de sua atividade e em valores maiores de pH a enzima foi estável na presença da pepsina. Em relação à estabilidade na presença de íons metálicos foi observado que apenas o cobre e o cobalto apresentaram efeito inibitório na atividade da protease. No desempenho animal, o extrato seco de proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 mostrou-se eficiente, apresentando resultados significativos compatíveis com produtos comerciais que possuem a mesma finalidade.

**Palavras-chave:** Proteases, *Bacillus*, adjuvantes, estabilidade, pH, desempenho, frango de corte.

## ABSTRACT

BOLZAN, Raphael Pires; D.Sc. Vegetal Production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2021. Use of *Bacillus* sp. SMIA-2 and its enzymes in broiler feed. Advisor: Prof<sup>a</sup> Ph.D. Meire Lelis Leal Martins.

Proteases are important industrial enzymes, but have limited application due to their short life span. In their liquid form they are susceptible to denaturation during storage and drying methods can minimize the loss of enzyme activity. The objective of this work was to evaluate the efficacy of carboxymethylcellulose with maltodextrin and Aerosil® with maltodextrin in the spray drying performance of *Bacillus* sp. SMIA-2 in order to prepare a dry formulation for industrial application - animal feed. The protease powder generated by the combination of carboxymethylcellulose with maltodextrin showed residual protease activity and mass recovery around 86% and 17.5%, respectively, and was stable after 180 days of storage at room temperature from 24 to 32 ° C. The protease powder generated by combining Aerosil® with maltodextrin showed residual protease activity and mass recovery around 80% and 31%, respectively, and was stable after 180 days of storage at room temperature from 24 to 32 ° C. These are promising features when considering their industrial application. Microbial proteases, especially from *Bacillus* spp. have been widely explored for various applications, such as improving the digestibility of animal diet proteins. In the work on animal production, the feasibility of applying a dry extract rich in proteases produced by submerged cultures of *Bacillus* sp. SMIA-2, in supplementing broiler

diets to improve production performance. The effect of pH (acidic and neutral) with and without pepsin and metal ions on enzyme activity was first studied. Subsequently, the performance of broilers fed diets supplemented with protease from 8 to 21 days of age was evaluated. The SMIA-2 proteases were resistant to degradation by pepsin at pH values equal to or greater than 4.0. At pH 4.0, the protease maintained more than 80% of its activity and at higher pH values, the enzyme was stable in the presence of pepsin. Regarding stability in the presence of metal ions, it was observed that only copper and cobalt showed an inhibitory effect on protease activity. In animal performance, the dry protease extract from *Bacillus* sp. SMIA-2 proved to be efficient, presenting significant results compatible with commercial products with the same purpose.

**Keywords:** Proteases, *Bacillus*, adjuvants, stability, pH, performance, broiler.

## 1. INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva de frangos de corte no Brasil destaca-se como atividade de alto nível tecnológico, geradora de emprego e renda para a população brasileira. A alta produtividade e eficiência desta cadeia proporcionaram o domínio do mercado internacional de carne de frango, tornando este produto um dos principais na lista dos exportados pelo país (Schmidt e Silva, 2018). Muitas pesquisas têm sido realizadas por alternativas que possibilitem a formulação de rações mais eficientes, econômicas e seguras, visto que a alimentação constitui o item de maior custo na produção animal.

Nos últimos anos o conceito de “Saúde Única” foi reintroduzido adotando-se uma abordagem que visa fornecer melhor saúde para pessoas, animais e meio ambiente. As enzimas aprovadas para uso na alimentação animal são produtos de fermentação natural sem nenhuma ameaça para o animal ou para o consumidor, contribuindo na melhoria da produção avícola, mostrando-se economicamente viáveis e também ecologicamente corretas (Khattak et al., 2006).

As bactérias do gênero *Bacillus* produzem variadas enzimas extracelulares importantes tais como amilases, proteases, celulasas, xilanasas, poligalacturonases dentre outras. Estas bactérias são capazes de multiplicar sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos estáveis em ampla faixa de ambientes adversos (Wang et al., 2007). Com exceção do grupo *Bacillus cereus* que inclui o *Bacillus anthracis*, o gênero *Bacillus* não produz toxinas e são

no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros–GRAS (Mahmood et al., 2017).

O *Bacillus* sp. SMIA-2 é uma bactéria termofílica isolada de amostras de solo coletadas no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Os resultados da comparação de sequências de 16SrRNA indicaram que o isolado apresentou similaridade com as sequências de *Bacillus caldoolyolyticuse*, *Bacillus* sp. AK1 e estes três organismos exibiram níveis de homologia de 94% nas sequências de DNA ribossomal (Souza e Martins, 2001). Diversos estudos revelaram que *Bacillus* sp. SMIA-2 produz níveis satisfatórios de várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases (Ladeira et al., 2010; Ladeira et al., 2012, Barbosa et al., 2014), amilases (Carvalho et al., 2008a; Carvalho et al., 2008b), pectinases (Cordeiro e Martins, 2009), xilanases (Cordeiro et al., 2002) e celulases (Ladeira et al., 2015), quando cultivado em culturas submersas contendo substratos de baixo custo, abrindo novas perspectivas para utilização desta cepa para a produção de enzimas em escala industrial.

Recentemente, Bernardo et al. (2020) sequenciaram o genoma do SMIA-2 e revelaram que essa cepa é 100% semelhante ao *Bacillus licheniformis* Gibson 46 (ATCC 14580T). De acordo com esses autores, as atividades enzimáticas do SMIA-2 foram suportadas por inventários de genes, incluindo seis genes de amilase; 13 loci para o metabolismo da xilose, 55 loci associados à degradação de proteína e três loci associados à degradação de celulose sob um complexo denominado celulosoma.

A secagem por atomização por spray dryer é uma técnica relativamente de baixo custo e um dos métodos mais antigos que consiste na transformação de material em estado líquido, na forma de soluções, emulsões ou suspensões, para o estado sólido, formando pós finos e secos (Masters, 1985; Dziezak, 1988). Considerando que enzimas e microrganismos são sensíveis às temperaturas utilizadas nos processos de secagem (Chávarri et al., 2010), uma forma de amenizar este problema é a utilização de formulações com adjuvantes protetores para garantir resistência e estabilidade dos mesmos durante a vida útil do produto (Donbrow, 1992; Rokka e Rantamaki, 2010).

Idealmente, as enzimas não deveriam necessitar de formulação excessiva, o que é uma etapa suplementar na produção e tem um custo relativamente alto. No entanto, quase todos os produtos enzimáticos disponíveis

atualmente possuem fraqueza em um ou mais pontos, como condições adversas de preparação de ração - pressão, umidade e temperatura, baixa resistência à desnaturação ácida e à hidrólise proteolítica no estômago (Ravindran, 2013).

A escolha do material adjuvante deve levar em consideração fatores como porosidade, solubilidade, viscosidade, transição vítrea, formação de filme e também econômicos (Augustin et al., 2001). Dentre as opções de adjuvantes destacam-se maltodextrina, glicose, lactose, sucrose, carboximetilcelulose, celulose micro-cristalina, goma arábica, glicerol, manitol, fosfato tricálcico, dióxido de silício coloidal (Belghith et al., 2001; Selivanov, 2005; Vasconcelos et al., 2005; Namaldi et al., 2006; Silva Júnior et al., 2006; Sloth et al., 2009).

Muitos estudos conduzidos no Brasil com enzimas exógenas na alimentação animal utilizam produtos comerciais desenvolvidos e fabricados por multinacionais (Tejedor et al., 2001; Strada et al., 2005; Barbosa et al., 2012; Praes, 2013; Perim, 2014; Silva, 2016; Cardinal et al., 2019; Dessimoni et al., 2019; Moura et al., 2019; Tavares-Samay et al., 2019; Bavaresco et al., 2020), não havendo destaque expressivo com trabalhos científicos abordando formulação, produção e aplicação de enzimas exógenas produzidas nacionalmente, uma vez que o processo de desenvolvimento de aditivos, incluindo enzimas, é um processo demorado e dispendioso. Não é de surpreender que as empresas de produção de enzimas gastem ações contínuas para proteger suas invenções. Em tais processos, os segredos de fabricação são provavelmente a maneira mais simples de obter proteção (Nunes, 2018).

Portanto, tendo como diretriz os benefícios do uso de enzimas exógenas na alimentação animal, a pressão da sociedade pelo consumo de alimentos seguros e diante da percepção do mercado de enzimas com enorme potencial econômico, buscou-se nesse trabalho avaliar diferentes formulações para secagem das proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 atomizados em spray dryer e avaliação quando utilizada na dieta de frangos de corte.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Microrganismos termofílicos e o *Bacillus* sp. SMIA-2

Nas últimas décadas os estudos relacionados aos microrganismos denominados extremofílicos com destaques para piezofílicos, acidofílicos, halofílicos e termofílicos têm recebido maior atenção devido ao potencial de suas aplicações biotecnológicas e industriais (Dumorné et al., 2017).

A ampliação do conhecimento sobre processos de isolamento e purificação de enzimas provenientes de microrganismos termoestáveis possibilitou a ampliação de novos processos industriais (Haki e Rakshit, 2003). O crescente interesse da indústria de biotecnologia por enzimas produzidas por microrganismos termofílicos é devido à sua capacidade superior de atuar em condições em que as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos possivelmente são desnaturadas (Ferrer et al., 2007).

Os microrganismos termofílicos estão entre os extremófilos mais estudados nas últimas quatro décadas, possuem capacidade de se desenvolver em grandes temperaturas entre 41 °C e 122 °C, sendo grande número de enzimas de microrganismos termofílicos caracterizados como celulases, amilases, xilanases, mananase, pectinases, quitinases, proteases, lipases, esterases e fitases. (Bertoldo e Antranikian, 2002; Maarel, 2002; Sunna e Bergquist, 2003).

A adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve adaptação da membrana citoplasmática, do DNA e das proteínas às temperaturas

acima da faixa mesofílica. Essa adaptação à termofilia tem despertado grande interesse na biotecnologia, considerando que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses microrganismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia ou ainda considerando o uso direto das mesmas em bioprocessos (Gomes et al., 2007).

Existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um micro-organismo e as características de suas enzimas intra e extracelulares. Espera-se que microrganismos termófilos produzam enzimas extracelulares capazes de tolerar uma temperatura correspondente, no mínimo, aquela ótima para seu crescimento. Estudos com enzimas de termófilos têm mostrado que essa relação é verdadeira, estimulando o isolamento de novas linhagens termófilas, assim como a caracterização das enzimas produzidas e o entendimento dos fatores que levam à sua termoestabilidade (Egorova e Antranikian, 2005; Gomes et al., 2007). A busca por essas enzimas baseia-se no fato de que a utilização de uma temperatura mais elevada em um processo industrial faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando da utilização de uma menor quantidade de enzimas, uma vez que um aumento de 10°C na temperatura promove aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade de reação. Ademais, a utilização de temperaturas maiores do que 60°C inibe o crescimento de micro-organismos contaminantes, reduzindo a possibilidade de contaminação microbiana, favorecendo sua utilização em indústrias alimentícias (Zamost et al., 1991; Rigoldi et al., 2018)

As enzimas de microrganismos termofílicos são capazes de aceitar proteólise e situações extremas como a presença de agentes desnaturantes, solventes orgânicos e alta salinidade. Suas termoenzimas possuem propriedade física e interações eletrostáticas para manter a atividade em altas temperaturas, além de diversas adaptações, como a capacidade de manter sua configuração e o funcionamento em temperaturas extremas, além de possuir capacidade de aumentar a quantidade de depósitos hidrofóbicos, formando uma ligação de bissulfeto entre dois íons com cargas opostas (Dumorné et al., 2017).

Outra característica importante em manter a capacidade hidrofóbica e conferir maior estabilidade está relacionada à configuração de suas membranas. Diferente das membranas dos microrganismos mesofílicos que possuem ácidos graxos insaturados, os ácidos graxos saturados dos microrganismos termofílicos

permitem que sua membrana adquira um equilíbrio entre densidade e fluidez, necessário para a manutenção de sua integridade física e funcional em temperaturas elevadas (Haki e Rakshit, 2003).

O efeito hidrofóbico é o principal mecanismo de termoestabilidade intrínseca da proteína e direciona o enovelamento, que resulta na estrutura nativa da molécula e diminui sua tendência ao desdobraimento, tornando a molécula menos flexível e menos exposta à degradação por altas temperaturas. A elevada rigidez intrínseca da proteína termofílica, decorrente da estabilidade do enovelamento, requer temperatura acima de 40°C para atividade a fim de promover o movimento térmico e o aumento da flexibilidade essencial para a atividade catalítica, ou seja, a adaptação da proteína para temperaturas extremas parece ser resultado de um equilíbrio entre o aumento da rigidez responsável pela estabilidade térmica e a flexibilidade requerida para exercer sua função fisiológica (Shiraki et al., 2001; Egorova e Antranikian, 2005).

A maioria das termoenzimas descritas apresenta altos teores de aminoácidos hidrofóbicos e com resíduos aromáticos. São os principais aminoácidos hidrofóbicos: Isoleucina, Valina, Leucina, Fenilalanina, Cisteína, e Metionina. A integridade dos aminoácidos formadores da proteína e a formação do núcleo hidrofóbico são fundamentais para sua viabilidade (Jaenicke e Bohm, 1998). As enzimas termoestáveis apresentam maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise (Gomes et al., 2007).

Em relação aos processos biotecnológicos nas indústrias, as temperaturas mais elevadas reduzem o risco de contaminação por microrganismos mesófilos, melhoram a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (Haki e Rakshit, 2003; Egorova e Antranikian, 2005; Dumorné et al., 2017). Adicionalmente, a utilização de temperaturas mais altas faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando de uma menor quantidade de enzima para atuação (Zamost et al., 1991).

Mesmo com diversas vantagens apresentadas que as enzimas termofílicas oferecem para o uso na indústria, a aplicação biotecnológica de microrganismos termofílicos ainda é limitado. Entretanto, os microrganismos

termofílicos apresentam enorme potencial como fontes sustentáveis que podem ser melhor exploradas em inúmeras áreas biotecnológicas para a expansão de uma economia de base biológica de impacto econômico (Dumorné et al., 2017).

*Bacillus* sp. SMIA-2, é uma bactéria gram-positiva, estritamente aeróbica, termofílica e formadora de esporos, que foi isolada de solos do município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil por Souza e Martins (2001) e encontra-se inserida no grupo de organismos reconhecidos como seguros no Generally Recognized as Safe (GRAS), de acordo com resultados da comparação de sequências de 16SrRNA, que indicaram que o isolado apresentou similaridade com as sequências de *Bacillus caldoolyolyticuse*, *Bacillus* sp. AK1 e estes três organismos exibiram níveis de homologia de 94% nas sequências de DNA ribossomal (Souza e Martins, 2001). Em recente ressequenciamento genômico, 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, três locais de enzimas celulolíticas e cinquenta e cinco locais associados à degradação de proteínas, estando associado sob um complexo de celulosoma. Essas informações recentes estão de acordo com diversos estudos realizados onde o *Bacillus* sp. SMIA-2 produziu níveis satisfatórios de várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases (Ladeira et al., 2010; Ladeira et al., 2012, Barbosa et al., 2014), amilases (Carvalho et al., 2008a; Carvalho et al., 2008b), pectinases (Cordeiro et al., 2009), xilanases (Cordeiro et al., 2002) e celulasas (Ladeira et al., 2015; Costa et al., 2017; Cruz et al., 2019), quando cultivado em culturas submersas contendo substratos de baixo custo, abrindo novas perspectivas para utilização desta cepa para a produção de enzimas em escala industrial.

## 2.2 Microencapsulação e secagem por spray dryer

A crescente expansão da tecnologia de alimentos proporciona constantemente o desenvolvimento de novos métodos na área que permitam a produção de alimentos e/ou ingredientes diferenciados (Barreto et al., 2015).

Conforme observado por Nedovic et al. (2011), a microencapsulação desenvolve na indústria produtos de grande interesse mercadológico com viabilidade econômica, justificando seu uso na indústria de alimentos para atender diversas necessidades dos processos como: facilitar a manipulação do material encapsulado; promover liberação controlada de determinadas substâncias; diminuir a velocidade de evaporação; reduzir a reatividade do material do núcleo com o ambiente; e promover a diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia (Shahidi e Han, 1993).

A microencapsulação deve primeiramente proporcionar facilidade de manuseio e estocagem para se tornar viável, além disso, deve-se manter sua eficiência e uma liberação controlada e gradativa do material encapsulado sob diferentes condições quando exposto ao meio externo a ação da luz, temperatura, umidade, oxigênio e pH (Hegenbart, 1993). Inúmeras são as técnicas aplicadas com o propósito de prover formas convenientes e estáveis de substâncias com propriedades bioativas, como as enzimas, por exemplo. O grande desafio é selecionar a mais eficiente e apropriada, considerando o tipo de material de revestimento e a aplicação a que será destinada (Anal e Singh, 2007).

Há diversas formas de se encapsular substâncias, como por meios físicos (atomização ou spray dryer, extrusão estacionária, bocal submerso, extrusão centrífuga, disco rotativo, spray chilling e spray cooling, leite fluidizado, cocristalização e liofilização), químicos (polimerização interfacial, indução molecular e polimerização in situ) e físico-químicos (coacervação simples, coacervação complexa, lipossomas, nanopartículas e evaporação do solvente) (Sloth, 2007; Schäfer, 2015).

Os primeiros equipamentos de spray dryer foram fabricados nos EUA na década de 30, a secagem por atomização com spray dryer é uma técnica relativamente barata entre os métodos de encapsulação (Dziezak, 1988; Hayashi, 1989; Schäfer, 2015). É considerado um dos melhores métodos de secagem para converter em uma única etapa, materiais fluidos em partículas sólidas. O processo de secagem consiste em pulverizar o produto líquido dentro de uma câmara submetida a uma corrente controlada de ar quente, e dessa maneira se consegue uma evaporação da água, obtendo-se uma separação ultrarrápida dos sólidos e solúveis contidos com mínima degradação do produto a secar, terminando esse processo com a recuperação do produto já em pó, de maneira

que a alta temperatura do ar de secagem não o afete demasiadamente (Masters, 1985; Roustapour et al. 2009).

O sentido de movimentação dos materiais no interior da câmara de secagem do spray dryer pode ocorrer de três modos distintos; concorrente, contracorrente e misto. Para alimentos, o ar de secagem é geralmente injetado no mesmo sentido do produto (concorrente), de modo que o ar e o produto entrem no topo da câmara e escoem em direção ao fundo, onde ambos são separados e o produto é removido do secador (Masters, 1985; Sloth, 2007; Fávaro-Trindade et al., 2011; Estevinho et al, 2013).

O equipamento possui um sistema de bombeamento, por onde a suspensão é aspirada até a região do bico atomizador, onde há também um sistema de aquecimento do ar de entrada. O bico atomizador possui saída para a solução e o ar. A atomização é iniciada quando a suspensão sob efeito da compressão do gás (geralmente ar atmosférico) entra pelo pequeno orifício do bico atomizador formando pequenas gotículas. Este representa um dos pontos críticos do processo, já que o tamanho da gota formada determina o tamanho da partícula. A atomização é realizada usando-se um sistema centrífugo e de alta pressão, e as gotículas atomizadas imediatamente entram em contato com um fluxo de ar quente na câmara de secagem, transformando-se em partículas sólidas (Sloth, 2007). Pela formação de um sistema de sucção o ar movimenta-se de forma circular formando um movimento de ciclone que encaminha as partículas secas para o recipiente coletor (Schäfer, 2015).

A atomização envolve a geração de um grande número de gotículas a partir de um fluido, resultando no aumento na relação área / volume e permitindo uma rápida remoção da umidade (Lefebvre, 1989). Aumentando-se a área superficial entre a gota e o meio de secagem, o tempo de exposição das partículas ao calor é curto, fazendo com que a temperatura do núcleo não ultrapasse 100 °C. Quando o ar quente entra em contato com a partícula úmida, ocorre a desidratação quase que instantânea da gotícula. Além disso, o aquecimento e a transferência de massa durante o processo de secagem ocorrem ao redor das gotículas formadas, criando uma proteção de vapor ao redor. Devido a estes fatores, esta técnica pode ser empregada em produtos termossensíveis (Dziezak, 1988; Lannes e Medeiros, 2003; Sloth, 2007; Schäfer, 2015). Entretanto, a secagem por spray tem sido frequentemente descrita como um

método de secagem severo devido à sua temperatura de operação frequentemente alta. Sob altas temperaturas, componentes termolábeis, como vitaminas e enzimas, entre outros componentes dos alimentos, podem ser danificados ou inativados durante o processo de secagem por spray dryer (Yoshii et al. 2008). Para reduzir danos e perdas durante o processo de secagem, existe no mercado uma gama de materiais encapsulantes, também conhecidos como aditivos, excipientes ou adjuvantes (Dziezak, 1988; Ré, 1998; Sloth, 2007).

Considerando que muitas substâncias químicas e biológicas são sensíveis às temperaturas elevadas utilizadas nos processos de secagem (Chávarri et al., 2010), a utilização do adjuvante para amenizar este problema atua como uma substância protetora que visa garantir a estabilidade dos mesmos durante a vida útil do produto (Rokka e Rantamaki, 2010). A escolha do material encapsulante deve levar em consideração fatores como: porosidade, solubilidade, viscosidade, transição vítrea, formação de filme e também seu custo (Augustin et al., 2001). O agente encapsulante deve formar um filme coesivo com o material a ser encapsulado e não reagir com o núcleo, oferecendo propriedades desejáveis de revestimento, tais como resistência e estabilidade (Donbrow, 1992). A rápida remoção da umidade pode proporcionar a formação de produtos amorfos que apresentem regiões cristalinas. O estado amorfo é caracterizado por uma alta higroscopicidade, que acarreta a consistência pegajosa denominada de *sticky*, formando aglomerados indesejáveis de alta consistência (Shahidi e Hand, 1993; Bhandari et al., 1997). A utilização em larga escala do spray dryer quando otimizado, seus parâmetros e processos proporciona uma elevada qualidade do pó obtido em relação a sua granulometria, umidade final, homogeneidade, densidade e forma, sendo que os pós obtidos são geralmente esféricos e porosos (Walton, 2000; Birchal et al., 2005;).

Devem ser considerados os seguintes aspectos para uma otimização dos parâmetros de secagem por spray dryer: aquecimento, volume do ar de secagem, tipo do bico atomizador, vazão do material e temperaturas do ar de entrada e temperaturas do ar de saída (Nath e Sapthy, 1998; Lannes e Medeiros, 2003). Em relação ao produto final seco, fatores relevantes a se considerar após sua formação são a umidade e a atividade de água (Straatsma et al., 1999). A umidade é um indicativo da eficiência do processo de desidratação, enquanto que o estudo da atividade de água permite previsões da estabilidade do produto

durante seu acondicionamento e armazenamento (Hossain et al., 2001; Brod, 2003). A fim de se evitar deterioração do produto seco, é de fundamental importância a avaliação final de sua atividade de água, uma vez que através dela pode-se prever reações químicas, enzimáticas e microbiológicas. A higroscopicidade, solubilidade, ponto de fusão e temperatura de transição vítrea podem ser influenciadas pelo tipo de adjuvante usado para secagem do produto.

Dentre as opções de adjuvantes destacam-se maltodextrina, glicose, lactose, sucrose, carboximetilcelulose, celulose microcristalina, goma arábica, glicerol, manitol, fosfato tricálcico e dióxido de silício coloidal (Belghith et al., 2001; Selivanov, 2005; Vasconcelos et al., 2005; Namaldi et al., 2006; Silva Júnior et al., 2006; Sloth et al., 2009).

### 2.2.1 Adjuvantes na produção de enzimas

A natureza da proteína enzimática é o ponto de partida de todo o trabalho de formulação e o conhecimento sobre parâmetros como solubilidade e compatibilidade é indispensável. Uma nova molécula de enzima com excelente desempenho pode falhar na aplicação se a enzima não for estável durante o transporte e armazenamento, bem como eficaz no nível de aplicação. A formulação certa pode contornar esses inconvenientes (Nunes e Philipps-Wiemann, 2018).

Os processos térmicos de secagem afetam diretamente as funções enzimáticas a ponto de desnaturar as proteínas, e por isso a incorporação de adjuvantes visa preservar a integridade dos compostos ativos (Meng et al., 2008).

Os adjuvantes devem ser compatíveis com o uso final do produto da enzima e devem estar em conformidade com uma série de procedimentos de qualidade, incluindo requisitos regulamentares, que são legais e obrigatórios.

As enzimas são muito mais estáveis no estado seco do que em solução, e no processo de formulação para produção de enzimas são utilizados materiais inertes como amido, lactose, maltodextrina, carboximetilcelulose, dióxido de silício para proteger a enzima durante o processo de secagem por atomização (Vasconcelos et al., 2005; Silva Júnior et al., 2006; Nunes e Philipps-Wiemann, 2018).



### 2.2.1.1 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) é um derivado de celulose produzido, via reação de Williamson, pelo tratamento de celulose com ácido monocloroacético em presença de hidróxido de sódio. É um importante produto industrial, geralmente isolado e comercializado como sal de sódio que apresenta como vantagens: capacidade de ser produzido a pressão atmosférica; ser solúvel em água devido à presença de grupos carboxilatos; e pode ser obtido a partir de biomassa abundante e barata, como o bagaço da cana-de-açúcar proveniente de usinas de açúcar e álcool (Fujimoto et al., 2002). A sua estrutura é baseada sobre o polímero de celulose de  $\beta$ -(1→4)-D-glucopiranosose, é um adjuvante com boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e hidrofiliabilidade (Toğrul e Arslan, 2004). É um polissacarídeo aniônico típico que tem sido amplamente utilizado como estabilizador em alimentos e um dos derivados naturais da celulose solúvel em água e que não tem efeitos nocivos para a saúde humana, altamente eficaz para melhorar as propriedades do produto e de processamento em campos de aplicação que variam de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos a produtos para as indústrias de papel e têxtil, sendo considerado um dos derivados mais importantes da celulose, (Schmitt et al., 1998; Su et al., 2010).

### 2.2.1.2 Maltodextrina

As maltodextrinas (MD) são produtos da hidrólise parcial do amido e sua adição como aditivos alimentares foi introduzida há 25 anos. Têm sido amplamente utilizadas em muitos tipos de alimentos processados, possuem várias propriedades funcionais que interferem na solubilidade, gelificação, prevenção de cristalização e viscosidade (Blanchard e Katz, 2006). São classificadas de acordo com o grau de hidrólise do amido denominado de dextrose equivalente (DE), uma medida que caracteriza a extensão da hidrólise do amido, bem como a média do seu peso molecular. A maltodextrina para secagem de alimentos deve possuir DE menor que 20. Conforme aumenta o grau de hidrólise, a média do peso molecular diminui e a DE aumenta. A dextrose usada como padrão é o amido (DE=0) e a glicose (DE=100), desta forma a melhor definição para maltodextrina é todo material que tenha um DE entre 3 e 20 (Fitton, 1979; Kennedy et al., 1985; Chronakis, 1998).

A solubilidade em água é uma importante propriedade da maltodextrina no que se refere às suas aplicações, ela é afetada pelo peso molecular dos sacarídeos, sendo que sacarídeos com alto peso molecular diminuem a solubilidade da solução. Geralmente as maltodextrinas com DE entre 5 e 15 são bem similares quanto à solubilidade, sendo que há uma tendência dos produtos serem mais solúveis quanto maior for o DE (Chronakis, 1998). Já a viscosidade das maltodextrinas é influenciada pela presença de misturas de oligossacarídeos de alto peso molecular e são dependentes da interação solvente-polímero, bem como da sua estrutura interna (Kenyon e Anderson, 1988; Kennedy et al., 1995).

A utilização da maltodextrina como auxiliar no processo de secagem por spray dryer provou ser útil para reduzir as reações de Maillard, onde o material encapsulado pela maltodextrina é coberto por um filme que protege o núcleo do composto ativo, além disso, ela atua como veículo de secagem de produtos alimentícios em três níveis: antes da secagem, auxiliando a dispersão para evitar a aglomeração do produto nas tubulações; durante a secagem, auxiliando na obtenção de grânulos homogêneos; e depois da secagem, auxiliando a dispersão do produto em água ou solvente (Kennedy et al., 1985; Kennedy et al., 1995; Chronakis, 1998).

#### 2.2.1.3 Aerosil®

O termo sílica refere-se aos compostos de dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) nas suas várias formas incluindo: sílicas cristalinas; sílicas vítreas e sílicas amorfas. O dióxido de silício é um composto binário natural formado pelos dois elementos químicos mais abundantes na crosta da Terra: oxigênio e silício (Terra Filho e Santos, 2006).

A sílica amorfa é um produto sintético (SAS) amplamente aplicado no processamento de alimentos com o principal objetivo de evitar a aglomeração das partículas em produtos em pó, podendo ser utilizada também como espessantes, clareador de bebidas e controlador de formação de espuma (Dekkers et al., 2011; Winkler et al., 2016).

As partículas de sílica foram constituintes da dieta ao longo da evolução humana e na década de 40 o químico Harry Kloepfer inventou o Aerosil® destinado à indústria de alimentos por meio de um processo pirogênico onde o tetracloreto de silício é queimado em uma chama de hidrogênio a temperaturas

entre 1000 a 2500 °C, gerando nanopartículas de sílica, também conhecida como sílica pirogênica devido ao seu método de produção (Fruijtier-Pöllöth, 2012; Maynard, 2014).

A sílica pirogênica agrega-se às partículas para formar estruturas de tamanho micron, o termo agregado descreve um conjunto de partículas mantidas juntas por ligações covalentes ou metálicas (Napierska et al, 2010). A sílica pirogênica é hidrofílica, mas pode se tornar hidrofóbica, reduzindo assim a absorção de umidade por meio de modificações de superfície subsequentes (Winkler et al., 2016).

### 2.3 Enzimas e sua utilização na avicultura

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango, com uma produção de 13,24 milhões de toneladas em 2019. Mundialmente foram produzidas 91,59 milhões de toneladas no ano de 2019. Desde 2004 o Brasil é o maior exportador de carne de frango no mundo, exportando atualmente para 150 países em torno de 32% da produção nacional (ABPA, 2020).

O tamanho desse recorde é decorrência de avanços tecnológicos em nutrição, genética, manejo e ambiência. Dentro desses fatores, a utilização de aditivos na dieta animal contribuiu significativamente para o aumento da produtividade no setor. O termo aditivo inclui todas as substâncias, as quais, quando adicionadas às rações, são capazes de melhorar o desempenho animal ou as características físicas dos alimentos (Araujo et al., 2007). Em qualquer atividade agropecuária o custo de produção é uma das grandes preocupações, não sendo diferente na avicultura. Pode-se considerar que em torno de 70% do custo de produção é determinado pela alimentação, sendo necessário o desenvolvimento de pesquisas que visem soluções para que haja maior aproveitamento dos nutrientes pelos animais.

Nutricionistas pressionados pelo setor avícola se empenham constantemente na busca de estratégias e alternativas que possibilitem a formulação de rações mais eficientes, que garantam um rápido desenvolvimento das aves, reduzindo seu tempo de abate, e por consequência seus custos. Entre diferentes alternativas nutricionais, a utilização de enzimas como suplementação, tem promovido melhoras no desempenho das aves.

A enzima é definida como uma proteína composta por aminoácidos ou seus derivados, que catalisam uma reação química específica. A necessidade de cofatores específicos é considerada como parte integrante da enzima. Por serem proteínas, as enzimas são passíveis de degradação por fatores como temperatura, umidade, pH e outros. As enzimas realizam reações químicas bem específicas, o que representa que apenas etapas bem particulares na transformação de um substrato são mediadas pelas enzimas (AAFCCO, 2006).

Elas são catalisadores proteicos que aumentam a velocidade de uma reação química e não são consumidos durante o processo (Champe e Harvey, 1989). São catalisadores biológicos produzidos por todos os seres vivos, atuando em substratos específicos, conforme condições de temperatura, umidade e pH, em um tempo definido. Desempenham papel fundamental na digestão, ajudando a degradar os componentes alimentícios em moléculas simples para sua digestão e assimilação.

As enzimas comerciais são obtidas através de processos fermentativos da biotecnologia onde os microrganismos como fungos, bactérias e leveduras são selecionados especificamente para este fim (Krabbe e Lorandi, 2014) na produção de amilases, pectinases, celulasas e proteases, e que além do processo da fermentação, estão envolvidos também os processos de extração, separação e purificação (Monteiro e Nascimento, 2009).

Com os avanços da biotecnologia, muitas substâncias vêm surgindo para ser utilizadas em vários segmentos da indústria. O desenvolvimento de produtos enzimáticos eficazes, estáveis e seguros sempre foi o principal objetivo dos fornecedores de enzimas. A formulação de hidrolases é a quarta fase do processo de produção após a seleção, fermentação e recuperação. As enzimas são adicionadas à ração para diversos fins, principalmente para melhorar a digestibilidade dos nutrientes, promovendo melhoria do desempenho animal e também por razões ambientais. Como muitos animais não conseguem digerir 15% a 20% dos nutrientes da ração que consomem, são adicionadas enzimas para garantir uma liberação otimizada de energia e micronutrientes dos alimentos ingeridos. Preocupações ambientais, como a redução do teor de nitrogênio e fósforo nos dejetos também são favoráveis ao uso de enzimas alimentares (Guerrand, 2018).

Quando menciona enzimas, o termo mais correto de se utilizar são produtos enzimáticos, uma vez que as condições nas quais as enzimas são produzidas são diferentes, resultando em produtos enzimáticos distintos. Com isso, pode-se afirmar que os diferentes produtos enzimáticos existentes no mercado não são iguais. Isto se deve a fatores específicos, inerentes às condições de fabricação das enzimas tais como: tipo e cepa de microrganismos, meio de cultura utilizado, condições de fermentação e processamento (Lecznieski 2005).

O mercado global de enzimas para alimentação animal está em expansão e oferece um futuro promissor devido ao crescimento da demanda por carnes e derivados, especialmente nas regiões de rápido crescimento econômico (Guerrand, 2018). As indústrias produtoras de enzimas podem comercializar enzimas específicas ou produtos contendo mais de uma atividade enzimática chamados de complexos enzimáticos, que são originados a partir da fermentação de um microrganismo original, ou então podem comercializar as misturas “blends” de enzimas obtidas a partir da fermentação de vários microrganismos (Meneghetti, 2013).

Esses produtos são adicionados em matérias-primas ou suplementados nas dietas, buscando sempre melhorar o valor nutritivo. Sendo assim, várias são as enzimas empregadas para melhorar o desempenho animal, cuja maioria presente no mercado é utilizada para degradar ou acelerar a digestão dos compostos dos macroingredientes de origem vegetal ou animal. São exemplos de tipos de enzimas utilizadas em dietas para aves, a base de milho e farelo de soja, e seus possíveis efeitos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Enzimas usualmente utilizadas na avicultura

<b>Enzima</b>	<b>Substrato</b>	<b>Efeito</b>
Xilanases	Arabinoxilanas	Redução da viscosidade da digesta intestinal
Glucanases	Betaglucanas	Redução da viscosidade da digesta intestinal; Diminuição de ovos sujos
Pectinases	Pectinas	Redução da viscosidade da digesta intestinal
Proteases	Proteínas	Suplementação de enzimas endógenas; Maior digestibilidade dos nutrientes
Celulases	Celulose	Aumento da digestibilidade da matéria seca
Amilases	Amido	Suplementação de enzimas endógenas; Maior digestibilidade dos nutrientes
Fitases	Ácido fítico	Aumento na utilização do fósforo vegetal; Remoção do fósforo fítico

Fonte: adaptado de Choct e Kocher, 2000.

Conforme observado por Zanella (2001), existem três grupos de enzimas disponíveis no mercado: enzimas para alimentos com baixa viscosidade (milho, sorgo e soja), enzimas para alimento de alta viscosidade (trigo, centeio, cevada, aveia, triticale e farelo de arroz) e enzima para degradar o ácido fítico dos grãos vegetais (melhorando a utilização do fósforo dos vegetais). De acordo com a sua finalidade, as enzimas usadas em rações animais podem ser destinadas a completar a ação de enzimas endógenas; remover ou destruir fatores antinutricionais (Polissacarídeos Não Amiláceos – PNA e Ácido Fítico); aumentar a digestibilidade total da ração; potencializar a ação de enzimas endógenas e diminuir a poluição ambiental por nutrientes poluidores como fósforo, nitrogênio, zinco e cobre usualmente excretados (Guenter, 1997; Cousins, 1999).

Após a suplementação nas dietas, a ação catalítica das enzimas depende de uma série de fatores, tais como: concentrações do substrato e da enzima, temperatura, variação do pH, umidade e da presença de coenzimas, resistência à atividade proteolítica e inibidores no local em que ocorrerá a reação. A termoestabilidade da enzima é outro fator que afeta sua ação catalítica, pois depende do tipo de microrganismo que produz a enzima, sendo menos resistentes (até 75°C) aquelas produzidas por fungos e mais resistentes (80 a 90°C) as produzidas por bactérias (Officer, 2000).

As proteases formam o grupo de enzimas que ocupa a posição mais privilegiada nos campos fisiológicos e comerciais. São enzimas proteolíticas

(catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas) de importância fundamental para o metabolismo e para o sucesso dos processos fisiológicos necessários à manutenção da vida (Rao et al, 1998). A grande variedade de proteases em contraste com sua elevada especificidade de ação tem atraído atenção mundial devido à possibilidade de sua exploração para diferentes aplicações como na medicina, indústria de agentes de limpeza, indústria de alimentos, indústria de alimentação animal, entre outras (Tunga et al., 2003; Guerrand, 2018).

As enzimas proteolíticas termoestáveis produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* são o grupo mais importante de enzimas comerciais e representam cerca de 20% do total de enzimas comercializadas no mundo (Gupta et al., 2002). De acordo com Gacesa e Hubble (1990), é possível identificar uma série de fases ao longo do desenvolvimento da indústria enzimática. A princípio, as preparações eram obtidas basicamente de extratos animais e vegetais com pequena contribuição microbiana. Com o crescimento da demanda por enzimas, houve uma limitação de materiais animais e vegetais levando a um aumento da demanda por enzimas microbianas, as quais começaram a ser utilizadas em larga escala.

A procura por novas enzimas começa na natureza, abundante em microrganismos dos quais apenas uma pequena fração é conhecida, sendo a terra e a água suas principais fontes. Em um grama de terra pode conter milhões de bactérias, fungos e outros microrganismos. Os microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas devido à sua ampla diversidade bioquímica, susceptibilidade de manipulação genética, sendo preferidas em relação às de animais ou plantas por apresentarem quase todas as características desejáveis para sua aplicação biotecnológica, bem como uma grande variedade catalítica, preço relativamente reduzido, bastante homogeneidade, estabilidade e com seu sistema de produção mais fácil e seguro (Cheetham e Wiseman, 1985; Rao et al., 1998; Kumar e Takagi, 1999; Nunes, 2018).

Os métodos de obtenção destas enzimas podem ser otimizados e as proteases microbianas podem ser mantidas sob armazenamento por um longo período, não necessariamente em suas condições ótimas de atuação, porém sem perda significativa de sua atividade (Gupta et al., 2002).

### 3. TRABALHOS

#### **3.1. Optimization of spray-drying conditions for obtaining *Bacillus* sp. SMIA-2 protease powder<sup>1</sup>**

Raphael Pires Bolzan<sup>2</sup>, Meire Lelis Leal Martins<sup>3</sup>

---

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado publicado na Food Science and Technology

<sup>2</sup>Instituto Federal do Espírito Santo - IFES – Campus de Alegre, 29520-000 - Alegre - ES, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Tecnologia de Alimentos, 28013-602 - Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil



**Abstract**

Microbial proteases, especially from *Bacillus* spp., have enormously been exploited for a broad variety of applications such as for physiological processes, food and feedstuff, detergents, as well as in the pharmaceutical and leather. In this work, proteases produced by the thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 submerged cultures were spray-dried in an attempt to improve its stability for applications in industry. The enzymatic extract was dried using drying adjuvants, and optimal conditions for preserving enzymatic activity were studied following a statistical experimental design. The spray process factors studied were the drier air inlet temperature and the adjuvants concentrations. The responses analyzed were the enzymatic activity and mass recovered of the powder after spray drying. Additionally, the stability of the powder was assessed during 180 days at room temperature. The results revealed that satisfactory levels of enzymatic activity were obtained when 0.5% (w/v) carboxymethylcellulose and 1.0% (w/v) maltodextrin were incorporated to enzymes solutions and the spray drier inlet temperature was 110 °C. Furthermore, this dried protease extracts showed potential for future commercial applications because of their stability at room temperature for 180 days.

**Key words:** *Bacillus*; proteases; atomization; storage.

**Practical Applications:** In this work, a durable enzymatic powder was obtained, allowing its use in future commercial applications.

## 1 Introduction

Proteases or peptidases constitute the class of enzymes with relevant role in a wide variety of industries, including leather, silk manufacturing, food and detergent industry (Freitas et al., 2012; Nasri et al., 2015; Singh & Bajaj, 2017). Thermostable proteases produced from thermophilic bacteria are advantageous in industrial processes that operate at higher temperatures (Barbosa et al., 2014; Barzkar et al., 2018) and bacteria from the genus *Bacillus* are promising sources for thermostable proteases production (Saggu & Mishra, 2017; Contesini et al., 2018; Zhou et al., 2020).

*Bacillus* sp. SMIA-2, a thermophilic and thermostable enzyme-producing bacterium was able to express a promising level of proteases in submerged cultures employing agricultural byproducts such as whey protein, corn steep liquor and passion fruit rind flour (Silva et al., 2007; Barbosa et al., 2014), which opened perspectives to generate high-value products from sustainable production processes. 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 & Martins, 2001). Recently, Bernardo et al. (2020) revealed that SMIA-2 is 100% identical with the type strain *Bacillus licheniformis* Gibson 46 (ATCC 14580T). The characteristics presented by the protease produced by SMIA-2, such as ability to function at high temperatures and pH levels and resistant to several surfactants and oxidizing agents (Silva et al., 2007; Nascimento & Martins, 2004) were very useful when thinking about industrial applications.

The performance of enzymes is influenced by its capacity for long term storage. Therefore, the development of formulations capable of preserving the activity of enzymes until their use is an important step in the manufacture of enzyme containing product (Costa-Silva et al., 2014). Spray drying is a cost-effective drying method widely used to stabilise heat sensitive ingredients, such as enzymes and probiotic bacteria (Schutyser et al.,

2012; Assadpour & Jafari, 2019; Bajaj et al., 2021). This technique has been extensively used for the dehydration of many industrial enzymes such as cellulases (Belghith et al., 2001; Libardi et al., 2020), alpha amylases (Samborska et al., 2005; Abdel-Mageed et al., 2019), lipases (Costa-Silva et al., 2014; Utami et al., 2017; Mohtar et al., 2019) and proteases (Namaldi et al., 2006; Cabral et al., 2017; Hamin et al., 2018). However, when subjected to the high temperatures used in the spray drying process, some enzymes may be denatured and, consequently, lose their catalytic activity (Hamin et al., 2014). A variety of excipients are often used as bulking agents and protective additives in an attempt to stabilize the enzymes (Ohtake et al., 2011; Emami et al., 2018).

In this work, the proteases recovered from SMIA-2 strain were spray-dried in the presence of adjuvants, and optimal conditions for preserving enzymatic activity were studied using a statistical experimental design.

## **2 Material and Methods**

### ***2.1 Microorganism and culture conditions***

The bacterial strain used in this study was a thermophilic *Bacillus* sp. previously isolated from a local soil sample. The culture medium for protease production contained (gL<sup>-1</sup>): KCl-0.3, MgSO<sub>4</sub>-0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.87, CaCl<sub>2</sub>-0.29, ZnO-2.03x10<sup>-3</sup>, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.7x10<sup>-2</sup>, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O-1.0x10<sup>-2</sup>, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O-8.5x10<sup>-4</sup>, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.4x10<sup>-3</sup>, NiCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.5x10<sup>-4</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-3.0x10<sup>-4</sup>, commercial corn steep liquor (Sigma Aldrich) -3.0, whey protein-1.0 and soluble starch-5.0 (Corrêa et al., 2011).

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 min. The medium (50 mL in 250 mL Erlenmeyer flasks) was inoculated with 1mL of an standard overnight culture (initial number of cells 10<sup>4</sup>) and incubated at 50 °C in an orbital shaker (Thermo Forma, Ohio, USA) operated at 150 rpm. After 36 h of incubation culture, 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 used as crude enzyme preparation.

## ***2.2 Protease assay***

The activity of protease was assessed in triplicate by measuring the release of trichloroacetic-acid soluble peptides from 0.2% (w/v) azocasein prepared in 0.1 M Tris/HCl buffer (pH 8.0). The reaction mixture containing 0.5 mL of azocasein solution and 0.5 mL of appropriate concentration of enzyme solution was incubated at 70 °C for 10 min. The 1 mL reaction was terminated by the addition of 0.5 mL of 15% (w/v) trichloroacetic acid and then centrifuged at 20,600 g for 5 min, after cooling (Jenssen et al., 1994). The absorbance of the non-precipitable azopeptides produced as a result of the protease activity was measured at 420 nM and corrected using a reagent blank. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to produce an increase in absorbance at 420 nM equal to 1.0 in 60 minutes.

## ***2.3 Spray drying of crude enzyme solution***

Spray-dried powders were produced through the atomization of crude proteases preparation in a lab-scale spray dryer (LAB-PLANT, MODEL SD-04, England). During operation, 100 mL prepared solution was fed at constant rate, 5.40 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 concentrations as showed in Table 1. According to the working inlet temperatures 70, 86, 110, 134 and 150 °C, observed drier outlet temperatures were 52, 65, 76, 92 and 102 °C, respectively.

In all of the experiments the air flow rate was constant. The adjuvants were incorporated into the enzyme solution before spray drying. The dried particles were collected and stored at room temperature (25-32 °C).

The protease activity was measured before and after drying. The activity measurement of the proteases after drying operation was accomplished by dissolving enzymes powder (0.01 g.mL<sup>-1</sup>) and the residual activity (%) determined and compared with the activity of the crude enzyme solution before drying.

#### **2.4 Experimental Design and Statistical Analysis**

A central composite design (CCD) 2<sup>3</sup> was constructed to evaluate the effects of the adjuvants concentrations and spray drier inlet air temperature on Residual protease activity and Mass recovery of the powder. The factorial planning encompassed three central points and yielded a total of 17 treatments for each experiment. The factors and factors levels studied are described in Table 1.

The results obtained were submitted to a regression analysis, initially calculating a polynomial equation, evaluating its lack of adjustment and the significance of each variable at  $p < 0.05$ . The predictive model was adjusted considering only the significant parameters and response surface graphs were drawn for those models with a high correlation coefficient, using the Statistica software, version 7.0.

Condition optimization was performed using CCD, and response surface was produced with fixed central points of 110 °C to inlet air temperature, 0.5% (w/v) CMC and 2.5% (w/v) maltodextrin. The model of the experiment can be expressed as follows (Equation 1):

$$Y = b_o + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^n \sum b_{ij} x_i x_j \quad \text{equation 1}$$

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

#### **2.5 Mass recovery (%)**

The mass recovery was determined according to Belghith et al. (2001).

$$\text{Mass recovery (\%)} = \frac{\text{Wt}}{\text{TSS}} \times 100$$

Where TSS is the total soluble solid of the crude protease solution in the presence of the adjuvant, and Wt is the weight of powder mass (g) obtained from the spray-drying process. TSS was determined from the crude extract protease solution using a hand-held digital refractometer (Pocket Refractometer Pal-1, Atago Co. Ltd, Tokyo, Japan). Three measurements were recorded from each sample.

### ***2.6 Protease powder stability (%)***

After drying, storage stability of obtained proteases powders at room temperature (25-32 °C) up to 180 days was investigated. The stability of protease was determined by measuring protease activities right after drying and after six months of storage.

### ***2.7 Water activity (*aw*)***

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).

## **3 Results and Discussion**

Considering the great industrial relevance of thermostable proteases produced by *Bacillus* sp. SMIA-2, an attempt was done to increase their shelf life by using the spray drying process. The proteases were recovered from 36 hours of *Bacillus* sp. SMIA-2 submerged cultures containing pectin, corn steep liquor and whey protein. The proteases were not purified before spray drying process because of their high cost. Besides, 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 (Braga et al., 2013). Thus, the crude protease extract (13.82 U/mL) containing by-products of the fermentation process (other proteins, carbohydrates and salts) was subjected to spray drying process, in order to develop stable formulations of the dry enzyme.

It is known that an enzyme functions best at a certain temperature. According to Silva et al. (2007), the optimum temperature for activity of protease from *Bacillus* sp. SMIA-2 was 70 °C and the enzyme retained 80% of the original activity after 2 h heat treatment at 60 °C. An alternative to avoid loss of protease activity would be to use lower temperatures in the drying process. However, the use of low temperatures can lead to a reduction in the production rate and generate a product with higher moisture content and with low storage stability. The addition of excipients to the enzyme crude solution prior to spray drying process is another alternative usually taken for this purpose. Thus, carboxymethylcellulose and maltodextrin were incorporated into the enzyme solution before spray drying and the interactive effect between them and the inlet air temperature (°C) were studied using a central composite design (CCD) 23. Factor levels (inlet air temperatures and both maltodextrin and CMC concentrations) were chosen based on studies published in the literature focused on protease spray drying (Namaldi et al., 2006; Hamin et al., 2017) and in preliminary experiments. Table 1 shows the results of the Residual protease activity and Mass recovery of powder obtained, according to the experimental planning carried out.

The Residual protease activity values varied from 63.1% to 86.69%. In this case, the best result (Formulation 13) was obtained when 0.5% (w/v) CMC and 1.0% (w/v) MD were incorporated to enzymes solutions and the spray drier inlet temperature was 110 °C. There are several studies of adding carbohydrates to enzymes containing formulations. The effect of air inlet temperature of the spray dryer between 70 °C and 130 °C and the effect of protective additives, glucose and maltodextrin, at 0-2% (w/v) on protease activity produced by recombinant *Bacillus subtilis* (BGSC-1A751) during spray drying were evaluated by Namaldi et al. (2006). Also, Hamin et al. (2018) evaluated the best conditions to remove the water by spray drying technique from collagenolytic proteases from *Myceliophthora thermophila* submerged bioprocess and Siqueira et al. (2013) selected the adequate adjuvant and evaluated the best parameters to use in drying the *Trichoderma harzianum*

enzymatic extract containing peptidases and cellulases. According to all these authors higher activity preservation was obtained when the additives were incorporated before spray drying the formulations and that the degree of improvement was dependent on the nature of the carbohydrate and its concentration.

**Table 1.** Matrix of CCD 2<sup>3</sup> (real and coded values) used and their responses.

Formulations	Inlet air temperature (°C)	CMC (% w/v)	MD (% w/v)	Mass recovery (%)	Residual protease activity (%)
1	86 (-1)	0.32 (-1)	1.6 (-1)	15.06	78.58
2	134 (+1)	0.32 (-1)	1.6 (-1)	19.60	85.23
3	86 (-1)	0.68 (+1)	1.6 (-1)	19.15	80.32
4	134 (+1)	0.68 (+1)	1.6 (-1)	23.38	81.91
5	86 (-1)	0.32 (-1)	3.4 (+1)	20.67	67.80
6	134 (+1)	0.32 (-1)	3.4 (+1)	26.20	74.67
7	86 (-1)	0.68 (+1)	3.4 (+1)	17.51	64.69
8	134 (+1)	0.68 (+1)	3.4 (+1)	19.72	63.10
9	70 (-1.68)	0.5 (0)	2.5 (0)	16.72	76.99
10	150 (+1.68)	0.5 (0)	2.5 (0)	23.37	74.24
11	110 (0)	0.1 (-1.68)	2.5 (0)	19.61	79.88
12	110 (0)	0.8 (+1.68)	2.5 (0)	22.01	76.70
13	110 (0)	0.5 (0)	1 (-1.68)	17.54	86.69
14	110 (0)	0.5 (0)	4 (+1.68)	27.49	72.94
15	110 (0)	0.5 (0)	2.5 (0)	16.73	80.82
16	110 (0)	0.5 (0)	2.5 (0)	17.46	79.45
17	110 (0)	0.5 (0)	2.5 (0)	17.66	80.03

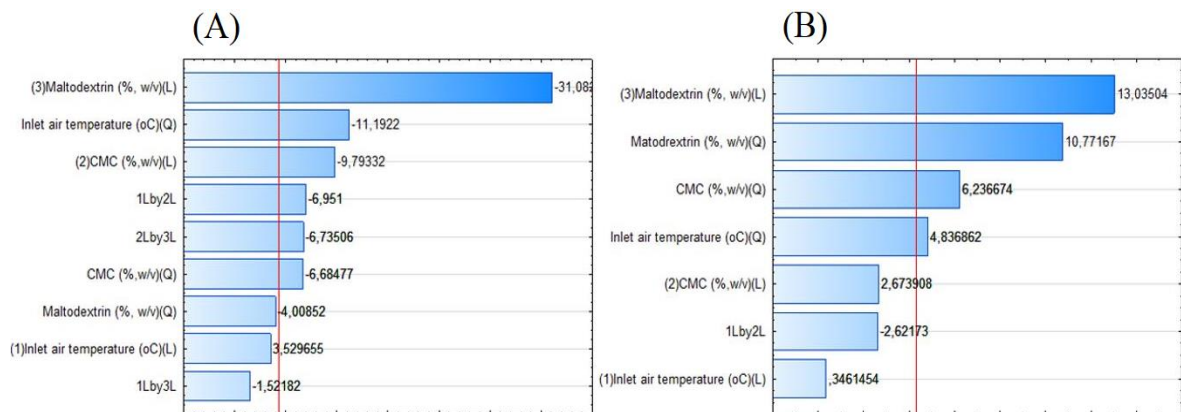
No powder was recovered when the crude extract rich in proteases was dried in the absence of additives. The filtration of the fermented broth previously to the spray drying process, probably reduced the solids concentration. In fact, the culture supernatant generally contains very low amount of solids leading to high drying cost per unit weight of the product formed with very low product recoveries (Gupta et al., 2014). Therefore, the use of excipients is justified not only to avoid thermal denaturation leading to loss of enzyme activity (Silva et al., 2007; Piszkiwicz & Pielak, 2019; Giovannelli et al., 2021), but also to develop more stable enzyme formulations and to improve dry mass recovery purposes (Libardi et al., 2020).

As can be observed in Table 1, the maximum percentage of mass recovered obtained was about 27% (Essay 14). The low mass recovery may be related to the powder collector



system performance (cyclone) used in the equipment. This problem could be solved during the scaling-up process, by choosing a more efficient collecting system (Costa-Silva et al., 2014).

An analysis of variance was performed for the experimental results presented in Table 1 in order to identify the variables that showed statistical significance. In this context, the results illustrated in the Pareto graph (Figure 1) revealed a negative, but statistically significant, influence of the three independent variables on Residual protease activity at the 95% confidence level. Increased concentrations of MD, CMC and inlet air temperature reduced protease activity. The concentration of maltodextrin was the variable that, originally presented a comparatively more pronounced effect (Figure 1A). On the other hand, increased inlet air temperature and increased MD concentration promoted a better mass recovery (Figure 1B). Thus, the conditions that led to higher levels of protease activity were different from those that provided the greatest Mass recovery.



**Figure 1.** Effect of the studied independent variables and their interactions: (A) Residual protease activity (%); (B) Mass recovery, for a 95% confidence level ( $p < 0.05$ ).

Regression analysis was applied to the experimental results of the Residual protease activity and the Mass recovered. First, a model containing all linear and quadratic effects, as well as the interaction factors between the variables, was tested. Table 2 shows the results of Anova and Regression coefficient of the adjusted model.

The adjusted models were highly significant ( $p < 0.05$ ), with a satisfactory value of determination coefficient ( $R^2$ ). It was possible to state that 85.40% and 86.64% of the variability in the Residual protease activity (%) and Mass Recovered (%) response respectively, could be accounted by the model and that it was suitable to represent the real relationship among the independent variables studied. When the calculated F value is greater than the table for the adopted confidence level, there is sufficient statistical evidence to suppose the existence of a relationship between the variables. The lack of adjustment was not significant ( $F_{cal}$  less than the  $F_{tab}$ ), indicating that the experimental data adjusted to the obtained models.

**Table 2.** ANOVA for the variables of response surface quadratic model.

Variable	Sum of squares	(Degrees of freedom)	Mean square	Fcal.	Ftab 0.05	P<0.05
<b>Residual activity (%)</b>						
Regression	602.2879	2	301.144	41.11	3.74	0.000689
Residues	102.5514	14	7.3251			
Lack of adjustment	101.6056	12	8.4671	17.90	19.41	
Pure error	0.9458	2	0.4729			
Total error	694.8852	16	43.4303			
<b>Mass recovery (%)</b>						
Regression	180.2790	2	90.1395	48.9591	3.74	0.000438
Residues	25.7756	14	1.8411			
Lack of adjustment	25.2964	12	2.1080	8.7969	19.41	
Pure error	0.4793	2	0.2396			
Total error	192.9564	16				

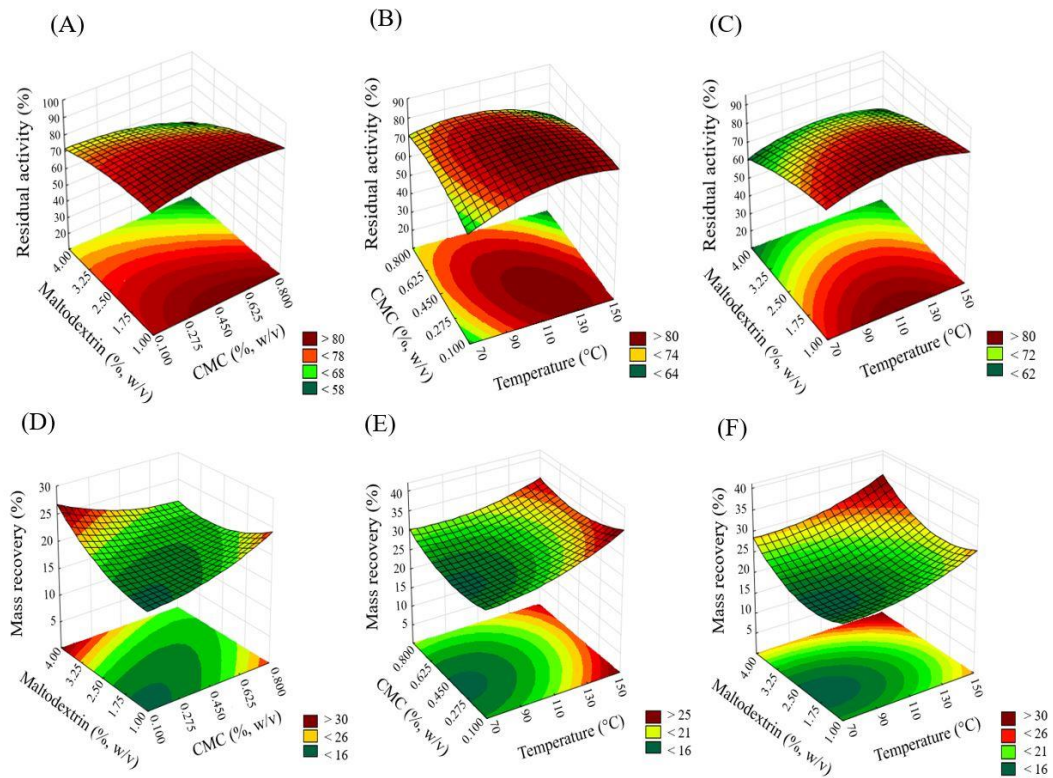
Subsequently, in order to conduct a comprehensive study of the influence of the independent variables on the Residual protease activity and Mass recovered of the powder, experimental and predicted values were compared with empirical equations adjusted with base on the analysis of variance (ANOVA). The equations obtained to predict the Residual activity of the protease (Equation 3) and the Mass recovered (Equation 4) of the obtained powder are:

$$\% \text{Residual activity} = 79.261 - 2.062 X_1^2 - 1.582 X_2 - 1.116 X_2^2 - 5.778 X_3 - 1.690 X_1 X_2 - 1.637 X_2 \cdot X^3 \quad (3)$$

$$\% \text{ Mass recovery} = 17.360 + 2.028 X_1 + 0.711 X_1^2 + 0.981 X_2^2 + 1.731 X_3 + 1.584 X_3^2 - 2.189 X_2 \cdot X_3 \quad (4)$$

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

The response surface and contour plot graphs (Figure 2) showed a relationship between two variables at time. The non-explicit variables were fixed at the central point (level 0) for the surface construction. An initial increase in CMC concentration in combination with lower concentrations of maltodextrin ( $< 1.75\%$ ; w/v) resulted in an increase of Residual protease activity (Figure 2A). In addition, it was observed that higher values of Mass recovery were found when higher concentrations of maltodextrin in combination with lower CMC concentrations were incorporated to enzyme solution. However, when lower concentrations of maltodextrin were combined with higher concentrations of CMC, higher values were also found (Figure 2D). As showed in Figure 2B, inlet air temperatures between  $110\text{-}140\text{ }^{\circ}\text{C}$  and CMC concentrations lower than  $0.45\%$  (w/v) resulted in higher Residual protease activity. The Mass recovery increased with increasing the inlet air temperatures within the experimental level at both high and low concentrations of CMC (Figure 2E). Higher inlet air temperatures and maltodextrin concentrations lower than  $1.75\%$  (w/v) resulted in higher Residual protease activity (Figure 2C). Furthermore, high inlet air temperatures combined with high maltodextrin concentrations resulted in greater mass recovery (Figure 2F). Thus, the experimental design approach used in this study was found to be effective in rapidly assessing the spray drying conditions for obtaining protease powder at any point within the range of inlet air temperature and concentration of both CMC and maltodextrin tested.



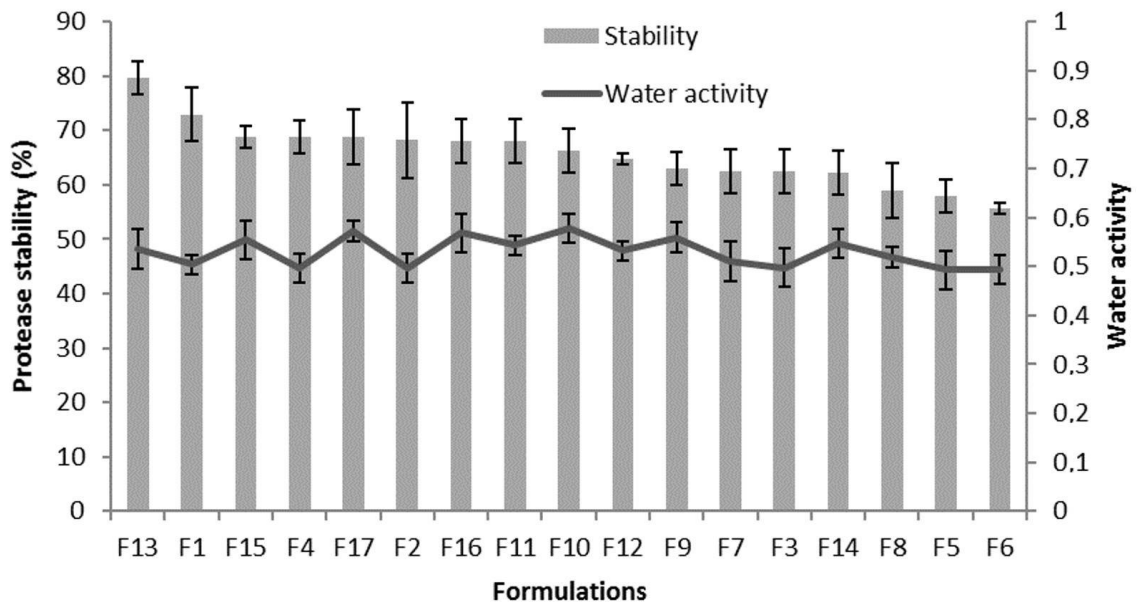
**Figure 2:** Three-dimensional response surface plot for: Effect of maltodextrin and CMC concentration on Residual protease activity (A) and Mass recovery (D) at a constant spray drier inlet temperature; Effect of spray drier inlet temperature and CMC concentration on Residual protease activity (B) and Mass recovery (E) at a constant maltodextrin concentration; Effect of spray drier inlet temperature and maltodextrin concentration on Residual protease activity (C) and Mass recovery (F) at a constant CMC concentration. Dark red color indicates high Residual protease activity and Mass recovery, while green and yellow color indicates low Residual protease activity and Mass recovery.

### 3.1 Protease powder stability

The stability of obtained proteases powders formulations during storage at room temperature for six months was investigated. The highest enzyme stability was maintained (80%) after 180 days for the Formulation 13, that was dried with 0.5% CMC and 1.0% MD and spray drier inlet temperature of 110 °C (Figure 3). Under this condition, satisfactory levels of protease activity were found.

The water activity ( $a_w$ ) of the proteases dried formulations are also showed in Figure 3. Values below 0.6 were obtained for all formulations, indicating their potential for storage. The values of  $a_w$  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 3.** Effect of six months of storage on the protease stability (■) and the water activity (—) of the powder.

#### 4 Conclusion

The study showed that the spray drying process used in this work was effective to dehydrate the proteases recovered from the submerged cultures of *Bacillus* sp. SMIA-2, maintaining good enzymatic activity when storage at room temperature for 180 days. The spray-dried protease generated could be very useful for industrial applications such as in the detergent industry, that not require the enzyme in pure form.

#### References

Abdel-Mageed, H. M., Fouad, S. A., Teaima, M. H., Abdel-Aty, A. M., Fahmy, A. S., Shaker, D. S., Mohamed, S. A. (2019). Optimization of nano spray drying parameters for production of [alpha]-amylase nanopowder for biotherapeutic applications using factorial design. *Dry Technology*, 37(16):2152-2160.

- Assadpour, E., Jafari, S. M. 2019. Advances in spray-drying encapsulation of food bioactive ingredients: From microcapsules to nanocapsules. *Annu Rev Food Sci Technol*, 10:103-131. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121641>.
- Bajaj, S. R., Marathe, S. J., Singhal, R. S. (2020). Co-encapsulation of vitamins B12 and D3 using spray drying: Wall material optimization, product characterization, and release kinetics. *Food Chem.*, 335:127642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127642>.
- Barbosa, J. B., Gentil, N. O., 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. *Biocatalysis and Biotransformation* 32: 244-250. <https://doi.org/10.3109/10242422.2014.934363>.
- Barzkar, N., Homaei, A., Hemmati, R., Patel, S. (2018). Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles*, 22:335-346. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1009-8>.
- Belghith, H., Chaabouni, S. E., Gargouri, A. (2001). Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of maltodextrin. *Enzyme Microb. Technol.*, 28(2-3):253-258. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00322-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00322-7).
- Bernardo, S. P. C., Rosana, A. R. R., de Souza, A. N., Chiorean, S., Martins, M. L. L., Vederas, J. C. (2020). Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium *Bacillus licheniformis* SMIA-2, an Antimicrobial and Thermostable Enzyme-Producing Isolate from Brazilian Soil. *Microbiol. Resour. Announc*, 9(17). <https://doi.org/10.1128/MRA.00106-20>.
- Beuchat, L. R. (1981). Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World*, 26(7):345-349.
- Cabral, T. P. F., Bellini, N. C., Assis, K. R., Teixeira, C. C. C., Lanchote, A. D., Cabral, H., Freitas, L. A. P. (2017). Microencapsulate *Aspergillus niger* peptidases from agroindustrial waste wheat bran: spray process evaluation and stability. *J. Microencapsul*, 34(6):560-570. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1367851>.
- Braga, A. R. C., Manera, A. P., Ores, J., Sala, L., Maugerim, F., Kalil, S. J. (2013). Kinetics and thermal properties of crude and purified  $\beta$ -galactosidase with potential for the production of galactooligosaccharides. *Food Technol Biotech*, 51(1):45-52. <https://hrcak.srce.hr/99746>.
- Contesini, F. J., Melo, R. R. D., Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit. Rev. Biotechnol*, 38(3):321-334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>.
- Corrêa, T. L. R., Moutinho, S. K. D. S., Martins, M. L. L., Martins, M. A. (2011). Simultaneous  $\alpha$ -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. Sci. Technol.*, 31(4):843-848. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000400003>.

- Costa-Silva, T. A., Souza, C. R. F., Oliveira, W. P., Said, S. (2014). Characterization and spray drying of lipase produced by the endophytic fungus *Cercospora kikuchii*. *Braz. J. Chem. Eng.* 31(4):849-858. <https://doi.org/10.1590/01046632.20140314s00002880>.
- Emami, F., Vatanara, A., Park, E. J., Na, D. H. (2018). Drying technologies for the stability and bioavailability of biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*, 10(3):131. <https://doi:10.3390/pharmaceutics10030131>.
- Freitas-Junior, A. C. V., Costa, H. M. S., Icimoto, M. Y., Hirata, I. Y., Marcondes, M., Carvalho, L. B., Oliveira, V., Bezerra, R. (2012). Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chem*, 133: 596-1602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.056>.
- Gupta, G., Sahai, V., Mishra, S., Gupta, R. K. (2014). Spray-drying of xylanase from thermophilic fungus *Melanocarpus albomyces* - Effect of carriers and binders on enzyme stability. *Indian J. Chem. Technol.*, 21:89-95. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/27533>.
- Hamin Neto, Y. A. A., da Rosa Garzon, N. G., Pedezzi, R., Cabral, H. (2018). Specificity of peptidases secreted by filamentous fungi. *Bioengineered*, 9(1):30-37. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1373531>.
- Hamin Neto, Y. A. A., de Freitas, L. A. P., Cabral, H. (2014). Multivariate analysis of the stability of spray-dried *Eupenicillium javanicum* peptidases. *Dry. Technol.* 32(5):614-621. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.853079>.
- Jenssen, P. H., Peek, K., Morgan, H.W. (1994). Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41(4):400-406. <https://doi.org/10.1007/BF00939027>.
- 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(1):113-128. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03075-1>.
- Mohtar, N. S., Abdul Rahman, M. B., Mustafa, S., Mohamad Ali, M. S., Raja Abd Rahman, R. (2019). Spray-dried immobilized lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM in sago. *Peer J.*, 7:e6880. <https://doi.org/10.7717/peerj.6880>.
- Namaldi, A., Çalik, P., Uludag, Y. (2006). Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine alkaline protease powders. *Dry Technol.*, 24(11):1495-1500. <https://doi.org/10.1080/07373930600961108>.
- Nascimento, W. C. A., Martins, M. L. L. (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.*, 35(1-2):91-96. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100015>.
- Nasri, R., Abed, H., Karra-châabouni, M., Nasri, M., Bougatef, A. (2015). Digestive alkaline proteases from *Serranus scriba* viscera: characteristics, application in the extraction of carotenoproteins from shrimp waste, and evaluation in laundry commercial

detergents. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 4:355-361. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.05.001>.

Ohtake, S., Kita, Y., Arakawa, T. (2011). Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 63(13):1053-1073. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.011>.

Saggu, S. K., Mishra, P. C. (2017). Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. *PLoS ONE*, 12(11):e0188724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188724>.

Samborska, K., Witrowa-Rajchert, D., Gonçalves, A. (2005). Spray-Drying of  $\alpha$ -Amylase - The Effect of Process Variables on the Enzyme Inactivation. *Dry Technol.*, 23:941-953. <https://doi.org/10.1081/DRT-200054243>.

Schutyser, M. A., Perdana, J., Boom, R. M. (2012). Single droplet drying for optimal spray drying of enzymes and probiotics. *Trends Food Sci. Tech.* 27(2):73-82. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.05.006>.

Silva, C. R. D., 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 the enzymatic activity. *Braz. J. Microbiol.*, 38(2):253-258. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200012>.

Singh, S., Bajaj, B. K. (2017). Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energ. Ecol. Environ.*, 2:370-386. <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0076-5>.

Siqueira, A. N. R., Rosa, N. G., Neto, P. B., Rodrigues, A., Freitas, L. A. P., Cabral, H. (2013). Optimization of the drying parameters for an enzymatic extract, and an evaluation of the subsequent proteolytic and cellulolytic activities. *Biochem. Biotechnol. Rep.*, 2(1):17-24. <http://dx.doi.org/10.5433/2316-5200.2013v2n1p17>.

Souza, A. N. D., Martins, M. L. L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz. J. Microbiol.*, 32(4):271-275. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>.

Utami, T. S., Hariyani, I., Alamsyah, G., Hermansyah, H. (2017). Production of dry extract extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method to catalyze biodiesel synthesis. *Energy Procedia*, 136:41-46. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.275>.

Zhou, C., Zhou, H., Li, D., Zhang, H., Wang, H., Lu, F. (2020). Optimized expression and enhanced production of alkaline protease by genetically modified *Bacillus licheniformis* 2709. *Microb. Cell Fact.*, 19:45. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01307-2>



### 3.2 EFFECTIVENESS OF MALTODEXTRIN AND AEROSIL® IN SPRAY DRYING PERFORMANCE OF PROTEASE FROM *Bacillus* sp. SMIA-2<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado que será submetida a revista Journal of Microbiology and Biotechnology

## ABSTRACT

Proteases are important industrial enzymes, but have limited application due to their short lifetime. Proteases in liquid form are susceptible to denaturation during storage and drying methods could minimize the loss of enzymatic activity. The aim of this work was to evaluate the effectiveness of maltodextrin and Aerosil® in spray drying performance of protease from *Bacillus* sp. SMIA-2 in order to prepare a dry formulation intended for industrial application (animal feed). Spray-drying of protease solution was carried out at a fixed inlet temperature of 110° and maltodextrin and Aerosil® ranging from 0.5 -3.5% (w/v) and 0-3.2% (w/v), respectively, as generated by central composite design. The results showed that using Aerosil® (0.5-1.0%, w/v) as an auxiliary agent and maltodextrin (1.6%, w/v) as soluble supports provided to obtain a powder with satisfactory levels of protease activity. At concentrations of maltodextrin and Aerosil® of 0.94% and 0.47% (w/v), the generated protease powder showed residual protease activity and mass recovery around 80% and 31%, respectively, and was stable after 180 days of storage at room temperature (24 – 32°C). These are promising characteristics when considering its application industrial.

**Key words:** Proteases, *Bacillus*, maltodextrin, aerosil®, spray-drying.

## INTRODUCTION

The genus of *Bacillus*, one of the most abundant bacterial strains found in soil, are the source of several enzymes of current industrial interest like amylases, proteases, cellulases and lipases, that are the main enzymes consumed worldwide and have applications in a wide range of products and industrial processes (Hertel et al., 2017; Ravindran et al., 2018; Yuan et al., 2020). Its capacity to form extremely resistant spores, allow *Bacillus* spores to be used as probiotic food supplements, where they are used in human as dietary supplements and in feed for livestock and aquaculture as growth promoters and competitive

exclusion agents (Nath et al., 2015). Besides, this genus has a history of safe use in both food and pharmaceutical industry (Leães et al., 2011).

*Bacillus* SMIA-2 a Gram-positive, strictly aerobic, thermophilic, spore-forming bacterium is known to produce important enzymes for industrial use such as proteases (Silva et al., 2007, Barbosa et al., 2014) in submerged cultures employing both pure and complex carbon sources. Proteases comprise a variety of enzymes defined by their ability to catalytically hydrolyze the peptide bonds of protein substrates (Naveed et al., 2021). As crude or purified preparations, proteases have diverse applications in a wide variety of industries, including leather, silk manufacturing, detergent industry, food and in feedstuff (Freitas-Junior et al., 2012; Nasri et al., 2015; Singh et al., 2017, Ariyaeia et al., 2019). In this last, the use of proteases in animal nutrition is an important and growing area of enzyme application, especially for pig and poultry nutrition. Feed enzymes offer the benefit of degrading specific feed components otherwise harmful or of no value to the livestock (Gifre et al., 2017).

Enzymes are much more stable in the dry state than in solution. A solid enzyme formulation can be obtained by lyophilisation or by spray drying of the concentrate broth. The spray-drying can be considered a superior alternative to freeze-drying when dehydrating a large quantity of samples as the process would take less time and be more economical (Banjare et al., 2019). However, dehydration of enzymes by spray drying can cause thermal denaturation leading to loss of enzyme activity. In this context, the addition of additives can minimize the denaturation of protein during this process.

Considering the great industrial relevance of proteases produced by *Bacillus* sp. SMIA-2, an attempt was done to increase their shelf life by using the spray drying process together with maltodextrin and Aerosil®. The effects of ratio of maltodextrin to Aerosil® on the residual protease activity and mass recovery of the powder was evaluated through a central composite design (CCD 2<sup>2</sup>). In addition, the stability of the powdered formulations was also determined.

## MATERIAL AND METHODS

### Microorganism and culture conditions

The bacterial strain used in this study was a thermophilic *Bacillus* sp. previously isolated from a local soil sample<sup>13</sup>. The culture medium for protease production contained (g L<sup>-1</sup>): KCl-0.3, MgSO<sub>4</sub>-0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.87, CaCl<sub>2</sub>-0.29, ZnO-2.03x10<sup>-3</sup>, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.7x10<sup>-2</sup>, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O-1.0x10<sup>-2</sup>, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O-8.5x10<sup>-4</sup>, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.4x10<sup>-3</sup>, NiCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.5x10<sup>-4</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-3.0x10<sup>-4</sup>, commercial corn steep liquor (Sigma Aldrich) -3.0, whey protein-1.0 and soluble starch-5.0 (Corrêa et al., 2011).

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 min. The medium (50 mL in 250 mL Erlenmeyer flasks) was inoculated with 1 mL of an standard overnight culture (initial number of cells 10<sup>4</sup>) and incubated at 50 °C in an orbital shaker (Thermo Forma, Ohio, USA) operated at 150 rpm. After 36 h of incubation culture, 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 used as crude enzyme preparation.

### Protease assay

The activity of protease was assessed in triplicate by measuring the release of trichloroacetic-acid soluble peptides from 0.2% (w/v) azocasein in 0.1 M Tris/HCl buffer (pH 8.0) at 70°C for 10 min. The 1 mL reaction was terminated by the addition of 0.5 mL of 15% trichloroacetic acid and then centrifuged at 20,600 g for 5 min, after cooling (Janssen et al., 1994). One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to produce an increase in absorbance at 420 nm equal to 1.0 in 60 minutes.

### Spray drying of crude enzyme solution

Spray-dried powders were produced through the atomization of crude proteases preparation in a lab-scale spray dryer (LAB-PLANT, MODEL SD-04, England). During operation, 100 ml prepared solution was fed at constant rate, 5.40 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 drier air inlet temperature used in the process was 110°C and the outlet air temperature could not be controlled. In all of the experiments the air flow rate was constant. The adjuvants were incorporated into the enzyme solution before spray drying and its concentrations are showed in Table 1. The dried particles were collected and stored at refrigeration temperature (15°C).

The proteases activities were measured before and after drying. The activity measurement of the proteases after drying operation was accomplished by dissolving enzymes powder (0.01g.mL<sup>-1</sup>) and the residual activities (%) determined and compared with the activities of the crude enzymes solutions before drying.

#### Experimental Design and Statistical Analysis

A central composite design (CCD) 2<sup>2</sup> was constructed to evaluate the effects of the Aerosil® (Evonik Industries, AG) and maltodextrin concentrations on Residual protease activity and Mass recovery of the powder. The factorial planning had three central points and yielded a total of 12 treatments for each experiment. The factors and factors levels studied are described in Table 1.

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%.

Condition optimization was performed using CCD, and surface-response was produced with fixed central points of 2.0% (w/v) Aerosil® and 1.6% (w/v) maltodextrin. The model of the experiment can be expressed as follows:

$$Y = b_o + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^n \sum b_{ij} x_i x_j \quad \text{equation 1}$$

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

#### Mass recovery (%)

The mass recovery was determined according to Belghith et al. (2001).

$$\text{Mass recovery (\%)} = \frac{\text{Wt}}{\text{TSS}} \times 100$$

Where, TSS is the total soluble solid of the crude protease solution in the presence of the adjuvant and Wt is the weight of powder mass (g) obtained from spray-drying process. TSS was determined from the crude extract protease solution using a hand-held digital refractometer (Pocket Refractometer Pal-1, Atago Co. Ltd, Tokyo, Japan). Three measurements were recorded from each sample.

#### Protease-rich powder stability (%)

After drying, storage stability of powdered formulations at room temperature (24 – 32°C) up to 180 days was investigated. The stability of protease was determined by measuring protease activities right after drying and after 180 days of storage.

#### Water activity (aw)

The water activity was determined in the powdered formulations by direct reading in an apparatus water activity meter, HygroLab C1 Bench-Top Indicator, Rotronic AG, Switzerland at 25 °C.

## RESULTS AND DISCUSSION

The filtrates from cultures of *Bacillus* sp. SMIA-2 (36 h) grown in starch, corn steep liquor and whey protein contained 1.01 mg mL<sup>-1</sup> of protein and 12.2 U mL<sup>-1</sup> protease. The proteins may partly have originated from the substrates or from cells following lysis, and may also constitute different enzymes, secreted to digest the substrates (Ladeira et al., 2015). Thus, the protease solution containing by-products of the fermentation process (other proteins, carbohydrates and salts) was subjected to spray drying process, in order to develop stable formulations of the dry enzyme. Although there is no specific legislation about the use of additives for enzymatic formulations, the maltodextrin and Aerosil® were used as drying adjuvants in an attempt to avoid loss of protease activity during the spray drying

process and storage. They were selected based on their function and are in accordance with the legislation of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil – MAPA (BRASIL, 2010).

Maltodextrin as additives has a significant effect on the solubility of powder, however, has shown contradicting results in hygroscopicity properties of the powder (Lee et al., 2018). On the other hand, the Aerosil® is known as a pharmacotechnical adjuvant used as a desiccant and as a nonstick agent for hygroscopic powders, as well as anti-caking and anti-humectant (Ferreira et al., 2016). In addition, it is harmless, thermally stable and safe.

During the drying process the drier air inlet temperature was maintained at 110°C degrees. It was selected based on previous studies (unpublished data).

Table 1 shows the results of the Residual protease activity and Mass recovery of powder obtained, according to the experimental planning carried out.

Table 1. Matrix of CCD 2<sup>2</sup> (real and coded values) used and their responses (Residual protease activity and Mass recovery).

<b>Essays</b>			Residual	Mass
	% Aerosil® (w/v)	% MD (w/v)	activity (%)*	Recovery (%)
<b>1</b>	(-1) 0.94	(-1) 0.47	79.97 ± 1.10	31.09
<b>2</b>	(1) 3.06	(-1) 0.47	37.98 ± 1.50	78.57
<b>3</b>	(-1) 0.94	(1) 2.73	72.45 ± 0.90	38.50
<b>4</b>	(1) 3.06	(1) 2.73	56.68 ± 0.20	48.86
<b>5</b>	(-1.41) 0.5	(0) 1.6	83.47 ± 4.31	30.29
<b>6</b>	(1.41) 3.5	(0) 1.6	43.24 ± 3.25	63.40
<b>7</b>	(0) 2	(-1.41) 0	54.67 ± 0.10	48.59
<b>8</b>	(0) 2	(1.41) 3.2	58.18 ± 0.60	47.84
<b>9</b>	(0) 2	(0) 1.6	68.95 ± 1.50	39.95
<b>10</b>	(0) 2	(0) 1.6	70.95 ± 1.10	41.12
<b>11</b>	(0) 2	(0) 1.6	72.54 ± 0.50	36.44
<b>12</b>	(0) 2	(0) 1.6	71.12 ± 0.60	43.41

\* The values represent the mean of three determinations ± standard deviation.

The Residual protease activity values varied from 37.98% to 83.47. In this case, the best result (Formulation 5) was obtained when 0.5% (w/v) Aerosil® was incorporated to enzymes solutions in combination with 1.6% (w/v) maltodextrin prior to spray drying process. However, as can also be observed in Table 1, the lowest percentage of mass recovered was obtained in the Formulation 5 (30.29), although this value can be considered adequate for lab-scale spray dryers. The maximum percentage of mass recovered obtained was found when 3.06% (w/v) Aerosil® was used in combination with 0.47% (w/v) maltodextrin (Formulation 2). The better performance in mass recovery observed for Formulation 2 may be due to the greater reduction in the adhesiveness of the particles to the drying equipment provided by the use of a higher concentration of Aerosil®, which increased the efficiency of dust collection by the cyclone.



The statistical significance of the model equation was assessed by an F-test (ANOVA) and the data are shown in Table 2. According to Lopes et al. (2006), the regression can be considered useful for predictive purposes if the  $Ms_{\text{regression}}/Ms_{\text{residue}}$  value is at least four to five times greater than the  $F_{\text{tabulated}}$  ( $F_{\text{tab}}$ ), and the F of the lack of adjustment in relation to the pure error must present the lowest possible value and always less than the F of the lack of tabulated adjustment. A high value for the lack of adjustment and greater than the  $F_{\text{tab}}$  may indicate that the data are not well adjusted to the model obtained.

The models showed significant regression at the 95% confidence level ( $F_{\text{cal}}$  higher than  $F_{\text{tab}}$ ) with  $R^2$  equal to 0.99151 and 0.95017 for Residual protease activity and Mass recovered respectively, showing that the models explained 99.15% and 95.017 of the variation of experimental data for Residual protease activity and Mass recovered. The  $F_{\text{cal}}$  value of the regression was higher than the  $F_{\text{tab}}$ , indicating that the models were predictive. The lack of adjustment was not significant ( $F_{\text{cal}}$  less than the  $F_{\text{tab}}$ ), indicating that the experimental data adjusted to the obtained models.

Table 2. ANOVA for the variables of response surface quadratic model.

Variable	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab0.05</sub>	P<0.05
<b>Residual activity (%)</b>						
Regression	2209.89	5	441.979	143.066	4.39	0.000689
Residues	18.536	6	3.08933			
Lack of adjustment	11.995	3	3.99833	1.83382	9.28	
Pure error	6.541	3	2.18033			
Total error	2228.43	11				
						R <sup>2</sup> =99.151
<b>Mass recovery(%)</b>						
Regression	1996.8	5	399.36	23,2924	4.39	0.000438
Residues	102.873	6	17.1455			
Lack of adjustment	7.57	3	25.8567	3.06564	9.28	
Pure error	25.303	3	8.43433			
Total error	2099.68	11				
						R <sup>2</sup> =95.017

The equations obtained to predict the Residual activity of the protease (Eq. 1) and the Mass recovered (Eq. 2) of the obtained powder are presented in function of the coded terms of the independent variables (Table 3).

Table 3. Modeled equation for the experimental results of Residual protease activity (Ractivity) and Mass recovery (% MR).

Variable (%)	Equation
% Ractivity (Equation 2)	$Y=70,88898163606-14,332751847494 x_1-3,2971619365609 x_1^2+2,017914958469 x_2-6,7612687813022 x_2^2+6,5525876460768 x_1x_2$
% MR (Equation 3)	$Z=40,230782364121+13,083182440931 x_1+3,7381355799737 x_1^2-2,91972586133 x_2+4,4239678988288 x_2^2-9,2811363462707 x_1x_2$

Where  $x_1$  is the Aerosil® concentration and  $x_2$  is the Maltodextrin concentration.

The response surface and contour plot graphs (Fig. 1) showed the response variation for each parameter studied (concentration of Aerosil® and maltodextrin). It was observed that the region where the highest residual activity values were obtained corresponds to concentrations of maltodextrin around 1.6% (w/v) and Aerosil® between 0.5-0.75% (w/v). At high concentrations of maltodextrin, good levels of protease activity were still observed, but when high concentrations of Aerosil® were used, the enzyme activity dropped dramatically (Fig. 1A).

Regarding to the Mass recovery, higher values were found when higher concentrations of Aerosil® in combination with lower maltodextrin concentrations (<1.6%, w/v) were incorporated to enzyme solution. This range corresponds to the region where the lowest levels of protease activity were obtained. Thus, the use of Aerosil® as an auxiliary agent was adequate as long as its concentration does not exceed 2.0% (w/v).

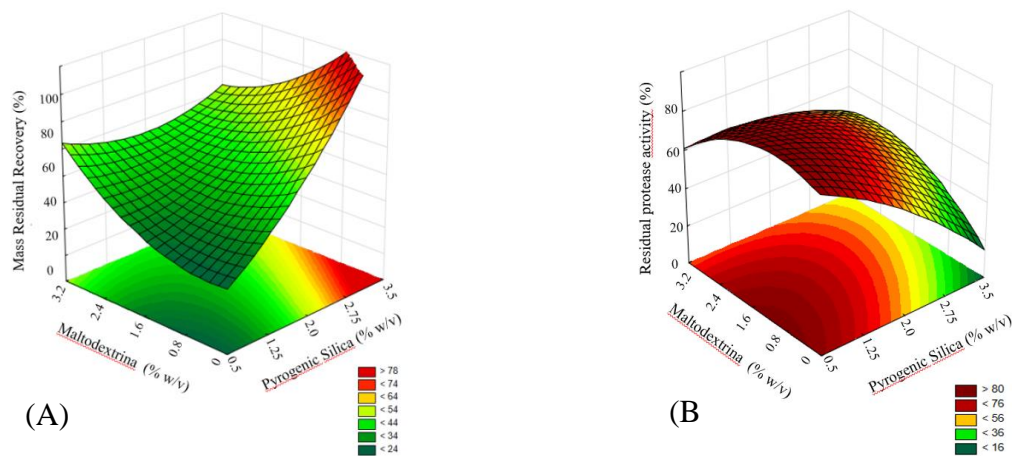


Figure 1. Three-dimensional response surface plots representing effects of the additives Aerosil® and maltodextrin concentration on Residual protease activity (A) and Mass recovery (%). Dark red color indicates high Residual enzyme activity (%) and Mass recovered (%), while green and yellow indicate low Residual enzyme activity (%) and Mass recovered (%).

In the particular case of drying proteases from *Bacillus* sp. SMIA-2 using Aerosil® (0.5-1.0%, w/v) as an auxiliary agent and maltodextrin (1.6%, w/v) as soluble supports provided to obtain a powder with satisfactory levels of protease activity, ease reconstitution in water and less powder adhesion on internal walls of the drying chamber. Commonly known mixtures of maltodextrin with Aerosil® are shown to have positive effect on quality of powdered products (Cortés-Rojas and Oliveira, 2012; Libardi et al., 2020).

#### Protease powder stability

The stability of obtained proteases rich powders formulations during storage at room temperature between 24 – 32°C for 180 days was investigated. The highest enzyme stability was maintained (75%) after 180 days for the Formulation 1 and 5 (Fig. 2), which also were the best to preserve activity of protease from *Bacillus* sp. SMIA-2 during spray drying. Thus, these formulations were the best to preserve the protease activity during spray drying and also provided the best stabilization of the powders during storage time. However, as

showed in the Figure 3, after 180 days of storage at room temperature between 26 – 38°C the powder obtained using Formulation 5 had a solidified appearance.

Similar values of water activity ( $a_w$ ) around 0.5 were obtained for all formulations indicating their potential for storage. According to Beauchat (1981) water activity values above 0.6 could promote microorganism growth and above 0.8 facilitate toxin production.

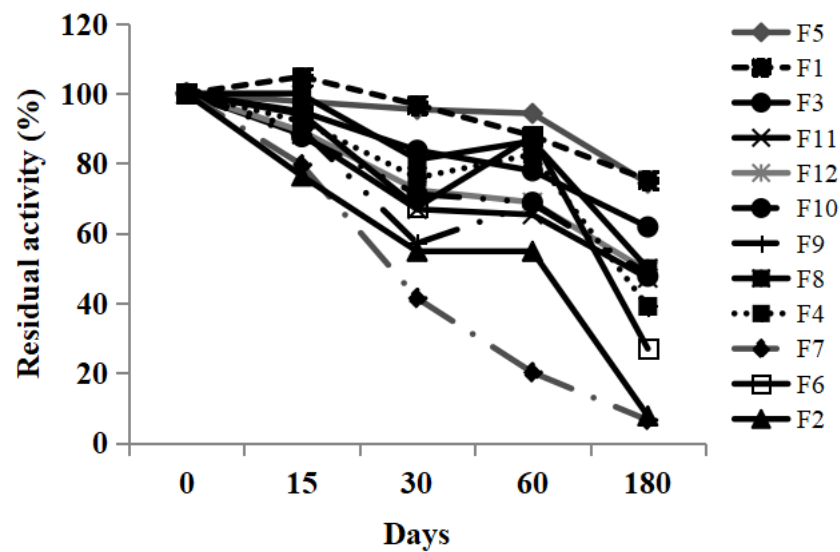


Figure 2. Effect of time storage on the protease powder stability (%) after 180 days storage

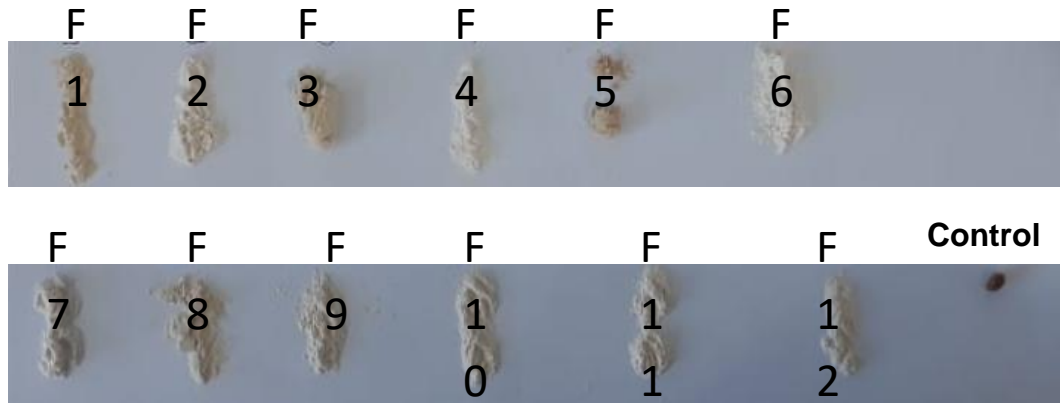


Figure 3. Images of powdered formulations after 180 days of storage at room temperature (24 – 32°C).

In order to confirm the optimized conditions for drying proteases produced by SMIA-2, a new fermentation was carried out as described in section 2.1 and the protease-rich extract obtained was dried using the conditions established in Formulation 1 that was, addition of 0.94% (w/v) Aerosil® and 0.47% (w/v) maltodextrin to the crude extract before the process. The filtrates from these cultures of *Bacillus* sp. SMIA-2 (36 h) showed activity of protease of  $12.61 \pm 0.21 \text{ U mL}^{-1}$ . After drying and rehydration ( $0.01 \text{ mg mL}^{-1}$ ) the protease activity decreased to  $10.35 \pm 0.19 \text{ U mL}^{-1}$ , corresponding to a loss of 17.9%. Image of proteases rich powder obtained at this condition is showed in Figure 4. This result can be considered very good for the mini spray dryer used in this work.



Figure 4. Image of proteases rich powder using 0.94% (w/v) Aerosil® and 0.47 % (w/v) maltodextrin.

## CONCLUSION

The CCD ( $2^2$ ) was used for the application of RSM to optimize the maltodextrin and Aerosil® concentration for the production of spray-dried protease recovered from *Bacillus* sp. SMIA-2 cultures. The results showed that using Aerosil® (0.5-1.0%, w/v) as an auxiliary agent and maltodextrin (1.6%, w/v) as soluble supports provided to obtain a powder with satisfactory levels of protease activity and stability after 180 days of storage at room temperature between 24 – 32°C.

## REFERENCES

- Ariyaei, A.; Farhadi, A.; Moradian, F.; Mianji, G. R. (2019). Cloning, expression and characterization of a novel alkaline serine protease gene from native Iranian *Bacillus* sp.; a producer of protease for use in livestock. *Gene*, 693:10-15.
- Banjare, I. S.; Gandhi, K.; Sao, K.; Arora, S.; Pandey, V. (2019). Physicochemical properties and oxidative stability of milk fortified with spray-dried whey protein concentrate–iron complex and in vitro bioaccessibility of the added iron. *Food technology and biotechnology*, 57(1):48-58.
- Barbosa, J. B.; Gentil, N. O.; 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
- Beuchat, L. R. (1981). Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World*, 26(7):345-349.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2010). Instrução Normativa MAPA nº 42 de 16/12/2010. Brasília
- Corrêa, T. L. R.; Moutinho, S. K. D. S.; Martins, M. L. L.; Martins, M. A. (2011). Simultaneous  $\alpha$ -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 Science and Technology*, 31(4):843-848.
- Cortés-Rojas, D. F.; Oliveira, W. P. (2012). Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. *Drying Technology*, 30(9):921-934.
- Ferreira, S.; Malacrida, C. R.; Telis, V. R. (2016). Influence of emulsification methods and use of colloidal silicon dioxide on the microencapsulation by spray drying of turmeric oleoresin in gelatin-starch matrices. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 94(11):2210-2218.
- Gifre, L.; Arís, A.; Bach, À.; Garcia-Fruitós, E. (2017). Trends in recombinant protein use in animal production. *Microbial cell factories*, 16(1):1-17.
- Hertel, R.; Meyerjürgens, S.; Voigt, B.; Liesegang, H.; Volland, S. (2017). Small RNA mediated repression of subtilisin production in *Bacillus licheniformis*. *Scientific reports*, 7(1):1-11.
- Ladeira, S. A.; Cruz, E.; Delatorre, A. B.; Barbosa, J. B.; Leal Martins, M. L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp: SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic journal of biotechnology*, 18(2):110-115.
- Leães, F. L.; Vanin, N. G.; Sant'Anna, V.; Brandelli, A. (2011). Use of byproducts of food industry for production of antimicrobial activity by *Bacillus* sp. P11. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5):822-828.
- Lee, J. K. M.; Taip, F. S.; Abdulla, H. Z. (2018). Effectiveness of additives in spray drying performance: A review. *Food Research*, 2(6):486-499.



- Libardi, N.; Soccol, C. R.; Tanobe, V. O.; Souza Vandenberghe, L. P. (2020). Definition of liquid and powder cellulase formulations using domestic wastewater in bubble column reactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 190(1):113-128.
- Nasri, R.; Abed, H.; Karra-Chaabouni, M.; Nasri, M.; Bougatef, A. (2015). Digestive alkaline proteinases from *Serranus scriba* viscera: Characteristics, application in the extraction of carotenoproteins from shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3):355-361.
- Nath, S.; Chowdhury, S.; Dora, K. C. (2015). Application of *Bacillus* sp. as a biopreservative for food preservation. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 5(4):85-95.
- Naveed, M.; Nadeem, F.; Mehmood, T.; Bilal, M.; Anwar, Z.; Amjad, F. (2021). Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, 151(2):307-323.
- Ravindran, R.; Hassan, S. S.; Williams, G. A.; Jaiswal, A. K. (2018). A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. *Bioengineering*, 5(4):93.
- Silva, C. R. D.; 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 the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2):253-258.
- Singh, S.; Bajaj, B. K. (2017). Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energy, Ecology and Environment*, 2(6):370-386.
- Yuan, F.; Li, K.; Zhou, C.; Zhou, H.; Liu, H.; Chai, H.; Lu, F.; Zhang, H. (2020). Identification of two novel highly inducible promoters from *Bacillus licheniformis* by screening transcriptomic data. *Genomics*, 112(2), 1866-1871.

### 3.3 USO DE PROTEASES DE *Bacillus* sp. SMIA-2 NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

#### RESUMO

As proteases microbianas, especialmente de *Bacillus* spp., têm sido amplamente exploradas para uma ampla variedade de aplicações, como na melhoria na digestibilidade das proteínas da dieta animal. Neste trabalho, foi avaliada a viabilidade de aplicação de um extrato seco rico em proteases produzidas por culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2, na suplementação de dietas de frangos para melhorar o desempenho produtivo. O efeito do pH (ácido e neutro) com e sem pepsina e de íons metálicos sobre a atividade das enzimas foi primeiramente estudado. Posteriormente, foi avaliado o desempenho de crescimento de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com a protease até 21 dias de idade. A protease foi completamente inativada após 30 min de incubação em pH 2,2 e a 40°C. Em pH 3,0 a enzima até apresentou bons níveis de atividade (>65%), mas ao ser incubada por 30 minutos a 40°C, também foi inativada. Entretanto, em valores de pH de 4,0 - 7,0 a protease do SMIA-2 apresentou boa estabilidade quando incubada por 1 hora a 40°C. As proteases do SMIA-2 foram resistentes à degradação pela pepsina em valores de pH igual ou superiores a 4,0. A pH 4,0 a protease manteve mais de 80% de sua atividade e em valores maiores de pH a enzima foi estável na presença da pepsina. Em relação à estabilidade na presença de íons metálicos foi observado que apenas o

cobre e o cobalto apresentaram efeito inibitório na atividade da protease. No desempenho animal, o extrato seco de proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 mostrou-se eficiente, apresentando resultados significativos para peso final, consumo de ração e ganho de peso compatíveis com os resultados dos produtos antibiótico, protease e probiótico comerciais avaliados.

**Palavras-chave:** Proteases, *Bacillus*, estabilidade, pH, desempenho, frango de corte.

### ABSTRACT

As microbial proteases, especially from *Bacillus* spp, they have been widely explored for a wide variety of applications, such as improving the digestibility of animal diet proteins. In this work, the viability of applying a dry extract rich in proteases produced by submerged cultures of *Bacillus* sp. SMIA-2, in supplementing broiler diets to improve production performance. The effect of pH (acidic and neutral) with and without pepsin and metal ions on enzyme activity was first studied. Subsequently, the growth performance of broilers fed diets supplemented with a protease up to 21 days of age was evaluated. A protease was completely inactivated after 30 min of incubation at pH 2.2 and at 40°C. At pH 3.0, the enzyme showed good levels of activity (> 65%), but when incubated for 30 minutes at 40°C, it was also inactivated. However, at pH values of 4.0 - 7.0, the SMIA-2 protease shows good stability when incubated for 1 hour at 40°C. The SMIA-2 proteases were resistant to degradation by pepsin at pH values equal to or greater than 4.0. At pH 4.0 the protease maintained more than 80% of the activity at higher pH values, the enzyme was stable in the presence of pepsin. Regarding stability in the presence of metal ions, it was observed only copper and dissipative cobalt inhibitory effect on protease activity. Without animal performance, the dry protease extract from *Bacillus* sp. SMIA-2 proved to be efficient, the result obtained for final weight, feed consumption and weight gain compatible with the results of the commercial antibiotic, protease and probiotic products obtained.

**Keywords:** Proteases, *Bacillus*, stability, pH, performance, broiler.

## INTRODUÇÃO

Proteases ou peptidases constituem a classe de enzimas mais utilizada mundialmente, que respondem por 65% do custo atual de venda de enzimas industriais (Benmrad et al., 2016; Barzkar et al., 2018). Como preparações brutas ou purificadas, as proteases têm diversas aplicações em uma ampla variedade de indústrias, incluindo couro, fabricação de seda, indústria de alimentos, detergentes e como suplementos de rações (Freitas-Junior et al., 2012; Nasri et al., 2015; Singh e Bajaj, 2017; Saleh et al., 2020).

A demanda por proteases para utilização na nutrição animal é uma alternativa para diminuir os custos de produção, uma vez que melhora a eficiência da utilização dos nutrientes dos alimentos tradicionais e viabiliza o uso de matérias-primas alternativas (Giannenas et al., 2017). A diminuição nos custos provocada pelo uso das enzimas é muito vantajosa, já que elas podem representar aproximadamente 70% nos sistemas de produção (Ferreira, 2019).

A inclusão de proteases na dieta reduz os níveis de inibidores de tripsina e lectinas, melhorando a digestibilidade da proteína e desempenho de frangos de corte (Angel et al., 2011; Freitas et al., 2011). Como reduz o nível de proteína da ração, reduz também os níveis de nutrientes excretados como o nitrogênio e, portanto, contribui para reduzir os impactos ambientais (Sucu et al., 2014; Geraldo et al., 2015; Mahmood et al., 2017).

Proteases são produzidas por animais e vegetais, porém as de origem microbiana são as mais utilizadas industrialmente, sendo o gênero *Bacillus* provavelmente a fonte bacteriana mais importante de proteases (Contesini et al., 2018).

*Bacillus* SMIA-2 é uma bactéria gram-positiva, aeróbica, termofílica, formadora de esporos, capaz de produzir enzimas termoestáveis, como proteases (Silva et al., 2007), amilases (Carvalho et al., 2008a; Carvalho et al., 2008b), pectinases (Andrade et al., 2011) e celulases (Oliveira et al., 2014; Ladeira et al., 2015; Costa et al., 2017; Cruz et al., 2019). A bactéria foi isolada de amostras de

solo coletadas na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Recentemente, Bernardo et al. (2020) sequenciaram o genoma do SMIA-2 e revelaram que essa cepa é 100% semelhante ao *Bacillus licheniformis* Gibson 46 (ATCC 14580T). De acordo com esses autores, as atividades enzimáticas do SMIA-2 foram suportadas por inventários de genes, incluindo seis genes de amilase; 13 loci para o metabolismo da xilose, 55 loci associados à degradação de proteína e três loci associados à degradação de celulose sob um complexo denominado celulosoma.

Considerando que a cepa *Bacillus* sp. SMIA-2 é um potente produtor de proteases extracelulares de grande interesse comercial, este trabalho teve como objetivo estudar a viabilidade de aplicação de proteases produzidas pelo SMIA-2 como aditivos de rações para frangos de corte.

## MATERIAL E MÉTODOS

- Obtenção das proteases

A cepa bacteriana termofílica *Bacillus* SMIA-2, previamente isolada de amostras de solo coletadas na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Souza e Martins, 2001) foi utilizada no presente estudo.

A produção de protease foi realizada em meio contendo (g/L de água destilada): KCl-0.3, MgSO<sub>4</sub>-0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.87, CaCl<sub>2</sub>-0.29, ZnO-2.03x10<sup>-3</sup>, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.7x10<sup>-2</sup>, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O-1.0x10<sup>-2</sup>, CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O-8.5x10<sup>-4</sup>, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.4x10<sup>-3</sup>, NiCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O-2.5x10<sup>-4</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-3.0x10<sup>-4</sup>, água de maceração de milho comercial (Sigma Aldrich) -3,0, proteína de soro de leite-1,0 e amido solúvel-2,5 (Corrêa et al., 2011).

O pH foi ajustado para 7,2, com NaOH 1,0 M, e o meio foi esterilizado por autoclavagem a vapor a 121 °C, 1 atm, por 15 min. O meio (50 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 1 mL de uma cultura padrão durante a noite (número inicial de células 10<sup>4</sup>) e incubado a 50 °C, em um agitador orbital (Thermo Forma, Ohio, EUA) operado a 150 rpm, por 36 h. Em seguida, o sobrenadante da enzima livre de células foi obtido por centrifugação (Hermle Z 382K), a 15.500 g, por 15 min, a 4°C foi seco por atomização, usando um modelo

SD-04 LAB-PLANT, (temperatura do ar de entrada =  $110 \pm 2$  °C, temperatura do ar de saída não foi controlada e taxa de fluxo = 5,4 mL/min). O Aerosil® (0,94%, m/v) e a maltodextrina (0,47%, m/v) foram incorporados à solução enzimática bruta antes da secagem por pulverização (Bolzan et al., 2021). As partículas secas ricas em proteases foram armazenadas a 5° C, até o seu uso.

Para efeito de comparação, uma protease comercial produzida por *Bacillus licheniformis* PWD-1 também foi usada nesse trabalho.

- Ensaio enzimático

A atividade proteásica das amostras secas ( $0,01\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi determinada (em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) a 15% (Johnvesly e Naik, 2001). O substrato utilizado para essa determinação foi uma solução de azocaseína 0,2% (p/v) preparada em tampão TRIS/HCl (pH 8,0). Nesta análise, 0,5mL do extrato enzimático foi colocado em 1,0 mL de substrato e incubado em banho-maria a 70°C/10 min. A reação foi paralisada pela adição de 0,5mL de TCA, centrifugada (Hermele Z 382K) a 15000g/5min a 4°C e o sobrenadante colocado em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de uma solução de NaOH 1N. Paralelamente, foi feito um tubo branco que continha todos os reagentes do ensaio, exceto que o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. 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.

- Estabilidade da protease seca em diferentes valores de pH e na presença de pepsina.

A estabilidade da protease a diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se o extrato enzimático sem o substrato em tampão glicina-HCl (2,2; 3,0; 4,0) e tampão acetato de sódio (pH 6,0 e 7,0) por 1 hora à temperatura de 40 °C. Os valores de pH da mistura de reação foram ajustados com NaOH ou HCl 1N.

A estabilidade da protease em condições de acidez gástrica foi avaliada incubando-se o extrato enzimático sem o substrato em tampão glicina-HCl (2,2; 3,0; 4,0) e tampão acetato de sódio (pH 6,0 e 7,0) na presença de pepsina ( $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por 1 hora à temperatura de 40 °C. Após este tratamento, as atividades

residuais das proteases foram determinadas conforme descrito anteriormente no "Ensaio enzimático".

- Efeito de íons metálicos na atividade da protease

Para estudar o efeito de diferentes íons metálicos na atividade da protease do SMIA-2, a enzima seca (0,01mg/mL) foi incubada a 40 °C por 30 minutos, com o íon correspondente, nas concentrações de 1 mM. A atividade enzimática residual (%) foi determinada nas condições padrões anteriormente descritas no Ensaio enzimático. Um controle (ausência de metais) foi realizado e considerado como sendo 100% de atividade. Os compostos estudados foram: CaCl<sub>2</sub>, CoSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> e C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>.

- Desempenho de frangos de corte alimentados com rações adicionadas de proteases do *Bacillus* sp. SMIA-2

- Local, modelo animal, instalações e manejo

Todos os procedimentos com animais para pesquisa foram aprovados pelo comitê de ética para experimentação e uso de animais em pesquisa do Instituto Federal do Espírito Santo, registrado sob o nº 23149.001939-2020-33.

O ensaio de desempenho foi realizado no setor de Avicultura do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Alegre. Foram utilizados 480 pintos de corte machos da linhagem Cobb-500 de um dia com peso médio de 42 ± 1,5 g, alojados em galpão de alvenaria coberto de telha fibrocimento, piso de concreto, paredes laterais com 0,30 m de altura, completados com tela de arame hexagonal até o telhado, providos de comedouro tubular e bebedouro pendular automático situado no interior do galpão avícola, com exaustão de ar por meio de ventiladores e cortinas externas de rafia suspensa. O aquecimento foi realizado na primeira semana de vida através de lâmpadas infravermelho de 250 watts, de modo a manter a temperatura ambiente entre 28 a 30 °C.

Os pintos foram vacinados contra a doença de Marek, Gumboro e Bouda aviária no incubatório. O programa de luz adotado foi o de 24 horas de luz durante todo o período experimental. As aves receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período de alojamento, sendo o período de adaptação inicial que

antecedeu o experimento composto por ração basal para todos os frangos de 1 a 7 dias conforme recomendações de Rostagno et al. (2017).

Após o período de adaptação, os animais foram transferidos para o galpão experimental de alvenaria coberto de telha fibrocimento, piso de concreto, paredes laterais com 0,30 m de altura, completados com tela de arame hexagonal até o telhado, providos de 4 linhas com 15 boxes de 1 m<sup>2</sup> cada, feitos em barra de metal tubular e tela hexagonal com 1,20 x 0,84 x 0,60 m (comprimento x largura x altura) totalizando 60 boxes no galpão, providos de comedouro tubular e bebedouro pendular automático em cada box. Todos os animais foram pesados no 8º dia e selecionados 400 animais com peso médio de 174,2 ± 15,00 g para formação dos grupos de tratamentos. Durante todo experimento foram registradas diariamente em intervalos de uma hora a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar em aparelho digital USB DataLogger® colocado na altura das aves conforme Tabela 1:

Tabela 1. Temperatura máxima e mínima, umidade relativa do ar máxima e mínima, durante o período de 1 a 21 dias de idade dos animais

	Mínima	Máxima	Média
Temperatura (°C)	20,7	36,7	27,7
Umidade (%)	55,3	88,0	70,8

A dieta experimental (Tabela 2) foi composta de ração basal a base de milho e farelo de soja para atender a exigência nutricional de frangos de corte machos com desempenho regular no período de 8 a 21 dias de vida de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2017), além do fornecimento de água, ambos *ad libitum*. Os aditivos: antibiótico, enzimas e probiótico foram adicionados na ração de forma “on top”.



Tabela 2. Composição nutricional da ração basal para frangos de corte

INGREDIENTES	1 a 7 dias	8 a 21 dias
Milho	55,790	61,820
Farelo de soja	37,650	32,430
Óleo de soja	1,800	1,500
Fosfato Bicálcico	1,920	1,500
Calcário	0,920	1,050
Sal	0,520	0,490
DL-metionina	0,360	0,290
L-lisina	0,300	0,250
L-treonina	0,120	0,080
Cloreto de colina	0,080	0,080
Mistura vitamínica <sup>1</sup>	0,150	0,120
Mistura mineral <sup>2</sup>	0,050	0,050
Adsorvente de micotoxinas <sup>3</sup>	0,300	0,300
Antioxidante <sup>4</sup>	0,010	0,010
Coccidiostático <sup>5</sup>	0,030	0,030
<b>TOTAL</b>	<b>100,000</b>	<b>100,000</b>
<b>COMPOSIÇÃO CALCULADA</b>		
Energia Metabolizável (Kcal/Kg)	2926,2	2980,0
Proteína Bruta (%)	22,00	20,00
Cálcio (%)	0,92	0,86
Fósforo disponível (%)	0,47	0,38
Sódio (%)	0,22	0,21
Metionina+ cistina digestível (%)	0,94	0,83
Metionina (%)	0,64	0,55
Lisina digestível (%)	1,30	1,14
Treonina digestível (%)	0,85	0,74
Triptofano digestível (%)	0,24	0,22

<sup>1</sup> Premix Mineral Rologomix (DSM®): Cobre: 20 g/kg, Ferro: 100 g/kg, Iodo: 2000 mg/kg, Manganês: 130 g/kg, Zinco: 130 g/kg. <sup>2</sup> Premix Vitamínico Rovimix(DSM®): Vitamina A 9.000.000 U.I., Vitamina D3 2.500.000 U.I., Vitamina E 20.000 U.I., Vitamina K3 2.500 mg, Vitamina B1 2.000 mg, Vitamina B2 6.000 mg, Vitamina B3 35 g, Vitamina B5 12 g, Vitamina B6 3.000,38 mg, Vitamina B7 100 mg, Vitamina B12 15.000 mcg, Vitamina B9 1.500 mg, Selênio 250 mg. <sup>3</sup>Mycosorb®. <sup>4</sup> BHT – ButilHidroxi Tolueno. <sup>5</sup> Coxistac®.

Os tratamentos experimentais aplicados ao ensaio foram:

- 1) Controle: Ração basal + 0,06% de extrato seco de proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2;
- 2) Antibiótico: Ração basal + 0,02% de antibiótico comercial usado na avicultura;

3) Protease Comercial: Ração basal + 0,05% de protease comercial de *Bacillus licheniformis* PWD-1;

4) Probiótico Comercial: Ração basal + 0,02% de probiótico comercial composto por enzimas, vitaminas, aminoácidos, mananoligossacarídeos (MOS), *Lactobacillus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*;

5) Protease e Probiótico Comerciais: Ração basal + 0,05% de protease comercial de *Bacillus licheniformis* PWD-1 + 0,02% de probiótico comercial composto por enzimas, vitaminas, aminoácidos, mananoligossacarídeos (MOS), *Lactobacillus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*.

A concentração utilizada para os produtos comerciais foi adotada conforme recomendações do fabricante. A concentração adotada para o tratamento Controle (1) foi determinada como a quantidade proporcional das proteases experimentais do *Bacillus* sp. SMIA-2 capaz de fornecer de forma equivalente a mesma atividade enzimática do tratamento da Protease Comercial (3).

- Delineamento experimental

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e oito repetições, totalizando 40 unidades experimentais com 10 aves cada, perfazendo 400 animais avaliados.

- Características avaliadas

As características avaliadas foram desempenho do peso final (PF), consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA).

Os animais foram pesados no 8º e 21º dias de vida no período experimental para determinação do peso final (PF) das aves. O ganho de peso (GP) foi calculado pela diferença entre o Peso Inicial e Peso Final dos animais. Da mesma forma, o Consumo de Ração (CR) foi obtido pela diferença entre a ração fornecida e as sobras das rações nos comedouros. Posteriormente, foi calculada a conversão alimentar (CA), pela razão entre o consumo de ração e o ganho de peso das aves.

Durante o período experimental de 14 dias, não houve mortalidade animal em nenhuma parcela dos tratamentos experimentais.

- Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo software estatístico R, em caso de significância estatística, as médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) em nível de 5% de significância para o desempenho animal. Para avaliação de atividade enzimática residual em diferentes pHs foi aplicado o teste Tukey em nível de 1% de significância. Para avaliação de atividade enzimática residual na presença de íons metálicos foi aplicado o teste F em nível de 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Estabilidade da protease seca produzida pelo SMIA-2

A protease utilizada neste estudo foi produzida por culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2 utilizando o meio de cultura e condições previamente estabelecidas por Corrêa et al. (2011) e Ladeira et al. (2010). Antes da secagem por atomização utilizando Aerosil® (dióxido de silício coloidal) e maltodextrina como adjuvantes (Bolzan et al., 2021), as enzimas não foram submetidas a nenhum processo de purificação. Durante esse processo, ligantes e/ou proteínas com efeito protetor sobre a enzima bruta podem ser removidos e, conseqüentemente, as propriedades da enzima podem ser modificadas de tal forma que seu comportamento cinético e termodinâmico também pode ser diferente (Braga et al., 2013). Antes da secagem, o extrato bruto apresentou atividade de protease de 12,61 UmL<sup>-1</sup>. Após a secagem na presença de Aerosil® (0,94%, m/v) e maltodextrina (0,47%, m/v) o extrato seco apresentou atividade de protease de 10,35 UmL<sup>-1</sup>, correspondendo a uma perda de 17,92 % de sua atividade original. Deve-se notar que as enzimas estabilizadas geralmente mostram atividade mais baixa do que a enzima "natural". As enzimas são muito mais estáveis no estado seco do que em solução (Nunes e Philipps-Wiemann, 2018).

Considerando a grande demanda de proteases como aditivo zootécnico para melhorar a digestibilidade e a utilização em rações, a viabilidade das proteases produzidas pelo SMIA-2, para incorporação em formulações de rações foi estudada. Ressalta-se que todo o genoma do SMIA-2 foi recentemente sequenciado e nenhum gene de virulência foi detectado (Bernardo et al., 2020). Segundo Bernardo et al. (2020), análises filogenéticas mostraram que o SMIA-2 pertence à espécie *licheniformis*. Portanto, a fim de comparação, uma protease comercial, produzida por *Bacillus licheniformis* PWD-1, também foi estudada nas mesmas condições.

Após os ensaios enzimáticos, foi observado que a atividade da protease comercial (PWD -1) foi superior em 20% da atividade da protease do SMIA-2. Sendo a recomendação de utilização de 0,05% pelo fabricante da protease comercial, a utilização proporcional em atividade enzimática da protease experimental do SMIA-2 foi de 0,06%.

Embora os benefícios das enzimas alimentares exógenas na melhoria da digestão de nutrientes e no desempenho das aves sejam conhecidos, é necessário que as mesmas preencham alguns requisitos tais como atuação sob condições simuladas de temperatura, acidez gástrica e presença de íons metálicos (Ravindran, 2013; Dias et al., 2002).

Inicialmente, a estabilidade das enzimas em diferentes valores de pH à temperatura de 40 °C foi determinada. Como mostrado na Figura 1, a protease do *Bacillus* sp. SMIA-2 aumentou sua estabilidade na medida em que o valor do pH também aumentou. A valores de pH de 2,2 a enzima foi completamente inativada após 30 min de incubação a 40°C. Em pH 3,0 a enzima até apresentou bons níveis de atividade (>65%), mas ao ser incubada por 30 minutos a 40°C, também foi inativada. Entretanto, em valores de pH de 4,0 - 7,0 a protease do SMIA-2 apresentou boa estabilidade quando incubada por 1 hora a 40°C. A protease do PWD-1 foi estável quando incubada em todos os valores de pH e intervalos de tempo estudados.

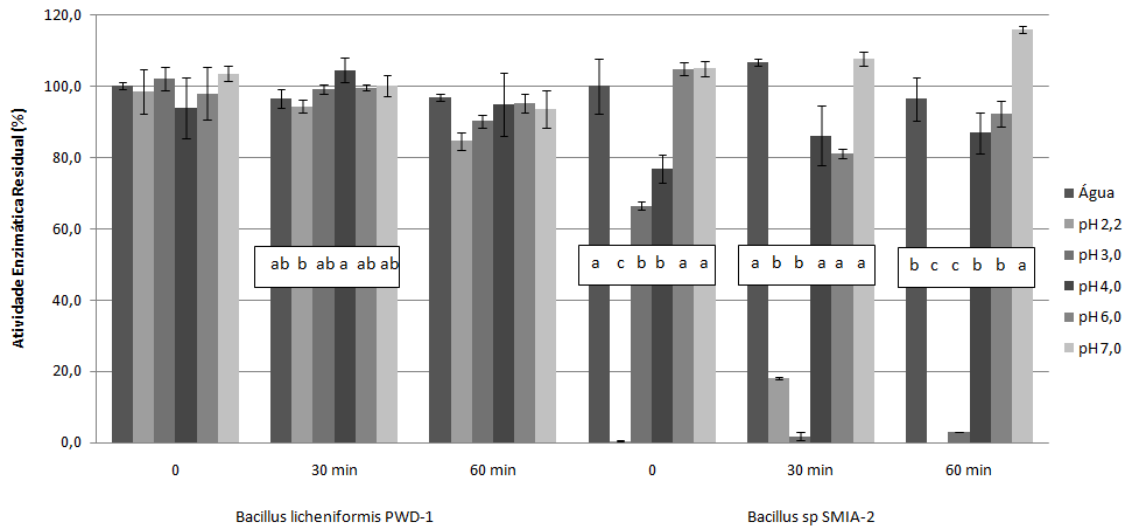


Figura 1. Estabilidade enzimática (%) da protease comercial de *Bacillus licheniformis* PWD-1 e das proteases de *Bacillus sp.* SMIA-2 em diferentes valores de pH à temperatura de 40 ° C. Médias avaliadas para o tempo 0, 30 e 60 para diferentes pHs e para cada enzima seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. A Atividade enzimática no tempo 0 da enzima dissolvida em água foi considerada 100%.

Durante o trânsito da ração no trato digestivo das aves ocorre uma variação do pH. A ração apresenta um valor de pH tipicamente próximo do neutro. O papo do frango é levemente ácido, o pró-ventrículo e a moela são ácidos, e o intestino é levemente ácido na extremidade proximal, tornando-se levemente alcalino a neutro em direção à parte distal (Bell, 2002; Ravindran, 2013). Portanto, uma protease ácida será mais ativa no estômago, enquanto uma protease alcalina funcionará melhor no intestino delgado. O uso de complexos enzimáticos que contêm mais de um tipo de enzima ou combinações da mesma classe de enzimas, porém com diferentes propriedades catalíticas, de maneira que um tipo poderia atuar em pH ácido (estômago) e outra com ação em pH neutro-alcalino (duodeno, jejuno), seria mais adequado para garantir a eficiência das enzimas em uma faixa mais ampla de pH (Mahmood et al., 2017). No caso do *Bacillus sp.* SMIA-2, a protease poderia atuar a valores de pH igual ou acima de 4,0.

O estômago e o intestino delgado da ave produzem pepsina e proteases pancreáticas, respectivamente, exceto quando muito jovens, onde os níveis endógenos podem ser limitantes (Barleta, 2011). Dessa forma, as proteases

exógenas e endógenas devem trabalhar sinergicamente. De acordo com os resultados apresentados na Figura 2, as proteases do SMIA-2 foram resistentes à degradação pela pepsina em valores de pH igual ou superiores a 4,0. A pH 4,0 a protease manteve mais de 80% de sua atividade e em valores maiores de pH a enzima foi estável na presença da pepsina. Portanto, a presença da pepsina não intensificou o efeito negativo na atividade da protease provocado pelo abaixamento do pH.

Segundo Selle e Ravindran (2007), é provável que as enzimas exógenas sejam ativas e degradem seus substratos na parte anterior do estômago, antes de serem submetidas à hidrólise por enzimas proteolíticas endógenas. No entanto, se a enzima exógena for resistente à ação proteolítica da pepsina, ela pode permanecer ativa no intestino delgado e ser mais eficaz. Vale destacar que a taxa de passagem do alimento pelo proventrículo é rápida, onde ocorre pouca digestão do alimento e as partículas finas apresentam trânsito rápido pela moela de acordo com Bell et al. (2002), sendo uma observação importante e possível de ocorrer na dinâmica de utilização das enzimas exógenas.

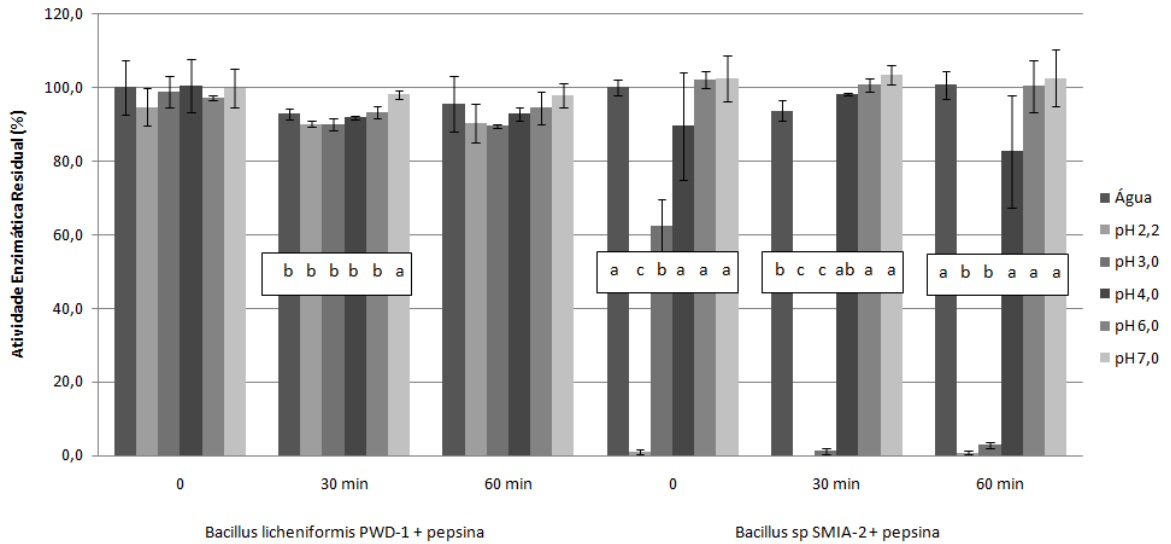


Figura 2. Estabilidade enzimática residual (%) da protease comercial de *Bacillus licheniformis* PWD-1 e das proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em presença de pepsina (2 mg/mL) em diferentes valores de pH à temperatura de 40 ° C. Médias avaliadas para o tempo 0, 30 e 60 para diferentes pHs e para cada enzima seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. A Atividade enzimática no tempo 0 da enzima dissolvida em água + pepsina foi considerada 100%.

A maioria das enzimas comerciais usadas na dieta animal é de origem fúngica e podem ser facilmente desnaturadas em temperaturas acima de 60 ° C. Por outro lado, enzimas produzidas por bactérias, como as de *Bacillus*, apresentam alta estabilidade em uma faixa ampla de pH e temperatura (Danilova e Sharipova, 2020). Idealmente, as enzimas não deveriam necessitar de formulação excessiva, o que é uma etapa suplementar na produção e tem um custo relativamente alto. No entanto, quase todos os produtos enzimáticos disponíveis atualmente possuem fraqueza em um ou mais pontos, como condições adversas de preparação de ração composta - pressão, umidade e temperatura, baixa resistência à desnaturação ácida e à hidrólise proteolítica no estômago (Ravindran, 2013). Os detalhes precisos dos métodos usados para estabilizar as preparações enzimáticas são mantidos em segredo ou protegidos por fortes patentes (Nunes, 2018).

As enzimas devem manter sua atividade biológica ao longo do tempo e de acordo com Silva et al. (2007), a temperatura ótima para atividade do *Bacillus* sp. SMIA-2 foi de 70 ° C e a enzima reteve 80% da atividade original após 2 horas de tratamento térmico a 60 ° C. Ressalta-se que a solução enzimática seca contendo a protease utilizada neste trabalho resistiu ao processo de secagem a temperaturas de 110°C e armazenamento à temperatura ambiente variando de 24 a 32 °C por 180 dias (Bolzan et al., 2021).

Em relação à estabilidade das enzimas na presença de íons metálicos, foi observado que apenas o cobre e o cobalto apresentaram efeito inibitório na atividade de ambas as enzimas, sendo esse efeito mais pronunciado para a protease do SMIA-2 (Figura 3). Dias et al. (2002) ao avaliar *in vitro* a estabilidade de um complexo enzimático comercial a base protease e carboidrase verificaram efeito inibitório apenas para o cobre, não sendo observado efeito significativo para cálcio, magnésio, manganês e cobalto quando incubados a 25° por 30 minutos.

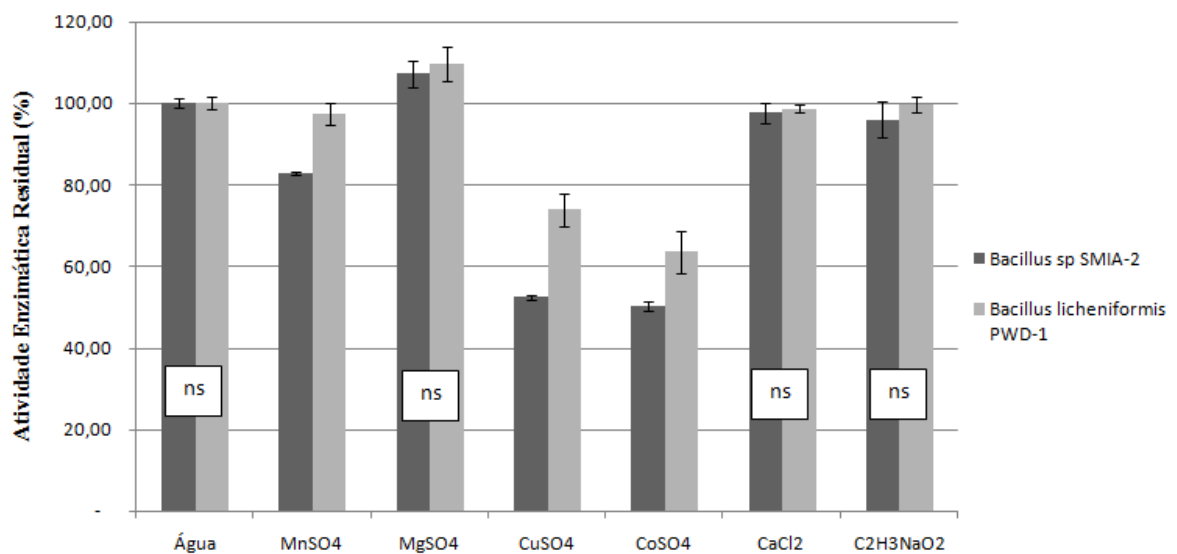


Figura 3. Atividade enzimática residual (%) das proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 e da protease comercial de *Bacillus licheniformis* PWD-1 após teste de estabilidade na presença de diferentes íons metálicos após 30 minutos de incubação a 40 ° C. Médias com “ns” não podem ser consideradas diferentes pelo teste F em nível de 5% de significância. A Atividade enzimática da enzima dissolvida em água foi considerada 100%



- Efeito de dietas contendo proteases no desempenho animal

Ao analisar os dados para as características de desempenho animal no período de 8 a 21 dias (Tabela 3), foram observados que os tratamentos influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o peso final (PF), consumo de ração (CR) e ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) no período. O tratamento experimental que recebeu ração com protease do SMIA-2 não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) com os tratamentos convencionais, que utilizaram antibiótico comercial, protease comercial e probiótico comercial, com exceção do tratamento que associou protease e probiótico comerciais. Para a característica de conversão alimentar (CA) estudada não ocorreu efeito significativo ( $p > 0,05$ ) entre todos os tratamentos no período experimental.

Tabela 3. Peso final (PF), consumo de ração (CR), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) de frangos de corte alimentados com ração contendo proteases, probiótico e antibiótico de 8 a 21 dias

TRATAMENTOS	CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO				
	PI (g/ave)	PF (g/ave)	CR (g/ave)	GP (g)	CA (g/g)
<sup>1</sup> Proteases SMIA-2	174,06	1005,37 a	1075,69 ab	831,00 a	1,295
<sup>2</sup> Antibiótico comercial	174,31	1024,12 a	1097,06 a	849,81 a	1,291
<sup>3</sup> Protease comercial PWD-1	174,25	1000,31 a	1071,44 ab	826,06 a	1,297
<sup>4</sup> Probiótico comercial	174,25	1021,00 a	1099,62 a	846,75 a	1,299
<sup>5</sup> Protease + probiótico comerciais	174,31	979,12 b	1059,37 b	804,81 b	1,316

Médias seguidas por letras distintas (colunas) diferem entre si estatisticamente pelo teste SNK em nível de 5% de significância.

<sup>1</sup>Proteases experimentais de *Bacillus* sp. SMIA-2 (0,06%),

<sup>2</sup>Antibiótico comercial utilizado na avicultura (0,02%),

<sup>3</sup>Protease comercial de *Bacillus licheniformis* PWD-1 (0,05%),

<sup>4</sup>Probiótico comercial composto por enzimas, vitaminas, aminoácidos, mananoligossacarídeos (MOS), *Lactobacillus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*(0,02%),

<sup>5</sup>Associação entre protease comercial e probiótico comercial (0,05% + 0,02%)

A suplementação com associação de enzima e probiótico comerciais (T5) proporcionou efeito significativo aos demais tratamentos no PF, CR e GP, prejudicando sua conversão alimentar (CA) no período de 8 a 21 dias de idade mesmo não diferindo estatisticamente aos demais. De acordo com Mingmongkolchai e Panbangred (2018), a eficácia do aditivo é dependente da dose ingerida e das cepas bacterianas, havendo importância em determinar a dosagem mínima eficaz das cepas probióticas.

A associação inadequada de diferentes aditivos e cepas de microrganismos pode comprometer o desempenho animal. Os dados apresentados no atual estudo destacam o menor desempenho no tratamento que associa protease e probiótico comerciais, estando de acordo com o estudo de Praes (2013), que utilizou associação de xilanase, fitase e protease com probiótico composto por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. A capacidade em aumentar a disponibilidade de nutrientes nas dietas que utilizam enzimas e probióticos, não foi observada no presente trabalho, sendo notado como o tratamento de menor desempenho dos animais. Provavelmente quando se associou enzimas e probióticos pode ter produzido um efeito antagônico, reduzindo a disponibilidade dos nutrientes e ação desses aditivos. No entanto, ainda não há consenso se a associação entre proteases e probióticos promove ou não melhora no desempenho conforme estudo de meta-análise apresentada por Lee et al. (2018), embora outros autores tenham observado melhorias na associação entre protease e probióticos (Payling et al., 2017; Wealleans et al., 2017).

O tratamento utilizando antibiótico comercial (T2) apresentou uma leve superioridade para peso final (PF) e ganho de peso (GP) mesmo sem diferir significativas ( $p > 0,05$ ) com os tratamentos T1, T3 e T4, e está de acordo com o observado por Toledo et al. (2007), onde relatam que a retirada total dos antibióticos promotores de crescimento resultou na diminuição média de desempenho das aves de 3% a 7%, com impacto negativo sobre a saúde animal e a mortalidade.

Os resultados de desempenho do presente trabalho estão de acordo com estudo apresentado por Vargas Júnior et al. (2000), que não observaram diferenças significativas entre aves submetidas a dietas sem antibióticos, com antibióticos, prebióticos e probióticos comerciais no período de 1 a 21 dias de

idade, e atribuíram esse resultado ao baixo desafio sanitário. Atualmente os antibióticos são amplamente utilizados como melhoradores de desempenho, profilático e terapêutico, sendo imprescindíveis para a produção animal (Pandolfi e Mota, 2020). Porém, a sua substituição presente e futura por aditivos considerados mais seguros como enzimas e probióticos fica evidenciada em diversos trabalhos (Ahmad, 2006; Toghyani et al., 2011; Mingmongkolchai e Panbangred, 2018; He et al., 2019).

Em relação ao tratamento com uso exclusivo de probiótico comercial (T4), por conter em sua composição diversos nutrientes como enzimas, aminoácidos e diferentes cepas de microrganismos benéficos ao hospedeiro, os resultados apresentados estão de acordo com diversos estudos que demonstram que seu uso melhora a capacidade de degradação dos nutrientes, a condição imunológica e a saúde intestinal dos animais e que refletem positivamente no desempenho produtivo (Kabir et al., 2004; Awad et al., 2009; Kabir, 2009; He et al., 2019).

Quando avaliado o tratamento controle (T1) das proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 e o tratamento com protease comercial (T3), ambos se comportaram de forma similar, concordando com estudos que destacam os benefícios da utilização de proteases exógenas sobre a melhora do desempenho animal (Shih et al., 1992; Rodrigues et al., 2003; Khattak, et al., 2006; Angel et al., 2011 Oxenboll et al., 2011; Dalólio et al., 2016; Yu et al., 2020).

Mesmo sendo denominada no presente trabalho como protease, a protease comercial (T3) e as proteases de *Bacillus* SMIA-2 (T1) possuem em sua composição, em menor concentração, enzimas como avicelase, carboximetilcelulase, Fpase, Xilanase, Amilase e Poligalacturonase identificadas em análises de atividade enzimática específicas. Dessa forma, o comportamento das proteases não purificadas se assemelha em parte ao comportamento do tratamento com probiótico comercial (T4), que possui além de diversos aditivos em sua composição uma mistura de diferentes enzimas. Não obstante, com relação à cepa de microrganismo, o probiótico é composto por múltiplas cepas enquanto as proteases estudadas são de cepa única, ou monocomponente.

Conforme observado por Adhikari e Kim (2017), os produtos com maior número de cepas podem ter maior influência do que produtos monocomponentes, uma vez que agem em diferentes sítios e têm mecanismos de ação distintos, resultando em efeitos sinérgicos. As proteases exógenas de fontes microbianas

estão sendo cada vez mais utilizadas nas dietas de aves e suínos para aumentar a hidrólise da proteína alimentar. A ciência que sustenta o modo preciso de ação e eficácia em diferentes configurações de produção e dieta ainda está em desenvolvimento e como resultado, seu uso ainda não é tão difundido como outras enzimas a exemplo da fitase e xilanase (Yu et al., 2020).

## CONCLUSÕES

As proteases atomizadas de *Bacillus* sp. SMIA-2 podem substituir os aditivos utilizados no experimento. Elas se mostraram promissoras em seu primeiro trabalho com alimentação animal. Novos ensaios de secagem com novas formulações devem buscar melhorias na estabilidade da atividade enzimática em faixas de pH mais ácidos.

É recomendável realizar novos estudos com as proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em ambientes com maior desafio sanitário e durante todo ciclo de vida do frango de corte, bem como conduzir ensaios de digestibilidade *in vivo* para aprofundar e validar sua utilização na alimentação animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, P. A.; Kim, W. K. (2017). Overview of prebiotics and probiotics: focus on performance, gut health and immunity—a review. *Annals of animal science*, 17(4):949-966.
- Ahmad, I. (2006). Effect of probiotics on broilers performance. *International Journal of Poultry Science*, 5(6):593-597.
- Andrade, M. V. V. D.; 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. *Food Science and Technology*, 31(1):204-208.
- Angel, C. R.; Saylor, W.; Vieira, S. L.; Ward, N. (2011). Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7-to 22-day-old broiler chickens. *Poultry science*, 90(10):2281-2286.

- Awad, W. A.; Ghareeb, K.; Abdel-Raheem, S.; Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry science*, 88(1):49-56.
- Barzkar, N.; Homaei, A.; Hemmati, R.; Patel, S. (2018). Thermostable marine microbial proteases for industrial applications: scopes and risks. *Extremophiles*, 22(3):335-346.
- Bell, D. D.; Weaver, W. D.; North, M. O. (Eds.). (2002). *Commercial chicken meat and egg production*. Springer Science & Business Media.
- Benmrad, M. O.; Moujehed, E.; Elhoul, M. B.; Jaouadi, N. Z.; Mechri, S.; Rekik, H.; Kourdali, S.; Hattab, M. E.; Badis, A.; Sayadi, S.; Bejar, S.; Jaouadi, B. (2016). A novel organic solvent-and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101. *International journal of biological macromolecules*, 91:961-972.
- Bernardo, S. P. C.; Rosana, A. R. R.; Souza, A. N.; Chiorean, S.; Martins, M. L. L.; Vederas, 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*, 9(17):1-3.
- Bolzan, R. P.; Cruz, E.; Barbosa, J. B.; Talma, S. V.; Martins, M. L. L. (2021) Optimization of spray-drying conditions for obtaining *Bacillus* sp. SMIA-2 protease. *Food Science and Technology*.
- Braga, A. R. C.; Manera, A. P.; Ores, J. C.; Sala, L., Maugeri, F.; Kalil, S. J. (2013). Kinetics and thermal properties of crude and purified  $\beta$ -galactosidase with potential for the production of galactooligosaccharides. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1):45-52.
- Carvalho, R. V. D.; Côrrea, T. L. R.; Silva, J. C. M. D.; Mansur, L. R. C. D. O.; Martins, M. L. L. (2008a). Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* SP. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1):102-107.
- Carvalho, R. V. D.; Corrêa, T. L. R.; Silva, J. C. M. D.; Viana, A. P.; Martins, M. L. L. (2008b). Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Food Science and Technology*, 28(2):380-386.
- Contesini, F. J.; Melo, R. R. D.; Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical reviews in biotechnology*, 38(3):321-334.
- Corrêa, T. L. R.; Moutinho, S. K. D. S.; Martins, M. L. L.; Martins, M. A. (2011). Simultaneous  $\alpha$ -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 Science and Technology*, 31(4):843-848.
- Costa, E. A.; Nunes, R.; Cruz, E.; Ladeira, S. A.; 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. *J Microbiol Biotechnol*, 2: e000115.

- Cruz, E.; Moraes, L. P. D.; 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(7):331-337.
- Dalólio, F. S.; Albino, L. F. T.; Rostagno, H. S.; Silva, D. L. D.; Xavier Júnior, M. D. L.; Oliveira, V. D. D. (2016). Metabolizable energy and digestible amino acids of full-fat soybean without or with protease supplementation in diets for broilers. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(5):565-576.
- Danilova, I.; Sharipova, M. (2020). The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. *Frontiers in Microbiology*, 11:1-7.
- Dias, J. C. C. A.; Santiago, G. S.; Ferreira, W. M.; Saliba, E. O. S.; Naranjo, A. P. (2002). Avaliação da estabilidade in vitro de uma protease comercial. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54(6):618-622.
- Ferreira, N.T. *Nutrição de precisão na produção de aves*. Feed & Food. (2019). Disponível em: <<https://feedfood.com.br/2019/12/02/nutricao-de-precisao-na-producao-de-aves/>>. Acesso em: 02 fev. 2021.
- Freitas, D. M.; Vieira, S. L.; Angel, C. R.; Favero, A.; Maiorka, A. (2011). Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel mono-component protease. *Journal of Applied Poultry Research*, 20(3):322-334.
- Geraldo, A.; Machado, L. C.; Brito, J. Á. D.; Bertechini, A. G.; Murakami, E. S. F. (2015). Effect of protease supplementation on production performance of laying hens. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37(1):29-33.
- Giannenas, I.; Bonos, E.; Anestis, V.; Filioussis, G.; Papanastasiou, D. K.; Bartzanas, T.; Papaioannou, N.; Tzora, A.; Skoufos, I. (2017). Effects of protease addition and replacement of soybean meal by corn gluten meal on the growth of broilers and on the environmental performances of a broiler production system in greece. *PloS one*, 12(1):1-26.
- He, T.; Long, S.; Mahfuz, S.; Wu, D.; Wang, X.; Wei, X.; Piao, X. (2019). Effects of probiotics as antibiotics substitutes on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, and barrier function of broilers. *Animals*, 9(11):985.
- Johnvesly, B.; Naik, G. R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process biochemistry*, 37(2):139-144.
- Kabir, S. L.; Rahman, M. M.; Rahman, M. B.; Rahman, M. M.; Ahmed, S. U. (2004). The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *International Journal of Poultry Science*, 3(5):361-364.
- Kabir, S. M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8):3531-3546.
- Khattak, F. M.; Pasha, T. N.; Hayat, Z.; Mahmud, A. (2006). Enzymes in poultry nutrition. *J. Anim. Pl. Sci*, 16(1-2):1-7.

- 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. *Química Nova*, 33(2):324-328.
- Ladeira, S. A.; Cruz, E.; Delatorre, A. B.; Barbosa, J. B.; Leal Martins, M. L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp: SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic journal of biotechnology*, 18(2):110-115.
- Lee, S. A.; Bedford, M. R.; Walk, C. L. (2018). Meta-analysis: explicit value of mono-component proteases in monogastric diets. *Poultry science*, 97(6):2078-2085.
- Mahmood, T.; Mirza, M. A.; Nawaz, H.; Shahid, M. (2017). Effect of different exogenous proteases on growth performance, nutrient digestibility, and carcass response in broiler chickens fed poultry by-product meal-based diets. *Livestock Science*, 200:71-75.
- Mingmongkolchai, S.; Panbangred, W. (2018). *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of applied microbiology*, 124(6):1334-1346.
- Nasri, R.; Abed, H.; Karra-Chaabouni, M.; Nasri, M.; Bougatef, A. (2015). Digestive alkaline proteinases from *Serranus scriba* viscera: Characteristics, application in the extraction of carotenoproteins from shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3):355-361.
- Nunes, C. S. (2018). Intellectual property on selection, expression, and production of enzymes. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Academic Press, 31-49.
- Nunes, C. S.; Philipps-Wiemann, P. (2018). Formulation of enzymes. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Academic Press, 429-440.
- 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(2):215-222.
- Oxenboll, K. M.; Pontoppidan, K.; Fru-Nji, F. (2011). Use of a protease in poultry feed offers promising environmental benefits. *International Journal of Poultry Science*, 10(11):842-848.
- Pandolfi, J.; Mota, S. (2020). O futuro da avicultura comercial no cenário de retirada de antimicrobianos como melhoradores de desempenho. *Embrapa Suínos e Aves-Artigo em periódico indexado (ALICE)*. 111(8):14-16
- Payling, L.; Kim, I. H.; Walsh, M. C.; Kiarie, E. (2017). Effects of a multi-strain *Bacillus* spp. direct-fed microbial and a protease enzyme on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbiota, and noxious gas emissions of grower pigs fed corn-soybean-meal-based diets—a meta-analysis. *Journal of animal science*, 95(9):4018-4029.
- Praes, M. F. F. M. (2013). *Probiótico e enzimas em dietas de frangos de corte: desempenho, características da cama e excretas e produção de biogás*. Tese

(Doutorado em Zootecnia) - Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 168p.

- Ravindran, V. (2013). Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(3):628-636.
- Rodrigues, P. B.; Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Gomes, P. C.; Barboza, W. A.; Toledo, R. S. (2003). Desempenho de frangos de corte, digestibilidade de nutrientes e valores energéticos de rações formuladas com vários milhos, suplementadas com enzimas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32(1):171-182.
- Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Hannas, M. I.; Donzele, J. L.; Sakomura, N. K.; Perazzo, F. G.; Brito, C. O. (2017). *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais*. Departamento de Zootecnia-UFV, Viçosa, MG, 488p.
- Saleh, A. A.; Dawood, M. M.; Badawi, N. A.; Ebeid, T. A.; Amber, K. A.; Azzam, M. M. (2020). Effect of supplemental serine-protease from *Bacillus licheniformis* on growth performance and physiological change of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1):86-92.
- Selle, P. H.; Ravindran, V. (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal feed science and technology*, 135(1-2):1-41.
- Shih, J. C.; Williams, C. M. (1992). Purified *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase. *U.S. Patent No. 5,171,682*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Silva, C. R. D.; 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 the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2):253-258.
- Singh, S.; Bajaj, B. K. (2017). Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energy, Ecology and Environment*, 2(6):370-386.
- Sucu, E.; Nayeri, A.; Sanz-Fernandez, M. V.; Upah, N. C.; Baumgard, L. H. (2014). The effects of supplemental protease enzymes on production variables in lactating Holstein cows. *Italian Journal of Animal Science*, 13(2), 3186.
- Toghyani, M.; Toghyani, M.; Tabeidian, S. A. (2011). Effect of probiotic and prebiotic as antibiotic growth promoter substitutions on productive and carcass traits of broiler chicks. In *International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, 9:82-86.
- Toledo, G. S. P. D.; Costa, P. T. C.; Silva, L. P. D.; Pinto, D.; Ferreira, P.; Poletto, C. J. (2007). Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápico como promotores, adicionados isoladamente ou associados. *Ciência Rural*, 37(6):1760-1764.
- Vargas Júnior, J. G.; Toledo, R.; Albino, L. (2000). Uso de prebióticos em rações de frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola, supl*, 2:31.
- Wealleans, A. L.; Walsh, M. C.; Romero, L. F.; Ravindran, V. (2017). Comparative effects of two multi-enzyme combinations and a *Bacillus* probiotic on growth performance, digestibility of energy and nutrients, disappearance of non-starch



polysaccharides, and gut microflora in broiler chickens. *Poultry science*, 96(12):4287-4297.

Yu, S.; BechThoegersen, J.; Kragh, K. M. (2020). Comparative study of protease hydrolysis reaction demonstrating Normalized Peptide Bond Cleavage Frequency and Protease Substrate Broadness Index. *Plos one*, 15(9).

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

As proteases são enzimas industriais importantes, mas têm aplicação limitada devido ao seu curto tempo de vida. Em sua forma líquida são suscetíveis à desnaturação durante o armazenamento e os métodos de secagem podem minimizar a perda de atividade enzimática. Após realização dos experimentos, o pó de protease gerado pela combinação de carboximetilcelulose com maltodextrina apresentou na melhor formulação atividade de protease residual e recuperação de massa em torno de 86% e 17,5%, respectivamente, e ficou estável após 180 dias de armazenamento em temperatura ambiente de 24 a 32 ° C. O pó de protease gerado pela combinação de Aerosil® com maltodextrina apresentou na melhor formulação atividade de protease residual e recuperação de massa em torno de 80% e 31%, respectivamente, e ficou estável após 180 dias de armazenamento em temperatura ambiente de 24 a 32 ° C. Estas são características promissoras quando se considera sua aplicação industrial. As proteases microbianas, especialmente de *Bacillus* spp. têm sido amplamente exploradas para variadas aplicações, como na melhoria da digestibilidade das proteínas da dieta animal. No trabalho voltado para produção animal, foi avaliada a viabilidade de aplicação de um extrato seco rico em proteases produzidas por culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2, na suplementação de dietas de frangos para melhorar o desempenho produtivo. As proteases do SMIA-2 foram resistentes nas simulações de digestão gástrica à degradação pela pepsina em valores de pH igual ou superiores a 4,0. A pH 4,0 a protease manteve mais de 80% de sua atividade e em valores maiores de pH a enzima foi estável na

presença da pepsina. Em relação à estabilidade na presença de íons metálicos foi observado que apenas o cobre e o cobalto apresentaram efeito inibitório na atividade da protease. No desempenho animal, o extrato seco de proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 mostrou-se eficiente, apresentando resultados significativos compatíveis com produtos comerciais que possuem a mesma finalidade. É recomendável realizar novos estudos com as proteases de *Bacillus* sp. SMIA-2 em ambientes com maior desafio sanitário e durante todo ciclo de vida do frango de corte, bem como conduzir ensaios de digestibilidade *in vivo* para aprofundar e validar com maior robustez a utilização das proteases atomizadas de *Bacillus* SMIA-2 na alimentação animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira Proteína Animal (2020). Mercado Mundial. São Paulo
- Anal, A. K.; Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5):240-251.
- Araujo, J. A.; Silva, J. H. V.; Amâncio, A. L. L.; Lima, M. R.; Lima, C. B. (2007). Uso de aditivos na alimentação de aves. *Acta Veterinaria Brasílica*, 1(3):69-77.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). Association of American Feed Control Officials. 2006.
- Augustin, M. A.; Sanguansri, L.; Margetts, C.; Young, B. J. F. A. (2001). Microencapsulating food ingredients. *Food Australia*, 53(6):220-223.
- Barbosa, J. B.; Gentil, N. O.; 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. *Biocatalysis and Biotransformation*, 32:244-250.
- Barbosa, N. A. A.; Sakomura, N. K.; Bonato, M. A.; Hauschild, L.; Oviedo-Rondon, E. (2012). Enzimas exógenas em dietas de frangos de corte: desempenho. *Ciência Rural*, 42(8):1497-1502.
- Barreto, A. R.; Ramírez-Mérida, L. G.; Araújo Etchepare, M.; Jacob-Lopes, E.; Menezes, C. R. (2015). Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos. *Ciência e Natura*, 37(5):164-174.
- Bavaresco, C.; Krabbe, E. L.; Avila, V. S.; Lopes, L. S.; Wernick, B.; Martinez, F. N. (2020). Calcium: phosphorus ratios and supplemental phytases on broiler performance and bone quality. *Journal of Applied Poultry Research*, 29(3):584-599.
- Belghith, H.; Chaabouni, S. E.; Gargouri, A. (2001). Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of maltodextrin. *Enzyme Microb. Technol.*, 28(2-3):253-258.

- Bernardo, S. P. C.; Rosana, A. R. R.; Souza, A. N.; Chiorean, S.; Martins, M. L. L.; Vederas, 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*, 9(17):1-3.
- Bertoldo, C.; Antranikian, G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current opinion in chemical biology*, 6(2):151-160.
- Bhandari, B. R.; Datta, N.; Howes, T. (1997). Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying technology*, 15(2):671-684.
- Birchal, V. S.; Passos, M. L.; Wildhagen, G. R.; Mujumdar, A. S. (2005). Effect of spray-dryer operating variables on the whole milk powder quality. *Drying Technology*, 23(3):611-636.
- Blanchard, P. H.; Katz, F. R. (2006). Starch hydrolysates. *Food polysaccharides and their applications*, 119-145.
- Brod, F. P. R. Avaliação de um secador vibrofluidizado. (2003). Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Campinas – SP, Universidade Estadual de Campinas, 336p.
- Cardinal, K. M.; Moraes, M. L. D.; Andretta, I.; Schirmann, G. D.; Belote, B. L.; Barrios, M. A.; Santin, E.; Ribeiro, A. M. L. (2019). Growth performance and intestinal health of broilers fed a standard or low-protein diet with the addition of a protease. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 48:1-11.
- Carvalho, R. V. D.; Côrrea, T. L. R.; Silva, J. C. M. D.; Mansur, L. R. C. D. O.; Martins, M. L. L. (2008a). Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* SP. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1):102-107.
- Carvalho, R. V. D.; Corrêa, T. L. R.; Silva, J. C. M. D.; Viana, A. P.; Martins, M. L. L. (2008b). Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Food Science and Technology*, 28(2):380-386.
- Champe, P. C.; Harvey, R. A. (1989). Enzimas. *Bioquímica ilustrada*, 2:53-66.
- Chávarri, M.; Marañón, I.; Ares, R.; Ibáñez, F. C.; Marzo, F.; Villarán, M. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 185-189.
- Cheetham, P. S. J.; Wiseman, A. (1985). Handbook of enzyme biotechnology. *Principles of Industrial Enzymology Basis of Utilization of Soluble and Immobilized Enzymes in Industrial Processes*, 2
- Choct, M., & Kocher, A. (2000). Non-starch carbohydrates: Digestion and its secondary effects in monogastrics. In *Proceedings-Nutrition Society of Australia* (Vol. 24, pp. 31-38). Nutrition Society of Australia; 1998.
- Chronakis, I. S. (1998). On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(7), 599-637.

- Cordeiro, C. A. M.; Martins, M. L. L. (2009). Produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 e algumas propriedades da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29:1-7.
- Cordeiro, C. A. M.; Martins, M. L. L.; Luciano, A. B.; Silva, R. F. D. (2002). Production and properties of Xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4):413-418.
- Costa, E. A.; Nunes, R.; Cruz, E.; Ladeira, S. A.; 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. *J Microbiol Biotechnol*, 2.
- Cousins, B. (1999). Enzimas na nutrição de aves. *Simpósio internacional acav-embra sobre nutrição de aves*, 1:115-129.
- Cruz, E.; Moraes, L. P. D.; 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(7):331-337.
- Dekkers, S.; Krystek, P.; Peters, R. J.; Lankveld, D. P.; Bokkers, B. G.; Hoeven-Arentzen, P. H.; Bouwmeester, H.; Oomen, A. G. (2011). Presence and risks of nanosilica in food products. *Nanotoxicology*, 5(3):393-405.
- Dessimoni, G. V.; Dalólio, F. S.; Moreira, J.; Teixeira, L. V.; Bertechini, A. G.; Hermes, R. G. (2019). Protease supplementation under amino acid reduction in diets formulated with different nutritional requirements for broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21(1):1-8.
- Donbrow, M. (1992). *The relation of release profiles from ensembles to those of individual microcapsules and the influence of types of batch heterogeneity on release kinetics*. CRS Press: London.
- Dumorné, K.; Córdova, D. C.; Astorga-Eló, M.; Renganathan, P. (2017). Extremozymes: a potential source for industrial applications. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(4):649-659.
- Dziezak, J. D. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food technology (Chicago)*, 42(4):136-153.
- Egorova, K.; Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current opinion in microbiology*, 8(6):649-655.
- Estevinho, B. N.; Rocha, F.; Santos, L.; Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications—A review. *Trends in food science & technology*, 31(2):138-155.
- Favaro-Trindade, C. S.; Heinemann, R. J. B.; Pedroso, D. D. L. (2011). Developments in probiotic encapsulation. *CAB Rev*, 6:1-8.
- Ferrer, M.; Golyshina, O.; Beloqui, A.; Golyshin, P. N. (2007). Mining enzymes from extreme environments. *Current opinion in microbiology*, 10(3):207-214.
- Fitton, M. G. (1979). Rapid determination of dextrose equivalent by cryoscopy. *Starch-Stärke*, 31(11):381-384.

- Freitas-Junior, A. C. V.; Costa, H. M. S.; Icimoto, M. Y.; Hirata, I. Y.; Marcondes, M.; Carvalho, L. B.; Oliveira, V.; Bezerra, R. (2012). Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. *Food Chem*, 133:596-1602.
- Fruijtner-Pölloth, C. (2012). The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica—A nanostructured material. *Toxicology*, 294(2-3):61-79.
- Fujimoto, J., Reis; E. A. D. O.; Petri, D. F.; Campana Filho, S. P. (2002). Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. *Química Nova*, 25(5):757-761.
- Gacesa, P.; Hubble, J. (1990). *Tecnología de las enzimas*. ACRIBIA.
- Gomes, E.; Guez, M. A. U.; Martin, N.; Silva, R. D. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química nova*, 30(1):136-145.
- Guenter, W. (1997). Practical experience with the use of enzymes. In Marquardt, R. R.; Z. Han, Z, *Enzyme in Poultry and Swine Nutrition*. ed. International Development Research Centre, Ottawa, ON, Canada, p.53-62.
- Guerrand, D. (2018). Economics of food and feed enzymes: status and perspectives. In *Enzymes in human and animal nutrition*, Academic Press, 487-514.
- Gupta, R.; Beg, Q.; Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1):15-32.
- Haki, G. D.; Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1):17-34.
- Hayashi, H. (1989). Drying technologies of foods-their history and future. *Drying technology*, 7(2):315-369.
- Hegenbart, S. (1993). Encapsulated ingredients keep problems covered. *Food Prod. Des.*, 29-50.
- Hossain, M. D.; Bala, B. K.; Hossain, M. A.; Mondol, M. R. A. (2001). Sorption isotherms and heat of sorption of pineapple. *Journal of Food Engineering*, 48(2):103-107.
- Jaenicke, R.; Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Current opinion in structural biology*, 8(6):738-748.
- Kennedy, J. F.; Knill, C. J.; Taylor, D. W. (1995). Maltodextrins. In *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives*. Springer, Boston, MA, p.65-82
- Kennedy, J. F.; Noy, R. J.; Stead, J. A.; White, C. A. (1985). Oligosaccharide component composition and storage properties of commercial low DE maltodextrins and their further modification by enzymatic treatment. *Starch-Stärke*, 37(10):343-351.
- Kenyon, M. M.; Anderson, R. J. (1988). Maltodextrins and low-dextrose-equivalence corn syrup solids: production and technology for the flavor industry.

- Khattak, F. M.; Pasha, T. N.; Hayat, Z.; Mahmud, A. (2006). Enzymes in poultry nutrition. *J. Anim. Pl. Sci*, 16(1-2):1-7.
- Krabbe, E. L.; Lorandi, S. (2014). Atualidades e tendências no uso de enzimas na nutrição de aves. *Anais do Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal*, 6., São Pedro, SP: Embrapa Suínos e Aves - Artigo em anais de congress (ALICE).
- Kumar, C. G.; Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, 17(7), 561-594.
- 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. *Química Nova*, 33(2):324-328.
- Ladeira, S. A.; Cruz, E.; Delatorre, A. B.; Barbosa, J. B.; Leal Martins, M. L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp: SMI-2 and its detergent compatibility. *Electronic journal of biotechnology*, 18(2):110-115.
- 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
- Lannes, S. C. D. S.; Medeiros, M. L. (2003). Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39(1):115-123.
- Lecznieski, J. L. (2006). Considerações práticas do uso de enzimas. *V seminário Internacional de aves e suínos*, 34-46.
- Lefebvre, A. H. (1989). Properties of sprays. *Particle & Particle Systems Characterization*, 6(1-4):176-186.
- Maarel, M. J.; Veen, B. V.; Uitdehaag, J. C.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of biotechnology*, 94(2):137-155.
- Mahmood, T.; Mirza, M. A.; Nawaz, H.; Shahid, M. (2017). Effect of different exogenous proteases on growth performance, nutrient digestibility, and carcass response in broiler chickens fed poultry by-product meal-based diets. *Livestock Science*, 200:71-75.
- Masters, K. (1985). Spray drying handbook. *Spray drying handbook*.
- Maynard, A. D. (2014). Old materials, new challenges?. *Nature nanotechnology*, 9(9):658-659.
- Meneghetti, C. (2013). *Associação de enzimas em rações para frangos de corte*. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Lavras - MG, Universidade Federal de Lavras, p.96.
- Meng, X. C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G. F.; Daly, C.; Ross, R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106(4):1406-1416.



- Monteiro, V. N.; Silva, R. N. (2009). Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista processos químicos*, 3(5):9-23.
- Moura, F. A. S.; Dourado, L. R. B.; Farias, L. A.; Lopes, J. B.; Lima, S. B. P.; Fernandes, M. L. (2019). Complexos enzimáticos sobre a energia metabolizável e digestibilidade dos nutrientes do milho para frangos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(3):990-996.
- Namaldi, A.; Çalik, P.; Uludag, Y. (2006). Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine alkaline protease powders. *Dry Technol.*, 24(11):1495-1500.
- Napierska, D.; Thomassen, L. C.; Lison, D.; Martens, J. A.; Hoet, P. H. (2010). The nanosilica hazard: another variable entity. *Particle and fibre toxicology*, 7(1):1-32.
- Nath, S.; Satpathy, G. R. (1998). A systematic approach for investigation of spray drying processes. *Drying technology*, 16(6):1173-1193.
- Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S.; Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1:1806-1815.
- Nunes, C. S. (2018). Intellectual property on selection, expression, and production of enzymes. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Academic Press, 31-49.
- Nunes, C. S.; Philipps-Wiemann, P. (2018). Formulation of enzymes. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition*, Academic Press, 429-440.
- Officer, D. I. (2000). Feed enzymes. *Farm animal metabolism and nutrition*, 19:405-426.
- Perim, F. S. (2014). *Celulase em rações para frangos de corte de um a 21 dias de idade*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Rio Verde – GO, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, p.61.
- Praes, M. F. F. M. (2013). *Probiótico e enzimas em dietas de frangos de corte: desempenho, características da cama e excretas e produção de biogás*. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 168p.
- Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3):597-635.
- Ravindran, V. (2013). Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(3):628-636.
- Ré, M. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying technology*, 16(6):1195-1236.
- Rigoldi, F.; Donini, S.; Redaelli, A.; Parisini, E.; Gautieri, A. (2018). Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL bioengineering*, 2(1).
- Rokka, S.; Rantamäki, P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, 231(1):1-12.

- Roustapour, O. R.; Hosseinalipour, M.; Ghobadian, B.; Mohaghegh, F.; Azad, N. M. (2009). A proposed numerical–experimental method for drying kinetics in a spray dryer. *Journal of food engineering*, 90(1):20-26.
- Schäfer, J. (2015). *Spray-Drying of Enzymes on the Bench-Top Scale with lengthened Chamber Retention Time* (Doctoral dissertation) - Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), 211p.
- Schmidt, N. S.; Silva, C. L. D. (2018). Pesquisa e desenvolvimento na cadeia produtiva de frangos de corte no Brasil. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 56(3):467-482.
- Schmitt, C.; Sanchez, C.; Desobry-Banon, S.; Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(8):689-753.
- Selivanov A. 2005. Stabilization of cellulases using spray drying. *Eng Life Sci*, 5:78-80.
- Shahidi, F.; Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6):501-547.
- Shiraki, K.; Fujiwara, S., Imanaka, T.; Takagi, M. (2001). Conformational stability of a hyperthermophilic protein in various conditions for denaturation. *Electrochemistry*, 69(12):949-952.
- Silva Júnior, J. O. C.; Vieira, J. L. F.; Barbosa, W. L. R.; Pereira, N. L. (2006). Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16:671-677.
- Silva, D. L. D. (2016). *Influência da suplementação de enzimas exógenas no valor nutricional do farelo de soja para frangos de corte*. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa, p.61.
- Sloth, J. (2007). *Formation of enzyme containing particles by spray drying* (Doctoral dissertation), PhD Thesis. Department of Chemical Engineering, Technical University of Denmark, p.159.
- 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 & engineering chemistry research*, 48(7):3657-3664.
- Souza, A. N. D.; Martins, M. L. L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz. J. Microbiol.*, 32(4):271-275.
- Straatsma, J.; Van Houwelingen, G.; Steenbergen, A. E.; Jong, P. (1999). Spray drying of food products: 1. Simulation model. *Journal of Food Engineering*, 42(2):67-72.
- Strada, E. S. D. O.; Abreu, R. D.; Oliveira, G. J. C. D.; Costa, M. D. C. M. M. D.; Carvalho, G. J. L. D.; Franca, A. S.; Clarton, L.; Azevedo, J. L. M. D. (2005). Uso de enzimas na alimentação de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(6):2369-2375.

- Su, J. F.; Huang, Z.; Yuan, X. Y.; Wang, X. Y.; Li, M. (2010). Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate polymers*, 79(1):145-153.
- Sunna, A.; Bergquist, P. L. (2003). A gene encoding a novel extremely thermostable 1, 4- $\beta$ -xylanase isolated directly from an environmental DNA sample. *Extremophiles*, 7(1):63-70.
- Tavares-Samay, A. M. A.; Dutra Junior, W. M.; Palhares, L. O.; Lopes, C. D. C.; Rabello, C. B. V.; Coelho, A. H. D. S. C. (2019). Determination of nutrient and energy values of cottonseed meal supplemented or not with phytase and protease for broiler chicks. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 48:1-9.
- Tejedor, A. A.; Albino, L. F. T.; Rostagno, H. S.; Lima, C. A. R. D.; Vieites, F. M. (2001). Efeito da adição de enzimas em dietas de frangos de corte à base de milho e farelo de soja sobre a digestibilidade ileal de nutrientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(3):809-816.
- Terra Filho, M.; SANTOS, U.P. (2006). Silicose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 32:41-47.
- Toğrul, H.; Arslan, N. (2004). Extending shelf-life of peach and pear by using CMC from sugar beet pulp cellulose as a hydrophilic polymer in emulsions. *Food hydrocolloids*, 18(2):215-226.
- Tunga, R.; Shrivastava, B.; Banerjee, R. (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*, 38(11):1553-1558.
- Vasconcelos, E. A. F.; Medeiros, M. G. F.; Raffin, F. N.; Moura, T. F. A. L. (2005). Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinusterebinthifolius*Raddi (Anacardiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(3):243-249.
- Walton, D. E. (2000). The morphology of spray-dried particles a qualitative view. *Drying Technology*, 18(9):1943-1986.
- Wang, F.; Podell, E. R.; Zaug, A. J.; Yang, Y.; Baciú, P.; Cech, T. R.; Lei, M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, 445:506-510
- Winkler, H. C.; Suter, M.; Naegeli, H. (2016). Critical review of the safety assessment of nano-structured silica additives in food. *Journal of nanobiotechnology*, 14(1):1-9.
- Yoshii, H.; Buche, F.; Takeuchi, N.; Terrol, C.; Ohgawara, M.; Furuta, T. (2008). Effects of protein on retention of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray drying. *Journal of food engineering*, 87(1):34-39.
- Zamost, B. L.; Nielsen, H. K.; Starnes, R. L. (1991). Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 8(2):71-81.
- Zanella, I. (2001). Suplementação enzimática em dietas avícolas. *Présimpósio De Nutrição Animal: Aves E Suínos*, 37.

## ANEXO 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética.

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**

INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Avenida Rio Branco, 50 – Santa Lúcia – 28056-264 – Vitória – ES  
27 3357-7518**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada “Utilização de protease de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 atomizadas em spray dryer na alimentação de frangos de corte”, registrada sob o nº 23149.001939-2020-33, sob a responsabilidade de **RAPHAEL PIRES BOLZAN**, lotado(a) no Ifes Campus de Alegre, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica e/ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo.

Finalidade: ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização: 21 de outubro a 21 de dezembro de 2020
Espécie/linhagem/raça: <i>Gallus gallus</i> / ave
Nº de animais: 480
Peso/idade: 01 dia, 42g
Sexo: macho
Origem: Incubatório Globo Aves – Marechal Floriano – ES

Vitória (ES), 28 de setembro de 2020.



**Sherrine Queiroz Fermo de Andrade**  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
(portaria nº 1694, de 22 de junho de 2016)  
**Instituto Federal de Educação do Espírito Santo**