

PROTEÍNAS DO SORO, AEROSIL® 200 E MALTODEXTRINA COMO
ADJUVANTES PARA ATOMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE PROTEASES E ESPOROS
DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* SMIA-2

DANIEL BARBOSA DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2026

PROTEÍNAS DO SORO, AEROSIL® 200 E MALTODEXTRINA COMO
ADJUVANTES PARA ATOMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE PROTEASES E ESPOROS
DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* SMIA-2

DANIEL BARBOSA DOS SANTOS

“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”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2026

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

S237

Santos, Daniel Barbosa dos.

PROTEÍNAS DO SORO, AEROSIL® 200 E MALTODEXTRINA COMO ADJUVANTES PARA ATOMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE PROTEASES E ESPOROS DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* SMIA-2 / Daniel Barbosa dos Santos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

48 f. : il.

Bibliografia: 41 - 48.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2026.
Orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

1. Proteases. 2. Endósporos. 3. Microencapsulação. 4. Bacillus. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630


PROTEÍNAS DO SORO, AEROSIL® 200 E MALTODEXTRINA COMO
ADJUVANTES PARA ATOMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE PROTEASES E ESPOROS
DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* SMIA-2

DANIEL BARBOSA DOS SANTOS


“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”

Aprovada em 21 de fevereiro de 2026


Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **JOAO BATISTA BARBOSA**
Data: 22/05/2026 14:33:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


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

Documento assinado digitalmente
 **LARISSA LEANDRO DA CRUZ**
Data: 22/05/2026 04:21:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Larissa Leandro da Cruz (D.Sc., Produção Vegetal) –
ACNC/UAMS/USDA-ARS

Documento assinado digitalmente
 **ERICA CRUZ**
Data: 20/05/2026 11:02:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Erica Cruz (Pós-doutoranda em Ciências de Alimentos/USP) – USP

Documento assinado digitalmente
 **MEIRE LELIS LEAL MARTINS**
Data: 19/05/2026 15:40:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2.....	4
3.2 Proteases.....	6
3.3 Secagem como método de conservação.....	9
3.4 Adjuvantes.....	9
3.4.1 Maltodextrina.....	10
3.4.2 Sílica Sintética Amorfa (Aerosil® 200).....	11
3.4.3 Proteínas do soro (<i>whey protein</i>).....	12
4 METODOLOGIA.....	13
4.1 Microrganismo.....	13
4.2 Produção de proteases e esporos pelo SMIA-2.....	13
4.3 Otimização das concentrações dos adjuvantes utilizados no processo de secagem por atomização.....	13
4.4 Determinação da atividade da protease.....	14
4.5 Contagem do número de esporos.....	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	16
5.1 Influência dos adjuvantes na coestabilização de proteases e esporos durante a secagem por atomização.....	16
5.2 Análises estatísticas sobre os efeitos dos adjuvantes na Atividade Residual de Protease e Contagem de Esporos.....	19
5.3 Otimização da formulação final e o impacto do Aerosil® 200 na qualidade do pó atomizado.....	29
6 CONCLUSÃO.....	33
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

RESUMO

SANTOS, Daniel Barbosa dos; M. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2026. Proteínas do soro, Aerosil® 200 e maltodextrina como adjuvantes para atomização simultânea de proteases e esporos de *Bacillus licheniformis* SMIA-2. Orientadora: Profª. Meire Lelis Leal Martins. Coorientadora: Drª Larissa Pacheco Ferreira.

Bacillus licheniformis SMIA-2 é um microrganismo esporulante e produtor de enzimas extracelulares, como a protease, com alto potencial biotecnológico industrial, podendo ser aplicado em diversos setores industriais. Porém, sem métodos adequados de conservação, há perda na atividade enzimática e na capacidade germinativa de seus esporos. Neste trabalho, a metodologia de superfície de resposta foi empregada para otimizar as concentrações de maltodextrina, proteínas do soro e Aerosil® 200 utilizadas como adjuvantes no processo de secagem simultâneo de proteases e esporos de SMIA-2. Os resultados mostraram que a atividade residual da protease foi significativamente influenciada pelos efeitos lineares e quadráticos dos adjuvantes, com destaque para a maltodextrina e as proteínas do soro, indicando comportamento não linear do sistema e a existência de regiões ótimas de formulação, estando em concentrações abaixo de 1% de ambos os adjuvantes. As superfícies de resposta evidenciaram que combinações baixas dos adjuvantes favoreceram maiores valores de atividade residual, enquanto concentrações altas resultaram em redução da resposta. A contagem de esporos apresentou elevada estabilidade em ampla faixa experimental, com valores superiores a 9 log UFC, evidenciando a alta resistência dos esporos ao processo de secagem por atomização. Conclui-se que a atomização simultânea de proteases e esporos de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 é tecnicamente viável. Todos os adjuvantes atuaram de maneira eficaz, contribuindo para a preservação da atividade enzimática, a viabilidade dos esporos e a obtenção de um produto em pó de melhor estabilidade e manuseio.

Palavras-chave: Proteases, endósporos, microencapsulação, *Bacillus*.

ABSTRACT

SANTOS, Daniel Barbosa dos; M. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2026. Whey proteins, Aerosil® 200, and maltodextrin as adjuvants for the simultaneous atomization of proteases and spores of *Bacillus licheniformis* SMIA-2. Advisor: D. Sc. Meire Lelis Leal Martins.

Bacillus licheniformis SMIA-2 is a spore-forming microorganism that produces extracellular enzymes, such as protease, and has high industrial biotechnological potential, applicable in various industry sectors. However, without adequate preservation methods, there is a loss in enzymatic activity and the germination capacity of its spores. In this work, response surface methodology was employed to optimize the concentrations of maltodextrin, whey proteins, and Aerosil® 200 used as adjuvants in the simultaneous drying process of proteases and spores of SMIA-2. The results showed that the residual protease activity was significantly influenced by the linear and quadratic effects of the adjuvants, especially maltodextrin and whey proteins, indicating non-linear behavior of the system and the existence of optimal formulation regions, being in concentrations below 1% of both adjuvants. Response surfaces showed that low concentrations of adjuvants favored higher residual activity values, while high concentrations resulted in reduced response. Spore counts showed high stability across a wide experimental range, with values exceeding 9 log CFU, demonstrating the high resistance of spores to the spray drying process. It is concluded that the simultaneous atomization of proteases and spores of *Bacillus licheniformis* SMIA-2 is technically feasible. All adjuvants were effective, contributing to the preservation of enzymatic activity, spore viability, and obtaining a powder product with better stability and handling.

Keywords: Proteases, endospores, microencapsulation, *Bacillus*.

1. INTRODUÇÃO

Bacillus licheniformis SMIA-2 se destaca como uma importante cepa na biotecnologia industrial devido à sua elevada capacidade de secreção de enzimas extracelulares e à habilidade de formar esporos altamente resistentes (Ferreira et al., 2025, Ferreira, 2023).

Entre as enzimas de maior relevância econômica produzidas por *Bacillus licheniformis* SMIA-2 estão as proteases alcalinas. Estas enzimas são amplamente empregadas nas indústrias de detergentes, alimentos, ração e processamento proteico (Adetunji et al., 2023).

A formação de esporos bacterianos com potencial probiótico de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 constitui um diferencial tecnológico fundamental para a sua aplicação em diversos setores industriais. Os esporos apresentam elevada resistência ao calor, à dessecação e ao pH ácido, permitindo sua incorporação em formulações submetidas ao processamento térmico, como rações peletizadas, além de aumentar a vida de prateleira dos produtos comerciais (Soares et al., 2023).

A transformação de enzimas e esporos bacterianos em produtos comercializáveis requer processos tecnológicos capazes de preservar funcionalidade, estabilidade e viabilidade durante o armazenamento e uso final. O processo de secagem por atomização (*spray dryer*) permite microencapsular compostos sensíveis ao calor, incluindo enzimas e células microbianas, criando uma matriz de proteção que minimiza danos térmicos e oxidação durante a remoção de água (Lopes et al., 2025). O processo é amplamente utilizado em biotecnologia industrial por sua escalabilidade, custo relativamente baixo e capacidade de produzir pós finos com boa reconstituição e ampla utilidade em diversos setores (Zhao et al., 2025). Devido a essas características, a secagem por atomização foi utilizada na secagem do *Bacillus Licheniformis*.

No caso de proteases microbianas, a secagem representa uma etapa crítica para a elaboração de formulações em pó que mantenham atividade enzimática e compatibilidade com matrizes sólidas (como detergentes em pó ou aditivos alimentares). A adição de protetores como maltodextrina, sacarose ou polióis

durante a secagem por atomização pode reduzir a perda de atividade enzimática durante o processo e o armazenamento das enzimas.

Em relação aos probióticos esporulados, a secagem é ainda mais estratégica. Ao produzir pós probióticos com esporos de *Bacillus*, a manutenção da viabilidade é essencial para garantir eficácia biológica e cumprir requisitos mínimos de contagem viável (geralmente acima de 10^6 – 10^9 UFC/g) até o momento do consumo ou aplicação. Esporos capazes de resistir a tratamentos térmicos e desidratantes são particularmente vantajosos para formulações alimentícias, rações animais e suplementos, já que retêm resistência à umidade, pH ácido e condições adversas de processamento, características inerentes a estruturas esporuladas como as de *Bacillus* spp (Lodi et al., 2024; Sommerfeld et al., 2024).

A escolha de agentes protetores e parâmetros operacionais (temperatura de entrada e saída, concentração de sólidos) é determinante para otimizar a estabilidade funcional de produtos secos. Neste trabalho foi desenvolvida uma formulação de agentes protetores contendo proteínas do soro (*whey protein*), Aerosil® 200 e maltodextrina para a secagem por atomização de proteases e esporos de *B. licheniformis* SMIA-2, de culturas submersas contendo amido solúvel, proteínas do soro e água de maceração de milho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e otimizar uma formulação de adjuvantes para o processo de secagem por atomização de esporos e proteases de *Bacillus licheniformis* SMIA-2, buscando preservar a viabilidade dos esporos e a atividade das enzimas na formulação em pó.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito combinado de diferentes concentrações de proteínas do soro, Aerosil® 200 e maltodextrina por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) no processo de secagem por atomização de esporos e proteases de *Bacillus licheniformis* SMIA-2;
- Analisar os resultados experimentais por meio de análise de variância (ANOVA) para validação do modelo matemático proposto;
- Determinar a estabilidade de esporos e proteases de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 durante o armazenamento a -18 °C, e;
- Obter uma formulação em pó contendo esporos e proteases de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 com potencial aplicação biotecnológica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Bacillus licheniformis* SMIA-2

Bacillus licheniformis SMIA-2 é uma bactéria aeróbica, termofílica e formadora de esporos, tendo sido isolada a partir dos solos em Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil por Souza e Martins (2001). É gram-positiva, móvel, com células de 1,2 µm por 5,3 µm e esporos subterminais a terminais. Cresce em pH 6,5–9,0, com ótimo crescimento em pH 7,0, e pode se desenvolver em temperaturas de até 70 °C, sendo o ideal 55 °C (Ferreira e Martins, 2021). É também reconhecida como GRAS (*Generally Recognised as Safe*) e QPS (*Qualified Presumption of Safety*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) e EFSA (*European Food Safety Authority*), respectivamente (Dutschei et al., 2022; EFSA Panel on Biological Hazards et al., 2024). Ou seja, ela é reconhecida como segura para uso e consumo humano por autoridades de segurança internacionais.

Bacillus licheniformis SMIA-2 é uma bactéria que produz enzimas hidrolíticas, como proteases, amilases, celulases e pectinases, em cultivos utilizando resíduos agroindustriais como substrato. Essas enzimas apresentam potencial para aplicações industriais devido à estabilidade em pH alcalino, boa atividade em altas temperaturas e compatibilidade com componentes de detergentes. Ensaio mostraram que as enzimas de SMIA-2 mantêm boa atividade na presença de detergentes comerciais, com variações dependendo da formulação. A desidratação das enzimas permite maior vida útil e conveniência no armazenamento e uso, consolidando seu potencial em processos tecnológicos e sustentáveis (Ferreira e Martins, 2025).

Pesquisas recentes demonstraram o potencial do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 na produção de enzimas estáveis por meio da secagem por atomização. Bolzan et al. (2022) otimizaram a secagem de proteases obtidas de culturas de SMIA-2, utilizando carboximetilcelulose e maltodextrina como adjuvantes. O processo, realizado a 110 °C, preservou a atividade enzimática e gerou pó estável por 180 dias à temperatura ambiente. Já Cruz et al. (2024) aplicaram goma arábica e celulose microcristalina para secar celulases extraídas de SMIA-2, conseguindo preservar as atividades das enzimas avicelase e carboximetilcelulase. Essas

enzimas mantiveram estabilidade em condições de armazenamento, destacando a versatilidade do SMIA-2 para produção sustentável de enzimas industriais.

O uso de espécies de *Bacillus* como probióticos tem ganhado atenção crescente nos últimos anos devido à sua capacidade de formar esporos altamente resistentes a condições ambientais adversas, o que favorece a sobrevivência durante a produção, armazenamento e passagem pelo trato gastrintestinal (Lee, Kim e Paik, 2019). Estudos sistemáticos indicam que *Bacillus licheniformis*, em particular, tem sido associado a modulação da microbiota intestinal, efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios e melhoria da digestão em modelos animais, sugerindo múltiplos mecanismos de ação benéfica (Olea, Ballesteros e Santoscoy, 2022). Pesquisas experimentais em suínos desmamados demonstraram que a suplementação dietética com probióticos à base de *Bacillus*, como *B. licheniformis* e *B. subtilis*, pode melhorar o desempenho de crescimento, reduzir a incidência de diarreia e modular positivamente a composição da microbiota intestinal (Mun et al., 2021).

A produção de proteases por microrganismos probióticos é um dos mecanismos funcionais que contribuem para a melhoria da digestão de proteínas dietéticas e para a modulação da microbiota intestinal, uma vez que estas enzimas hidrolíticas quebram proteínas complexas em peptídeos e aminoácidos, facilitando sua absorção e, simultaneamente, podendo interferir em interações com patógenos (Wang et al., 2021). Em cepas probióticas formadoras de esporos, como algumas de *Bacillus*, a capacidade de formar endósporos altamente resistentes permite que o microrganismo sobreviva a condições adversas, incluindo pH ácido do estômago, processamento industrial e armazenamento prolongado, garantindo a viabilidade até o local de ação no trato gastrintestinal. Esse atributo de esporulação não só amplia a estabilidade tecnológica e farmacêutica dos probióticos, mas também favorece a colonização transitória e o potencial de germinação em ambientes intestinais favoráveis, o que é considerado um diferencial em relação a probióticos não formadores de esporos (Popov et al., 2021).

3.2 Proteases

As enzimas são biomoléculas presentes nas células vivas de microrganismos, animais e plantas. Elas atuam como catalisadores biológicos, acelerando a velocidade das reações químicas ao reduzir a energia de ativação necessária para que essas reações ocorram, sem serem consumidas ou modificadas no processo. Por essa razão, são denominadas biocatalisadores, refletindo sua origem biológica. Assim como outras proteínas, as enzimas são compostas por uma ou mais cadeias longas de aminoácidos interligados. Cada enzima apresenta uma conformação específica, determinada pela sequência única de aminoácidos que a compõem, resultando em uma estrutura tridimensional particular (Kaushal, Singh e Arya, 2022).

Algumas dessas enzimas são as proteases, que são enzimas hidrolíticas que atuam como biocatalisadores para a clivagem de proteínas em peptídeos menores e aminoácidos (Sharma et al., 2019). As proteases representam um grupo de enzimas composto por diferentes tipos, incluindo proteinases, peptidases e amidases. As proteinases são responsáveis pela hidrólise de proteínas completas, resultando na formação de peptonas e aminoácidos. As peptidases atuam na degradação das peptonas, liberando aminoácidos, enquanto as amidases catalisam a hidrólise de aminoácidos, liberando amônia. De acordo com o pH em que atuam, as proteases podem ser classificadas como ácidas (pH 2,0–6,0), neutras (pH 6,0–8,0) ou alcalinas (pH 8,0–13,0). Essas enzimas possuem pesos moleculares que variam de 18 a 90 kDa. Diferentes tipos de proteases apresentam características distintas, como atividade catalítica, especificidade por substrato, intervalo de pH e temperatura, tipo do sítio ativo e perfis de estabilidade (Sharma et al., 2019).

As proteases são classificadas também em exopeptidases e endopeptidases, com base no local de ação em relação à cadeia polipeptídica. As exopeptidases atuam nos terminais da cadeia, sendo divididas em aminopeptidases, que removem resíduos do N-terminal, e carboxipeptidases, que agem no C-terminal, com algumas especializadas na remoção de cadeias laterais específicas. Já as endopeptidases clivam ligações internas da cadeia polipeptídica e são classificadas em seis principais grupos conforme o resíduo no sítio ativo: serina proteases, que utilizam um resíduo de serina para catalisar a clivagem; cisteína proteases, cuja

atividade depende de resíduos de cisteína e é sensível a agentes sulfidríla; metaloproteases, que necessitam de íons metálicos, como zinco, para sua atividade e estabilidade; aspárticas, que possuem resíduos de aspartato no sítio catalítico e atuam em pH ácido; proteases de treonina, que utilizam o resíduo de treonina para hidrolisar ligações peptídicas; e proteases glutâmicas, que possuem resíduo de ácido glutâmico no sítio ativo (Sharma et al., 2019; Rawlings e Bateman, 2019; Rawlings, 2020; Chakraborty et al., 2023).

Proteases podem ser produzidas por animais, vegetais e microrganismos. Das proteases de relevância econômica derivadas de animais destacam-se renina, quimotripsina, tripsina e pepsinas, fundamentais no processo digestivo (Irazoqui et al., 2024). A extração dessas enzimas depende do abate de gado, regulado por políticas agrícolas e políticas públicas. Como alternativa, a tecnologia de DNA recombinante pode ser usada para produzir essas proteases em larga escala (Ren et al., 2026). Além disso, elas são investigadas como métodos de biocontrole de pragas. A tripsina hidrolisa proteínas alimentares, atuando na extremidade carboxila de lisina ou arginina. Com peso molecular de 23,3 kDa, é eficiente a 37 °C e amplamente utilizada em cultura de tecidos, indústrias alimentícias e medicinais. A quimotripsina é ativada a partir do quimotripsinogênio pela tripsina, hidrolisando aminoácidos como fenilalanina, tirosina e triptofano. Empregada em diagnósticos e processos industriais, também é utilizada na hidrólise de proteínas do leite. A pepsina é usada para clivar aminoácidos como fenilalanina, triptofano e tirosina no N-terminal. (Gurumallesh et al., 2019).

As proteases vegetais mais abundantes são as cisteína proteases (CPs), seguidas pelas serina (SPs) e aspárticas (APs). As CPs possuem grupo sulfidríla como nucleófilo e atuam em pH 5-8 com pesos moleculares entre 25-30 kDa. Elas são importantes na defesa e mobilização de proteínas, sendo inibidas por iodoacetamida e benzoato de p-cloromercúrio. As SPs apresentam um resíduo serina como nucleófilo, atuam em pH 7-11 e temperaturas de até 50°C, com pesos de 20-120 kDa. Envolvem díades ou tríades catalíticas e estão associadas a processos como defesa contra patógenos e especialização de tecidos. Seus inibidores incluem diisopropil-fluorofosfato e o fenilmetilsulfonil fluoreto. As APs possuem resíduos aspárticos que ativam moléculas de água para catálise,

encontrando-se presentes nas folhas, sementes e flores de plantas. Possuem alta especificidade para aminoácidos hidrofóbicos, atuam em pH 4-6,5 e até 55°C, com pesos de 35-65 kDa. Proteases vegetais como papaína, bromelaína e ficina têm sido usadas industrialmente. Por exemplo, a papaína é usada na produção de queijos e hidrolisados proteicos; a bromelaína possui aplicações biomédicas como anti-inflamatória, fibrinolítica e antibacteriana; e a ficina pode hidrolisar fibras sintéticas (Troncoso et al., 2022).

As proteases microbianas representam cerca de dois terços das proteases comerciais globais, destacando-se pela alta produtividade, baixo custo, facilidade de manipulação genética e eficiência industrial. São amplamente utilizadas devido às suas propriedades desejáveis para aplicações industriais. *Bacillus* sp. é uma fonte importante de proteases alcalinas, que são frequentemente extracelulares e purificadas para uso comercial. Essas enzimas desempenham papéis vitais em atividades metabólicas e em setores industriais, como processamento de filmes fotográficos, detergentes e produção de hidrolisados de zeína (Razzaq et al., 2019).

As proteases microbianas são classificadas em seis categorias catalíticas: serina, proteases glutâmicas e de treonina, cisteína, aspártica e metaloproteases. Em *Bacillus* spp., apenas as categorias serina, cisteína, aspártica e metaloproteases estão presentes, desempenhando funções em três áreas principais: Controle de qualidade (remoção de proteínas não funcionais e defeituosas), regulação (ativação ou degradação de proteínas com funções transitórias) e nutrição (degradação de proteínas para obtenção de peptídeos e aminoácidos). Essas funções podem se sobrepor, como na eliminação de proteínas mal-dobradas ou na renovação de proteínas ribossômicas durante a fase estacionária. As proteínas celulares possuem uma meia-vida proteica definida, com algumas sendo rapidamente degradadas após cumprirem suas funções específicas, enquanto outras permanecem estáveis. A degradação também pode ser desencadeada por danos causados por espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, provenientes de processos oxidativos internos ou do ambiente (Harwood e Kikuchi, 2022).

3.3 Atomização como método de conservação

Por definição, a secagem é uma etapa do processamento de produtos, que remove grande parte da água dos mesmos, utilizando calor sob condições controladas. O processo deve equilibrar a umidade do produto com o ambiente de armazenamento, preservando sua aparência e qualidades nutritivas (Gava, Silva e Frias, 2009).

Um dos tipos de secagem muito utilizados nas indústrias e laboratórios é a secagem por atomização/pulverização. A secagem por atomização transforma amostras líquidas em pós úteis para diversas indústrias, como alimentícia, química, farmacêutica e manufatura. O processo envolve a atomização do líquido e o controle automatizado da termodinâmica para obter produtos de qualidade. Avanços em formulação, atomização, técnicas eletrostáticas, design de processo e escolha de gás de secagem têm melhorado a eficiência e a qualidade, resultando em pós estáveis, de fluxo livre e com morfologia ajustável para dispersão ou reidratação (Szczap e Jacobs, 2023).

A secagem por atomização pode ser usada para aumentar a estabilidade de determinados produtos, como, por exemplo, enzimas, que são muito usadas na indústria de alimentos, apesar de terem uma baixa estabilidade nas condições adversas da mesma. Este processo combina secagem e encapsulamento em uma única etapa, reduzindo o consumo de energia e simplificando a produção. Ele permite controlar características do produto, como tamanho e morfologia das partículas, além de encapsular componentes hidrofílicos e hidrofóbicos. Exemplos de sua utilização incluem a produção eficiente de lacase e bromelaína encapsulada para aplicações industriais, demonstrando seu potencial para criar partículas estáveis em empresas ambientalmente sustentáveis (Weng et al., 2023).

3.4 Adjuvantes

Durante o processo de secagem por atomização, enzimas podem sofrer perda de atividade devido a fatores como temperatura elevada, desidratação rápida e estresse mecânico, o que pode levar à desnaturação e agregação proteica. Para minimizar esses efeitos, é comum a adição de adjuvantes estabilizadores antes da atomização. Esses compostos atuam formando uma matriz protetora ao redor das

moléculas enzimáticas, reduzindo danos estruturais durante a secagem e o armazenamento. Entre os principais mecanismos de ação dos adjuvantes destacam-se a substituição das interações da água na estrutura da proteína, a formação de uma camada protetora ao redor da enzima e a redução da mobilidade molecular, o que contribui para maior estabilidade térmica e estrutural. Dessa forma, a presença desses compostos favorece a manutenção da atividade enzimática e melhora o rendimento do produto final em pó (Abdel-Mageed et al., 2020).

Alguns adjuvantes amplamente utilizados em processos de secagem por atomização incluem carboidratos, aminoácidos, surfactantes e polímeros. No presente estudo, foram utilizados maltodextrina, sílica sintética amorfa (Aerosil® 200) e proteínas do soro do leite (*whey protein*), que desempenham funções importantes na proteção e estabilização das enzimas e esporos durante o processo de secagem.

3.4.1 Maltodextrina

A maltodextrina é um polímero derivado do amido por hidrólise controlada, composto por D-glicose unida por ligações α -(1,4) e α -(1,6). Contém 2–3% de glicose e 5–7% de maltose, sendo transformada em pó branco higroscópico por pulverização. É levemente doce, solúvel em água e quase insolúvel em álcool. Seu grau de degradação do amido é medido pelo valor de dextrose equivalente, que varia de 3 a 20. A maltodextrina tem estrutura parcialmente baseada em amilose e amilopectina, formando redes contínuas em concentrações mais altas. Em solução, pode apresentar estrutura helicoidal hidrofóbica, permitindo a complexação com diversos compostos, o que influencia sua estrutura (Xiao et al., 2022).

Maltodextrinas são amplamente utilizadas na formulação de alimentos devido à sua capacidade de ajustar propriedades físico-químicas. Elas atuam como agentes espessantes, melhoram a doçura, evitam a cristalização, formam filmes protetores e encapsulam ingredientes bioativos para aumentar sua biodisponibilidade. O valor de dextrose equivalente é um fator-chave, influenciando higroscopicidade, viscosidade e temperatura de transição vítrea, sendo crucial na escolha da maltodextrina para aplicações específicas na indústria (Badin et al., 2025).

A maltodextrina também possui outras características úteis como solubilidade em água, insipidez, biodegradabilidade, economicidade e melhora da textura e da conservação de produtos ao proteger contra a umidade. A eficácia da maltodextrina varia conforme sua proporção, matérias-primas e condições de processamento, sendo necessários estudos para otimizar a formulação e preservar compostos bioativos (Paiva et al., 2023).

3.4.2 Sílica sintética amorfa (Aerosil® 200)

Partículas de sílica amorfa sintética podem ser produzidas como tipos seco, úmido e monodisperso, com áreas de superfície específicas entre 50 e 600 m²/g, correlacionadas a tamanhos primários de partículas entre 5 e 50 nm. Essas partículas formam microestruturas agregadas devido à ligação de hidrogênio entre grupos de silanóis, criando redes submicrométricas resistentes ao cisalhamento. Em suspensões, aumentos na fração volumétrica de sílica levam à formação de aglomerados devido a forças atrativas entre as microestruturas (Kawaguchi, 2020).

As nanopartículas Aerosil® 200, compostas de 99,8% de SiO₂ e conhecidas como sílica pirogênica, possuem tamanho de 5 a 50 nm, com área de superfície específica de 200 m²/g, e estão disponíveis em formas hidrofílicas e hidrofóbicas. Amplamente utilizadas como agentes de fosqueamento, espessantes e preenchimento em adesivos e revestimentos, também atuam como dessecantes para controle de insetos. Classificada como não cancerígena pelo IARC (Grupo 3), a sílica amorfa é considerada segura pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (Abdelfattah e Zein, 2019).

Em relação à secagem por pulverização, o Aerosil® 200 atua como estabilizador de dispersão, formador de poros e agente de deslizamento de pó. No estudo de Koleva e Tzachev, 2024, em que tiveram como objetivo aumentar a solubilidade em água de eugenol, definiram que as formulações contendo Aerosil® 200 obtiveram ótimo rendimento, fluidez do pó, quantidade total de eugenol carregado e eficiência de encapsulamento.

3.4.3 Proteínas do soro do leite (*whey protein*)

As principais proteínas do leite são caseínas, que causam coagulação, e proteínas do soro, extraídas enzimaticamente, como α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, albumina do soro bovino e imunoglobulinas, ricas em aminoácidos de cadeia ramificada. Essas proteínas compõem o *whey protein*, amplamente utilizado por atletas e praticantes de exercícios para aumentar a síntese proteica, a massa muscular magra e o desempenho esportivo (Vasconcelos, Bachur e Aragão, 2020).

Em relação à secagem em spray, essas proteínas possuem excelente capacidade de formação de filme e alta solubilidade, sendo eficazes como adjuvante quando combinadas com maltodextrina. Essa combinação melhora o revestimento superficial, eleva a temperatura de transição vítrea e reduz a rugosidade das partículas, evitando a absorção de umidade. O filme proteico formado aumenta a resistência à oxidação, melhora a emulsificação e reduz interações com as paredes do secador, resultando em maior rendimento e vida útil prolongada do produto final (Guirlanda, Alvim e Takahashi, 2023).

4. METODOLOGIA

4.1 Microrganismo

A cepa bacteriana utilizada neste estudo foi a *Bacillus licheniformis* SMIA-2, previamente isolada por Souza e Martins (2001). Todo o projeto do genoma do SMIA-2 foi depositado no DDBJ/ENA/GenBank sob o número de acesso JAACZZ000000000 (Bernardo et al., 2020).

4.2 Produção de proteases e esporos pelo SMIA-2

Para a produção simultânea das proteases e esporos pelo SMIA-2, o seguinte meio de cultura foi utilizado (gL^{-1}): KCl (0,3), MgSO_4 (0,5), K_2HPO_4 (0,87), CaCl_2 (0,29), ZnO ($2,03 \times 10^{-3}$), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($2,7 \times 10^{-2}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \times 10^{-2}$), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($8,5 \times 10^{-4}$), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($2,4 \times 10^{-3}$), $\text{NiCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($2,5 \times 10^{-4}$), H_3BO_3 ($3,0 \times 10^{-4}$), água de maceração de milho (Sigma Aldrich) (3,0), proteínas do soro (1,0) e amido solúvel (5,0). O pH foi ajustado para 7,0 com uma solução de 1,0 M de NaOH e autoclavado a uma temperatura de 121 °C a 1 atm, por 15 minutos.

O meio de cultura (50 mL de meio de cultura em erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 1mL de uma cultura padrão incubada durante um período de 36 horas (número inicial de células 10^4) e incubado a 50 °C em um agitador orbital (Thermo Forma, Ohio, EUA) operando a 150 rpm. Após 36 horas de crescimento, o caldo da fermentação foi submetido à secagem por atomização.

4.3 Otimização das concentrações dos adjuvantes utilizados no processo de secagem por atomização

Para a otimização das concentrações dos adjuvantes que foram adicionadas ao caldo da fermentação, foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) do tipo 2^3 , em relação às variáveis independentes: concentração das proteínas do soro (*whey protein*), concentração do Aerosil® 200 e concentração da maltodextrina; com três repetições do ponto central e seis pontos axiais, totalizando 17 ensaios. Os níveis das variáveis independentes, definidos a partir de estudos realizados por Bolzan et al., 2022, estão apresentados na Tabela 1.

A análise estatística dos dados obtidos foi submetida à análise de variância

e posteriormente gerado modelos de superfície de resposta, utilizando o programa Statistica versão 5.0. As respostas avaliadas foram atividade residual da protease (U/mL) e contagem de esporos (log UFC).

Tabela 1. Representação do planejamento experimental DCCR com os níveis das variáveis independentes: concentração proteínas do soro, Aerosil® 200 e maltodextrina

Variáveis (% p/v)		Níveis				
		- 1,68	- 1,0	0	+1,0	+ 1,68
Proteínas do soro	X_1	0	0,40	1	1,60	2
Aerosil® 200	X_2	0	0,2	0,5	0,8	1
Maltodextrina	X_3	0	0,40	1	1,60	2

A metodologia para a secagem por atomização da protease e dos esporos do SMIA-2 foi baseada nos trabalhos de Bolzan et al., 2022.

As proteínas do soro do leite, o Aerosil® 200 e a maltodextrina foram incorporados à solução enzimática antes da secagem por atomização (LAB-PLANT, MODELO SD-04, Inglaterra). Durante a operação, o caldo da fermentação mais os adjuvantes foram alimentados a uma taxa constante, 5,40 mL/min com uma bomba peristáltica para um bico, onde a atomização ocorreu por meio de um fluxo de ar pressurizado. A temperatura de entrada do ar mais seco usada no processo foi de 110 °C.

4.4 Determinação da atividade da protease

A atividade da protease foi avaliada em triplicata, medindo a liberação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético de 0,2% (p/v) de azocaseína preparada em tampão Tris/HCl 0,1 M (pH 8,5). A mistura de reação contendo 0,5 mL de solução de azocaseína e 0,5 mL de concentração apropriada de solução enzimática foi colocada em banho-maria por 70 °C por 10 min, resfriando-a logo em seguida (Jenssen et al., 1994). A reação de 1 mL foi encerrada pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 15% (p/v) e centrifugada a 15000 rpm por 5 min. A absorbância dos azopeptídeos não precipitáveis, produzidos como resultado da atividade

proteolítica, foi medida a 420 nm e corrigida com um branco de reagentes. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento de absorvância de 1,0 a 420 nm em 60 minutos.

4.5 Contagem do número de esporos

Para a contagem do número de esporos nas amostras secas, o procedimento descrito por Cruz (2021) foi adotado. As amostras ($0,015\text{g.mL}^{-1}$) foram submetidas a um choque térmico ($80^{\circ}\text{C}/10$ min) utilizando-se banho-maria e resfriadas imediatamente em banho de gelo (Rabinovitch & Oliveira, 2015). A seguir, foram realizadas diluições decimais seriadas empregando-se solução salina 0,85% (m/v). A partir das diluições preparadas, as alíquotas do material foram semeadas em meio TSY, incubadas a 50°C por 12h e os resultados das contagens obtidas foram expressos como UFC/mL de esporos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Influência dos adjuvantes na coestabilização de proteases e esporos durante a secagem por atomização

A secagem por atomização de caldo fermentado obtido de culturas submersas de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 contendo 0,5% (p/v) de amido solúvel, 0,3% (p/v) de proteínas do soro e 0,3% (p/v) de água de maceração de milho; e incubadas por 36 horas a 50° C. O caldo fermentado obteve 6,32 U/mL de proteases e contagem de esporos de 9,85 log UFC.

A síntese de proteases está frequentemente associada à transição da fase exponencial para a fase estacionária, período em que ocorre o início da esporulação. Essa regulação coordenada permite que, sob limitação nutricional, as células secretem enzimas hidrolíticas para obtenção de nutrientes, enquanto parte da população inicia a diferenciação em esporos metabolicamente dormentes e altamente resistentes ao calor, à dessecação e a agentes químicos.

Tradicionalmente, a produção industrial de enzimas envolve etapas subsequentes de clarificação e purificação do caldo fermentado, que podem representar uma fração significativa do custo total do processo, dependendo do grau de pureza requerido (Cunniffe et al., 2025). No entanto, para aplicações técnicas — como detergentes e processos de hidrólise industrial — a pureza elevada não é um requisito essencial, uma vez que a atividade catalítica e a estabilidade operacional são os principais parâmetros de interesse (Raina, Kumar e Saran, 2022). Nesse contexto, a utilização direta do caldo fermentado como matéria-prima para secagem surge como alternativa estratégica para redução de custos e simplificação do processo produtivo. Da mesma forma, quando o processo de secagem por atomização de esporos de *Bacillus* é realizado diretamente a partir do caldo fermentado, elimina-se a etapa de separação e lavagem celular, reduzindo custos e tempo de processamento.

Os resultados obtidos após a finalização da secagem de todos os ensaios e a análise da atividade residual de protease e contagem de esporos estão representados na Tabela 2, assim como o peso resultante de cada pó produzido. De todos os ensaios realizados, apenas a amostra 1, que foi submetida à secagem na

presença de 0,4% (p/v) de proteínas do soro, 0,2% (p/v) Aerosil® 200 e 0,4% (p/v) maltodextrina conseguiu manter atividade de protease (128%), sendo seu percentual maior que a amostra controle (6,32 U/mL⁻¹). Para os demais ensaios, houve uma variação entre 22,67 e 85,75%. Já na contagem de esporos, houve uma variação de 8,62 e 10,66 log UFC, demonstrando que, após o processo de secagem, as colônias formadoras de esporos não foram afetadas.

Tabela 2. Matriz DCCR 2³ (valores reais e condicionais) e suas respostas

Amostra	Proteínas do soro (%)	Aerosil® 200 (%)	Malto dextrina (%)	Rendimento das amostras (g)	Contagem de esporos (log UFC)	Atividade residual da protease (%)
1	0,4 (-1)	0,2 (-1)	0,4 (-1)	0,362	9,95	127,99
2	1,6 (+1)	0,2 (-1)	0,4 (-1)	0,567	9,22	48,96
3	0,4 (-1)	0,8 (+1)	0,4 (-1)	0,412	10,26	47,18
4	1,6 (+1)	0,8 (+1)	0,4 (-1)	0,448	9,52	27,04
5	0,4 (-1)	0,2 (-1)	1,6 (+1)	0,703	9,06	85,75
6	1,6 (+1)	0,2 (-1)	1,6 (+1)	1,027	8,82	46,23
7	0,4 (-1)	0,8 (+1)	1,6 (+1)	1,034	8,37	50,73
8	1,6 (+1)	0,8 (+1)	1,6 (+1)	1,229	9,36	22,67
9	0 (-1,68)	0,5 (0)	1 (0)	0,583	9,72	58,96
10	2 (+1,68)	0,5 (0)	1 (0)	1,179	7,95	24,64
11	1 (0)	0,5 (0)	1 (0)	0,885	9,21	79,86
12	1 (0)	0,5 (0)	1 (0)	0,796	8,62	71,12
13	1 (0)	0,5 (0)	0 (-1,68)	0,459	8,72	55,29
14	1 (0)	0,5 (0)	2 (+1,68)	1,171	8,67	45,66
15	1 (0)	0,5 (0)	1 (0)	0,396	9,37	54,91
16	1 (0)	0,5 (0)	1 (0)	0,861	10,66	58,45
17	1 (0)	0,5 (0)	1 (0)	0,795	10,02	30,78

A secagem por atomização (*spray drying*) de proteases produzidas por *Bacillus*, na presença de adjuvantes, é uma estratégia muito usada para estabilizar a enzima, facilitar o armazenamento, o transporte e ampliar a sua aplicação industrial. Bolzan et al. (2022) demonstraram que a maltodextrina exerceu papel fundamental na preservação da atividade proteolítica de proteases produzidas pelo *Bacillus licheniformis* SMIA-2 submetidas ao atomizador. No referido estudo, a utilização de 1,0% (m/v) de maltodextrina resultou em maior atividade residual da protease após a secagem, quando comparada a formulações sem esse adjuvante. Esse efeito foi atribuído à capacidade da maltodextrina de formar uma matriz vítrea ao redor da enzima durante a atomização, reduzindo a mobilidade molecular e, conseqüentemente, os danos estruturais induzidos pelo calor e pela rápida remoção de água.

Segundo Bolzan (2022), a combinação da maltodextrina (1%, p/v) e Aerosil® 200 (0,5-1,0 % , p/v) gerou pós com níveis satisfatórios de atividade enzimática e estabilidade após 180 dias de armazenamento à temperatura ambiente, com recuperação de atividade em torno de aproximadamente 80% e rendimento de massa aceitável. Desta forma, a utilização de formulações combinadas de maltodextrina e Aerosil® 200 (SiO₂ coloidal) na secagem de proteases, permite associar proteção conformacional da enzima à estabilidade física do pó obtido. A maltodextrina atua como agente protetor durante a secagem por atomização, formando uma matriz amorfa que reduz a desnaturação térmica e interfacial. O Aerosil® 200, adicionado em baixas proporções (0,5–2%, p/p), contribui principalmente para a redução da higroscopicidade, melhoria da fluidez e maior estabilidade durante o armazenamento, atuando como agente anti-aglomerante e adsorvente de umidade residual (Maury et al., 2005; Gupta et al., 2002).

Estudos sobre a secagem por atomização de proteases utilizando proteína do soro do leite como adjuvante são escassos na literatura. Entretanto, vários estudos mostram que o isolado de proteína de soro de leite (WPI ou WPC) usado sozinho ou em combinação com carboidratos (como maltodextrina, amido, etc.) melhora a viabilidade de probióticos durante e após a secagem por spray (Puttarat et al., 2021; Chaparro et al., 2021; Supadil, Melia e Juliyarsi, 2025). Zhou et al. (2023) relataram que proteínas de soro de leite como adjuvante na atomização do *Bacillus*

coagulans BC01 foram eficientes na manutenção da sua sobrevivência e estabilidade durante armazenamento e segundo Bhagwat et al. (2020), cepas probióticas de *Enterococcus* de origem humana microencapsuladas por secagem por atomização utilizando proteína do soro do leite e maltodextrina como agente encapsulante, apresentaram a contagem recomendada de células probióticas.

Considerando que neste estudo foi realizada a secagem por atomização simultânea de *Bacillus licheniformis* e proteases, a utilização dos adjuvantes proteínas do soro de leite, maltodextrina e Aerosil® 200 foram eficientes tanto na manutenção da atividade das proteases quanto na sobrevivência do *Bacillus licheniformis* SMIA-2.

5.2 Análises estatísticas sobre os efeitos dos adjuvantes na atividade residual de protease e contagem de esporos

A seguir, segue a Tabela 3 e Tabela 4 com os resultados das ANOVAs realizadas, assim como as equações obtidas para prever a atividade residual da protease (Eq. 1) e o número de esporos (Log UFC) (Eq. 2) em função dos termos codificados das variáveis independentes:

Tabela 3: ANOVA para as variáveis do modelo quadrático de superfície de resposta para atividade residual da protease

Variável	SQ	GL	QM	Fcal	Ftab 0,05	R² (%)
Atividade residual da protease(%)						
Regressão	8379,961	9	931,11	3,02	2,66	79,98
Whey (L)	3689,80	1	3689,80			
Whey (Q)	47,86	1	47,86			
Aerosil® 200 (L)	2268,24	1	2268,24			
Aerosil® 200 (Q)	1094,12	1	1094,12			
Malto dextrina (L)	281,27	1	281,27			
Malto dextrina (Q)	11,43	1	11,43			
1L por 2L	618,83	1	618,83			
1L por 3L	124,84	1	124,84			
2L por 3L	243,56	1	243,56			
Resíduo	2160,818	7	308,69			
Falta de Ajuste	1707,237	5	341,45	1,50	5,74	
Erro Puro	453,581	2	226,79			
Total	10794,38	16	674,65			

Tabela 4: ANOVA para as variáveis do modelo quadrático de superfície de resposta para contagem de esporos

Variável	SQ	GL	QM	Fcal	F _{tab} 0,05	R ² (%)
Contagem de esporos (log 10, esporos/mL)						
Regressão	5,740853	9	0,63787	1,30	2,66	52,26
Whey (L)	1,000679	1	1,00068			
Whey (Q)	0,937358	1	0,93736			
Aerosil® 200 (L)	0,020744	1	0,02074			
Aerosil® 200 (Q)	0,762488	1	0,76249			
Malto dextrina (L)	0,858499	1	0,85850			
Malto dextrina (Q)	1,286784	1	1,28678			
1L por 2L	0,186050	1	0,18605			
1L por 3L	0,616050	1	0,61605			
2L por 3L	0,072200	1	0,07220			
Resíduo	3,435546	7	0,49079			
Falta de Ajuste	2,603479	5	0,52070	1,25	5,74	
Erro Puro	0,832067	2	0,41603			
Total	8,094812	16	0,50593			

$$\% \text{ Atividade residual} = 48,0041 + 16,4371x_1 - 2,0604x_1^2 - 12,8875x_2 - 9,8515x_2^2 - 4,5382x_3 - 1,0071x_3^2 + 8,7951x_1 \cdot x_2 + 3,9503x_1 \cdot x_3 + 5,5177x_2 \cdot x_3 \quad (\text{Eq. 1})$$

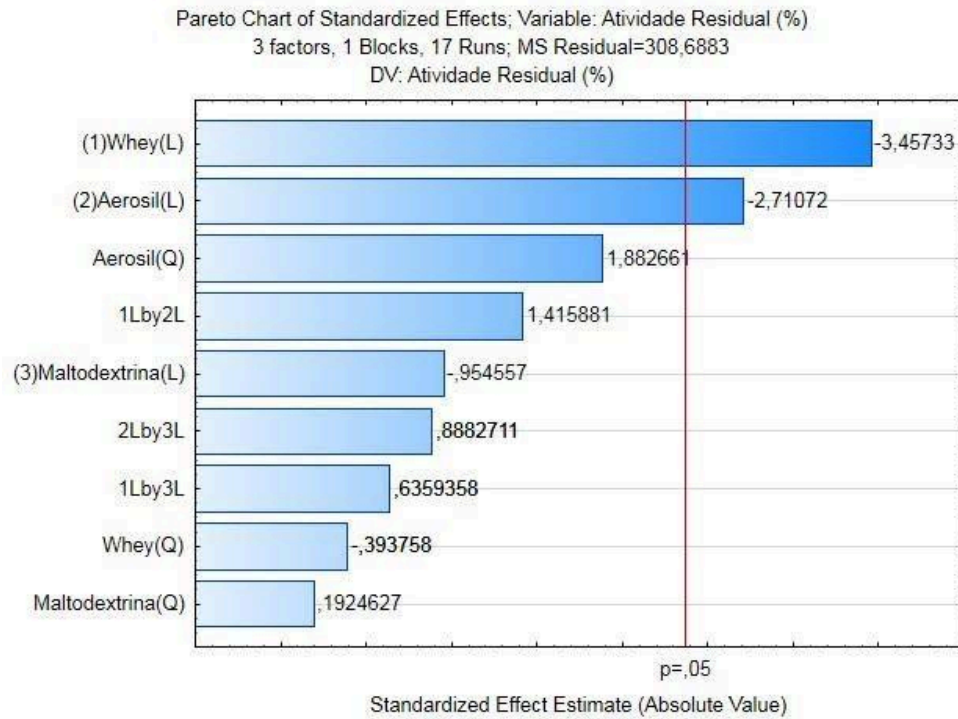
$$\% \text{ Contagem de esporos} = 9,574344 - 0,270690x_1 - 0,151185x_1^2 - 0,038974x_2 - 0,122901x_2^2 - 0,250723x_3 - 0,200683x_3^2 + 0,152500x_1 \cdot x_2 + 0,277500x_1 \cdot x_3 - 0,095000x_2 \cdot x_3 \quad (\text{Eq. 2})$$

A análise de variância (ANOVA) para a atividade residual da protease, baseada no modelo quadrático de superfície de resposta, indicou que o modelo proposto foi estatisticamente significativo ($F_{\text{cal}} = 3,02 > F_{\text{tab}} = 2,66$), explicando aproximadamente 80% da variabilidade dos dados experimentais ($R^2 = 79,98\%$). Esse resultado demonstrou que o modelo foi adequado para descrever a influência das variáveis independentes estudadas sobre a estabilidade da protease após o processo de atomização. A ausência de falta de ajuste significativa ($F_{\text{cal}} = 1,51 < F_{\text{tab}} = 5,74$) confirmou a boa qualidade do ajuste do modelo, indicando que as variações observadas entre os valores experimentais e os valores previstos foram atribuídas majoritariamente ao erro experimental. A equação da atividade residual da protease indica que o whey protein exerceu efeito positivo significativo, enquanto o Aerosil® 200 e a maltodextrina apresentaram efeitos negativos sobre a atividade enzimática em níveis mais elevados.

Para a contagem de esporos, a ANOVA revelou que o modelo quadrático não foi estatisticamente significativo em nível de 95% de confiança ($F_{\text{cal}} = 1,30 < F_{\text{tab}} = 2,66$), apresentando um coeficiente de determinação moderado ($R^2 = 52,26\%$). Esses resultados indicaram que apenas cerca da metade da variabilidade observada na contagem de esporos pode ser explicada pelas variáveis independentes estudadas. Entretanto, a ausência de falta de ajuste significativa ($F_{\text{cal}} = 1,25 < F_{\text{tab}} = 5,74$) demonstrou que o modelo ainda descreve adequadamente o comportamento da resposta dentro da região experimental avaliada. Para a contagem de esporos, observa-se tendência de redução com o aumento dos adjuvantes, embora o modelo não tenha apresentado significância estatística para essa resposta.

Os gráficos de pareto apresentados na Figura 1A e B demonstraram como o efeito de cada adjuvante influenciou na atividade residual da protease e na contagem de esporos.

(A)



(B)

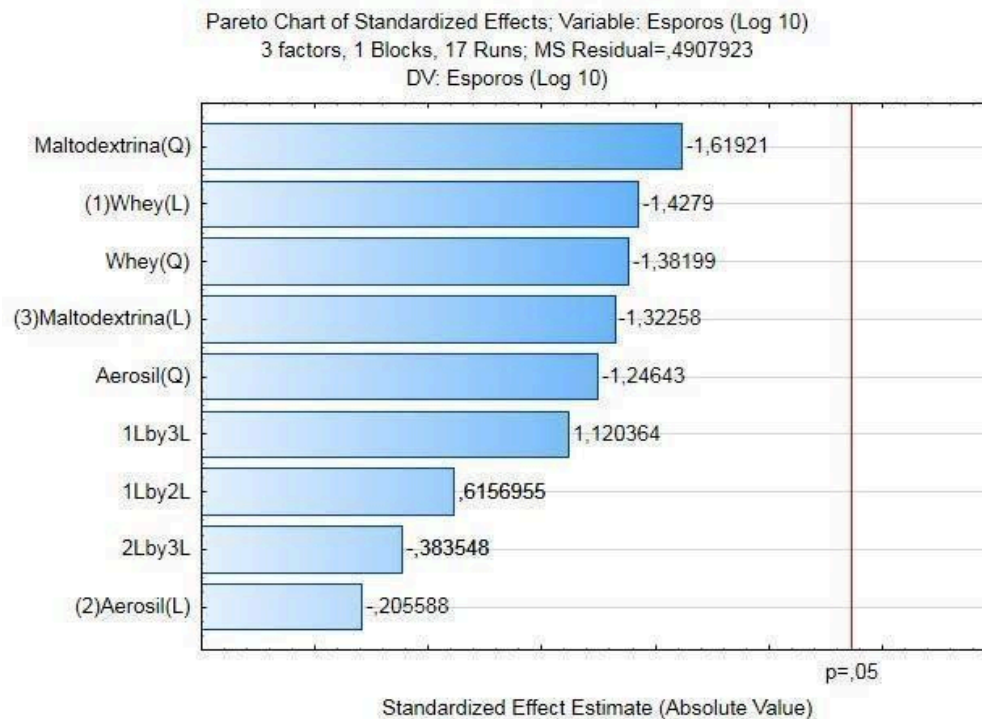


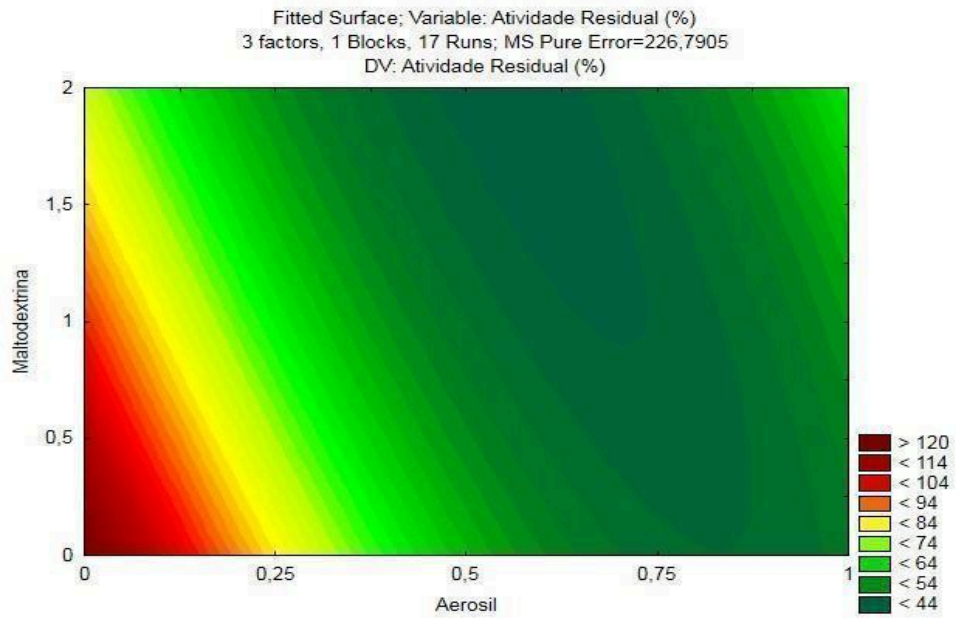
Figura 1: Diagramas de Pareto para a resposta da atividade residual da protease (%) (A) e do número de esporos (Log UFC) (B), para um coeficiente de 95% ($p > 0,05$), respectivamente.

A presença de termos quadráticos no gráfico de Pareto indicou que a atividade residual da protease apresentou comportamento não linear em função das variáveis estudadas, evidenciando a existência de regiões ótimas de formulação. Na Figura 1A pode ser observado que o Aerosil® 200 e as proteínas do soro afetaram significativamente os 17 ensaios, reduzindo seu rendimento enzimático. Maltodextrina também influenciou negativamente as amostras, porém, não o suficiente para haver um efeito significativo. Embora os efeitos quadráticos não tenham apresentado significância estatística isolada em nível de 95%, sua contribuição foi consistente com a curvatura observada nas superfícies de resposta, especialmente para Aerosil® 200 e proteínas do soro. Enquanto isso, as interações entre adjuvantes obtiveram resultados estatisticamente positivos, apesar de não serem significativas.

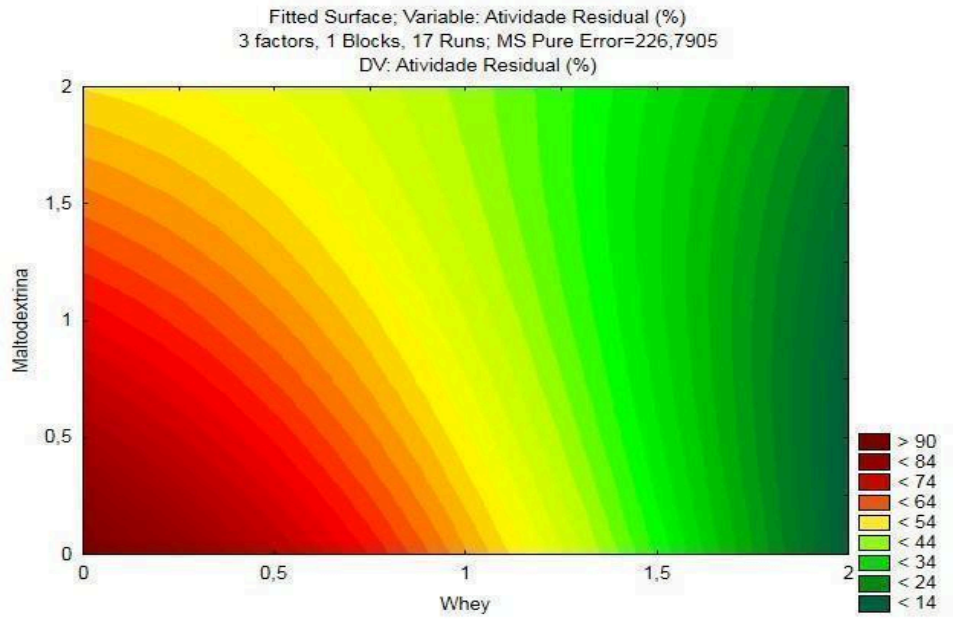
Já na Figura 1B o Log N° esporos foi pouco sensível às variações individuais e às interações entre maltodextrina, proteínas do soro e Aerosil® 200 dentro da faixa experimental estudada, reforçando a elevada resistência dos esporos ao processo de atomização. Sendo assim, os adjuvantes e suas interações não influenciaram significativamente no número de esporos expressos como Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Na Figura 2(A-F), os gráficos de superfície de resposta e de contorno obtidos pela análise dos dados experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional (Tabela 2) mostraram uma relação entre duas variáveis no tempo. As variáveis não explícitas foram fixadas no ponto central (nível 0) para a construção da superfície.

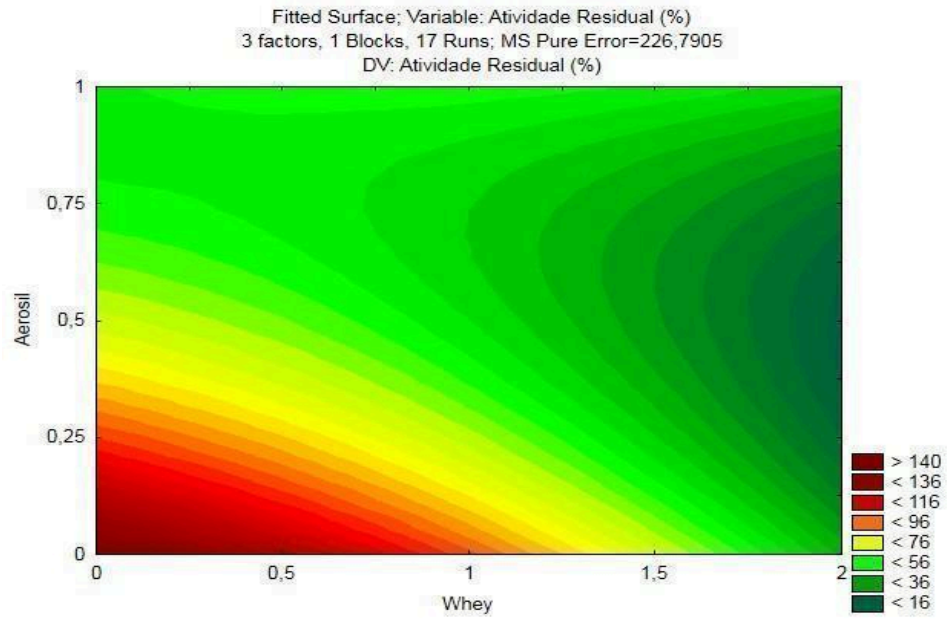
(A)



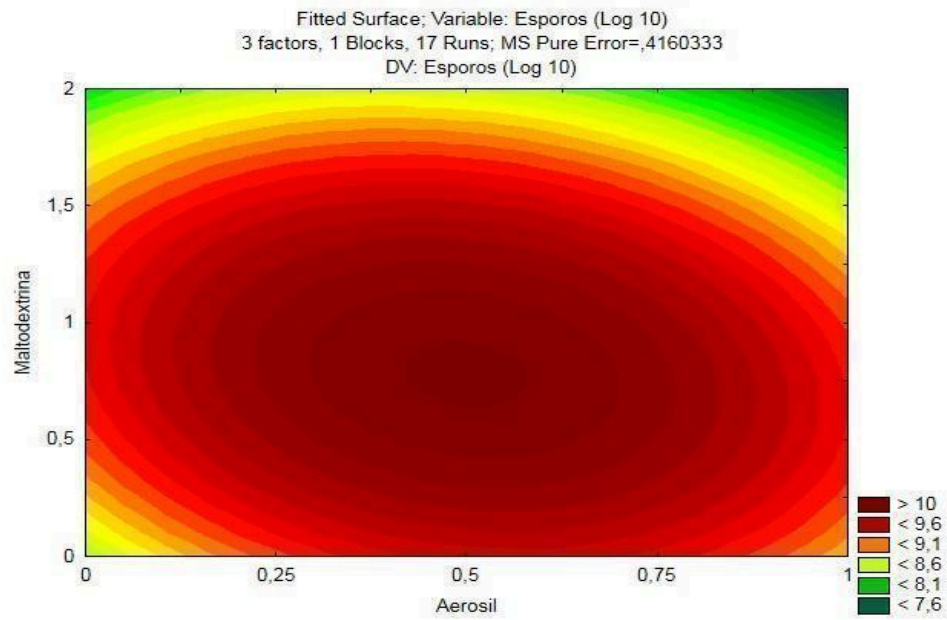
(B)



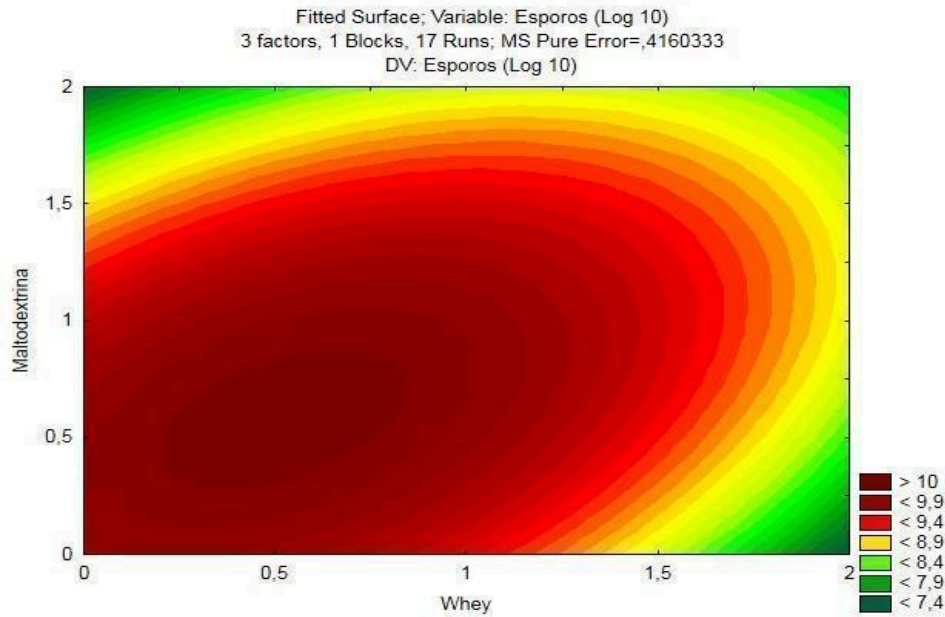
(C)



(D)



(E)



(F)

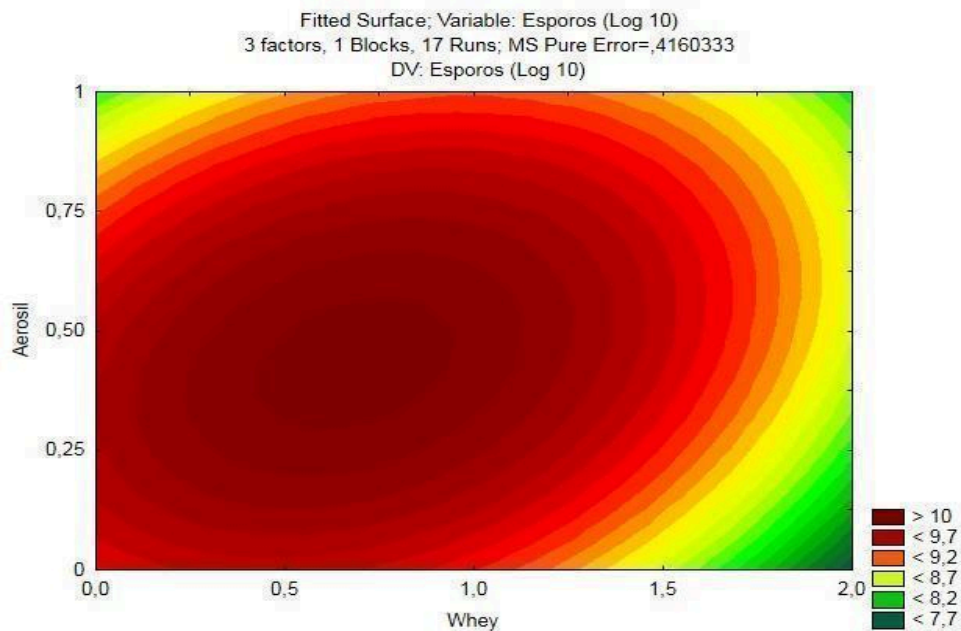


Figura 2: Gráficos de superfície de resposta para: Efeito da maltodextrina e do Aerosil® 200 na Atividade Residual (A) e na Contagem de Esporos (D); Efeito da maltodextrina e do whey na Atividade Residual (B) e na Contagem de Esporos (E); Efeito do Aerosil® 200 e do whey na Atividade Residual (C) e na Contagem de Esporos (F). A cor vermelha indica alta atividade da protease residual e concentração de esporos. Cores amarelas e verdes indicam baixa atividade de protease residual e concentração de esporos.

A predominância de regiões em vermelho nas superfícies de resposta indica que as condições ótimas para a atividade residual da protease e a contagem de esporos coincidem com condições que favorecem a estabilidade do sistema durante a secagem, enquanto regiões em verde e amarelo refletem formulações menos eficientes, possivelmente associadas a maior estresse térmico e estrutural. Os resultados encontrados para os gráficos referentes à atividade residual de protease demonstram que, quanto maior a concentração de adjuvantes, menor foi a atividade enzimática. Já os gráficos de contagem de esporos demonstram como a influência dos três adjuvantes interferiu pouco na produção de esporos. Pode-se concluir que o SMIA-2 possui uma resistência intrínseca de seus esporos às condições de estresse térmico e de desidratação impostas pelo processo de atomização, sendo coerente com a ausência de efeitos estatisticamente significativos ($p > 0,05$) observada no gráfico de Pareto para essa variável resposta.

Assim como observado por Bolzan et al., 2022, os gráficos de superfície demonstram a existência de uma região ótima de concentração de maltodextrina para maximização da atividade residual da protease. No entanto, a adição de Aerosil® 200 desloca essa região ótima, sugerindo um efeito sinérgico entre o agente encapsulante e o adjuvante de fluxo. Esse comportamento pode ser explicado pela capacidade do Aerosil® 200 de reduzir a coesão entre partículas e a adesão às paredes do equipamento, promovendo secagem mais eficiente e menor tempo de exposição térmica da enzima. Este estudo também indica que a combinação entre maltodextrina e proteínas do soro promove uma matriz mais complexa, capaz de intensificar a proteção da enzima durante a atomização, devido ao mesmo contribuir para a formação de um filme proteico ao redor da enzima, reduzindo a desnaturação térmica.

5.3 Otimização da formulação final e o efeito do Aerosil® 200 na qualidade do pó atomizado

A Figura 3 abaixo demonstra as amostras resultantes do processo de secagem.

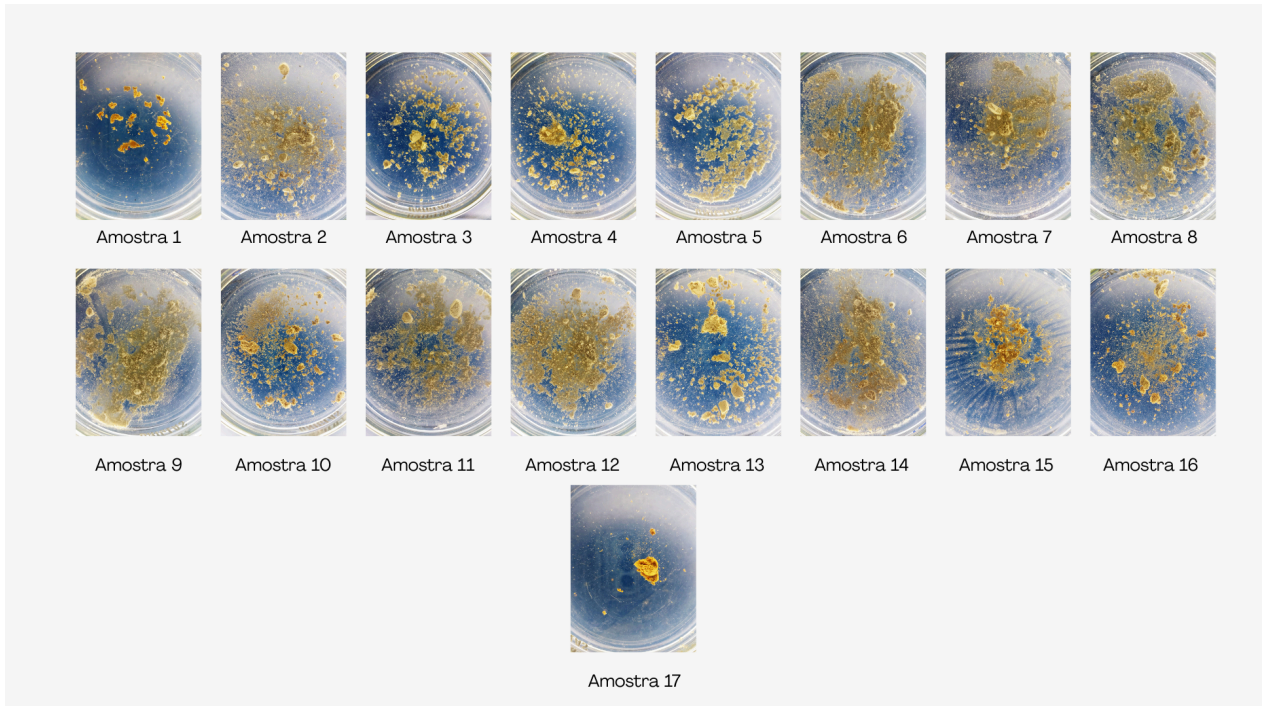


Figura 3: Imagens das amostras atomizadas obtidas dos 17 diferentes ensaios.

A maioria das amostras obteve um aspecto arenoso, fluido e maleável. Já os ensaios 1 e 17 formaram grumos pegajosos, que tornaram suas análises mais difíceis de realizar, devido à dificuldade de manuseio e diluição. Considerando que a melhor amostra encontrada no experimento foi a amostra 1 (0,2% de Aerosil® 200, 0,4% de proteínas do soro e 0,4% de maltodextrina), pensou-se em ajustar uma das concentrações dos adjuvantes para melhorar o pó final, transformando-o em uma amostra mais fácil de se utilizar. Estudos como o de Koleva e Tzachev, 2024, e de Vasconcelos, Medeiros e Moura, 2005, utilizaram o Aerosil® 200 para reduzir a umidade de suas amostras, tornando o pó final mais fluido, seco e sem conjuntos aglomerados.

Pensando nisso, foi realizada, então, a atomização do caldo fermentado nas condições similares utilizadas na amostra 1 (maltodextrina 0,4%, p/v, e proteínas do

soro 0,4%, p/v), sendo diferentes entre si as concentrações de Aerosil® 200 (0%, 0,2%, 0,5% e 0,7%). Posteriormente, a atividade residual da protease foi medida para definir se haveria uma diferença estatisticamente significativa entre elas. As amostras foram conservadas a -18° C, e testadas em diferentes datas para observar a estabilidade de sua protease.

Tabela 5: Estabilidade das proteases atomizadas na presença de maltodextrina (0,4%, p/v), proteínas do soro (0,4%, p/v) e diferentes concentrações de Aerosil® 200

Tempo de estocagem (dias)	Concentração de Aerosil® 200				
	Caldo fermentado	0%	0,2%	0,5%	0,7%
0	100% ± 0,02	92,75% ± 0,02	91,68% ± 0,02	85,02% ± 0,02	84,19% ± 0,04
1	91,74% ± 0,11	88,41% ± 0,03	78,95% ± 0,03	86,09% ± 0,05	85,92% ± 0,02
4	90,37% ± 0,01	88,17% ± 0,04	74,85% ± 0,02	89,12% ± 0,06	86,33% ± 0,01
7	93,22% ± 0,02	88,52% ± 0,03	77,16% ± 0,01	87,69% ± 0,02	85,20% ± 0,03
14	100,89% ± 0,01	98,34% ± 0,05	83,23% ± 0,05	93,88% ± 0,06	91,74% ± 0,02
30	99,11% ± 0,03	95,30% ± 0,06	79,96% ± 0,02	92,50% ± 0,03	93,22% ± 0,03

*100% refere-se ao valor de 16,82 U/mL.

A Tabela 5 mostra quantos dias das análises da atividade residual da protease foram realizados nas 4 amostras com concentrações diferentes de Aerosil® 200, assim como uma amostra controle (sem atomizar). Os resultados demonstraram que, estatisticamente, tirando 0,2%, não houve diferença entre as médias das atividades de protease obtidas pelos diferentes ensaios, conseguindo mantê-las mesmo após o processo de atomização. Já 0,2% de Aerosil® 200

apresentou valor menor do que as médias das demais concentrações. A mesma repetição dos testes também demonstrou como as amostras em pó conseguiram manter sua atividade residual de protease por um período de tempo considerável. Considerando isso, a amostra de 0,7% foi selecionada como amostra final, devido ao fato de apresentar mais maleabilidade e não haver diferença estatística entre as demais amostras estudadas pela tabela acima. As imagens referentes à diferença entre a amostra 0,2% e 0,7% estão mostradas na Figura 4A e B.

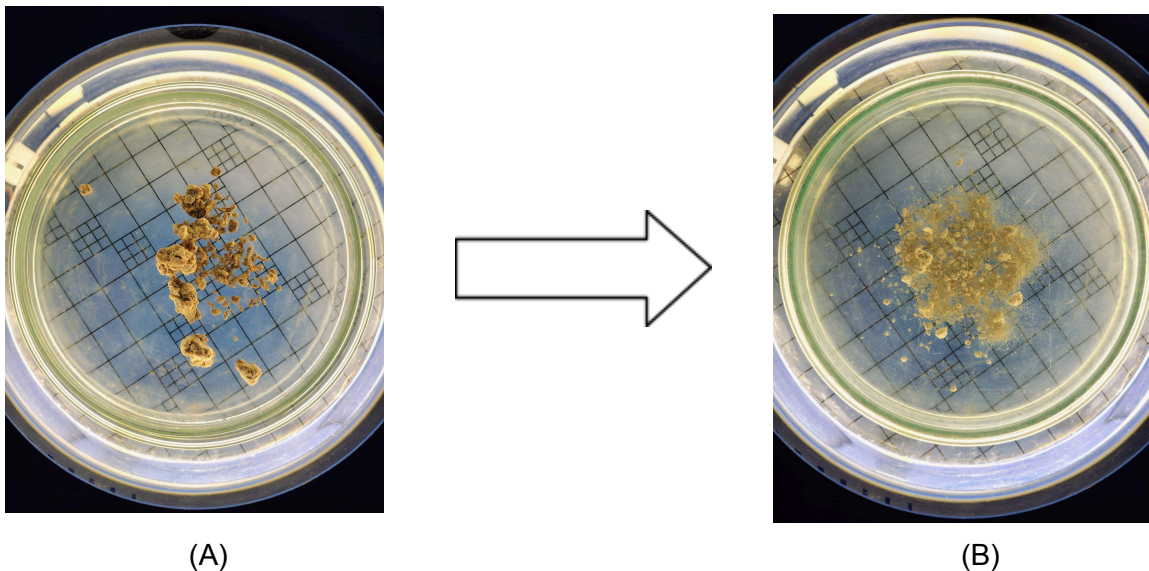


Figura 4: Imagens das amostras atomizadas na presença de maltodextrina (0,4%, p/v) e proteínas do soro (0,4%, p/v) e 0,2%, p/v (A); e 0,7%, p/v de Aerosil[®] 200 (B).

É notável pelas fotos acima que a amostra com 0,7% de Aerosil[®] 200 formou um pó arenoso, bem mais solto e de fácil utilização, comparado à amostra 0,2%, que se manteve em sua forma de grumos.

A Tabela 6 a seguir demonstra a estabilidade dos esporos do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 em pó, armazenados à temperatura de -18° C, através da repetição da contagem de esporos por um determinado período de tempo.

Tabela 6: Estabilidade dos esporos recuperados do caldo fermentado atomizado com maltodextrina (0,4%, p/v), proteínas do soro (0,4%, p/v) e Aerosil® 200 (0,7%, p/v)

Tempo de estocagem (dias)	Média aprox. do log n° de esporos (%)
0	100 ± 0,09
18	97,72 ± 0,13
31	98,31 ± 0,43
60	101,69 ± 0,32
84	103,08 ± 0,25
117	105,06 ± 0,16

*100% equivale ao valor de $10,08 \pm 0,09$ log UFC.

A avaliação da estabilidade dos esporos de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 na formulação final ao longo de 117 dias evidenciou elevada manutenção da viabilidade microbiana, com variações mínimas em relação ao valor inicial. Observou-se que a contagem de esporos permaneceu próxima ou superior a 100% durante todo o período avaliado, atingindo valores de até 105,06% após 117 dias, o que indica não apenas estabilidade, mas possível reorganização do sistema em função do equilíbrio higroscópico do pó. Esse comportamento sugere que a matriz formada pela combinação de maltodextrina e proteínas do soro atuou como barreira física protetora, reduzindo a exposição dos esporos à umidade e ao oxigênio, enquanto o Aerosil® 200 contribuiu para a melhoria da fluidez e diminuição da coesão entre partículas, favorecendo a estabilidade estrutural do produto.

Esses resultados corroboram as superfícies de resposta previamente discutidas, nas quais a contagem de esporos apresentou baixa sensibilidade às variações individuais dos adjuvantes, reforçando a elevada resistência intrínseca dos esporos. Além disso, a manutenção da viabilidade ao longo do armazenamento confirma o potencial tecnológico da atomização simultânea para a obtenção do pó microbiano estável, indicando que a formulação otimizada é adequada para aplicações industriais que demandam longa vida de prateleira sem comprometimento de suas características.

6. CONCLUSÕES

A otimização do processo de secagem por atomização de proteases e esporos de *Bacillus licheniformis* SMIA-2, recuperados de caldos fermentados de culturas contendo amido solúvel, proteínas do soro e água de maceração de milho, empregando a metodologia de superfície de resposta mostrou que as concentrações das proteínas do soro, Aerosil® 200 e maltodextrina que proporcionaram os maiores níveis de atividade residual da protease foram 0,4% (p/v), 0,2% (p/v) e 0,4% (p/v), respectivamente.

O incremento na concentração do Aerosil® 200 para 0,7% (p/v), mantendo as concentrações das proteínas do soro e da maltodextrina em 0,4% (p/v) permitiu a obtenção de um pó menos aderente, sem perda da atividade da protease e dos esporos.

As proteases e os esporos do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 ficaram estáveis por um longo período de tempo, demonstrando como a atomização foi bem-sucedida em conservar as características do microrganismo, sem haver grandes perdas durante o processo de secagem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Mageed, H. M., Fouad, S. A., Teaima, M. H., Radwan, R. A., Mohamed, S. A., AbuelEzz, N. Z. (2020). Engineering lipase enzyme nano-powder using nano spray dryer BÜCHI B-90: experimental and factorial design approach for a stable biocatalyst production. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 16: 759–771. DOI doi.org/10.1007/s12247-020-09515-4

Abdelfattah, H., Zein, D. M. (2019). Biological studies and toxicity experiments of aerosil 200 nanoparticles on adults and larvae of some stored grain insects. *International Journal of Entomology Research*, 4: 103–108. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/333221212_Biological_studies_and_toxicity_experiments_of_AEROSIL_200_nanoparticles_on_adults_and_larvae_of_some_stored_grain_insects

Adetunji, A. I., Olaitan, M. O., Erasmus, M., Olaniran, A. O. (2023). Microbial proteases: a next generation green catalyst for industrial, environmental and biomedical sustainability. *Food Materials Research*, 3: 12 DOI doi.org/10.48130/FMR-2023-0012.

Badin, R., Gaiani, C., Desobry, S., Prakash, S., Bhandari, B., Rasch, R., Bostelmann, H., Burgain, J. (2025). Links between single maltodextrin particles properties and powder functionality. *Carbohydrate Polymers*, 350: 123057. DOI doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.123057

Bolzan, R. P., Cruz, E., Barbosa, J. B., Talma, S. V., Martins, M. L. L. (2022). Optimization of spray-drying conditions for obtaining *Bacillus* sp. SMIA-2 protease powder. *Food Science and Technology*, 42. DOI doi.org/10.1590/fst.18121

Chakraborty, D., Chatterjee, S., Althuri, A., Palani, S. G., Mohan, S. V. (2023). Sustainable enzymatic treatment of organic waste in a framework of circular economy. *Bioresource Technology*, 370: 128487. DOI doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128487

Chaparro, J. A., Velásquez, H. J. C., Valencia, J. U. S., Monterroza, E. J. P. (2021). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 by spray drying using maltodextrin, whey protein concentrate and trehalose. *Food Science and Technology International*, 28: 476–488. DOI doi.org/10.1177/10820132211020621

Cunniffe, J., Berrio, V. R., Hunter, C., Nguyen, T., Salmon, S., Crook, N., Grunden, A., Sagues, W. J. (2025). Techno-economic analysis of industrial-scale fermentation for formate dehydrogenase (FDH) production. *Bioresources and Bioprocessing*, 12: 1-16. DOI doi.org/10.1186/s40643-025-00985-3

Cruz, E. (2021) Celulases de *Bacillus* sp. SMIA-2: Secagem e uso para o desenvolvimento de formulações ecológicas de limpeza. Doutorado em Produção Vegetal - Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Campos dos Goytacazes - RJ, 101p.

Cruz, E., Talma, S. V., Barbosa, J. B., Bolzan, R. P., Ladeira S. A., Carvalho V, R., Martins, M. L. L. (2024). Spray drying of cellulases produced by *Bacillus* sp. SMIA-2. *Bioscience Journal*, 40. DOI doi.org/10.14393/bj-v40n0a2024-64855

Dutschei, T., Zühlke M. K., Welsch, N., Eisenack, T., Hilkmann, M., Krull, J., Stühle, C., Brott, S., Dürwald, A., Reisky, L., Hehemann, J. H., Becher, D., Schweder, T., Bornscheuer, U. T. (2022). Metabolic engineering enables *Bacillus licheniformis* to grow on the marine polysaccharide ulvan. *Microbial Cell Factories*, 21: 1-14. DOI doi.org/10.1186/s12934-022-01931-0

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Allende, A., Ordóñez, A. A., Bortolaia, V., Cid, S. B., Cesare, A. D., Dohmen, W., Guillier, L., Jacxsens, L., Nauta, M., Gras L. M., Ottoson, J., Peixe, L., Rodriguez, F. P., Skandamis P., Suffredini, E., Cocconcelli P. S., Salvador, P., Maradona, M. P., Querol, A., Sijtsma, L. (2025). Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 21: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2024. *EFSA Journal*, 23: 1-14. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2025.9169>

Ferreira, L. P., Cruz, E., Martins, M. L. L. (2025). Use of *Bacillus licheniformis* SMIA-2 For the Development of Environmentally Friendly Cleaning Products. *Revista de Gestão Social e Ambiental*, 19: e012446. DOI doi.org/10.24857/rgsa.v19n6-008

Gava, A. J., Silva, C. A. B. da., Frias, J. R. G. (2008). *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel, 428p.

Guirlanda, C. P., Alvim, I. D., Takahashi, J. A. (2023). Atomization of cocoa honey using whey protein isolate to produce a dry formulation with improved shelf life for industrial application. *Foods*, 12: 4269. DOI doi.org/10.3390/foods12234269

Gupta, R., Beg, Q. K., Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15–32. DOI doi.org/10.1007/s00253-002-0975-y

Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128: 254–267. DOI doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081

Harwood, C. R., Kikuchi, Y. (2021). The ins and outs of *Bacillus* proteases: activities, functions and commercial significance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46: 1-20. DOI doi.org/10.1093/femsre/fuab046

Irazoqui, J. M., Santiago, G. M., Mainez, M. E., Amadio, A. F., Eberhardt M. F. (2024). Enzymes for production of whey protein hydrolysates and other value-added products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108: 1-11. DOI doi.org/10.1007/s00253-024-13117-2

Jenssen, 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. DOI doi.org/10.1007/bf01982527

Kaushal, J., Singh, G., Arya, S. K. (2022). Emerging trends and future prospective in enzyme technology. *In*: Kuddus, M., Aguilar, C. N. (ed.) *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology*. Academic Press, 491-503. DOI doi.org/10.1016/B978-0-323-89929-1.00036-6

Kawaguchi, M. (2020). Dispersion stability and rheological properties of silica suspensions in aqueous solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284: 102248. DOI doi.org/10.1016/j.cis.2020.102248

Koleva, I. Z., Tzachev, C. T. (2024). Efficient improvement of eugenol water solubility by spray drying encapsulation in soluplus® and lutrol F 127. *Pharmaceuticals*, 17: 1156–1156. DOI doi.org/10.3390/ph17091156

Lee, N. K., Kim, W. S., Paik, H. D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Science and Biotechnology*, 28: 1297-1305. DOI doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9

Lodi, L. A., Borges, R., Lopes, M. M., Graciano, V. A., Bortoletto-Santos, R., Barud, H. S., Oliveira-Paiva, C. A. de, Ribeiro, C., Farinas, C. S. (2024). Spray-drying microencapsulation of *Bacillus megaterium* in PVA/cationic starch/zinc oxide for promoting growth and zinc availability in soybean plants. *ACS Agricultural Science & Technology*, 4: 1271–1283. DOI doi.org/10.1021/acsagscitech.4c00476

Lopes, M. M., Farinas, C. S., Bueno, M. M., García-Moreno, P. J., Guadix, E. M. (2025). Microencapsulation of *Bacillus subtilis* by spray-drying using starch hydrolysates with different dextrose equivalent values. *International Journal of Biological Macromolecules*, 320: 146082. DOI doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146082

Maury, M., Murphy, K., Kumar, S., Shi, L., Lee, G. (2005). Effects of spray-drying and subsequent storage conditions on the stability of enzymes. *Journal of Food Engineering*, 68: 429–437. DOI doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.06.016

Mun, D., Kyoung, H., Kong, M., Ryu, S., Jang, K. B., Baek, J., Park, K. I., Song, M., Kim, Y. (2021). Effects of *Bacillus*-based probiotics on growth performance, nutrient digestibility, and intestinal health of weaned pigs. *Journal of Animal Science and Technology*, 63: 1314–1327. DOI doi.org/10.5187/jast.2021.e109

Olea, H. R., Ballesteros, B. R., Santoscoy, R. A. C. (2022). Potential application of the probiotic *Bacillus licheniformis* as an adjuvant in the treatment of diseases in humans and animals: A systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 13: 993451. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2022.993451

Paiva, Y. F., Maria, R., Alexandre, Santos, Amadeu, S., Gilson, A., Bezerra, L., Pereira, W., Moura, H. V., Silva, Costa, C. C., Plúvia Oliveira Galdino, Gomes, J. P., Alexandre, D. (2023). Maltodextrin as a drying adjuvant in the lyophilization of tropical red fruit blend. *Molecules*, 28: 6596–6596. DOI doi.org/10.3390/molecules28186596

Popov, I. V., Algburi, A., Prazdnova, E. B., Mazanko, M. S., Elisashvili, V., Bren, A. B., Chistyakov, V. A., Tkacheva, E. V., Trukhachev, V. I., Donnik, I. M., Ivanov, Y. A., Rudoy, D., Ermakov, A. M., Weeks, R. M., Chikindas, M. L. (2021). A review of the effects and production of spore-forming probiotics for poultry. *Animals*, 11: 1941. DOI doi.org/10.3390/ani11071941

Puttarat N., Thangrongthong S., Kasemwong K., Kerdsup P., Taweechotipatr M. (2021) Spray-drying microencapsulation using whey protein isolate and nano-crystalline starch for enhancing the survivability and stability of *Lactobacillus reuteri* TF-7. Food Sci Biotechnol, 30: 245-256. DOI doi.org/10.1007/s10068-020-00870-z

Raina, D., Kumar, V., Saran, S. (2022). A critical review on exploitation of agro-industrial biomass as substrates for the therapeutic microbial enzymes production and implemented protein purification techniques. Chemosphere, 294. DOI doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133712

Rawlings, N. D. (2020). Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 1868: 140345. DOI doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140345

Rawlings, N. D., Bateman, A. (2019). Origins of peptidases. Biochimie, 166: 4–18. DOI doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.026

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7. DOI doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110

Ren, X., Ning, X., Liu, B., Xu, X., Men, L., Deng, A., Zhang, Y., Zhang, Z., & Zhang, W. (2026). Boosting recombinant bovine chymosin in *Komagataella phaffii* via fusion protein and constitutive promoter expression. Foods, 15: 731. DOI doi.org/10.3390/foods15040731

Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A., & Kumar, A. (2019). A Review on Microbial Alkaline Protease: An essential tool for various industrial approaches. Industrial Biotechnology, 15: 69–78. DOI doi.org/10.1089/ind.2018.0032

Soares, M. B., Almada, C. N., Penha, E. P. R., Ferreira, B. M., Balthazar, C. F., Khorshidian N., Rocha, R. S., Xavier-Santos, D., Cruz, A. G., Ranadheera C. S., Mortazavian, A. M., Gómez-Zavaglia, A., Martinez, R. C. R., Sant'Ana, A. S. (2023). Review - Sporeforming probiotic bacteria: Characteristics, health benefits, and technological aspects for their applications in foods and beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 138: 453–469. DOI doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.029

Sommerfeld, S., Tomais, L. F. S., Gomes, L. R., Silva, M. V. C., Pedrosa, I. E., Vieira, D. S., Peluco, A. C., Azevedo, V. A. C., Fonseca, B. B. (2024). The resistance of *Bacillus* spores: Implications for the strain-specific response to high-performance disinfectants. *Current Microbiology*, 81. DOI doi.org/10.1007/s00284-024-03872-w

Supadil, D., Melia, S., Juliyarsi, I. (2025). Enhancing probiotic viability in fermented milk starter using maltodextrin and whey protein isolate microencapsulation techniques. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 15: 1-5. DOI doi.org/10.55251/jmbfs.11800

Szczap, J. P., Jacobs, I. C. (2023). Atomization and spray drying processes. *In*: Sobel, R (ed.) *Microencapsulation in the Food Industry*. Academic Press, 59–71. DOI doi.org/10.1016/b978-0-12-821683-5.00017-0

Troncoso, D. F., Sánchez, D. A., Ferreira, M. L. (2022). Production of plant proteases and new biotechnological applications: An updated review. *ChemistryOpen*, 11: 1-38. DOI doi.org/10.1002/open.202200017

Vasconcelos, E. A. F., Medeiros, M. G. F., Raffin, F. N., Moura, T. F. A. L. (2005). Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius Raddi* (*Anacardiaceae*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15: 243–249. DOI doi.org/10.1590/s0102-695x2005000300015

Vasconcelos, Q., Bachur, T., Aragao, G. F. (2020). Whey protein supplementation and its potentially adverse effects on health: A systematic review. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 46. DOI doi.org/10.1139/apnm-2020-0370

Wang, H. Zhang, X., Chen, Z., Hao, G., Li, G. (2021). Two potential probiotic *Bacillus* with proteolytic activity to dietary protein from adult feces. *Biocontrol Science*, 26: 221-224. DOI doi.org/10.4265/bio.26.221

Weng, Y., Li, Y., Chen, X., Song, H., Zhao, C.-X. (2023). Encapsulation of enzymes in food industry using spray drying: recent advances and process scale-ups. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64: 7941–7958. DOI doi.org/10.1080/10408398.2023.2193982

Xiao, Z., Xia, J., Zhao, Q., Niu, Y., Zhao, D. (2022). Maltodextrin as wall material for microcapsules: A review. *Carbohydrate Polymers*, 298: 120113. DOI doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120113

Zhao, L., Wang, Y., Pan, M., Kong, W., Wang, H., & Tan, J. (2025). Optimization of fermentation conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* JL54 and preparation of powder through spray drying. *Plants*, 14: 1263–1263. DOI doi.org/10.3390/plants14081263

Zhou, R., Xu, Y., Dong, D., Hu J., Zhang, L., Liu, H. (2023) The effects of microcapsules with different protein matrixes on the viability of probiotics during spray drying, gastrointestinal digestion, thermal treatment, and storage. *eFood*. 4: 98. DOI doi.org/10.1002/efd2.98