

APLICAÇÃO DE PROTEASES E AMILASES PRODUZIDAS POR
Bacillus sp. SMIA-2 NA REMOÇÃO DE MANCHAS DE TECIDOS

ERIKA FRAGA DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO- 2012

APLICAÇÃO DE PROTEASES E AMILASES PRODUZIDAS POR
Bacillus sp. SMIA-2 NA REMOÇÃO DE MANCHAS DE TECIDOS

ERIKA FRAGA DE SOUZA

“Dissertação 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 Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Profa. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO- 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 077/2012

Souza, Erika Fraga de

Aplicação de proteases e amilases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 na remoção de manchas de tecidos / Erika Fraga de Souza. – 2012.

60 f. : il.

Orientador: Meire Leis Leal Martins.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2012.

Bibliografia: f. 50 – 60.

1. Proteases 2. Amilases 3. *Bacillus* sp. SMIA-2 4. Detergente 5. Manchas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD –
667.1

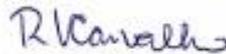
APLICAÇÃO DE PROTEASES E AMILASES PRODUZIDAS POR
Bacillus sp. SMIA-2 NA REMOÇÃO DE MANCHAS DE TECIDOS

ERIKA FRAGA DE SOUZA

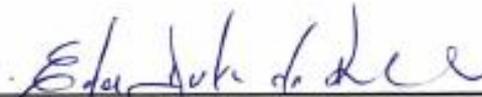
"Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal".

Aprovado em 28 de Agosto de 2012.

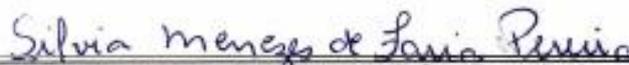
Comissão Avaliadora:



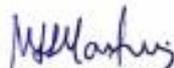
Raquel Vieira de Carvalho (D.Sc., Produção Vegetal) - UFES



Eder Dutra de Resende (D.Sc., Engenharia Química) – UENF



Sílvia Menezes de Faria Pereira (D.Sc., Engenharia e Ciências dos Materiais) –
UENF



Meire Lélis Leal Martins (Ph.D., Microbiologia Industrial)– UENF
Orientadora

Dedico a todos aqueles que torceram, incentivaram e reconheceram o meu empenho em cumprir mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. Tenho certeza que esteve comigo me abençoando em todos os momentos e tudo ocorreu conforme a providência divina;

Aos meus pais, Luiz Fernando e Silvana por tanto amor. Obrigada por não medirem esforços em me ajudar em todos os momentos e estarem ao meu lado sempre;

Ao Léo, meu namorado, amigo e parceiro em todos os momentos que precisei, por me incentivar sempre e me compreender nos momentos de ausência e preocupação;

Ao meu irmão Luiz Vítor, aos demais familiares e amigos por torcerem pelo meu crescimento e felicidade. Obrigada pelo carinho;

Às minhas avós, Elza e Elza e à minha madrinha Sílvia pelas orações e pela torcida;

Aos meus avôs Alcimar, Vítor (*in memoriam*) e meu padrinho Ronaldo (*in memoriam*) por serem meus ídolos e meus exemplos de caráter;

À Professora Meire pela orientação, ensinamentos e por me possibilitar fazer parte desse grande projeto;

A FAPERJ pela concessão da bolsa de mestrado;

Aos meus queridos amigos mineiros, João e Simone, que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada, sempre dispostos a me ajudar e com os quais eu muito aprendi e conversei. Teria sido mais difícil sem ajuda de vocês;

Aos demais companheiros de bancada: Nati, Andréia, Silvania, Vanessa e em especial a Priscila que muito me ajudou na realização das fermentações. Obrigada pelos momentos de descontração, pelo apoio e pela ajuda no meu crescimento profissional;

Aos amigos do LTA: Suelen, Geraldo, Natália, Clara, Nayara, Manoel, Carmô, Jeffinho e tantos outros que torceram por mim;

Às técnicas Aninha e Val por estarem sempre dispostas a contribuir, pelo carinho e amizade;

A Sílvia pela amizade, por me transmitir otimismo, fé e pelos conselhos;

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial ao Prof. Ricardo Bressam, por permitir o uso da centrífuga e à aluna Juliana por auxiliar no uso;

Ao Prof. Eder Dutra por disponibilizar o uso do colorímetro;

A Elaine do LQFPP pelo apoio na liofilização das amostras;

A todos os Professores do LTA pelos ensinamentos nas disciplinas e pela amizade;

Aos amigos da Bio 2005 por serem e terem sido fundamentais na minha formação e pela força que representa a nossa amizade;

Aos amigos da Embrapa (Gabi, Marcela, Kátia, Andressa, Melícia, Maíra, Lud, Regi, Lívia, Selma e os pesquisadores Leda, Janine e Edmar) pelo apoio e incentivo;

Aos profissionais que passaram pela minha caminhada e contribuíram para a minha formação pessoal e profissional: Profa. Denise Dagnino (orientadora da Graduação), Profa. Marília Berbert (Profa. Microbiologia Industrial), Diogo Meirelles (amigo da Iniciação científica), Stnio Oliveira e Jorge Dias (Usina Paraíso).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Aplicação industrial de enzimas	4
3.2. Produção de enzimas.....	6
3.3. Processos de concentração de enzimas.....	8
3.3.1. Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	8
3.3.2. Liofilização.....	10
3.4. Proteases.....	11
3.5. Amilases.....	13
3.6. Fontes de obtenção de amilases e proteases.....	15
3.7. Aplicação de enzimas na indústria de detergentes.....	17
3.8. Medida de detergência em laboratório.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Microrganismo.....	21
4.2. Manutenção do microrganismo.....	21
4.3. Meio de crescimento.....	21
4.4. Preparo do pré-inóculo.....	22
4.5. Crescimento do microrganismo.....	23
4.6. Medida do crescimento e pH.....	23
4.7. Determinação da atividade enzimática.....	23
4.7.1. Determinação da atividade da α -amilase.....	23
4.7.2. Determinação da atividade da Protease.....	24

4.7.3. Determinação de proteínas.....	24
4.8. Produção e purificação parcial das enzimas.....	25
4.9. Liofilização.....	25
4.10. Caracterização parcial da α -amilase e protease no extrato dialisado.....	26
4.10.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da α -amilase e protease.....	26
4.10.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da α -amilase e protease.....	26
4.11. Estabilidade de extratos dialisados das enzimas protease e α -amilase nas temperaturas usadas nas lavagens dos tecidos.....	27
4.12. Desempenho das enzimas produzidas por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 na lavagem do EMPA 112.....	26
4.12.1. Lavagem usando extrato liofilizado.....	27
4.12.2. Lavagem usando extrato dialisado.....	28
4.13. Avaliação de detergência.....	29
4.14. Análise Estatística.....	30
4.15. Preparo das manchas nos tecidos.....	30
4.16. Desempenho das enzimas na lavagem de tecidos manchados com gema de ovo, molho de tomate e Toddyho®.....	30
4.17. Estabilidade ao armazenamento do extrato dialisado congelado.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Perfil de crescimento do microrganismo.....	32
5.2. Produção e purificação parcial das enzimas.....	33
5.3. Liofilização.....	34
5.4. Caracterização parcial da α -amilase e protease no extrato dialisado.....	36
5.5. Estabilidade de extratos dialisados contendo enzimas proteases e α -amilases usadas nas lavagens dos tecidos.....	38
5.6. Desempenho de proteases e α -amilases produzidas por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 na lavagem de tecidos padrão EMPA 112.....	40
5.6.1. Lavagem de tecidos padrão EMPA 112 utilizando extratos liofilizados.....	40
5.6.2. Lavagem de tecidos padrão EMPA 112 utilizando extratos dialisados das enzimas proteases e α -amilases.....	41

5.7. Desempenho das enzimas proteases e α -amilases dialisadas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 na lavagem de tecidos manchados com diferentes alimentos.....	44
5.8. Estabilidade ao armazenamento de extratos dialisados congelados.....	46
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b).....	13
Figura 2. Crescimento (■), pH(●) e atividade de protease (▼) e α -amilase (▲) de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	32
Figura 3. Atividade (■) e estabilidade (●) de extratos dialisados contendo enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2, em diferentes pHs.....	36
Figura 4. Temperatura ótima para atividade de extratos dialisados contendo enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	38
Figura 5. Estabilidade térmica de extratos dialisados contendo enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	38
Figura 6. Estabilidade de extratos dialisados contendo enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por <i>Bacillus</i> sp SMIA-2, incubados em diferentes temperaturas.....	39
Figura 7. Estabilidade de extratos dialisados das enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 incubados em diferentes temperaturas na presença do detergente Tixan®.....	39

Figura 8. Efeito da solução “detergente-enzimas” na remoção de sujidades dos tecidos sujos padrão (EMPA 112) utilizando diferentes condições de lavagem a 55°C.....	44
Figura 9. Remoção de manchas de tecidos sujos com molho de tomate utilizando diferentes condições de lavagem a 40°C.....	44
Figura 10. Remoção de manchas de tecidos sujos com Toddyho [®] utilizando diferentes condições de lavagem a 40°C.....	45
Figura 11. Remoção de manchas de tecidos sujos com gema de ovo utilizando diferentes condições de lavagem a 40°C.....	45
Figura 12. Remoção de manchas de tecidos sujos com gema de ovo utilizando diferentes condições de lavagem a 55°C.....	46
Figura 13. Estabilidade de extratos dialisados congelados das enzimas proteases (a) e α -amilases produzidas simultaneamente por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicação das enzimas de uso industrial.....	6
Tabela 2: Composição do meio de crescimento g.L ⁻¹	22
Tabela 3. Purificação Parcial da α -amilase.....	34
Tabela 4. Purificação Parcial da protease.....	34
Tabela 5. Influência da liofilização na atividade da amilase.....	35
Tabela 6. Influência da liofilização na atividade da protease.....	35
Tabela 7. Medidas da refletância de tecidos EMPA 112 submetidos a diferentes condições de lavagem usando enzimas liofilizadas.....	40
Tabela 8. Medidas de refletância de tecidos EMPA 112 obtidas após a lavagem a 40°C utilizando o detergente Tixan® e extrato dialisado de proteases e α -amilases de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	41
Tabela 9. Medidas de refletância de tecidos EMPA 112 submetidos a diferentes condições de lavagem a 40°C utilizando as enzimas proteases e α -amilases dialisadas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	42
Tabela 10. Medidas de refletância de tecidos EMPA 112 submetidos a diferentes condições de lavagem a 25°C utilizando as enzimas proteases e α -amilases dialisadas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	43
Tabela 11. Medidas de refletância de tecidos EMPA 112 submetidos a diferentes condições de lavagem a 55°C utilizando as enzimas proteases e α -amilases dialisadas de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	43

RESUMO

SOUZA, Erika Fraga de; M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2012. Aplicação de proteases e amilases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 na remoção de manchas de tecidos. Orientadora Profa: Meire Lelis Leal Martins.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o potencial de aplicação de α -amilases e proteases produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA-2, como aditivo em detergentes. *Bacillus* sp. SMIA-2 secretou protease quando cultivado em meio líquido contendo proteínas do soro de leite, amido e água de maceração de milho. A maior atividade da protease e α -amilase ocorreu após 36 horas de fermentação, alcançando níveis de 14,91U/mL e 2,47 U/mL respectivamente. Os extratos enzimáticos foram parcialmente purificados por precipitação com sulfato de amônio e diálise. As frações ativas das várias fermentações foram unificadas e apresentaram atividade enzimática de 17,92 U/mg e 80,60 U/mg para α -amilase e protease, respectivamente. Estudos sobre a caracterização das enzimas dialisadas revelaram que a temperatura para atividade ótima e melhor estabilidade da α -amilase foi 90°C e para protease foi a 70°C. O pH para atividade ótima de ambas as enzimas foi 8,5. Após a incubação dessas enzimas por 2 h a pH 8,5 foi observado um decréscimo de 23% e 11% da atividade inicial da protease e amilase, respectivamente. A estabilidade das enzimas com detergente Tixan® após 30 minutos de incubação a 25°C, 40°C e 55°C também foi estudada. Tecidos manchados com Ketchup, gema de ovo e

chocolate (EMPA 112 e Toddynho®) foram submetidos a tratamentos de lavagem com água, detergente e detergente contendo protease e amilases de *Bacillus* sp. SMIA-2. A adição das enzimas α -amilase e proteases produzidas simultaneamente pela cepa *Bacillus* sp. SMIA-2 melhorou o desempenho do detergente na remoção de manchas de tecidos.

ABSTRACT

SOUZA, Erika Fraga de; M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August, 2012. Use of proteases and amylases produced by *Bacillus* sp. SMIA-2 to remove stains in clothes pieces. Prof. Advisor: Meire Lelis Leal Martins.

This work was carried out with the objective of studying the potential application of α -amylase and protease produced simultaneously by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2, as detergents additives. *Bacillus* sp. SMIA-2 secreted α -amylase and protease when cultivated in liquid culture containing whey protein concentrate, starch and corn steep liquor. The highest activity of the protease and α -amylase was found after 36h of culture incubation reaching levels of 14,91 U/mL and 2,47 U/mL respectively. The crude enzymes were partially purified by combination of ammonium sulfate precipitation and dialysis. The active fractions from several fermentations, were pooled and showed enzyme activity of 17,92 U/mg and 80,60 U/mg for α -amylase and protease, respectively. Studies on the crude dialyzed enzymes characterization revealed that the optimum temperature and the best thermostability of the α -amilase was 90 °C and the protease was 70 °C. The optimum pH of both enzymes was found to be 8,5. After incubation of these enzymes for 2 h at pH 8,5 was observed a decrease of about 23% and 11% of the protease and amylase original activity, respectively. The stability of these enzymes with the detergent Tixan[®] after 30 min of incubation at 25°C, 40°C e 55°C was also

studied. Stained cloth pieces soiled with Ketchup, egg yolk and chocolate (EMPA 112 and Toddynho[®]) were subjected to wash treatments with water, detergent and detergent containing *Bacillus* sp. SMIA-2 protease and amylases. The addition of enzymes α -amylase and protease produced simultaneously by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain improved the cleaning performance of detergent for removing stains clothes.

1. INTRODUÇÃO

A importância da sustentabilidade nas atividades produtivas tem sido amplamente reconhecida, havendo a necessidade da substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis. Reconhece-se também a necessidade da substituição das múltiplas etapas de processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes.

Os processos químicos tradicionalmente adotados pela engenharia química utilizam compostos químicos muitas vezes tóxicos, como matérias-primas ou insumos da sua cadeia produtiva. Dentro deste contexto, destaca-se a tecnologia enzimática, que é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (Bon *et al.*, 2008).

Em decorrência destas necessidades e tendências, prevê-se um aumento significativo no consumo de enzimas em nível internacional. Este cenário é particularmente importante para o Brasil, país que necessita inserir-se de forma representativa como usuário de Tecnologia Enzimática, que concilia desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental.

O mercado mundial de enzimas industriais é estimado em US\$ 2,3 bilhões anuais e tem três segmentos: enzimas técnicas (destinadas a indústrias de tecidos e de produtos de limpeza), enzimas para alimentos e bebidas e enzimas para ração animal. As principais enzimas de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases e fitases, e as maiores

empresas produtoras são europeias: Gist-Brocades (Holanda), Genencor International (Finlândia) e Novo Nordisk (Dinamarca). A última detém sozinha, cerca de metade do mercado mundial de enzimas industriais (Mussatto *et al.*, 2007).

De forma geral, as proteases e amilases podem ser extraídas de diferentes fontes, microrganismos, animais e vegetais. As fontes microbianas são as mais utilizadas, e dentre os microrganismos mais citados para a produção destas enzimas se encontram as bactérias do gênero *Bacillus* (Gupta *et al.*, 2002). Microrganismos de uma mesma linhagem possuem o potencial de produzir enzimas com características completamente ou parcialmente diferenciadas, e por este motivo a busca por novas fontes microbianas continua sendo foco de vários pesquisadores. Dentre as espécies, o gênero *Bacillus* possui atrativo industrial por diversas características vantajosas, tais como: alta taxa de crescimento, levando a um curto tempo para a fermentação, e a capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular.

Indústrias de detergentes são os principais consumidores de enzimas, tanto em termos de volume quanto em valor. O uso das enzimas em detergentes possibilita a substituição de componentes prejudiciais ao meio ambiente. Elas também são obtidas de fontes renováveis, são biodegradáveis e não oferecem riscos à vida marinha. Proteases são as principais enzimas usadas na formulação de detergentes enzimáticos e as amilases o segundo tipo de enzimas mais empregadas.

Bacillus sp. estirpe SMIA-2, uma bactéria termofílica, isolada de amostras de solo da região norte fluminense do estado do Rio de Janeiro (Souza e Martins, 2001) foi capaz de produzir α -amilases e proteases quando cultivada em um meio de baixo custo (Carvalho *et al.*, 2008; Nascimento e Martins, 2004). Correa (2009) otimizou a produção simultânea de proteases e amilases a partir de resíduos agroindustriais e caracterizou parcialmente ambas as enzimas. A boa atividade e estabilidade apresentada pelas enzimas em altos valores de pH tornam possível a aplicação das mesmas na indústria de detergentes, já que os mesmos costumam apresentar pH alcalino.

No presente trabalho foi avaliada a ação destas enzimas juntamente com um detergente comercial na remoção de manchas de gema de ovo, molho de tomate e chocolate em tecidos.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho das enzimas, α -amilase e protease, produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA-2, na remoção de manchas em tecidos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aplicação industrial de enzimas

Enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica com elevada seletividade e especificidade. As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular (Lima *et al.*, 2001). Além da importância fisiológica, ao longo dos anos, algumas enzimas vêm sendo usadas em diversos processos industriais (Maurer, 2004). As enzimas constituem o principal alvo da pesquisa em biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (Do Canto e Menezes, 1995).

A importância da sustentabilidade nas atividades produtivas tem sido amplamente reconhecida, havendo a necessidade de substituir processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis. Além disso, alguns processos químicos tradicionalmente adotados pela engenharia química utilizam compostos químicos muitas vezes tóxicos ao meio ambiente. Dentro deste contexto, destaca-se a tecnologia enzimática, que é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado (Bon *et al.*, 2008).

Há necessidade da substituição das múltiplas etapas de processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes. As enzimas na indústria apresentam menor custo, menor geração de resíduos poluentes e desempenho superior quando comparadas ao uso de produtos químicos (Comyns, 2009). Um exemplo a ser citado é o das amilases microbianas que substituíram com sucesso a hidrólise química nas indústrias do amido (Najafi *et al.*, 2005).

Em decorrência destas necessidades e tendências, prevê-se um aumento significativo no consumo de enzimas em nível internacional. Estados Unidos e Europa Ocidental, seguidos de Japão e Canadá, dominam o mercado de enzimas, enquanto em países em desenvolvimento da Ásia-Pacífico, Europa Oriental e África, esse mercado tem se apresentado emergente (Sarrouh *et al.*, 2012).

Os Estados Unidos respondem por 34% do mercado de enzimas, configurando-se como o maior consumidor (Bon *et al.*, 2008). O mercado de enzimas industriais nos Estados Unidos, obteve receita de US\$ 394,1 milhões em 2006 e estima-se que este possa chegar a US\$ 748,9 milhões em 2013 (Comyns, 2009). Os três maiores fornecedores de enzimas industriais são: Novozymes S/A (sede situada na Dinamarca), Genencor International Inc (sede nos Estados Unidos), e DSM NV (sede na Holanda). Os seus principais segmentos do mercado são: alimentos (produtos lácteos, fermento de cerveja, bebidas), rações animais e aplicações técnicas. A Novozymes é o principal fornecedor de cada um destes três setores, com uma quota estimada em 47% do mercado de enzimas industriais em 2009 (Comyns, 2009).

Em 2005 as importações de enzimas no Brasil chegaram a US\$ 31 milhões e as exportações a US\$ 3 milhões (Mussato *et al.*, 2007). O mercado brasileiro é essencialmente importador, indicando desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no país. No entanto, o Brasil é o país de maior destaque da América latina, absorvendo 60% da demanda de enzimas, dentre os países mais industrializados. A importação de enzimas é feita principalmente de países europeus, Estados Unidos e Japão, enquanto a exportação é feita para a maioria dos países latino-americanos (Bon *et al.*, 2008).

O Brasil apresenta um enorme potencial para produzir enzimas por dois motivos em especial: abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas: palha

de arroz, soro de leite, bagaço de cana), que constitui substrato de baixo custo para fermentações, e a enorme diversidade biológica, ainda pouco explorada para a descoberta de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial (Mussatto *et al.*, 2007). O incentivo à tecnologia enzimática no Brasil aumentaria a representatividade comercial e econômica brasileira no cenário internacional, além de trazer benefícios econômicos, ambientais e industriais (Bon *et al.*, 2008).

As principais enzimas de uso industrial são as proteases, amilases, lactases, pectinases, celulases, pectinases, oxidorreduções, lipases e xilanases (Hasan *et al.*, 2006; Haki e Rakshit, 2003). As proteases representam 60% do mercado de enzimas de uso industrial (Merheb *et al.*, 2007), as amilases vêm em seguida movimentando 30% deste mercado (Asoodeh *et al.*, 2010).

Indústria	Enzimas usadas
Têxtil	amilase, celulase, pectinase, oxidorredução
Detergentes	protease, amilase, celulase, lipase
Alimentícia	celulase, lactase, lipase, pectinase, protease
Papel	lipase, oxidorredução, xilanase
Couro	lipase, protease

Tabela 1: Aplicação das enzimas de uso industrial (Fonte: Kirk *et al.*, 2002; Nielsen e Oxenboll, 1998).

3.2. Produção de enzimas

Embora tradicionalmente as enzimas mais estudadas sejam de origem animal ou vegetal, as enzimas microbianas apresentam maior interesse do ponto de vista industrial por ser mais facilmente produzidas em larga escala via fermentação (Haki e Rakshit, 2003). Assim, os microrganismos surgem como uma alternativa simples e barata para a produção dessas enzimas. Na maioria das vezes, os microrganismos são fáceis de manipular, requerem condições mínimas de nutrição e de manutenção e apresentam alta eficiência na produção de

enzimas, que ainda assim pode vir a ser aumentada por meio do uso de técnicas de melhoria genética (Sajedi *et al.*, 2005).

Os processos industriais de produção de enzimas são desenvolvidos majoritariamente em cultivos submersos aerados, que permitem maior controle dos parâmetros operacionais. O cultivo em estado sólido é também utilizado, principalmente nos países orientais, por apresentar vantagens para a produção de algumas enzimas, principalmente as produzidas por fungos filamentosos (Bon *et al.*, 2008).

A matéria-prima é um dos componentes mais importantes no custo de produção de enzimas (Bon *et al.*, 2008). A fonte de carbono utilizada para o crescimento do microrganismo responde por cerca de 30-40% do custo de produção destas enzimas (Joo e Chang, 2005). A adição de reagentes ricos em moléculas de alto valor biológico e de baixo custo ao meio de cultivo torna-se interessante. Sendo assim, esta é uma das razões para o crescente interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais gerados pelas atividades agropecuárias e de processamento de produtos agropecuários (Villas-Bôas e Esposito, 2000).

Os resíduos agroindustriais são provenientes de usinas sucroalcooleiras, indústrias do processamento de carnes, laticínios, grãos, frutas e hortaliças (Dantas e Aquino, 2010). Vários autores reportam a utilização de resíduos da agroindústria, como as proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho, visando obtenção de produtos de interesse comercial como as enzimas, com resultados satisfatórios (Carvalho *et al.*, 2008; Azeredo *et al.*, 2006).

O soro gerado na produção do queijo é um líquido amarelo-esverdeado composto principalmente de proteínas, lactose e minerais, constituindo assim um subproduto rico em nutrientes (Smithers *et al.*, 1996). A água de maceração de milho, resultante da moagem úmida deste cereal, é rica em aminoácidos e polipeptídeos. Trata-se de uma fonte de nitrogênio de baixo custo, substituindo o extrato de levedura e peptona nos processos fermentativos (Liggett e Koffler, 1948).

A produção de enzimas amilases e proteases por bactérias do gênero *Bacillus* sp. é bastante citada na literatura. No entanto, a produção simultânea das mesmas não é muito discutida. Um meio de cultivo utilizando resíduos

agroindustriais que propicie a obtenção destas duas enzimas significa simplificação, rapidez e economia do processo de produção de enzimas.

3.3 Processos de concentração de enzimas

As operações que se seguem ao processo fermentativo são importantes devido ao custo substancial dos processos de separação, concentração e purificação das enzimas (Queiroz *et al.*, 2001). Os critérios usados para a separação e purificação de uma enzima dependem da sua aplicação. Em indústrias de alimentos e detergentes, geralmente não é necessário um alto grau de pureza para a enzima produzida (Madamwar e Shah, 2005).

A primeira etapa do processo de concentração enzimático, no caso de enzimas extracelulares, é a separação das células do meio de cultura fermentado. Geralmente, a separação da enzima das células pode ser feita simplesmente por centrifugação ou filtração. Após essa etapa, a enzima está presente no sobrenadante, mas em baixa concentração (Bon *et al.*, 2008). A etapa de concentração pode ser feita por ultrafiltração, liofilização ou precipitação, desde que estas técnicas não promovam a inativação da enzima. Além da capacidade de concentração, os métodos de precipitação e ultrafiltração também podem proporcionar, em alguns casos, uma purificação parcial da preparação enzimática de baixa-resolução na amostra (Habert *et al.*, 2006).

3.3.1. Precipitação fracionada com sulfato de amônio

A precipitação por adição de sal ocorre devido a um decréscimo de solubilidade resultante de um efeito *salting-out* (hidrofóbico) ou da combinação de um efeito *salting-in* (eletrostático) com um efeito *salting-out*. O efeito *salting-in* causa o aumento da solubilidade do soluto com o aumento da concentração de sal, enquanto o *salting-out* causa um decréscimo de solubilidade com o aumento da concentração do mesmo (Ladish, 2001).

O mecanismo de precipitação de proteínas com sais decorre de um aumento da força iônica de um sistema. Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas à solução contendo proteínas, ocorre uma interação destas com as cargas provenientes da dissociação do sal e diminuição da interação

interproteínas, aumentando a solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, verifica-se um efeito oposto. As moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo desta forma, a desidratação das proteínas. Durante este processo a interação interproteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e conseqüentemente ocorre a precipitação de proteínas pelo efeito *salting-out* (Lima *et al.*,2008).

A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para a precipitação é diferente para cada proteína (Lima *et al.*,2008).

Os sais neutros têm efeito pronunciado sobre a solubilidade de proteínas, desta forma, os sais de íons divalentes, tais como cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), são muito mais eficientes na solubilização do que os sais de íons monovalentes como o cloreto de sódio (NaCl)(Nelson e Cox, 2004).

O sulfato de amônio é o sal mais utilizado em *salting-out* devido à sua alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções, à ausência de efeitos desnaturantes e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução, além de ser de baixo custo mesmo em alta pureza (Ladish, 2001).

Uma desvantagem desse processo é a existência de sal em ambas as fases formadas. O sistema bifásico formado é constituído de uma fase líquida concentrada em eletrólito e uma fase composta que contém a proteína precipitada com grande proporção da fase líquida salina, podendo também conter sal na fase sólida intrinsecamente ligada a ela. Assim, são necessárias operações como diálise ou diafiltração para a eliminação do sal da fase precipitada e processamento da fase líquida para sua reutilização ou descarte final (Ladish, 2001).

A precipitação com sulfato de amônio é comumente usada na primeira etapa de purificação para retirar as proteínas que precipitam em concentrações diferentes da proteína de interesse e ainda para concentrá-la (Slivinski, 2007). Entretanto, esse procedimento pode levar muito tempo até que as partículas precipitadas decantem, e pode ocasionar a inativação da enzima. As proteínas

precipitadas têm sua estrutura tridimensional modificada. Trata-se, portanto, de um modo agressivo para essas moléculas, pois sua função bioquímica depende de sua estrutura. A aplicação desse método só é viável, portanto, quando a adequada conformação da proteína é recuperada após a precipitação (Lucarini *et al.*, 2005).

A adição do sal na quantidade correta pode seletivamente precipitar algumas proteínas, enquanto outras permanecem em solução. O fracionamento salino de enzimas ocorre a uma faixa limitada, pelo uso de diferentes concentrações de sais, em que baixas concentrações precipitam algumas proteínas não desejadas, que são descartadas, e a adição em altas concentrações precipitam a proteína desejada (Gerhartz, 1990).

3.3.2. Liofilização

O processo de liofilização pode ser definido como um processo no qual a maior parte da água contida em um produto congelado é removida por sublimação, ou seja, a água passa diretamente do estado sólido para vapor sem passar pelo estado líquido. O processo de secagem é realizado em temperatura baixa e sob pressão reduzida (Pitombo, 2005).

O processo de liofilização tem sido descrito como método a ser utilizado após a purificação enzimática, para manutenção da atividade durante armazenamento (Tatini *et al.*, 2006). Aplica-se à remoção de qualquer solvente, mas em biotecnologia, o interesse fundamental é a água (Pitombo, 2005).

A liofilização divide-se em três etapas: na primeira, o material é congelado, a seguir a água é sublimada sob pressão reduzida e na terceira etapa ela é removida por dessorção, ou seja, uma secagem a vácuo (pressão reduzida) (Pitombo, 2005).

Esse processo de secagem possui uma série de vantagens que torna o método preferido para a conservação de materiais biológicos. O material permanece congelado até estar completamente seco e, portanto elimina-se o encolhimento e a migração dos constituintes dissolvidos, ou seja, o processo retém a forma original do material. As modificações físico-químicas são inibidas e são minimizadas as perdas dos constituintes voláteis, ou a perda de atividade biológica, ou outra atividade na preservação da estrutura da molécula. O produto

liofilizado possui estrutura porosa, sendo prontamente reconstituído aos seus respectivos tamanhos e formas originais, quando imersos em água. Possuem boa estabilidade durante o armazenamento, resultando em longo tempo de vida de prateleira. Produtos liofilizados são altamente higroscópicos e de fácil dissolução em água (Pitombo, 2005).

Entretanto, estudos com espectroscopia por infravermelho têm documentado que os problemas relacionados com o congelamento e a desidratação induzidos pela liofilização podem levar ao desdobramento molecular da proteína. O desdobramento não somente pode levar à desnaturação irreversível da proteína, mesmo se a amostra é reidratada imediatamente, mas também pode reduzir a estabilidade durante o armazenamento da proteína liofilizada (Carpenter *et al.*, 1999).

3.4. Proteases

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular classifica as enzimas de acordo com o seu modo de ação sobre o substrato em: oxirredutases (classe 1), transferases (classe 2), hidrolases (classe 3), liases (classe 4), isomerases (classe 5) e ligases (classe 6). As proteases são enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 4, as peptideo-hidrolases ou peptidases, pois por uma reação de hidrólise, elas clivam a proteína em peptídeos e aminoácidos, adicionando uma molécula de água à ligação peptídica. As proteases são classificadas em dois grupos principais, que são as exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99), dependendo do sítio de ação dessas enzimas (Rao *et al.*, 1998).

As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos. As exopeptidases podem ser subdivididas em aminopeptidases (quando clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino terminal) ou carboxipeptidases (quando clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento carboxílico terminal). Baseado no tipo do grupo funcional presente no sítio catalítico da enzima, as carboxipeptidases foram subdivididas em serina, metalo, e cisteína carboxipeptidases (Rao *et al.*, 1998).

As endopeptidases são também chamadas proteinases, sendo, portanto, muito comum a utilização do termo proteinase para se referir a uma protease. As

endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma peptídeos maiores. As endopeptidases são ainda classificadas em quatro relevantes grupos, que são: serina, cisteína, aspártico e metaloproteases. As serina-peptidases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, aspártico-peptidases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico, cisteína-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metaloproteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico (Rao *et al.*, 1998).

As proteases, também conhecidas como enzimas proteolíticas, são constituintes essenciais em todas as formas de vida, incluindo os procariotos, os fungos, as plantas e os animais (Kumar e Takagi, 1999). As enzimas proteases estão envolvidas em processos biológicos essenciais, tais como a coagulação sanguínea, morte celular, diferenciação de tecidos, catabolismo de proteínas, processamento e transporte de proteínas secretoras através da membrana (Maurer, 2004).

Além da sua importância fisiológica, as proteases têm importante aplicabilidade biotecnológica. Elas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e representam mais que 60% do mercado mundial de enzimas de uso industrial (Vishwanatha *et al.*, 2010). As proteases têm aplicação em diferentes processos industriais tais como no processamento de alimentos e bebidas, formulação de detergentes, processamento de couro e pele, amaciamento de carnes, formulação de medicamentos, indústria têxtil entre outros (Reddy *et al.*, 2008; Genckal e Tari, 2006; Haki e Rakshit, 2003).

A demanda industrial por enzimas proteolíticas que apresentem estabilidade e especificidade a fatores como: pH, temperatura, íons metálicos, surfactantes e solventes orgânicos; estimula a busca por novas enzimas (Kamoun *et al.*, 2008). As proteases são classificadas em ácidas, neutras e alcalinas, de acordo com a faixa de pH em que apresentam atividade ótima (Mukherjee *et al.*, 2008). As proteases que apresentam alta atividade proteolítica e estabilidade quando submetidas às condições alcalinas, as chamadas proteases alcalinas, são importantes para as indústrias de laticínios, couro e principalmente para a indústria de detergentes (Deng *et al.*, 2010; Maurer, 2004). As proteases alcalinas usadas na indústria de detergentes totalizam 35% do total de venda de enzimas

microbianas (Hadj-Ali *et al.*, 2007) e 89% do total de proteases comercializadas (Mukherjee *et al.*, 2008).

3.5. Amilases

O amido é um polímero constituído por moléculas de glicose unidas por ligações α -1,4 e α -1,6. Dois polissacarídeos compõem a estrutura do amido: amilose e amilopectina. A primeira é uma molécula linear contendo mais de 6000 unidades de glicose conectadas por ligações glicosídicas α -1,4 e a segunda, muito similar ao glicogénio (Myers *et al.*, 2000), é altamente ramificada contendo ligações α -1,4 entre os monômeros de glicose e α -1,6 nos pontos de ramificação a cada 24-30 resíduos de glicose (Figura 1) (Brena *et al.*, 1996).

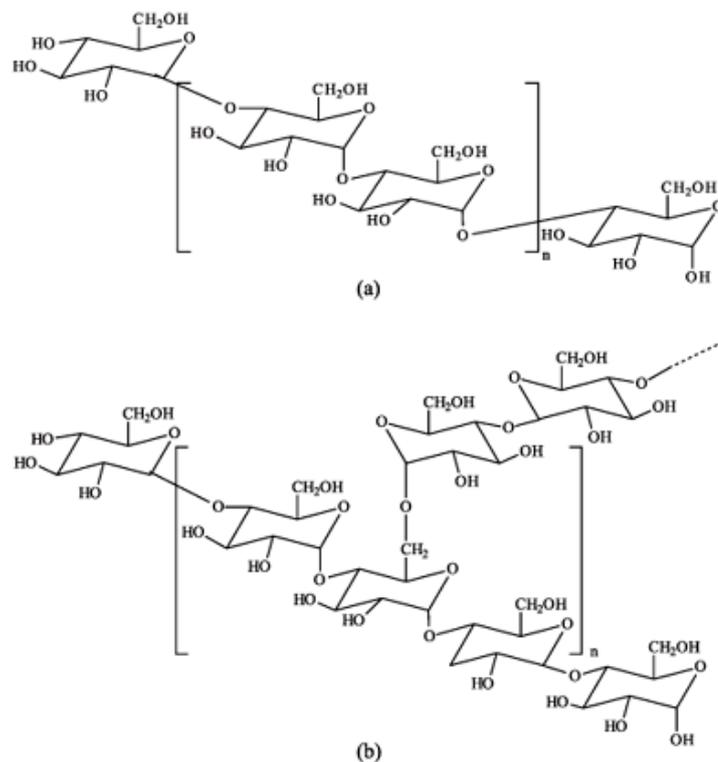


Figura 1. Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b) (Corradini *et al.*, 2005).

Para que a hidrólise do amido seja completa faz-se necessária a atuação de várias enzimas (Haki e Rakshit, 2003) pertencentes ao grupo das amilases. As amilases são enzimas capazes de hidrolisar as moléculas de amido, resultando em oligossacarídeos de diferentes tamanhos, como as dextrinas e maltoses. Por

catalisar reações de hidrólise, as amilases são classificadas como hidrolases (Classe 3) segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (Mitidieri *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2003).

Conforme o seu modo de ação, as enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias: as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α -1,4, de uma maneira aleatória, no interior da molécula de amido. Sua ação resulta na formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias. Por outro lado, as exoamilases hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em produtos finais pequenos (Gupta *et al.*, 2003). As principais amilases são: α -Amilases, β -Amilases e glicoamilases.

As α -amilases (EC 3.2.1.1, α -1,4-D-glicano glicanoidrolase), também chamadas de enzimas dextrinizantes, correspondem a endoamilases, que atuam ao acaso ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando maltose, glicose e dextrina. A α -amilase é a enzima amilolítica mais importante e popular entre as amilases de uso industrial, é uma enzima induzida na presença de amido ou maltose (Gupta *et al.*, 2003).

As β -amilases (EC 3.2.1.2, α -1,4-D-glicano-maltoideolase) são exoamilases que hidrolisam a penúltima ligação α -1,4, a partir da extremidade não redutora da molécula de amilose liberando maltose. Esse tipo de amilase está distribuído nos tecidos das plantas onde hidrolisa amido em β -maltose, sendo particularmente abundante em soja, trigo e cevada, principalmente durante a germinação (Gupta *et al.*, 2003).

As glicoamilases (EC 3.2.1.3, α -1,4-D-glicano-glicoidrolase) são exoamilases que rompem as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido; esta última em menor velocidade, a partir da extremidade não redutora, levando à produção de glicose. Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas, como maltose, dextrinas e glicogênio, são hidrolisadas pela enzima. Também chamadas de enzimas de sacarificação, elas são capazes de hidrolisar completamente o amido em incubações por longos períodos (Gupta *et al.*, 2003).

As enzimas amilases são de grande importância biotecnológica, pois apresentam aplicações nas áreas de alimentos (sacarificação do amido), fermentação (cerveja), têxtil e de papéis (Pandey *et al.*, 2000). Embora estas

enzimas possam ser obtidas de plantas, animais e microrganismos, as enzimas de origem microbiana predominam no setor industrial (Gupta *et al.*, 2003). Muitas espécies de bactérias e fungos têm sido identificadas como boas produtoras de amilase (Jin *et al.*, 2001; Stamford *et al.*, 2001; Yuguó *et al.*, 2000; Coronado *et al.*, 2000; Murado *et al.*, 1997; Sidhu *et al.*, 1997; Babu e Satyanarayana, 1995; Dey *et al.*, 1991).

Existem amilases que além de serem termoestáveis, são estáveis a pH alcalinos e outras que são estáveis a pH ácidos. Tanto as amilases alcalinas quanto as amilases acidófilas possuem aplicabilidade industrial (Asoodeh *et al.*, 2010). Um dos usos das amilases alcalinas é como aditivo em detergentes usados em processos de lavagem, uma vez que esses processos são geralmente realizadas sob pH alcalino, em água quente ou fria (Asoodeh *et al.*, 2010). As amilases acidófilas são usadas na indústria de processamento de alimentos, principalmente na indústria de amido, onde o pH natural da suspensão de amido é geralmente em torno de 4,5 (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006; Goyal *et al.*, 2005; Sarikaya *et al.*, 2000).

3.6. Fontes de obtenção de amilases e proteases

Os microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas devido à sua ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade de manipulação genética. Isto faz com que as enzimas microbianas sejam preferidas que as de animais ou de plantas, por apresentar quase todas as características desejáveis para sua aplicação biotecnológica (Rao *et al.*, 1998; Kumar e Takagi, 1999).

As enzimas microbianas são mais utilizadas que as enzimas de plantas e animais devido à grande variedade catalítica, além de ser obtidas em elevadas quantidades, com preço relativamente reduzido, possuindo bastante homogeneidade e qualidade. Além disso, são mais estáveis que seus homólogos obtidos de plantas e animais e seu processo de produção é mais fácil e seguro (Wiseman, 1985).

Dentre os microrganismos as bactérias são as principais fontes de proteases e amilases. Entre as enzimas bacterianas, aquelas secretadas pelo gênero *Bacillus* são as mais termoestáveis, aumentando ainda mais a sua aplicabilidade industrial. As α -amilases e proteases produzidas por várias espécies de *Bacillus* diferem entre si quanto à faixa ótima de pH, temperatura,

estabilidade da enzima, além de outros fatores fisiológicos inerentes a cada espécie. Portanto, as enzimas de diferentes origens têm aplicabilidades específicas em diferentes setores (Haki e Rakshit, 2003).

Uma grande variedade de microrganismos produz amilases e proteases, e sabe-se que as produzidas por microrganismos termofílicos apresentam características mais termoestáveis do que as produzidas pelos microrganismos mesofílicos (Niehaus *et al.*, 1999). Essas enzimas termoestáveis apresentam vantajosas aplicabilidades industriais, pois permitem que os processos biotecnológicos sejam conduzidos em elevadas temperaturas (Hough e Danson, 1999).

Os microrganismos termófilos (ou termofílicos) podem ser classificados em moderados, extremos e em hipertermófilos, de acordo com a sua temperatura ótima de crescimento. Os procariotos dos Domínios Bacteria e Archaea e os eucariotos (Domínio Eukarya - fungos filamentosos) com temperaturas ótimas de crescimento entre 40 e 50 °C são classificados como termófilos moderados. Os termófilos extremos são os procariotos dos Domínios Bacteria e Archaea que apresentam temperatura ótima de crescimento entre 65 a 85 °C. Os microrganismos hipertermófilos são os procariotos do Domínio Archaea com temperaturas ótimas de crescimento de 85 até 110 °C (Madigan e Oren, 1999).

A adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica. As proteínas dos microrganismos termófilos apresentam sequências de aminoácidos, estrutura tridimensional e mecanismos catalíticos idênticos aos de suas similares mesofílicas, porém, geralmente apresentam maior termoestabilidade intrínseca que sua equivalente mesofílica. A maior termoestabilidade observada nessas moléculas tem sido foco de inúmeras teorias e pesquisas, mas ainda não é completamente entendida (Gomes *et al.*, 2007).

O uso de temperaturas mais elevadas diminui o risco de contaminação por microrganismos mesófilos (Haki e Rakshit, 2003), favorece a solubilidade de substratos e produtos, além de aumentar as velocidades de reação devido à redução da viscosidade e ao aumento do coeficiente de difusão dos substratos (Egorova e Antranikian, 2005). Entre outras vantagens, as enzimas de

microrganismos termofílicos também têm se mostrado tolerantes a substâncias desnaturantes como detergentes e solventes orgânicos (Atomi, 2005).

Por exemplo, as amilases termoestáveis são de grande interesse na indústria de processamento do amido, uma vez que a temperatura de gelatinização do mesmo fica em torno dos 70°C (Sarikaya *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 1999). As vantagens da utilização de amilases termoestáveis neste tipo de processo industrial incluem a diminuição do risco de contaminação e custos de resfriamento externo, uma melhor solubilidade dos substratos e uma diminuição da viscosidade, permitindo que a mistura e o bombeamento sejam acelerados (Lin *et al.*, 1998).

As bactérias termofílicas do gênero *Bacillus* se destacam pela capacidade de produzir as principais enzimas de uso industrial: amilases, pectinases, xilanases, celulases, quitinases, proteases e lipases (Haki e Rakshit, 2003). As bactérias desse gênero são foco de atenção da biotecnologia, visto que esses microrganismos podem ser isolados e cultivados com relativa facilidade (Johnvesly e Naik, 2001).

O Gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é extremamente heterogêneo tanto geneticamente quanto fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo dos açúcares, composição da parede, etc). São bacilos gram-positivos aeróbicos e capazes de produzir endósporos. Possuem grande diversidade quanto às condições fisiológicas (temperatura, pH e salinidade), sendo capazes de crescer sob condições extremas de temperatura e pH (Wang *et al.*, 2007). Com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitos inofensivos, que não produzem toxinas e são incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Mahmood *et al.*, 1998).

3.7. Aplicação de enzimas na indústria de detergentes

Os detergentes, assim como os sabões, são substâncias sintéticas que promovem a remoção, dispersão e estabilização de materiais de uma superfície. O desempenho destas funções depende da composição da formulação, das condições de uso (temperatura e técnica de lavagem), da natureza da superfície a ser tratada, da natureza da substância a ser removida e ou dispersa e da natureza da fase móvel (Luz, 2007; Kissa, 1981).

A indústria de detergentes da América do Norte, Europa, Japão e América Latina tem feito acordos com o governo no sentido de descontinuar, substituir ou reduzir o uso de componentes prejudiciais ao meio ambiente. Exemplos são a descontinuidade do uso de surfactantes ramificados não biodegradáveis, redução no uso do tripolifosfato de sódio (para evitar a eutrofização dos corpos d'água) e a proliferação de produtos de limpeza doméstica baseados em ingredientes biodegradáveis e considerados menos nocivos para a natureza (Andersen, 1998).

As formulações mais atuais substituíram por enzimas muitos dos ingredientes que agrediam o meio ambiente, eram tóxicos e provocavam o desgaste de materiais e de instrumentos. As enzimas são obtidas de fontes renováveis, biodegradáveis e não oferecem riscos à vida marinha (Rodríguez *et al.*, 2006) .

Os detergentes enzimáticos atuam de maneira mais eficiente sobre a matéria orgânica do que os detergentes iônicos, porque agem de forma específica (Bon *et al.*, 2008). As enzimas têm a capacidade de agir sobre o sangue, a gordura, o muco, a saliva, as proteínas em geral, produzindo um substrato mais fácil de ser removido pelos agentes de limpeza, tornando mais efetiva a ação dos mesmos (Hmidet *et al.*, 2009). A principal vantagem do uso de enzimas em detergentes para lavagem de roupas é que elas são capazes de remover manchas sem agredir os tecidos e sem prejudicar as cores. Além disso, por ter melhor desempenho na limpeza, conseqüentemente apresentam redução no tempo de lavagem, consumo de energia e água (Gupta *et al.*, 2003).

O primeiro detergente contendo enzimas foi introduzido no mercado em 1913, na Alemanha e era constituído de tripsina de pâncreas de porcos. Apenas em 1963 a comercialização desses produtos passou a ser significativa, quando ocorreu o desenvolvimento de um detergente contendo protease bacteriana. A partir de 1980, as amilases, celulasas e lipases começaram a ser utilizadas como componentes na formulação de detergentes (Luz, 2007).

De acordo com Kumar e Takagi (1999), para a utilização de enzimas em detergentes, as mesmas devem preencher alguns requisitos como possuir elevada atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, ser efetivas em baixas quantidades, compatíveis com os demais compostos do detergente como surfactantes, perfumes e descorantes, apresentar estabilidade

durante o armazenamento e a lavagem, além de ser facilmente produzidas em larga escala (Sellami-Kamoun *et al.*, 2006; Joo e Chang, 2005).

A indústria de detergentes se tornou a maior consumidora das proteases alcalinas porque elas são usadas como aditivos de detergentes, cujo pH varia de 9 a 12, para facilitar a remoção dos resíduos de proteínas (sangue, leite, molho) (Kamoun *et al.*, 2008). Detergentes de circulação internacional como Dynamo®, Era plus® (Protector & Gamble) e Tide® (colgate Palmolive) contêm enzimas proteolíticas, produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* (Joo e Chang, 2005; Anwar e Saleemuddin, 1998; Rao *et al.*, 1998). Proteases alcalinas de *Bacillus brevis* (Banerjee *et al.*, 1999), *Bacillus* sp. SSR1 (Singh *et al.*, 2001) e *Bacillus stearothermophilus* (Dhandapani e Vijayaragvan, 1994) têm sido usadas na formulação de detergentes.

As amilases têm sido utilizadas em detergentes em pó de lavanderias desde 1975 para remoção de manchas contendo amido, chocolate, comida de bebê, entre outras (Gupta *et al.*, 2003). As amilases presentes nos detergentes hidrolisam este amido, transformando-o em oligômeros de cadeia curta, que são solúveis em água (Kiran e Chandra, 2008; Mitidieri *et al.*, 2006; Sarikaya *et al.*, 2000). Amilases alcalinas termoestáveis usadas em detergentes têm sido purificadas das espécies *Aspergillus oryzae* (Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2004), *Bacillus* sp. (Kiran e Chandra, 2008; Kim *et al.*, 1995), *Bacillus licheniformis* (Medda *et al.*, 1980), *Bacillus halodurans* (Hmidet *et al.*, 2008; Hashim *et al.*, 2004) e *Bacillus amyloliquefaciens* (Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2004).

3.8. Medida de detergência em laboratório

A quantidade de sujeira sobre o tecido pode ser estimada por comparação visual ou determinada por análises químicas, métodos radioativos e espectrofotométricos (refletância ou transmissão da luz). Análises químicas ou métodos radioativos determinam a exata quantidade de sujeira sobre o tecido, enquanto métodos espectrofotométricos consomem menos tempo e se correlacionam com a avaliação visual da remoção de sujeira (Kissa, 1981).

O método mais utilizado, em laboratório, para determinação da detergência, é o da lavagem de tecidos sujos padrão, onde a sujeira está

homogeneamente distribuída sob o tecido, sendo acompanhado por medidas de refletância antes e após a lavagem (Krusmann,1978).

O colorímetro de Hunter atribui índices à coloração da amostra a partir de uma escala de cor, sendo assim, é um instrumento útil na determinação da refletância da amostra.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

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

Os resultados de comparação das sequências de 16S rRNA indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *Bacillus caldoolyolyticus* e *Bacillus* sp. espécie AK1 (Souza e Martins,2001)

4.2. Manutenção do microrganismo

O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio TSY (triptona 20 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L; ágar 20 g/L e água 1 L), sob temperatura de refrigeração.

4.3. Meio de crescimento

O meio de crescimento utilizado para a produção simultânea de α -amilase e proteases foi definido por Correa *et al.* (2011) e sua composição é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2: Composição do meio de crescimento g.L⁻¹

Constituintes:	g.L⁻¹
KCl	0,3
K ₂ HPO ₄ ,	0,87
CaCl ₂ ,	0,29
MgSO ₄ ,	0,5
amido solúvel	2,5
proteínas do soro de leite	1,0
água de maceração de milho	3,0
Solução de traços de metais *	1,0

*Composição de solução de traços de metais (g.L⁻¹): CaCl₂ 2.2×10^{-3} , ZnO 2.5×10^{-3} , FeCl₃.6H₂O 2.7×10^{-2} , MnCl₂.4H₂O 1.0×10^{-2} , CuCl₂.2H₂O 8.5×10^{-4} , CoCl₂.6H₂O 2.4×10^{-3} , NiCl₃.6H₂O 2.5×10^{-4} , H₃BO₃ 3.0×10^{-4} ,

O meio de cultivo foi preparado usando água destilada como diluente. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,5 com NaOH 2M. Após o ajuste do pH, o meio de crescimento foi distribuído em erlenmeyers de 250mL (100mL de meio por erlenmeyer). Os erlenmeyers contendo o meio foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.4. Preparo do pré-inóculo

O inóculo foi preparado estriando o microrganismo em placas de petri contendo o meio TSY. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS, modelo Q 315 D26 a 50°C por 18 horas. Após este período, 5 mL do meio de crescimento foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250mL, contendo 100mL do respectivo meio de crescimento, incubadas por mais 18 horas a 50°C em “*shaker*” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA), operando a 150 rpm e posteriormente utilizadas para inocular o meio de crescimento. Este meio foi denominado pré-inóculo.

4.5. Crescimento do microrganismo

O meio de cultura foi inoculado com 4 mL de uma cultura de véspera (pré-inóculo) e incubado a 50°C em um “*shaker*” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA), operando a 150 rpm. Durante o estudo do perfil de crescimento do microrganismo, em intervalos de tempos predeterminados foram retiradas amostras em triplicata para determinação do crescimento, pH e da atividade enzimática.

4.6. Medida do crescimento e pH

O crescimento do microrganismo foi determinado pela medida da turbidez do meio de crescimento, medindo-se a Densidade Ótica a 600nm com a utilização de um espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240.

A determinação do pH foi utilizando o pHmetro da TECNAL.

4.7. Determinação da atividade enzimática

4.7.1. Determinação da atividade da α -amilase

A atividade da α -amilase foi determinada pelo incremento dos açúcares redutores na solução como resultado da ação da α -amilase sobre amido. A atividade foi determinada em amostras em triplicata, pela quantificação de açúcares redutores (glicose) através do método de Miller (1959). Uma mistura contendo 0,5 mL de extrato enzimático; 0,5 mL de uma solução de amido 0,5% em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,5 e mais 0,2 mL do mesmo tampão foi incubada a 90°C por 10 minutos. Após este período foi adicionado 1,0 mL do reagente de Miller (ácido 3,5- dinitrossalisílico) à reação. A mistura foi colocada em água em ebulição por 10 minutos, em seguida, resfriados em banho de gelo por 5 minutos e adicionados 4,8 mL de água destilada. A coloração desenvolvida foi medida através de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 540nm.

O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o reagente de Miller (ácido 3,5- dinitrossalisílico) foi adicionado juntamente com a

enzima à solução de amido 0,5% e, esta mistura foi colocada em água em ebulição como descrito anteriormente.

O teor de açúcares redutores foi determinado por meio de uma curva de glicose. Uma unidade da atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar redutor por minuto por mL a partir do amido solúvel nas condições do ensaio.

4.7.2. Determinação da atividade da protease

A atividade da protease foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 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 0,2M pH 8,5. Nesta análise, 0,5 ml do extrato enzimático foi colocado em 1,0 mL de substrato e incubado em banho-maria a 70°C por 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de TCA, centrifugada (Hermele Z 382K) a 15.000g por 5 minutos a 4°C e a mistura de reação colocada em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de uma solução de NaOH 1M (Janssem *et al.*, 1994). Paralelamente, foi feito um controle contendo todos os reagentes do ensaio, exceto que o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático.

A coloração desenvolvida foi medida através de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 420nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos.

4.7.3. Determinação de proteínas

A dosagem de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry, conforme modificações propostas por Peterson (1977), utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão. Os reagentes empregados foram os seguintes: Reagente A (carbonato de sódio, 20 g/L; NaOH 2 M, 50 mL/L; tartarato de sódio e potássio, 0,2 g/L), reagente B ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 g/L) e reagente C (50 partes do Reagente A e uma parte do Reagente B). A mistura de reação era constituída de 40 μL da amostra, 360 μL de água destilada e 2000 μL da solução C. Esta mistura foi agitada vigorosamente. Após o repouso da mesma por 15

minutos, foi adicionado 200 μ L do reagente de Folin. A mistura foi agitada novamente e em seguida deixada em repouso por mais 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que a amostra foi substituída por água destilada. A coloração desenvolvida foi medida através de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 750 nm.

4.8. Produção e purificação parcial das enzimas

O meio de crescimento (100 mL em erlenmeyer de 250 mL em triplicata) foi inoculado com 4mL do pré-inóculo e incubado em um agitador Thermo Forma Orbital Shaker (Ohio, USA) a 150 rpm e temperatura de 50°C. Após 36 horas de crescimento do microrganismo, o meio foi centrifugado a 4500g por 15 minutos a 4°C em centrífuga Heuzwet e as atividades enzimáticas da α -amilase e protease foram dosadas no sobrenadante livre de células. Posteriormente às dosagens, o sobrenadante foi tratado com NH_4SO_4 a 60% de saturação. Após 18 horas de repouso a 4°C, o caldo foi novamente centrifugado (9000g/30min.). Em seguida o precipitado formado foi ressuspensionado em tampão Fosfato 0,01M pH 7,5, e dialisado em membranas de diálise (Sigma Aldrich D0530-100 FT) contra o mesmo tampão a 4°C/18horas. Durante este período foi realizada a troca do tampão de 4 em 4 horas. A diálise ocorreu em beakers de 2 L mantidos sob leve agitação por agitador magnético TECNAL TE-0851. Ao final da diálise, as atividades enzimáticas foram novamente dosadas.

4.9. Liofilização

O extrato dialisado submetido à liofilização foi liofilizado em liofilizador LIOTOP L202. Após a liofilização, as atividades enzimáticas foram dosadas, para isto o liofilizado foi reconstituído com tampão Tris/HCl pH 8,5 na concentração de 1mg/mL e as análises determinadas conforme item 4.7. O material liofilizado foi mantido em congelador até o uso.

4.10. Caracterização parcial da α -amilase e protease no extrato dialisado

4.10.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da α -amilase e protease

O efeito da temperatura na atividade das enzimas foi determinado incubando-se a mistura de reação em temperaturas entre 40 e 100°C, com intervalos de 10°C, em pH 8,5 para a protease e α -amilase. Após 10 minutos de incubação em cada temperatura, a atividade enzimática foi determinada nas condições padrões descritas nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

A estabilidade térmica foi avaliada pela incubação do sobrenadante nas temperaturas de 70 e 80°C para protease e α -amilase por 1 hora em banho-maria. Em intervalos de 10 minutos, a atividade residual foi analisada nas temperaturas ótimas das enzimas. A atividade residual (%) foi obtida segundo descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

4.10.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da α -amilase e protease

O efeito do pH na atividade da amilase e proteases foi avaliado na faixa de 6,0 a 10,0 com intervalos de 0,5 unidades. As soluções tamponantes utilizadas foram tampão fosfato (pH 6,0-8,0), tampão Tris-HCl (pH 8,5-9,0) e tampão Bórax (pH 9,5-10,0).

O pH ótimo foi determinado preparando-se o substrato, amido 0,5% (p/v) e azocaseína 0,2% (p/v), nas soluções tampão com diferentes valores de pH. A partir daí, a reação foi executada conforme descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

A estabilidade da enzima em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se apenas o sobrenadante nas soluções tampão descritas anteriormente por 2 horas em temperatura ambiente. Após este tratamento, a atividade residual (%) da α -amilase e protease foi determinada conforme descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

4.11. Estabilidade dos extratos dialisados das enzimas proteases e α -amilases nas temperaturas usadas nas lavagens dos tecidos

Foi determinada e comparada a estabilidade do extrato dialisado e a estabilidade do extrato dialisado na presença de detergente a 25°C, 40°C e 55°C. Para este experimento foi utilizado o detergente Tixan® diluído em água destilada na concentração de 7 mg/mL para simular condições de lavagem (Banerjee *et al.*, 1999). A solução detergente foi fervida a 100°C durante 15 minutos para desnaturar quaisquer enzimas porventura presentes na formulação do detergente.

O extrato dialisado e o extrato dialisado adicionado à solução detergente 7mg/mL (na proporção de 1:1) foram incubados nas diferentes temperaturas durante 30 min. Em intervalos de tempo regulares (5, 10, 15 e 30 minutos) foram dosadas as atividades residuais da amilase e da protease. Foi considerada como 100% a atividade enzimática apresentada antes do período de incubação.

4.12. Desempenho das enzimas produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 na lavagem de EMPA 112

4.12.1. Lavagem usando extrato liofilizado

Para este experimento, pequenos tecidos (7 cm x 7 cm) sujos padrões EMPA 112 (tecidos sujos com cacau, leite e açúcar) (TEXCONTROL) foram utilizados. Os tecidos foram submetidos a diferentes tratamentos de lavagem utilizando frascos erlenmeyers de 500 mL contendo a solução de detergente e o extrato liofilizado das enzimas sob agitação de 150 rpm em “shaker” rotatório TECNAL TE-420. O detergente Tixan® foi utilizado para os testes de lavagem. O detergente foi diluído com água destilada a 7mg/mL e fervido por 15 minutos a fim de inativar as enzimas já existentes em sua formulação. Foram realizados os seguintes tratamentos de lavagem nos tecidos:

1. 50 mL de Água destilada
2. 50 mL de solução detergente
3. 50 mL de solução detergente + 1mg/mL do extrato liofilizado das enzimas.

As lavagens foram realizadas em triplicata, a 30°C e 50°C durante 15 minutos. Após a lavagem os tecidos foram enxaguados com água destilada por 5 minutos e secos em estufa TECNAL TE 393/I a 50°C por 40 minutos.

Comparativamente, a enzima protease comercial Savinase® (Sigma Aldrich), proveniente de *Bacillus* sp., foi diluída de maneira a apresentar atividade U/mL semelhante à atividade U/mL apresentada pela enzima protease de *Bacillus* sp. SMIA-2. A enzima Savinase® diluída 400x foi usada na lavagem do tecido EMPA 112 a 30°C e 50°C.

4.12.2. Lavagem usando extrato dialisado

Para este experimento, inicialmente, pequenos tecidos (7cm x 7cm) sujos padrões EMPA 112 (tecidos sujos com cacau, leite e açúcar) (TEXCONTROL) foram utilizados. Inicialmente a lavagem dos tecidos foi realizada em frascos erlenmeyers de 500 mL contendo a solução de detergente e o extrato dialisado das enzimas sob agitação de 150 rpm em “shaker” rotatório TECNAL TE-420. O detergente Tixan® foi utilizado para os testes de lavagem. O detergente foi diluído com água destilada a 7mg/mL e fervido por 15 minutos a fim de inativar as enzimas já existentes em sua formulação. Os tecidos foram submetidos à lavagem em triplicata por 15 minutos, enxaguados por 5 minutos e secos em estufa TECNAL TE 393/I a 50°C por 40 minutos.

Foram realizados os seguintes tratamentos de lavagem a 40°C nos tecidos:

1. 50 mL de água destilada
2. 50 mL de solução detergente
3. 50 mL de solução detergente + 1 mL de extrato enzimático (1,15 U/mL protease e 0,23 U/mL amilase)
4. 50 mL de solução detergente + 5 mL de extrato enzimático (5,35 U/mL protease e 1,15 U/mL α -amilase)
5. 50 mL de solução detergente + 10 mL de extrato enzimático (9,82 U/mL protease e 2,11 U/mL α -amilase)

Com objetivo de reduzir o volume de extrato usado nas lavagens dos tecidos, as lavagens passaram a ser feitas com tecidos EMPA 112 menores (5 x 5

cm²), em frascos erlenmeyers menores (250 mL) contendo a solução de detergente e o extrato dialisado das enzimas no volume total de 25 mL. Foram realizados os seguintes tratamentos de lavagem nos tecidos a 40°C:

1. 25 mL de água destilada
2. 25 mL de solução detergente
3. 20 mL de solução detergente + 5 mL de extrato enzimático (11,78 U/mL protease e 2,53 U/mL α -amilase)
4. 15 mL de solução detergente + 10 mL de extrato enzimático (23,56 U/mL protease e 5,03 U/mL α -amilase)
5. 10 mL de solução detergente + 15 mL de extrato enzimático (35,34 U/mL protease e 7,58 U/mL α -amilase)
6. 5 mL de solução detergente + 20 mL de extrato enzimático (47,12 U/mL protease e 10,11 U/mL α -amilase)

Os tecidos EMPA 112 (5 x 5 cm²) também foram lavados a 25 e 55° C por 15 minutos, em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo a solução de detergente e o extrato dialisado das enzimas nas seguintes condições:

1. 25 mL de Água destilada
2. 25 mL de solução detergente
3. 20 mL de solução detergente + 5 mL de extrato enzimático (11,78 U/mL protease e 2,53 U/mL α -amilase)
4. 10 mL de solução detergente + 15 mL de extrato enzimático (35,34 U/mL protease e 7,58 U/mL α -amilase)

4.13. Avaliação da detergência

Os tecidos EMPA 112 após a lavagem e secagem, foram submetidos à medida de cor utilizando o colorímetro de Hunter, Hunterlab Miniscan Spectrophotometer (HUNTER LAB).

Na escala de Hunter, o índice "L" mede a luminosidade variando de 0 (para amostra perfeitamente preta – mínima refletância) e 100 (para amostra perfeitamente branca – máxima refletância). O parâmetro "a" mede variações na faixa de cor verde (sinal negativo) ao vermelho (sinal positivo) e o parâmetro "b"

mede variações na faixa de cor azul (sinal negativo) ao amarelo (sinal positivo). Valores de “a” e “b” iguais a zero e $L = 50$ equivalem à cor cinza. Quanto maior a diferença das leituras do índice L entre os tecidos sujos padrão que foram lavados e os tecidos não lavados, maior é a detergência.

4.14. Análise Estatística

A média da diferença dos valores de cor foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SAS versão 9.0. Os efeitos das médias dos tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram utilizadas 3 repetições para cada teste. Os tecidos lavados e secos também foram fotografados.

4.15. Preparo das manchas nos tecidos

Foram preparados 3 tipos de tecidos manchados com substâncias ricas em amido e proteína. Tecidos de algodão medindo $5 \times 5 \text{ cm}^2$ foram mantidos submersos em beckers contendo gema de ovo (proteína), molho de tomate (amido) e Toddynho® (proteína e amido) por 2 minutos. Os tecidos manchados ficaram estendidos em varal à temperatura ambiente para que as manchas pudessem secar durante 24-36 horas.

4.16. Desempenho das enzimas na lavagem de tecidos manchados com gema de ovo, molho de tomate e Toddynho®

Os tecidos manchados ($5 \times 5 \text{ cm}^2$) com molho de tomate, gema de ovo e Toddynho® foram lavados a 40°C , em triplicata, sob agitação de 150 rpm em *shaker* rotatório TECNAL TE-420, por 15 minutos em erlenmeyers de 250 mL contendo a solução de detergente (diluído com água destilada a 7mg/mL e fervido por 15 minutos) e o extrato dialisado das enzimas nas seguintes condições:

1. 25 mL de Água destilada
2. 25 mL de solução detergente
3. 20 mL de solução detergente + 5 mL de extrato enzimático (11,78 U/mL protease e 2,53 U/mL α -amilase)

Os tecidos manchados com gema de ovo também foram lavados a 55°C para melhorar o desempenho das enzimas na remoção da mancha.

Após as lavagens todos os tecidos foram secos em estufa TECNAL TE 393/l a 50°C durante 40 minutos, comparados visualmente e fotografados.

4.17. Estabilidade ao armazenamento do extrato dialisado congelado

Paralelamente aos testes de lavagem, a estabilidade da atividade enzimática do extrato dialisado congelado foi acompanhada durante 60 dias. Durante este período, o extrato foi descongelado com 30 e 60 dias e as atividades enzimáticas dosadas a fim de determinar se estava havendo perda de atividade ao longo do tempo de armazenamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil de crescimento do microrganismo

O perfil do crescimento microbiano, pH do meio e atividade da α -amilase e proteases secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo amido solúvel (0,25%, p/v), proteínas do soro de leite (0,1%, p/v) e água de maceração de milho (0, 3%, p/v) são mostrados na Figura 2.

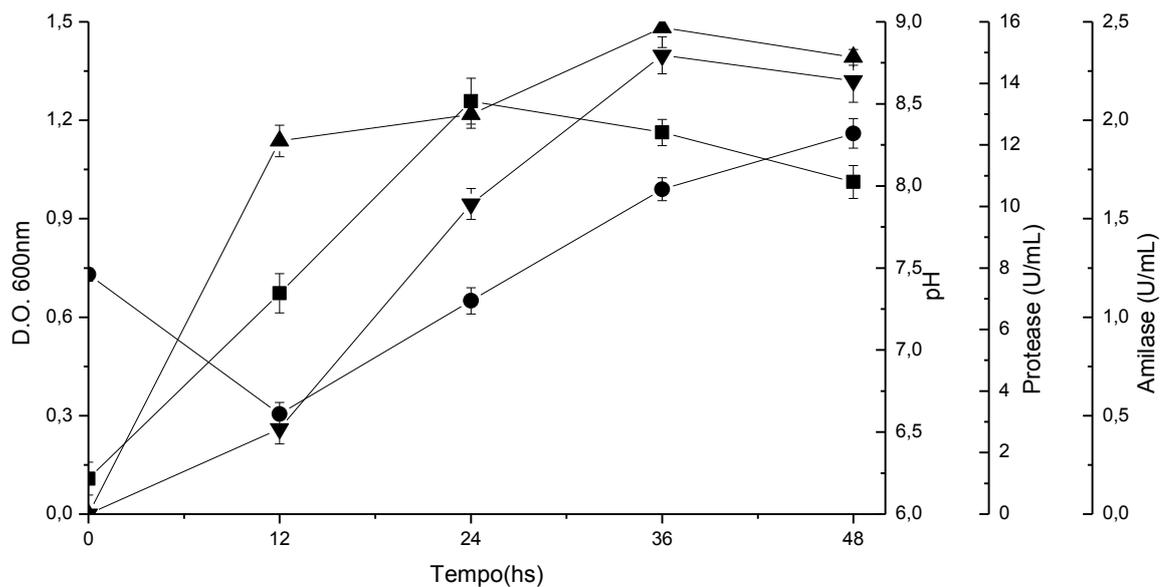


Figura 2. Crescimento (■), pH(●), atividade da protease (▼) e α -amilase (▲) de *Bacillus* sp SMIA-2 em culturas submersas contendo amido solúvel (0,25%, p/v), proteínas do soro de leite (0,1%, p/v) e água de maceração de milho (0, 3%, p/v) a 50°C.

O crescimento do microrganismo foi notado até 24 horas de incubação. *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de secretar proteases e α -amilase durante esta fase. No entanto, a maior atividade destas enzimas ocorreu ao fim da fase logarítmica e atingiu seu máximo com 36 horas de fermentação. Neste tempo, a atividade da amilase e da protease atingiu respectivamente 2,47 U/mL e 14,91 U/mL. Estes resultados sugerem que a indução efetiva destas enzimas não ocorre até que a fase estacionária seja alcançada e corroboram com os encontrados por Asgher *et al.* (2007), Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides (2004), para a síntese de α -amilases e com Gupta *et al.* (2002) que relataram que espécies de *Bacillus* produzem proteases extracelulares durante o final da fase logarítmica e início da fase estacionária.

Em relação ao pH do meio, notou-se uma queda nos valores de pH da cultura de 7,46 para 6,61 nas primeiras 12 horas de cultivo. Posteriormente, foi observado um aumento nos valores para 8,32 em 48 horas. Esta oscilação reflete quais reagentes são consumidos durante o processo fermentativo e fornece informações acerca do início e término da indução da síntese das enzimas, já que a secreção das mesmas está diretamente relacionada à concentração de nitrogênio disponível no meio (Kumar e Takagi, 2003).

5.2. Produção e purificação parcial das enzimas

De acordo com os resultados obtidos no estudo do perfil de crescimento do microrganismo, foi estabelecido o período de fermentação de 36 horas para a produção das enzimas por *Bacillus* sp. SMIA-2. As atividades enzimáticas foram dosadas ao final das 36 horas de fermentação, após a etapa de diálise e nas amostras dialisadas submetidas à liofilização. Em todas as fermentações realizadas, o processo da diálise possibilitou o aumento da atividade enzimática tanto para a protease quanto para a α -amilase, conforme mostrado na Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

A atividade enzimática da amilase aumentou de 2,52 U/mL para 12,9 U/mL após a diálise, enquanto a atividade da protease aumentou de 12,02 U/mL para 58,03 U/mL. Em relação à atividade específica (U/mg de proteína), a atividade enzimática da amilase aumentou de 7,20 U/mg para 17,92 U/mg após a diálise, enquanto a atividade da protease aumentou de 34,34 U/mg para 80,60

U/mg, representando assim incremento de aproximadamente 2,5 vezes para a amilase e 2,3 vezes para a protease.

Porém, a atividade total da α -amilase e da protease apresentada pelo extrato dialisado correspondeu respectivamente a 34,16% e 32,22% da atividade total, considerada 100%, apresentada pelas enzimas do extrato bruto. Estes valores são inferiores aos encontrados por Ashwini *et al.*, (2011), que relataram uma purificação para a α -amilase de 5,8 vezes e rendimento de 60% após o processo de diálise.

Tabela 3. Purificação parcial da α -amilase

Tratamento	Vol. Total (mL)	Atividade Total (U)	Atividade Enzima (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Específica atividade (U/mg protein)	Rendimento Atividade total (%)	Purificação (U/mg protein)
Extrato Bruto	3926	9893	2,5	0,35	1.374	7,20	100	1
Dialisado	262	3379	12,9	0,72	189	17,92	34,16	2,5

Tabela 4. Purificação parcial da protease

Tratamento	Vol. Total (mL)	Atividade Total (U)	Atividade Enzima (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Específica atividade (U/mg protein)	Rendimento Atividade total (%)	Purificação (U/mg protein)
Extrato Bruto	3926	47190	12,0	0,35	1374	34,34	100	1
Dialisado	262	15203	58,0	0,72	189	80,60	32,22	2,3

5.3. Liofilização

Parte dos extratos dialisados provenientes das fermentações realizadas foi submetida à liofilização. O material liofilizado obtido foi pesado e foi observado uma relação de 230 mg de material liofilizado/ 100 mL de extrato dialisado. Foi realizada a determinação da atividade enzimática na amostra liofilizada. Para isso, o liofilizado foi reconstituído com tampão Tris/HCl pH 8,5 na concentração de 1mg/mL. As tabelas 5 e 6 apresentam a influência da liofilização na atividade enzimática, considerando o volume de 100 mL do extrato dialisado submetido à liofilização.

Tabela 5. Influência da liofilização na atividade da amilase

Tratamento	Atividade Total (U)	Atividade Enzima (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Específica atividade (U/mg protein)	Rendimento Atividade total (%)
Antes liofilização	1290	12,9	0,72	72	17,91	100
Após liofilização	568	5,68	0,46	46	12,35	68,96

Tabela 6. Influência da liofilização na atividade da protease

Tratamento	Atividade Total (U)	Atividade Enzima (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína Total (mg)	Específica atividade (U/mg protein)	Rendimento Atividade total (%)
Antes liofilização	5800	58,0	0,72	72	80,55	100
Após liofilização	3630	36,3	0,46	46	78,91	62,59

Em relação à atividade apresentada pelo extrato dialisado antes da liofilização, a perda de atividade tanto para a amilase quanto para a protease depois da liofilização foi de 32% e 38%, respectivamente, considerando a atividade do extrato dialisado como 100%.

Embora o processo de secagem por liofilização seja um dos métodos mais adequados para a conservação de materiais biológicos, as proteínas raramente podem ser liofilizadas sem perda da atividade, geralmente associadas a alterações em sua conformação (Wang, 2000). Segundo Murgatroid *et al.* (1997), o congelamento é uma das etapas mais críticas de liofilização, já que a estrutura do produto, o tamanho e a forma são determinados após o congelamento. Esta estrutura não deve ser alterada durante o processo de liofilização, correndo-se o risco de ocorrer danos ou mesmo a perda do produto. Portanto, um agente estabilizante, por exemplo, um açúcar ou um poliálcool, normalmente é exigido (Wang, 2000).

5.4. Caracterização parcial da α -amilase e protease no extrato dialisado

Na determinação do pH ótimo a atividade da α -amilase e da protease foi maior em pH 8,5. Ambas as enzimas apresentaram os menores valores de atividade em pH 6 e 10. Em relação à máxima atividade obtida em pH 8,5, a α -amilase foi reduzida a 33 e 46% e a protease foi reduzida a 41 e 51%, respectivamente em pH 6 e 10 (Figura 3).

A amilase e a protease também apresentaram maior estabilidade em pH 8,5. Ambas as enzimas apresentaram estabilidade crescente até o pH 8,5. A amilase manteve 89% da sua atividade considerada ótima em pH 8,5, enquanto a protease manteve 77% (Figura 3).

Amilase de *Bacillus* sp. apresentou atividade ótima em pH 7 (Teodoro e Martins, 2000), enquanto a produzida por *Bacillus* sp. PN5 mostrou-se ativa e estável em pH 10. Cerca de 80 e 60% da atividade amilolítica ainda foi notada quando esta enzima foi incubada em tampão com pH 10 por 1 e 6 horas, respectivamente (Saxena *et al.*, 2007). Já Sajedi *et al.* (2005) concluíram que o pH ótimo da α -amilase secretada por *Bacillus* sp. KR-8104 estava entre 4 e 6. Proteases secretadas por *Bacillus pantotheneticus* em meio de cultivo contendo melaço foi mais ativa em pH 8,4 e estável em valores entre 7 e 11 (Shikha *et al.*, 2007).

A boa atividade e estabilidade de ambas as enzimas em altos valores de pH tornam possível a aplicação das mesmas na indústria de detergentes, já que estes costumam apresentar pH alcalino (em torno de 8- 12) (Sellami-Kamoun *et al.*, 2006).

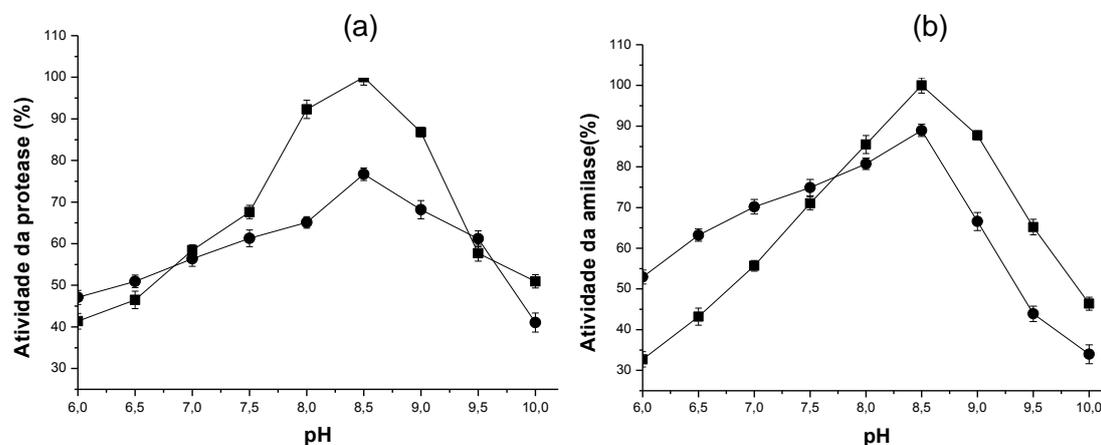


Figura 3. Atividade (■) e estabilidade (●) de extratos dialisados, contendo enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA-2, em diferentes pHs.

A influência da temperatura na atividade da α -amilase e protease secretadas por *Bacillus* sp. SMIA-2 também foi investigada. As temperaturas que proporcionaram as maiores atividades da α -amilase e proteases foram 90°C e 70°C, respectivamente (Figura 4), as quais são maiores ou similares às temperaturas ótimas encontradas para outras amilases (Burhan *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2008) e proteases (Genckal e Tari, 2006; Silva *et al.*, 2007) de cepas de *Bacillus* sp.

Além da temperatura ótima, a termoestabilidade das enzimas protease e amilase produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 foi analisada medindo-se a atividade residual da amilase a 90°C e das proteases a 70°C após incubação das mesmas, sem o substrato, durante 1 hora em temperaturas de 70 e 80°C.

Em relação à atividade ótima apresentada a 90°C, α -amilase manteve 52% da sua atividade quando incubada a 80°C e 48% da sua atividade quando incubada a 70°C. Já a protease não se manteve estável durante os 60 minutos em que ficou incubada. Nos cinco primeiros minutos a enzima perdeu 94 e 84% da atividade respectivamente a 80 e 70°C (Figura 5).

Amilase de *Bacillus* sp. PN5 teve sua atividade evidenciada a 90°C. Após 6 horas de incubação nesta mesma temperatura, a enzima ainda exibia 90% de atividade (Saxena *et al.*, 2007).

Em estudos com proteases de *Bacillus subtilis* as enzimas se mostraram mais ativas entre 37 e 45°C. No entanto, quando incubadas a 60°C durante 15, 30, 45, 90 e 120 minutos, cerca de 67, 47, 37, 28 e 24% da atividade enzimática ainda foi encontrada, respectivamente (Mukherjee, 2008).

Enzimas termotolerantes são aplicadas em variados setores industriais por prevenir a contaminação microbiana por mesófilos, tornar os reagentes mais solúveis facilitando a difusão dos mesmos e permitir que concentrações mais altas destes compostos sejam utilizadas (Van den Burg, 2003; Haki e Rakshit, 2003).

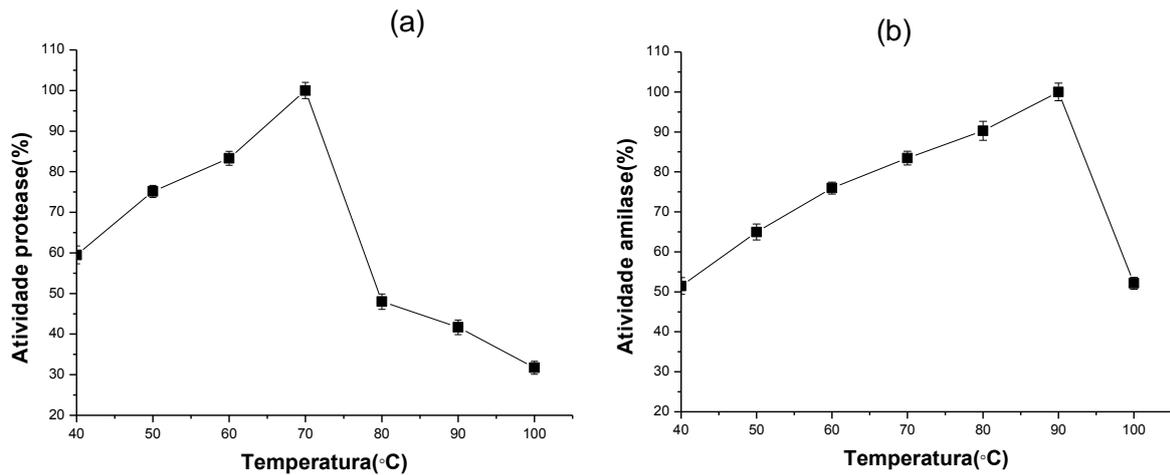


Figura 4. Temperatura ótima para atividade de extratos dialisados contendo enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA-2.

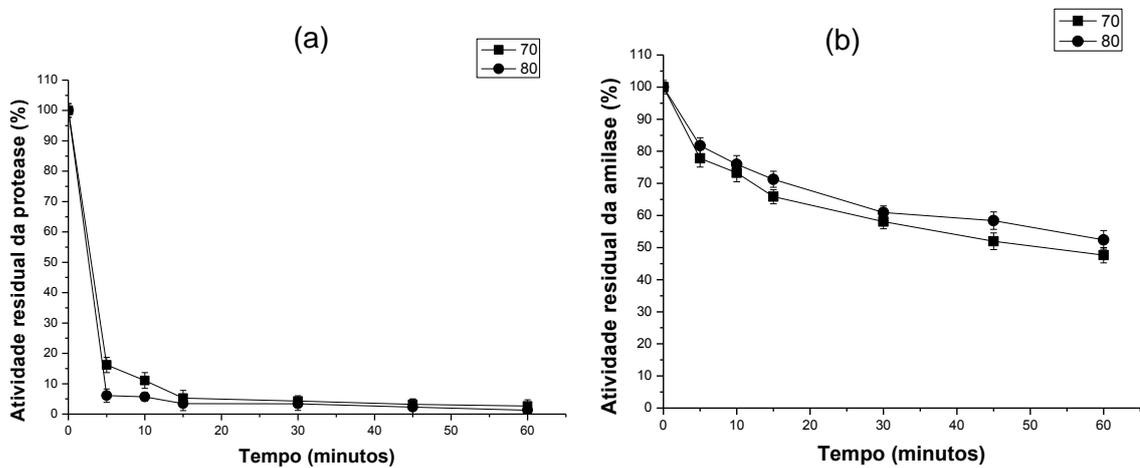


Figura 5. Estabilidade térmica de extratos dialisados contendo enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA-2.

5.5. Estabilidade de extratos dialisados contendo enzimas proteases e α -amilases nas temperaturas usadas nas lavagens dos tecidos

As enzimas proteases e amilases presentes no extrato dialisado foram estáveis quando incubadas por 30 minutos nas temperaturas 25, 40 e 55°C, como mostrado na Figura 6. Quando incubadas nas mesmas condições, porém na presença de um detergente comercial (Tixan®), a α -amilase manteve sua atividade durante o todo o período de incubação nas temperaturas testadas, entretanto a atividade da protease caiu drasticamente, quando incubada a 55°C (Figura 7).

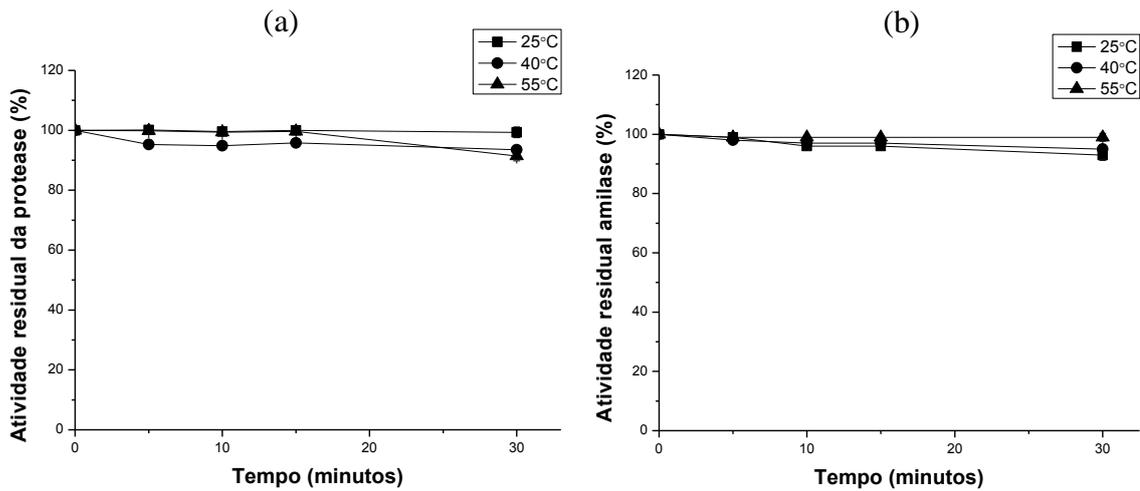


Figura 6. Estabilidade de extratos dialisados contendo enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA-2 incubados em diferentes temperaturas.

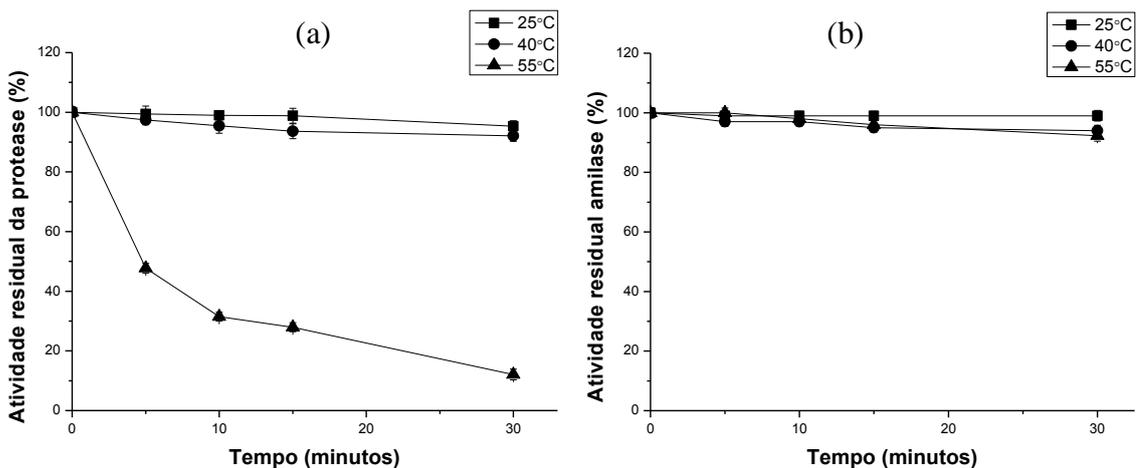


Figura 7. Estabilidade de extratos dialisados contendo enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA-2 incubados em diferentes temperaturas na presença do detergente Tixan®.

De acordo com os resultados relatados por Carvalho *et al.* (2008), a α -amilase produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2 quando incubada a 50°C sem a presença de detergente foi estável durante 1 hora. A enzima manteve cerca de 86%, 85% e 75% da atividade, após 20 minutos de incubação a 50°C, na presença de detergentes em pó das marcas: Omo®, Campeiro® e Tide®, respectivamente.

Correa (2009) também observou a perda de 32% da atividade da protease produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2 quando incubada a 50°C durante 120 minutos com detergente Campeiro®. De acordo com Godfrey e West (1996) todas as proteases adicionadas em detergentes podem ser estabilizadas com utilização da glicina juntamente com íons cálcio. Nascimento e Martins (2006) mantiveram 85% da estabilidade da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 quando incubada a 60°C por 1 hora, na presença de glicina e íons cálcio, com o detergente Tide®.

5.6. Desempenho de proteases e α -amilases produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 na lavagem de tecidos padrão EMPA 112

5.6.1. Lavagem de tecidos padrão EMPA 112 utilizando extratos liofilizados

Os extratos dialisados das enzimas proteases e α -amilases obtidos de culturas submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2 foram concentrados por liofilização e utilizados na lavagem de tecidos padrões EMPA 112, que são tecidos manchados com leite e chocolate. Os extratos liofilizados foram reconstituídos na concentração de 1mg/mL em tampão Tris HCl pH 8,5 e nestas condições apresentaram atividades enzimáticas de 15,50 U/mL para a protease e 3,04 U/mL para α -amilases. A média das refletâncias dos tecidos submetidos a diferentes condições de lavagem está mostrada na Tabela 7.

Tabela 7. Medidas da refletância de tecidos EMPA 112 submetidos a diferentes condições de lavagem usando enzimas liofilizadas

CONDIÇÕES DE LAVAGEM	PARÂMETRO L*	
	30°C	50°C
Água destilada	61,05 ^c	63,24 ^c
Água e detergente	65,56 ^b	65,30 ^b
Água, detergente e enzimas <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	68,48 ^a	68,62 ^a
Água, detergente e enzima Comercial	70,41 ^a	70,54 ^a

*Letras iguais (mesma coluna) não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey em nível 5% de significância.

A medida do parâmetro L do tecido EMPA 112 sem lavar foi de 61,09. De acordo com os resultados apresentados, a lavagem dos tecidos tanto a 30°C quanto a 50°C, utilizando proteases e α -amilases dialisadas e liofilizadas de *Bacillus* sp. SMIA2 adicionadas à solução do detergente Tixan® propiciou um aumento da média das refletâncias emitidas pelos tecidos quando comparadas aos tecidos lavados apenas com a solução detergente. Além disso, a refletância emitida pelos tecidos lavados com solução detergente adicionada das enzimas de *Bacillus* sp. SMIA-2 foi estatisticamente igual à refletância emitida pelos tecidos lavados com solução detergente adicionados de uma protease comercial Savinase®.

5.6.2 Lavagem de tecidos padrão EMPA 112 utilizando extratos dialisados das enzimas proteases e α -amilases

Os resultados da refletância emitida pelos tecidos EMPA 112 após a lavagem a 40°C utilizando 50 mL de solução detergente adicionado de extratos dialisados das enzimas proteases e α -amilases estão apresentados na Tabela 8. As concentrações do extrato enzimático que foram testadas não foram suficientes para que os tecidos EMPA 112, após a lavagem, diferissem estatisticamente dos tecidos lavados com detergentes sem adição do extrato.

Tabela 8. Medidas de refletância de tecidos EMPA 112 obtidas após a lavagem a 40°C utilizando o detergente Tixan® e extrato dialisado de proteases e α -amilases de *Bacillus* sp. SMIA-2

Lavagens a 40°C	Refletância*
50 mL água	62,09 ^b
50 mL Detergente	64,52 ^a
50 mL Detergente + 1,15 U/mL protease e 0,25 U/mL α -amilase	64,52 ^a
50 mL Detergente + 5,35 U/mL protease e 1,15 U/mL α -amilase	64,49 ^a
50 mL Detergente + 9,82 U/mL protease e 2,10 U/mL α -amilase	64,91 ^a

*Letras iguais não diferem estatisticamente.

A lavagem a 40°C dos tecidos EMPA 112 utilizando solução detergente Tixan® 25 mL e concentrações crescentes e maiores das enzimas proteases e α -amilases testadas anteriormente foi novamente realizada. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 9, a refletância emitida pelos tecidos após a lavagem com o detergente e as concentrações das enzimas testadas foram superiores e estatisticamente diferentes daquela apresentada pelos tecidos lavados apenas com o detergente. Portanto, todas as concentrações testadas contribuíram positivamente para a limpeza dos tecidos EMPA 112.

Tabela 9. Medidas da refletância de tecidos EMPA 112 submetidos a diferentes condições de lavagem a 40°C utilizando as enzimas proteases e α -amilases dialisadas de *Bacillus* sp SMIA-2. Letras iguais não se diferem estatisticamente

Lavagens a 40°C	Refletância*
25 mL água	62,09 ^c
25 mL Detergente	64,52 ^b
20 mL Detergente + 11,78 U/mL protease e 2,53 U/mL α -amilase	67,51 ^a
15 mL Detergente + 23,56 U/mL protease e 5,06 U/mL α -amilase	67,83 ^a
10 mL Detergente + 35,34 U/mL protease e 7,58 U/mL α -amilase	66,08 ^a
5 mL Detergente + 47,12 U/mL protease e 10,11 U/mL α -amilase	67,31 ^a

Com o objetivo de avaliar a influência da temperatura no desempenho das enzimas, a lavagem dos tecidos EMPA 112 também foi realizada nas temperaturas de 25° e 55°C (Tabela 10 e 11). Os tecidos lavados a 25°C utilizando apenas o detergente e o detergente adicionado de extrato enzimático dialisado não apresentaram diferença estatística entre si para a refletância, ou seja, nesta temperatura o desempenho da enzima não foi satisfatório (Tabela 10).

Já a temperatura de 55°C favoreceu a atuação das enzimas e os tecidos lavados com adição do extrato enzimático apresentaram a média dos valores da refletância superiores e estatisticamente distintos aos apresentados pelos tecidos

lavados só com detergente sem adição de extrato. As concentrações testadas a 55°C também apresentaram diferença estatística entre si, o volume de 10mL de detergente e 15mL de extrato enzimático apresentou o maior valor para a refletância comparado aos demais testados nas outras condições (Tabela 11). Os tecidos EMPA 112 lavados a 55°C são mostrados na Figura 8.

Tabela 10. Medidas da refletância de tecidos EMPA 112 submetidos a diferentes condições de lavagem a 25°C utilizando as enzimas proteases e α -amilases dialisadas de *Bacillus* sp SMIA-2. Letras iguais não se diferem estatisticamente

Lavagens a 25°C	Refletância*
25 mL água	62,68 ^b
25 mL Detergente	64,39 ^a
20 mL Detergente + 11,78 U/mL protease e 2,53 U/mL α -amilase	65,26 ^a
10 mL Detergente + 35,34 U/mL protease e 7,58 U/mL α -amilase	65,61 ^a

Tabela 11. Medidas da refletância de tecidos EMPA 112 submetidos a diferentes condições de lavagem a 55°C utilizando as enzimas proteases e α -amilases dialisadas de *Bacillus* sp SMIA-2. Letras iguais não se diferem estatisticamente

Lavagens a 55°C	Refletância*
25 mL água	63,00 ^d
25 mL Detergente	64,30 ^c
20 mL Detergente + 11,78 U/mL protease e 2,53 U/mL α -amilase	66,42 ^b
10 mL Detergente + 35,34 U/mL protease e 7,58 U/mL α -amilase	68,20 ^a

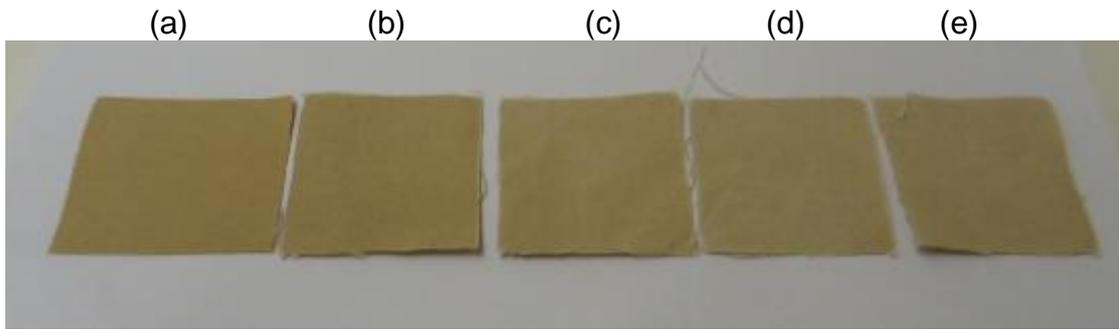


Figura 8. Efeito da solução “detergente-enzimas” na remoção de sujidades dos tecidos sujos padrão (EMPA 112) utilizando diferentes condições de lavagem a 55°C. (a) Tecido sem lavar, (b) Tecido após a lavagem com água, (c) Tecido após a lavagem com 25 mL detergente, (d) Tecido após a lavagem com 20 mL detergente e 5 mL enzimas, (e) Tecido após a lavagem com 10 mL detergente e 15 mL enzimas.

5.7. Desempenho das enzimas proteases e α -amilases dialisadas de *Bacillus* sp SMIA-2 na lavagem de tecidos manchados com diferentes alimentos

O desempenho das enzimas proteases e α -amilases dialisadas de *Bacillus* sp. SMIA-2 na lavagem de tecidos manchados com diferentes alimentos foi testado. Os tecidos foram lavados com 20 mL de solução detergente+ 5 mL de extrato enzimático (amilase 2,53 U/mL e protease 11,78 U/mL) por 15 minutos a 40°C.

O resultado da lavagem dos tecidos manchados inicialmente com molho de tomate em diferentes condições está mostrado na Figura 9. Quando comparada visualmente, a lavagem dos tecidos com detergente adicionados das enzimas de *Bacillus* sp SMIA-2, proporcionou uma melhor remoção das manchas de molho de tomate.

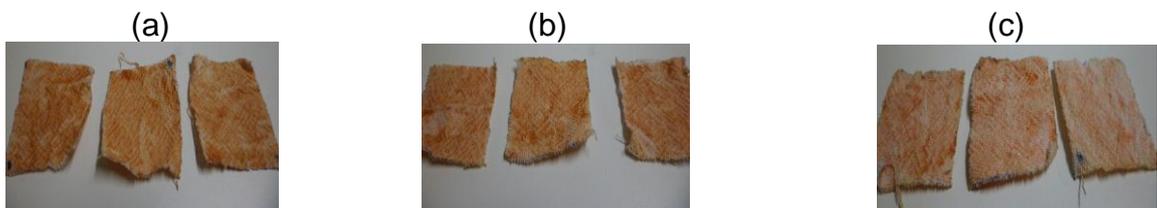


Figura 9. Remoção de manchas de tecidos sujos com molho de tomate utilizando diferentes condições de lavagem a 40°C. (a) Tecido após a lavagem com água, (b) Tecido após a lavagem com 25 mL detergente, (c) Tecido após a lavagem com 20 mL detergente e 5 mL enzimas.

O resultado da lavagem dos tecidos manchados com Toddynho® está mostrado na Figura 10. Quando comparada visualmente, a lavagem dos tecidos com detergente adicionado das enzimas de *Bacillus sp* SMIA-2, foi muito mais eficiente na remoção das manchas de chocolate.

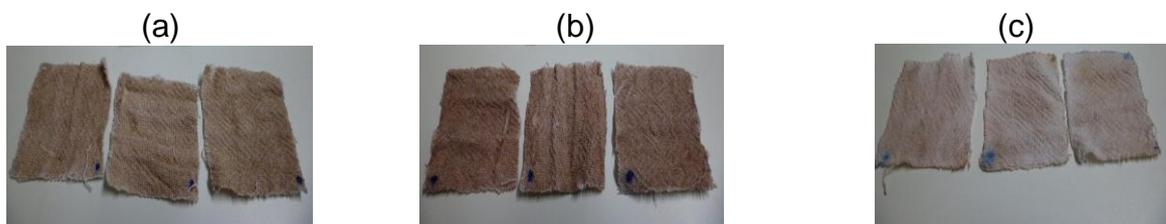


Figura 10. Remoção de manchas de tecidos sujos com Toddynho® utilizando diferentes condições de lavagem a 40°C. (a) Tecido após a lavagem com água, (b) Tecido após a lavagem com 25 mL detergente, (c) Tecido após a lavagem com 20 mL detergente e 5 mL enzimas.

Resultados similares foram encontrados para tecidos manchados com gema de ovo, em que a lavagem dos mesmos com detergente adicionado das enzimas proteases e α -amilases dialisadas de *Bacillus sp* SMIA-2 foi mais eficiente na remoção das manchas (Figura 11).

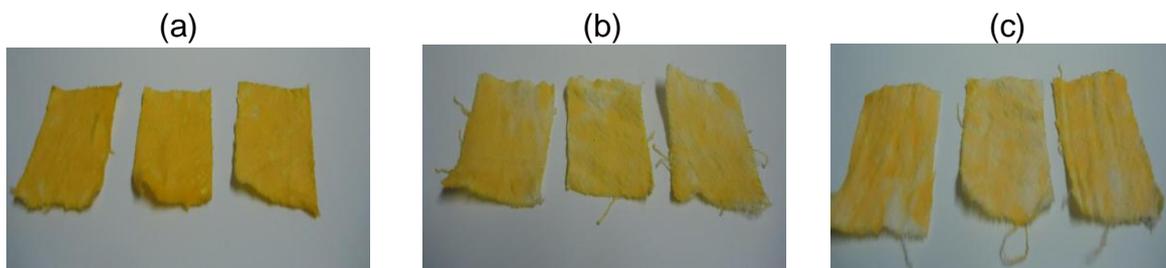


Figura 11. Remoção de manchas de tecidos sujos com gema de ovo utilizando diferentes condições de lavagem a 40°C. (a) Tecido após a lavagem com água, (b) Tecido após a lavagem com 25 mL detergente, (c) Tecido após a lavagem com 20 mL detergente e 5 mL enzimas.

A lavagem dos tecidos sujos com gema de ovo a 55°C removeu quase que completamente as manchas como mostrado na Figura 12, demonstrando a melhor eficiência das enzimas quando se aumentou a temperatura de lavagem. A concentração das enzimas foi a mesma usada na lavagem a 40°C, porém de

acordo com os resultados apresentados na figura 4, as atividades das enzimas protease e amilase foram maiores a 55°C do que a 40°C, o que justifica o melhor desempenho na lavagem a 55°C.

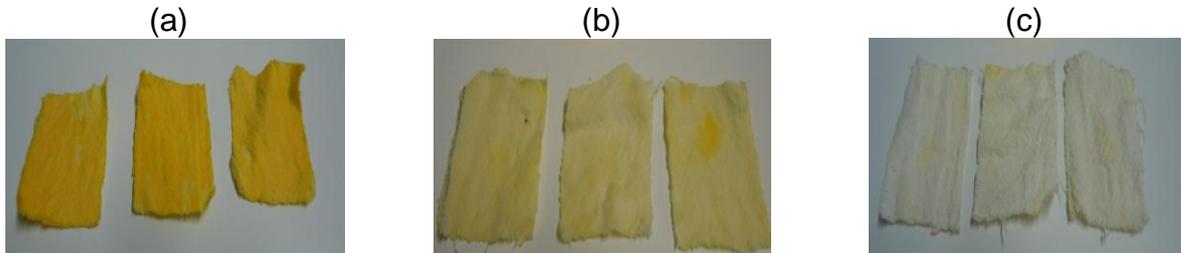


Figura 12. Remoção de manchas de tecidos sujos com gema de ovo utilizando diferentes condições de lavagem a 55°C. (a) Tecido após a lavagem com água, (b) Tecido após a lavagem com 25 mL detergente, (c) Tecido após a lavagem com 20 mL detergente e 5 mL enzimas.

Hmidet *et al.* (2009) conseguiram melhor desempenho na remoção de manchas de sangue, chocolate e molho “barbecue” em tecidos quando usaram solução detergente suplementadas com extrato enzimático contendo enzimas protease e amilase de *Bacillus licheniformis* NH1 nas lavagens a 50°C por 60 minutos.

Abidi *et al.* (2008) realizando lavagens de tecidos com manchas de sangue, chocolate e gema de ovo também conseguiram melhorar o desempenho na remoção das manchas quando adicionaram extrato enzimático (5 mL de proteases 1900U/mL) de fungo *Botrytis cinerea* a 50 mL de solução detergente.

5.8. Estabilidade ao armazenamento de extratos dialisados congelado

Os extratos dialisados das enzimas proteases e α -amilases produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA2 foram congelados e em intervalos de tempo definidos às atividades de ambas as enzimas foram determinadas. De acordo com os resultados apresentados na Figura 13, ao final de 60 dias a α -amilase manteve 90% da atividade inicial, enquanto a protease foi ainda mais estável e manteve 98% da sua atividade inicial. Portanto, esses resultados demonstram que o extrato dialisado apresentou boa estabilidade quando congelado.

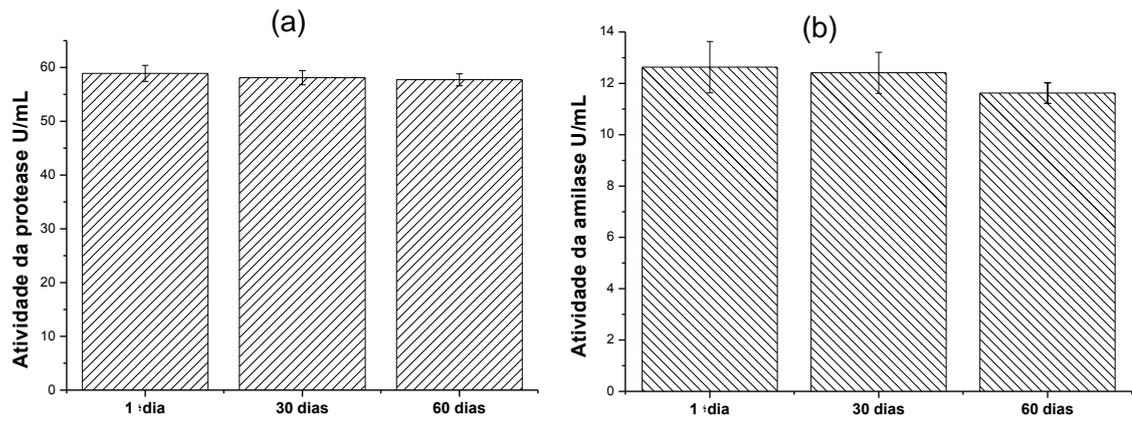


Figura 13. Estabilidade de extratos dialisados congelados das enzimas proteases (a) e α -amilases (b) produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA-2.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho foi avaliado o desempenho das enzimas, α -amilase e protease, produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp. SMIA-2, na remoção de manchas de Ketchup, gema de ovo e chocolate (Toddyho[®] e EMPA 112) em tecidos.

As enzimas foram coproduzidas por fermentações submersas de *Bacillus* sp. SMIA-2. Após a concentração por precipitação com sulfato de amônio e diálise, a atividade especificada da α -amilase que era de 7,20U/mg aumentou para 17,92 U/mg de proteína, assim como a atividade da protease que era de 34,34U/mg aumentou para 80,60U/mg de proteína.

Os extratos enzimáticos foram usados na lavagem dos tecidos. Também foram usados extratos dialisados e liofilizados nas lavagens. As α -amilase e protease produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 melhoraram o desempenho do detergente Tixan[®] (7mg/mL) quando foram adicionadas nas concentrações iguais ou superiores a 11,78 U/mL protease e 2,53 U/mL amilase, nas lavagens dos tecidos sujos padrão EMPA 112 realizadas a 40°C e 55°C.

A adição de enzimas no detergente Tixan[®] nas lavagens dos tecidos de algodão com mancha de gema de ovo, Ketchup e chocolate (Toddyho[®]) não só melhorou o desempenho do detergente, como também removeu quase completamente a mancha do Toddyho[®] dos tecidos lavados a 40°C e o da gema de ovo dos tecidos lavados a 55°C.

A α -amilase e a protease do extrato enzimático dialisado e congelado mantiveram 90% e 98% de estabilidade na sua atividade ao final do período de 60 dias.

O estudo de caracterização desse extrato dialisado revelou que o pH ótimo dessas enzimas é 8,5. Neste pH, a α -amilase manteve 89% de sua atividade e a protease manteve 77%. A temperatura ótima de atividade da protease foi 70°C, enquanto o da α -amilase foi 90°C.

As enzimas protease e α -amilase produzidas por *Bacillus* sp. SMIA-2 se mostraram eficientes na remoção de manchas de alimentos ricos em proteína e amido. Além disso, apresentaram características importantes e necessárias para o uso em detergentes enzimáticos, devendo, portanto, ser testadas em formulação de detergentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abidi, F.; Liman, F.; Negib, M.M. (2008). Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Process Biochemistry*. 43:1202-1208.
- Alberton, L. R.; Vandenberghe, L.P.S.; Assmann, R.; Fendrich, R.C.; Rodríguez-Leon, J.; Soccol, C. (2009). Xylanase production by *Streptomyces viridosporus* T7A in submerged and solid state fermentation using agro-industrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52:171-180.
- Andersen, L.P. (1998). Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. *US Patent*. 5: 834, 299.
- Anwar, A.; Saleemuddin, M. (1998). Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*. 64:175-183.
- Asgher, M.; Asad, M.J.; Rahman, S.U.; Legge, R.L. (2007). A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79:950-955.
- Ashwini K.; Gaurav Kumar; Karthik L.; Bhaskara Rao K. V. (2011) Optimization, production and partial purification of extracellular α -amylase from *Bacillus* sp. *Marini*. *Archives of applied Science Research*. 3: 33-42.
- Asoodeh, A.; Chamanic, J.; Lagziana, M. (2010). A novel thermostable, acidophilic α -amylase from a new thermophilic "*Bacillus* sp. *Ferdowsicus*" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 46:289-297.
- Atomi, H. (2005). Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 9:166-173.

- Azeredo, L.A.I.; Lima, M.B. de; Coelho, R.R.R.; Freire, D.M.G. (2006). A low cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp.594 using feather meal and corn steep liquor. *Current Microbiology*, 53:535-539.
- Babu, K.R.; Satyanarayana, T. (1995). α -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 30:305-309.
- Baldasso, C. (2008). Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.163 p.
- Banerjee, U.C.; Sani, R.K.; Azmi, W.; Soni, R. (1999).Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterisation as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*. 35:213-219.
- Banik, R.M.; Prakash, M. (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*. 159:135-140.
- Bon, E.P.S.; Gírio, F.; Pereira Jr., N.(2008). Enzimas na produção de etanol. In:Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.;Corvo, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado,Rio de Janeiro.Ed. Interciência p,241-271.
- Brena, B.M.; Pazos, C.; Franco-Fraguas, L.; Batista-Vieira, F. (1996). Chromatographic methods for amylases. *Journal of Chromatography*, 684: 217-237.
- Burhan, A.; Nisa, U.; Gokhan, C.; Omer, C.; Ashabil, A.; Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38:1397–403.
- Cai,Z.; Hakkinen, P.J.(2005). Detergent. *Encyclopedia of Toxicology*.739-742
- Carpenter, J.F.; Izutsu, k; Randolph, T.W.(1999). Freezing and drying induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives. In:Rey, L., Freezing- drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products.
- Carvalho, R.V.; Corrêa, T.L.R.; Silva, J.C.M.; Mansur, L.R.C.O.; Martins, M. L. L. (2008). Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:102-107.
- Comyns, A.E. (2009).The US industrial enzymes markets. *Focus on Surfactants*. 1:3-4
- Coronado, M.J.; Vargas, C.; Hofemeister, J.; Ventosa, A.; Nieto, J.(2000). Production and biochemical characterization of an α -amylase from the

moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiology Letters*. 183: 67-71.

Corradini, E.; Lotti, C.; Medeiros, E.S.; Carvalho, A.J.F.; Curvelo, A.A.S.; Mattoso, L.H.C. (2005). Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. *Polímeros*, 15:268-273.

Corrêa, T.L.R. (2009). Estudos sobre a co-produção da α -amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico. Tese (Mestrado em Produção vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 108 p.

Corrêa, T.L.R.; Moutinho, S.K.S; Martins, M.L.L.; Martins, M.A. (2011). Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. *Ciência Tecnologia de Alimentos*: 31: 843-848.

Dantas, M.E.; Aquino, L.C.L. (2010). Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 12 :81-87.

Deng, A; Wu, J; Zhang, Y.; Zhang, G.; Wen, T. (2010). Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. *Bioresource Technology*. 101:7100-7106.

Dey, S.; Maiti, T.K.; Saha, N.; Banerjee, R.; Bhattacharyya, B.C. (1991). Extracellular protease and amylase activities in ligninase-producing liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*. 26: 325-329.

Dhandapani, R.; Vijayaragvan, R. (1994). Production of thermophilic, extracellular alkaline protease by *B. stearothermophilus* AP-4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10:33-35.

Do Canto, W.L.; Menezes, T.J.B. (1995). Estudos Econômicos – Alimentos Processados: Produção, usos e mercado de enzimas. *Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL*. 29:1-53.

Egorova, K.; Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology*. 8:649-655.

Faria, L. (2010). Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloeosporioides* produzida por fermentação em substrato líquido. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)- Universidade Federal de Minas Gerais.

- Genckal, H.; Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:703-710.
- Gerhartz, W. (1990). General production methods. In: Enzymes in industry: production and applications. Weinheim (Alemanha): VCH. Cap.3, p.43-53.
- Godfrey, T.; West, S. (1996). Industrial Enzimology. 2d. Ed. Stockton Press Ed. US e Canadá, 609p.
- Gomes, E.; Guez, M.A.U.; Martin, N.; Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*. 30:136-145.
- Goyal, N.; Gupta, J.K.; Soni, S.K. (2005). A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microbial Technology*. 37:723-734.
- Graminha, E.B.N.; Gonçalves, A.Z.L.; Pirola, R.D.P.B.; Balsalobre, M.A.A.; Gomes, E.R.S (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 144: 1–22.
- Gupta, R.; Beg, Q.K.; Khan, S.; Chauhan, B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of alkaline protease. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60:381-395.
- Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.K.; Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 38:1599- 1616.
- Habert, A.; Borges, C.; Nobrega, R. (2006). Processos de separação por membranas. Rio de Janeiro: Ed. E-papers. 180p.
- Hadj-Ali, N.; Saxena, R.K.; Gupta, R. (2007). Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and microbial Technology*. 40: 515-523.
- Haki, G.D.; Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89:17-34.
- Hasan, F.; Ali Shah, A.; Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and microbial Technology*. 39:235-251.
- Hashim, S.O.; Delgado, O.; Hatti-Kaul, R.; Mulaa, F.; Mattiasson, B. (2004). Starch hydrolysing *Bacillus halodurans* isolates from a Kenyan soda lake. *Biotechnology Letters*. 26:823-828.
- Hmidet, N.; Bayouhd, A.; Berrin, J.G.; Kanoun, S.; Juge, N.; Nasri, M. (2009). Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from

Bacillus licheniformis NH1: Cloning, nucleotide sequence and expression of *amyN* gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. 43:499-510.

- Hough, D. W.; Danson, M.J. (1999). Extremozymes. *Current opinion in chemical Biology*. 3:39-46.
- Iefuji, H.; Chino, M.; Kato, M.; Imura, Y. (1996). Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochemical Journal*. 318:989-996.
- Janssen, P.H.; Peek, K.; Morgan, H.W. (1994). Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41:400-406.
- Jellouli, K.; Bougatef, A.; Manni, L.; Agrebi, R.; Siala, R.; Younes, I.; Nasri, M. (2009). Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio metschnikovii* J1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36:939-948.
- Jin, F.; Li, Y.; Zhang, C.; Yu, H. (2001). Thermostable α -amylase and β -galactosidase production from the thermophilic and aerobic *Bacillus* sp. JF strain. *Process Biochemistry*. 36:559-564.
- 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*. 37:139-144.
- Joo, H.S.; Chang, C.S. (2005). Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*. 40:1263-1270.
- Kamoun, A.S.; Haddar, A.; Ali, N.E.H.; Frikha, B.G.; Kanoun, S.; Nasri, M. (2008). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*. 163:299-306.
- Kim, T.U.; Gu, B.G.; Jeong, J.Y.; Byun, S.M.; Shin, Y.C. (1995). Purification and Characterization of a Maltotetraose-Forming Alkaline α -Amylase from an Alkalophilic *Bacillus* Strain, GM8901. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:3105-3112.
- Kiran, K.K.; Chandra, T.S. (2008) Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77:1023-1031.
- Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Microbiology*. 13: 345-351.
- Kissa, E. (1981). Wetting and Detergency. *Pure and Applied Chemistry*. 53:2255-2259.

- Konsula, Z.; Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*. 39:1745-1749.
- Krussmann, H. (1978). Evaluation of detergents for washing fabrics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 55:165
- Kumar, C.G.; Takagi, H. (1999). Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17:561-594.
- Ladisch, M.R. (2001). *Bioseparation Engineering*. New York: Wiley Interscience, 753p.
- Ladeira, S.A.; Andrade, M.V.V.; Delatorre, A.B.; Perez, V.H.; Martins, M.L.L. (2010) Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova*. 33:324-328.
- Liggett, R.W., Koffler, H. (1948). Corn steep liquor in microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 12:297-311.
- Lima, M.R. (2008). Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio. In: III Congresso Brasileiro de mamona, energia e Ricinoquímica. Salvador. Disponível em WWW.seagri.ba.gov.br/anais_mamona/ÓLEO%20E%20CO-PRODUTOS. Acesso em 27 mar 2012.
- Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (2001) *Biotecnologia industrial. V3: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. 1ªed. Editora Edgard Blucher Ltda. 616p.
- Lin, L.L.; Chyau, C.C.; Hsu, W.H. (1998). Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 28:61-68.
- Lucarini, A.C.; Kilikian, B.V.; Pessoa, A. (2005) Precipitação. In: Kilikian, B.V.; Pessoa, A. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri; Editora Manole, p 89-113.
- Luz, F.F. (2007). Desenvolvimento de um detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras e avaliação de sua viabilidade econômica de produção. Tese (Mestrado em Biologia celular e Molecular)- Porto Alegre- RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 145 p.
- Madamwar, D.; Shah, A.R. (2005). Xylanase production by a new isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry*. 40: 1763-1771.

- Madigan, M.T.; Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*. 2:265-269.
- Mahmood, A.U.; Greenman, J.; Scragg, A.H. (1998). Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial Technology*. 22:130-137.
- Matsubara, T.; Ben Ammar, Y.; Anindyawati, T.; Yamamoto, S.; Ito, K.; Iizuka, M.; Minamiura, N. (2004). Degradation of Raw Starch Granules by α -Amylase Purified from Culture of *Aspergillus awamori* KT-11. *Biochemistry and Molecular Biology*. 37:422-428.
- Maurer, K.H. (2004). Detergent proteases. *Current Opinion in Microbiology*. 15:330-334.
- McTigue, M.A.; Kelly, C.T.; Doyle, E.M.; Fogarty, W.M. (1995). The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* sp. IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology*. 17:570-573.
- Medda, S; Chandra, A.K. (1980). New Strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing Thermostable α -Amylase Active at Alkaline pH .*Journal of Applied Bacteriology*. 48:47-58.
- Merheb, C.W.; Cabral, H.; Gomes, E.; Silva, R. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*. 104:127-131.
- Miller, GL. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 3:426-428.
- Mitidieri, S.; Martinelli, A.H.S.; Schrank, A.; Vainstein M.H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*. A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*. 97:1217-1224.
- Morita, H.; Fujio, Y. (2000). Effect of organic nitrogen sources on raw starch-digesting glucoamylase production of *Rhizopus* sp. MKU 40. *Starch*. 52:18-21.
- Mukherjee, A.K.; Adhikari, H.; Rai, S.K.(2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation *Biochemical Engineering Journal*.39:353-360.
- Mulder, M.(1996). Basic Principles of membrane technology.2 Ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 564 p.
- Murgatroyd, K.; Butler,L.D.;Kinnarney, K; Monger,P.(1997). Good pharmaceutical freeze-drying practice, Peter Cameron(ed.)

- Murado, M.A.; González, M.P.; Torrado, A.; Pastrana, L.M. (1997). Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. *Process Biochemistry*. 32:35-42.
- Mussato, S.I.; Fernandes, M.; Milagres, A.M.F. (2007). Enzimas: poderosas ferramentas na indústria. *Instituto Ciência Hoje*. 41:28-33.
- Myers, A.M., Morell, M.K., James, M.G., Ball, S.G. (2000). Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology*, 122:989-997.
- Najafi, M.F.; Deobagkar, D.; Deobagkar, D. (2005). Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. *Protein Expression and Purification*. 41:349-354.
- Nascimento, W.C.A.; Martins, M.L.L. (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:91-96.
- Nascimento, W.C.A.; Martins, M.L.L. (2006). Studies on the stability of protease from *bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37:307-311.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. (2004). *Lenhinger: Princípios de Bioquímica*. 4ed. São Paulo; Savier 1119 p.
- Niehaus, F.; Bertoldo, C.; Kahler, M.; Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51:711-729.
- Nielsen, R.I.; Oxenboll, K. (1998). Enzymes from fungi: their technology and uses. *Mycologist*. 12:69-71.
- Oskouie, S.F.G.; Tabandeh, F.; Yakhchali, B. ; Eftekhar, F. (2008). Response surface optimization of medium composition for alkaline proteases production by *Bacillus clausii*. *Biochemical Engineering Journal*. 39:37-42.
- Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Soccol, V.T.; Sing, D.; Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 31:135-152.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochem.*, 83, 346-356.
- Pitombo, R.N.M. (2005). Liofilização. In: Pessoa Jr, A.P.; Kilikian, B.V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri, SP: Manole. p 332-348.
- Queiroz, J.A.; Tomaz, C.T.; Cabral, S. (2001). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*. 87:143-159.

- Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Gathe, M.S.; Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:597-635.
- Reddy, L.V.A.; Wee, Y. J.; Yun, J.S.; Ryu, H.W. (2008). Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*. 99:2242-2249.
- Rodríguez, V.B.; Alameda, E.J.; Gallegos, J.F.M.; Requena, A.R.; López, A.I.G.(2006). Thermal deactivation of a commercial α -amylase from *Bacillus licheniformis* used in detergents. *Biochemical Engineering Journal*. 27:299-304.
- Saeki, K.; Ozaki, K.; Kobayashi, T.; Ito, S. (2007). Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 103:501-508.
- Sajedi, R.H.; Naderi-Manesh, H.; Khajeh, K.; Ahmadvand, R.; Ranjbar, B.; Asoodeh, A.; Moradian, F. (2005). A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*. 36:666-671.
- Sarikaya, E.; Higasa, T.; Adachi, M.; Mikami, B. (2000). Comparison of degradation abilities of α - and β -amylase on raw starch granules. *Process Biochemistry*. 35:711-715.
- Sarrouh, B; Santos, TM; Miyoshi, A; Dias, R; Azevedo, V. (2012). Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *Journal Bioprocessing Biotechniques*
- Saxena, R.K.; Dutt, K.; Agarwal, L.; Nayyar, P. (2007). A highly thermostable and alkaline amylase from *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, 98:260-265.
- Sellami-Kamoun, A.; Haddar, A.; Ali, N. E-H.; Ghorbel-Frikha, B.; Kanoun, S.; Nasri, M. (2006). Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiological Research*. 163:299-306.
- Shikha; Sharan, A.; Darmwal, N.S. (2007). Improved production of alkaline from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. *Bioresource Technology*, 98:881-885.
- Showell, M.S.(2006). Handbook of detergents. Part D: Formulation. *CRC Press*. Boca Raton.USA.530 p.
- Sidhu, G.S.; Sharma, P.; Chakrabarti, T.; Gupta, J.K. (1997). Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*. 21:525-530.

- Silva, C.R.; Delatorre, A.B.; Martins, M.L.L. (2007). Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by a thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:253-258.
- Silva, M.A. (2011). Produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis*. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais). Universidade Católica de Pernambuco. 73 p.
- Slivinski, C.T. (2007). Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa. PR.
- Singh, J.; Batra, N.; Sobti, R.C. (2001). Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*. 36:781-785.
- Siso, M.I.G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*. 57:1-11.
- Sivaramakrishnan, S.; Gangadharan, D.; Nampoothiri, K.M.; Soccol, C.R.; Pandey, A. (2006). α -Amylases from Microbial Sources - An Overview on Recent Developments. *Food Technology Biotechnology*. 44:173-184.
- Smithers, G.W., Ballard, F.J., Copeland, A.D., Silva, K.J., Dionysius D.A., Francis, G.L., Goddard, C., Grieve, P.A., McIntosh, G.H. Mitchell, I.R., Pearce, R. J., Regester, O.G. (1996) Symposium: Advances in dairy foods processing and engineering. *Journal of Dairy Science*, 79:1454-1459.
- Stamford, T.L.M.; Stamford, N.P.; Coelho, L.C.B.B.; Araújo, J.M. (2001). Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardia* sp. Endophyte of yam bean. *Bioresource Technology*. 76:137-141.
- Souza, A. N.; Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32:271-275.
- Tatini Jr, V.; Parra, D.F.; Pitombo, R.N.M. (2006). Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42:127-136.
- Teodoro, C.E.S., Martins, M.L.L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 298-302.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6:213-218.

- Van Der Maarel, M.J.; Van Der Veen, B.; Uitdehaag, J.C.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*. 94:137-155.
- Villas-Bôas, S.G., Esposito, E. (2000). Bioconversão do bagaço de maçã. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 14:38-42.
- Vishwanatha, K.S.; Rao, A.G.A.; Singh, S.A. (2010). Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37:129-138.
- 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.
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal Pharmaceutical*. 203:1-60.
- Wiseman, A. (1985). Manual de Biotecnologia de los enzimas. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.
- Yuguo, Z.; Zhao, W.; Xiaolong, C. (2000). α -Amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 5:115-121.