



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

FRANCISCO JONATHAN DOS SANTOS ARAÚJO

AVALIAÇÃO DE PROTEASES E BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR
***Bacillus subtilis* TIM27 COMO ADITIVOS EM DETERGENTE**

FORTALEZA

2020

FRANCISCO JONATHAN DOS SANTOS ARAÚJO

AVALIAÇÃO DE PROTEASES E BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis* TIM27 COMO ADITIVOS EM DETERGENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Coorientador: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A689a Araújo, Francisco Jonathan dos Santos.

Avaliação de proteases e biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* TIM27 como aditivos em detergente / Francisco Jonathan dos Santos Araújo. – 2020.
71 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

Coorientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

1. Detergentes biodegradáveis. 2. Proteases. 3. Subtilisina. 4. Surfactantes naturais. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCO JONATHAN DOS SANTOS ARAÚJO

AVALIAÇÃO DE PROTEASES E BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis* TIM27 COMO ADITIVOS EM DETERGENTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. SÍntia Silva Almeida
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Fundação Oswaldo Cruz no Ceará (Fiocruz-Ceará)

A Deus.

A minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo, por toda a inspiração, amor, fé e esperança que me ajudaram a construir a pessoa que sou hoje.

Aos meus pais, Francisca Sandra e Antônio Carlos por sempre me apoiarem, por terem me proporcionado uma educação de excelência, dentro das suas limitações, e por estarem sempre do meu lado ao longo desses anos. Ao meu irmão Carlos Henrique e ao meu padrasto André Silva por toda sua cumplicidade, amor e apoio.

Às minhas avós Maria de Fátima e Maria Cosma por cuidarem tão bem de mim ao longo da minha vida, me dando educação e muito amor.

À minha tia Fabiana de Oliveira por todo o incentivo à minha educação, por ser minha inspiração e por toda a ajuda dada a mim ao longo da minha vida.

À toda a minha família por todo o suporte, alegria e amor.

À minha orientadora Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, minha mãe científica, por ser um exemplo de pesquisadora e professora, que me acolheu desde o ensino médio com seus ensinamentos científicos, profissionais e sobre a vida.

À minha co-orientadora Denise Cavalcante Hissa por todos os ensinamentos passados, pela sua grande cumplicidade, determinação e carinho dado a mim ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Sintia Almeida e ao Prof. Dr. Gilvan Pessoa pela contribuição nas disciplinas do mestrado e no aperfeiçoamento desse trabalho.

À minha grande amiga Gabrielly Oliveira da Silva, que desde o ensino médio trilhamos juntos a carreira científica e acadêmica, por todo amor, carinho e irmandade.

À minha amiga Brenda Suellen por sua amizade, pelo seu apoio e todo o conhecimento compartilhado comigo ao longo desses anos de graduação e mestrado.

À toda equipe do laboratório de ecologia microbiana e biotecnologia: Mirella Leite; Bárbara Cibelle; Cristiane Rabelo; Andrea Silva; Bella Giselle; Igor Duarte; Saulo Gonçalves; João Alberto; Lara Andrade; Liandra Éllen; Andreza Freitas; Larissa Belizário; Luzia Zeferino; Ao “Seu Valdenor” pelos momentos de descontração e por tornar o ambiente de trabalho um lugar divertido e cheio de aprendizado.

A Gabriel Braga por todo o suporte, companheirismo, por sempre acreditar em mim e por todo amor e carinho.

A Lidinar Félix por sua amizade e companheirismo, por ser uma amiga na fé e por sempre estar me apoiando em vários segmentos da minha vida.

Aos meus amigos: Alex dos Santos; Mário Lima; Matheus Augusto; Karina Rodrigues, Claudiane Carvalho pelos momentos de muita diversão, risadas, por me apoiarem em todos os segmentos da minha vida, por torcerem por mim e sonhar junto comigo ao longo desse tempo de irmandade.

A Julio César, José Vandeci e Maria Ozimeira por todo o suporte, carinho e por terem me acolhido em sua família com muito amor.

A todo o corpo docente e administrativo do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, em especial ao Prof. Dr. André Luiz, ao Prof. Dr. Bartolomeu Souza, e ao assistente administrativo Renato.

À Funcap e a Universidade Federal do Ceará por contribuir e possibilitar a realização deste sonho através do apoio financeiro e técnico.

Quando recebemos um ensinamento devemos receber como um valioso presente e não como uma dura tarefa.
Eis aqui a diferença que transcende.

Albert Einstein

RESUMO

A crescente demanda da sociedade moderna por produtos de limpeza menos poluentes ao ambiente tem estimulado as pesquisas por aditivos naturais, mais facilmente biodegradáveis e ambientalmente seguros. Como os surfactantes sintéticos, derivados do petróleo, adicionados a enzimas são os componentes-chave dos produtos de limpeza, tem-se como alternativa para a nova geração de produtos de limpeza a substituição dos surfactantes sintéticos por biosurfactantes com adição de enzimas microbianas. Entretanto as condições adversas de lavagem como o pH extremamente alcalino, estimulam a prospecção de novas moléculas mais estáveis para esta aplicação. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de enzimas e de biosurfactantes produzidos por uma estirpe de *Bacillus subtilis*, TIM27, como aditivos de detergentes comerciais. Os biosurfactantes (BIOS27) foram produzidos em Caldo Surfactina e parcialmente purificados por precipitação ácida. As enzimas foram produzidas pelo cultivo em Caldo Nutriente contendo 0,2% de glicerol e submetidas a precipitação com sulfato de amônio nas faixas de saturação de F_{0-40%} F_{40-70%} e F_{70-90%}, com monitoramento da atividade esterásica e proteolítica de cada fração através da formação de halos de hidrólise em Ágar Nutritivo contendo 0,1% de tributirina ou 1% de leite desnatado, respectivamente. A influência de um gradiente de pH (de 6-11) e de NaCl (0,5-4 M) foram avaliados na atividade proteolítica de F_{40-70%} e atividade emulsificante de BIOS27. Além disso, a temperatura ideal (20 – 80 °C) de atividade proteolítica de F_{40-70%} bem como a influência de 1% de detergentes (Triton X-100, Tween80 e SDS), 7 mg/mL de OMO[®], 5 mM de íons metálicos (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺) e 1 e 5 mM de inibidores de proteases (β-Mer, PMSF e EDTA). Experimentos para identificação das enzimas após purificação em cromatografia de troca iônica seguida de cromatografia hidrofóbica foram realizados utilizando espectrometria de massas (ESI-Q-TOF). O desempenho de lavagem de manchas por F_{40-70%} e BIO27 foram realizados utilizando tecidos de algodão impregnadas com emulsão de gema de ovo. Como resultado foi observado que a fração F_{40-70%} apresentou atividades proteásica e esterásicas provenientes principalmente de uma subtilisina de 39,4 kDa identificada por espectrometria de massa. A fração bruta F_{40-70%} teve sua melhor atividade em pH 8,0, temperatura de 50 °C e mostrou estabilidade na presença do detergente comercial OMO[®]. Entretanto, mostrou redução de atividade de 40% em EDTA e total inibição por SDS e íon Zn⁺². BIOS27 apresentou ótimos índices de emulsão de 66,6 % e capacidade de redução da tensão superficial da água para 25,3 mN/m, mesmo na presença de pH alcalino (pH 11,0) e alta concentração de NaCl (2,0 M). De forma qualitativa, a combinação da F_{40-70%},

enriquecida com a subtilisina, ao biossurfactante lipopeptídeo mostrou desempenho equivalente ao detergente comercial OMO[®] para limpeza de mancha de gema de ovo em tecido de algodão. A incorporação de F_{40-70%} a uma solução de OMO[®] aquecido, também provou ter melhor atividade para remoção dessas manchas do que as enzimas endógenas do produto comercial, mostrando o grande potencial dessas biomoléculas em formulações de detergentes.

Palavras-chave: Detergentes biodegradáveis. Esterase. Subtilisina. Surfactantes naturais.

ABSTRACT

The growing demand of modern society for ecofriendly cleaning products has stimulated the search of natural additives and biodegradable products. Since petroleum-derived surfactants added to commercial enzymes are the key components of the major cleaning products, the replacement of synthetic these surfactants by biosurfactants supplemented with microbial enzymes is an alternative for the new generation cleaning products. However, the adverse laundry conditions such as extreme alkaline pH, has encourage the prospection of new and more stable molecules for this application. Therefore, this study aimed the evaluation of enzymes and biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* TIM27 as commercial detergent additives. Biosurfactants (BIOS27) were produced using Surfactin Broth and partially purified by acid precipitation. Whereas enzymes were produced by cultivation in Nutrient Broth supplemented with glycerol 0.2% and subjected to precipitation with ammonium sulfate in the saturation ranges of F_{0-40%} F_{40-70%} and F_{70-90%}, monitoring of esterase and proteolytic activity through the formation of hydrolysis halos in Nutritive Agar containing 0.1% tributyrin or 1% skim milk, respectively. The influence of pH values (6 -11) and NaCl concentration (0.5 - 4 M) were evaluated on F_{40-70%} proteolytic activity and BIOS27 emulsifying activity. In addition, the ideal temperature (20 - 80 °C) of F_{40-70%} proteolytic activity as well as the influence of 1% detergents (Triton X-100, Tween 80 and SDS), 7 mg/mL OMO[®], 5 mM of metal ions (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺) and 1 and 5 mM protease inhibitors (β -Mer, PMSF and EDTA). Experiments for enzyme identification after purification in ion exchange chromatography followed by hydrophobic chromatography were performed using mass spectrometry (ESI-Q-TOF). F_{40-70%} and BIO27 were tested for washing performance using egg yolk emulsion impregnated in cotton fabrics. As results, it was observed that the F_{40-70%} fraction showed proteolytic and esterase activities mainly due to the presence of a 39.4 kDa alkaline subtilisin identified by mass spectrometry. The crude fraction F_{40-70%} showed higher proteolytic activity at pH 8.0, 50 °C and showed stability in the presence of the OMO[®] commercial detergent. However, it showed 40% activity reduction in EDTA and total activity inhibition by SDS and Zn²⁺ ion. BIOS27 presented an excellent emulsion index of 66.6% and ability to reduce the surface tension of water to 25.3 mN/m, even in the presence of alkaline pH (pH 11.0) and high concentration of NaCl (2.0 M). Qualitatively, the combination of F_{40-70%}, enriched with subtilisin, and biosurfactant BIOS27 showed equivalent performance to commercial OMO[®] detergent for cleaning egg yolk stain on cotton fabric. The incorporation of F_{40-70%} in a heated OMO[®] solution also proved to have

better activity to remove these stains than the endogenous enzymes of the commercial product, showing the great potential of these biomolecules in detergent formulations.

Keywords: Biodegradable detergents. Esterase. Subtilisin. Natural surfactants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aplicações biotecnológicas de organismos extremófilos em ciência básica, medicina e indústria.....	21
Figura 2 – Aplicações industriais de biossurfactantes.....	25
Figura 3 – Ação de detergência de biossurfactantes na remoção de manchas em tecidos.....	26
Figura 4 – Relação entre a concentração micelar crítica (CMC) e tensão superficial.....	28
Figura 5 – Detecção das atividades esterásica e proteásica em meio contendo tributirina (a) e (b) caseína.....	42
Figura 6 – Atividade enzimática das três frações resultantes da precipitação do sobrenadante da cultura de TIM27 com sulfato de amônio.....	43
Figura 7 – Atividade emulsificante de mistura água-querosene em diferentes concentrações de biossurfactante lipopeptídeo produzido por TIM27.....	44
Figura 8 – Detecção de atividade esterásica e proteásica da fração F40-70% em gel.....	45
Figura 9 – Purificação da F40-70% em coluna de troca iônica eluída com gradiente de NaCl. Detecção das atividades proteásicas e esterásica no pico eluído com 200 mM de NaCl.....	46
Figura 10 – Eletroforese em gel de tricina da F40-70% antes e após purificação em coluna de troca iônica eluída com 200 mM de NaCl.....	46
Figura 11 – Eletroforese em gel de tricina do pico da troca iônica purificado em coluna hidrofóbica eluída com um volume de 1,5 mL por tubo de coleta em um gradiente de sulfato de amônio (b). Atividades proteásica e esterásica (a)....	47
Figura 12 – Efeito de concentrações de NaCl na atividade emulsificante do biossurfactante produzido por TIM27.....	48
Figura 13 – Efeito do pH na atividade emulsificante e de redução da tensão superficial. Dados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.....	49

Figura 14 – Temperatura e pH ideal da atividade catalítica da F40-70% e estabilidade da atividade enzimática na presença de NaCl. Dados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.....	50
Figura 15 – Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica de F40-70%. Letras iguais significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.....	51
Figura 16 – Efeito de detergentes, biossurfactantes e agentes oxidantes na atividade proteolítica de F40-70%. Letras iguais significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.....	51
Figura 17 – Efeito de inibidores proteolíticos na atividade enzimática de F40-70%. Dados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.....	52
Figura 18 – Desempenho do biossurfactante lipopeptídeo (BIOS27) e da F40-70% de TIM27 na remoção de manchas de gema de ovo em tecidos de algodão em comparação ao detergente comercial OMO®.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações e potenciais valores de mercados das principais enzimas disponíveis.....	20
Tabela 2 – Classificação dos biossurfactantes e principais microrganismos produtores.....	23
Tabela 3 – Empresas produtoras de biossurfactantes e o setor de aplicação.....	29
Tabela 4 – Classificação de proteases e suas principais características.....	30
Tabela 5 – Concentração de proteínas presentes no sobrenadante bruto da cultura de TIM27 e nas frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio.....	43
Tabela 6 – Identificação de duas proteínas obtidas na cromatografia hidrofóbica por espectrometria de massas.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -Mer	β -Mercaptoethanol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
IE24	Índice de emulsão
TS	Tensão Superficial
NaCl	Cloreto de sódio
CMC	Concentração micelar crítica
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
CAGR	Taxa composta de crescimento anual
AISE	Associação Internacional de Sabões, Detergentes e Produtos de Manutenção
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Enzimas e mercado	19
2.2	Biossurfactantes	22
2.3	Indústria de detergentes	26
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivos Gerais	33
3.2	Objetivos específicos	33
4	MATERIAS E MÉTODOS	34
4.1	Pesquisa de atividades esterásica e proteásica em sobrenadantes de culturas de TIM27	34
4.2	Produção e purificação parcial de enzimas	34
4.3	Produção e purificação parcial dos biossurfactantes lipopeptídeos	35
4.4	Índice de emulsão (IE24) e redução da tensão superficial (TS)	36
4.5	Revelação de atividade enzimática em gel (Zimograma)	36
4.6	Análises cromatográficas da fração F _{40-70%}	37
4.7	Identificação de enzimas por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)	37
4.8	Efeitos da concentração de NaCl e pH nas atividades tensoativas dos biossurfactantes lipopeptídeos	38
4.9	Atividade proteásica	38
4.10	Efeito do pH, da temperatura e concentração de NaCl na atividade enzimática	39
4.11	Efeito de íons metálicos na atividade proteásica	39
4.12	Avaliação das preparações enzimáticas para aplicações em detergentes	39
4.13	Efeito de inibidores na atividade proteásica	40
4.14	Desempenho da preparação enzimática para limpeza de tecido	40
4.15	Análises estatísticas	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Pesquisa de atividades esterásica e proteásica no sobrenadante da cultura de TIM27	42
5.2	Produção e purificação parcial de enzimas	42
5.3	Produção e purificação parcial dos biossurfactantes lipopeptídeos	43

5.4	Detecção de enzimas em gel (Zimograma)	44
5.5	Análises cromatográficas da fração F _{40-70%}	45
5.6	Identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)	47
5.7	Efeitos da concentração de NaCl e pH nas atividades tensoativas dos biossurfactantes lipopeptídeos	48
5.8	Efeito do pH, da temperatura e concentração de NaCl na atividade enzimática	49
5.9	Efeito de íons metálicos	50
5.10	Avaliação das preparações enzimáticas para aplicações em detergentes	51
5.11	Efeito de inibidores na atividade proteásica	52
5.12	Desempenho da preparação enzimática para limpeza de tecido	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos utilizados em diversos setores industriais devido suas diversas vantagens quando comparados a catalisadores químicos, como biodegradabilidade, alta seletividade, eficácia catalítica e rentabilidade. As hidrolases, que incluem as proteases e esterases, são enzimas demandadas pelas indústrias de alimentos, biodiesel, cosmética, detergentes, bebidas, dentre outros (GUPTA *et al.*, 2002). As proteases são detentoras da maior parcela de vendas de enzimas industriais no mundo (60% do mercado mundial). Quando comparados com proteases de outras fontes, como de animais e plantas, as proteases microbianas possuem um maior interesse comercial devido sua grande capacidade de produção, estabilidade e atividade catalítica (ALI *et al.*, 2016).

Os biossurfactantes são compostos ativos de superfície que, alternativamente aos surfactantes sintéticos, possuem baixa toxicidade, alta atividade, alta taxa de biodegradabilidade e biocompatibilidade (ANJUM *et al.*, 2016; BEZZA; CHIRWA, 2015). Os surfactantes de origem microbiana da classe dos lipopeptídicos são produzidos por uma gama de microrganismos aeróbicos incluindo bactérias, leveduras, fungos e actinomicetos, sendo as bactérias do gênero *Bacillus* os maiores produtores desses biossurfactantes (RAAIJMAKERS *et al.*, 2010).

Além de ótimos produtores de biossurfactantes, bactérias do gênero *Bacillus* contam com a maior participação de produção de enzimas industriais no mercado atual, o que incluem as subtilisinas (GULMEZ *et al.*, 2018). As subtilisinas (EC 3.4.21.14) são proteases extracelulares produzidas por vários microrganismos e pertencem à segunda maior família de serino-proteases. O seu nome deriva da espécie bacteriana *Bacillus subtilis*, da qual a enzima foi isolada pela primeira vez (OTTESEN; SVENDSEN, 1970). Comercialmente proteases alcalinas, incluindo subtilisinas com atividade ótima em pH alcalinos (8-10), são ideais para aplicações como aditivos em detergentes comerciais devido sua estabilidade nessa faixa de pH e na presença de surfactantes e agentes oxidantes presentes nesses produtos (GULMEZ *et al.*, 2018; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

A crescente demanda da sociedade moderna por produtos de limpeza menos poluentes ao ambiente tem estimulado as pesquisas por aditivos naturais, mais facilmente biodegradáveis e ambientalmente seguros. Como os componentes-chave dos produtos de limpeza são surfactantes sintéticos, derivados do petróleo, e enzimas, a nova geração de produtos de limpeza deverá substituir os surfactantes sintéticos por biossurfactantes.

Focando nessas novas demandas, esse estudo avaliou a produção e a caracterização de uma fração enriquecida com proteases (F_{40-70%}) e biossurfactantes lipopeptídicos (BIOS27) produzidos por uma nova estirpe de *Bacillus subtilis* TIM27, proveniente de sedimentos de manguezal, visando suas aplicações como aditivos em formulações de produtos de limpeza.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas e mercado

Enzimas são biocatalisadores de reações químicas cada vez mais presentes em processos industriais contemporâneos. A palavra 'enzima' foi usada pela primeira vez pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne em 1877, quando ele descrevia a capacidade do fermento de produzir álcool a partir de açúcares, e é derivado das palavras gregas en (que significa 'dentro') e zyme (que significa 'fermento') (KÜHNE, 1877). Essas moléculas são extraídas dos organismos vivos e aplicadas em vários seguimentos industriais, tais como alimentos, bebidas, biodiesel, papel, farmacêutica, limpeza e higiene pessoal.

O mercado global de enzimas industriais atingiu um montante de US \$ 5,5 bilhões em 2018 e a estimativa é que esse valor atinja US \$ 7,0 bilhões até 2023, com uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 4,9% no período 2018-2023. (BBC REASERCH, 2018).

A indústria de alimentos movimentou o maior mercado de enzimas, com uma participação de 26%, o que correspondeu a uma parcela de US \$ 1,4 bilhão em 2017, seguido por biocombustíveis e detergentes com 18% (US \$ 969,3 milhões) e 14% (US \$ 754,4 milhões), respectivamente (DEGNAN, 2018). Entretanto, a demanda por enzimas industriais vem crescendo continuamente impulsionado pela necessidade de soluções sustentáveis para processos industriais e pelo crescimento de demandas em decorrência do aumento da população mundial. Dessa forma existe uma grande demanda por novas enzimas, ocasionando uma corrida frenética na comunidade científica na busca de novas enzimas aprimoradas, com características catalíticas e econômicas favoráveis para o mercado.

Os microrganismos são preferidos às plantas e animais como fontes de enzimas porque são mais fáceis de serem cultivados, crescem rapidamente, seu conteúdo enzimático é mais previsível e controlável, diferentes microrganismos funcionam bem sob uma ampla gama de condições físicas e químicas variadas e podem utilizar diferentes tipos de resíduos como fonte de carbono e energia (SINGH *et al.*, 2016). Além disso, o aumento da demanda por produtos de consumo, a necessidade de redução de custos nos processos industriais, a segurança ambiental, a possibilidade de reações mais específicas quando comparados com catalisadores químicos e a estabilidade dessas moléculas (CHOI; HAN; KIM, 2015) contribuem para o aumento do mercado de enzimas microbianas. Várias enzimas microbianas

já são aplicadas em muitos segmentos da indústria (Tabela 1). Lipases e proteases extracelulares são conhecidas pela sua grande estabilidade, por essa razão essas enzimas são utilizadas na indústria de detergentes para a remoção de gorduras e manchas de tecidos e superfícies. Um outro exemplo de aplicação de enzimas microbianas é a quimosina na indústria de laticínios que deteve uma das maiores arrecadações em 2018, onde chegou a um montante de 2,3 bilhões de dólares. Esse valor só ficou abaixo do valor arrecadado na aplicação de hidrolases na indústria de petróleo que atingiu 330 bilhões de dólares em 2015 (SINGH *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Aplicações e potenciais valores de mercados das principais enzimas disponíveis.

Enzimas	Setor/Indústria	Potencial Valor de Mercado
Lipase, Protease, Celulase, Amilase	Detergente (Novozymes)	\$2.767 M em 2019 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/protein-hydrolysis-enzymes.asp)
Amilase, Glucoamilase, Glucose Isomerase	Processamento de amido (Novozymes/Dinamarca, DuPont/EUA, Rouquette Freres/França etc.)	\$2.238 M em 2018 (http://www.prnewswire.com/news-releases/alcohol-and-starchsugar-enzyme-market-by-type-carbohydrase-protease-and-lipase-by-application-industrial-specialty--geography---global-trends--forecasts-to-2018-256229371.html)
Protease, Fitase, Xilanase	Para ração animal (Royal DSM NV)	\$1.371 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Xilanase	Celulose e Papel	200 M (www.novozymes.com)
Arbinanase, Amilase, Poligalacturonase	Processamento de frutas ou Vegetais (Novozymes, DSM)	Enzimas em alimentos: \$ 2.3 B em 2018 (http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles22.htm)
Hidrolase	Óleo e Gás (Novozymes)	\$330 B em 2015 (Petrochina, China)
Quimosina	Laticínios (Pfizer, Chr. Hansen)	Enzimas em alimentos: \$ 2.3 B em 2018 (http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles22.htm)
Urease, Pectinase	Vinho (Carlsberg)	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Protease	Carne (Novozymes)	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Amilase	Têxtil (Novozymes)	\$2.7 M em 2019 (www.marketsandmarkets.com)
Amilase	Panificação	\$695.1 M em 2019 (www.marketsandmarkets.com)
β -Glucanase	Produção de cervejas	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)
Protease	Curtume	Enzimas na alimentação: \$ 1.37 M em 2020 (http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/feed-enzyme.asp)

Fonte: NANDY (2016).

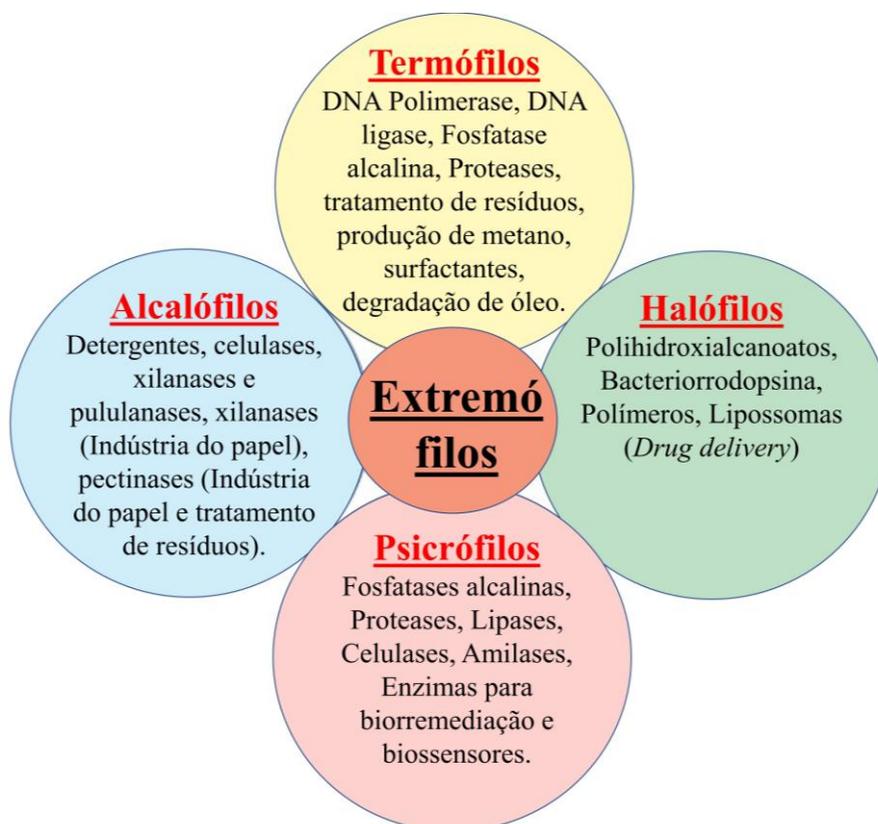
Enzimas microbianas quando comparadas com outros catalisadores químicos e biológicos possuem maior especificidade, regioseletividade e estereoseletividade pelos seus substratos em condições de temperatura e pressão consideradas brandas. Entretanto, as condições ótimas das operações industriais, na maioria dos casos, envolvem pH e temperaturas extremas e substratos não naturais. Dessa forma, o potencial da biocatálise enzimática ainda não foi totalmente explorado e encontrar estratégias eficazes para superar esses desafios operacionais são motivações premente para muitos pesquisadores (SHELDON;

WOODLEY, 2018).

Enzimas mais robustas e estáveis podem ser obtidas por meio da modificação genética (BOONYAPAKRON *et al.*, 2017), da regulação da sua expressão (ZHANG *et al.*, 2017) e de modificações químicas na sua estrutura (incorporação de íons, por exemplo). Com os grandes avanços da biologia molecular nas últimas décadas, pode-se realizar modificações genéticas na estrutura de enzimas e ocasionar mutações que afetem positivamente a performance de uma enzima (HAN *et al.*, 2019).

Uma outra estratégia é a busca por enzimas que atuam em ambientes que apresentam condições físico-químicas extremas, através da prospecção de microrganismos que vivem em condições extremas de temperatura, pressão, alcalinidade ou acidez e salinidade. Estudos acerca dos organismos extremófilos desempenham um importante papel tanto na ciência básica quanto na ciência aplicada. Eles são importantes para entender os fundamentos da diversidade bioquímica e estrutural encontrados nessas condições adversas, assim como podem ajudar a desvendar um enorme reservatório de enzimas e outros materiais biológicos para aplicações em biotecnologia (Figura 1).

Figura 1 - Aplicações biotecnológicas de organismos extremófilos em ciência básica, medicina e indústria.



Fonte: KUMAR *et al.* (2018).

O aumento do número de genomas e metagenomas de extremófilos, que agora podem ser sequenciados por tecnologias de sequenciamento de terceira geração, possibilita a identificação de novas enzimas de microrganismos que não são capazes de crescer em meios de cultura tradicionais. Por exemplo, Pessoa *et al.*, (2017) isolaram uma protease alcalina e termoestável, com pH e temperatura ótimas de 8,5 e 60 °C, respectivamente, a partir de uma biblioteca metagenômica de sedimento de manguezal da Bahia, Brasil.

Os manguezais são ecossistemas costeiros localizados entre o mar e o continente sujeitos ao regime das marés. Seus sedimentos lamosos são ricos em silte e argila, pouco oxigenados e apresentam variações diárias de salinidade. (HOLGUIN *et al.*, 2006). Esses ecossistemas apresentam grande importância ecológica devido a vegetação típica e adaptada às condições ambientais peculiares e por serem berço para reprodução de várias espécies marinhas. Sabe-se que esses ecossistemas apresentam rica diversidade microbiana (CHAVES *et al.*, 2012; COLARES; MARIA; MELO, 2013; ROCHA *et al.*, 2016), entretanto, ainda pouco explorada (NOGUEIRA *et al.*, 2015; THATOI *et al.*, 2013). Dessa forma, esses ambientes representam uma fonte para a prospecção de novos isolados microbianos e/ou novos genes para diversas aplicações biotecnológicas (COUTO *et al.*, 2010).

Vários trabalhos têm reportado a bioprospecção de componentes bioativos em manguezais ao redor do mundo, alguns deles por técnicas dependentes e outros por técnicas independentes de cultivo. Castro *et al.*, em 2014, avaliaram a produção de enzimas industriais em microrganismos endofíticos isolados de duas espécies de plantas de manguezais, *Rhizophora mangle* e *Avicennia nitida*. Como resultado eles identificaram que dentre os isolados: 75% apresentaram atividade proteásica, 62% atividade endoglucanase, 45% atividade amilolítica e 52,5% apresentaram atividade lipolítica, corroborando a ideia de que os manguezais são potenciais fontes para a prospecção de enzimas industriais. Várias outras enzimas como lipases, fitases, esterases, proteases, xilanases e amilases tem sido isoladas a partir de microrganismos de manguezais, além de vários outros bioprodutos de importância econômica como biossurfactantes, bioplásticos, ágar, alginato e carragenana (THATOI *et al.*, 2013).

2.2 Biossurfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas com atividade de superfície que podem ser obtidas por processos químicos (sintéticos) ou de fontes naturais (biossurfactantes). Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, esses

compostos tendem a se distribuir nas interfaces com diferentes graus de polaridade, reduzindo a tensão superficial e interfacial. Essas propriedades únicas tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais incluindo detergência, emulsificação, de-emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (MARCHANT; BANAT, 2012).

Surfactantes são encontrados em formulações de alimentos, cosméticos, detergentes, pesticidas, além de serem altamente demandados na indústria petroquímica (DENG *et al.*, 2016; RUFINO *et al.*, 2011). Os surfactantes predominantes em aplicações industriais continuam sendo os de origem sintética, derivados do petróleo, altamente tóxicos, de baixa degradabilidade e persistência prolongada no ambiente (RUFINO *et al.*, 2011). Biossurfactantes são produzidos principalmente por microrganismos e representam uma alternativa sustentável ao uso dos surfactantes sintéticos. Como os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes são compostos anfipáticos, ou seja possuem um grupo hidrofóbico e um grupo hidrofílico (SHARMA *et al.*, 2015).

Os biossurfactantes possuem grandes vantagens quando comparados com os surfactantes sintéticos: não são tóxicos, são biocompatíveis e mais facilmente biodegradados, além de suportarem melhor condições extremas de pH, temperatura e salinidade (ANJUM *et al.*, 2016; BEZZA; CHIRWA, 2015).

Os surfactantes de origem microbiana são distribuídos em cinco classes com base em sua estrutura química: glicolipídios, fosfolipídios e ácidos graxos, lipopeptídeos ou lipoproteínas, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação dos biossurfactantes e principais microrganismos produtores.

Estrutura Química	Biossurfactante	Microrganismo	Referência
Glicolipídios	Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(DESAI; BANAT, 1997; LAI <i>et al.</i> , 2009; WEI <i>et al.</i> , 2008)
	Soforolipídeos	<i>Candida bombicola</i>	(DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010; DESAI; BANAT, 1997)
	Celbiolipídeos	<i>Ustilago</i>	(BOOTHROYD; THORN; HASKINS, 1956; DESAI; BANAT, 1997)
	Manosileritritol Lipídeos	<i>Pseudozyma</i>	(DESAI; BANAT, 1997; MORITA <i>et al.</i> , 2012)
	Trehalolipídios	<i>Rhodococcus</i>	(DESAI; BANAT, 1997; MARQUÊS <i>et al.</i> , 2009)
Fosfolipídios	Fosfato lipídico	<i>Torulopsis maynoliae</i>	(COOPER; ZAJIC; GERSON, 1979; DESAI; BANAT, 1997)
Lipopeptídeos	Serrawetina	<i>Serratia</i>	(CHANG <i>et al.</i> , 2011; DESAI; BANAT, 1997; WEI; CHEN, 2005)
	Surfactina	<i>Bacillus</i>	(WEI <i>et al.</i> , 2003; WEI;

			WANG; CHANG, 2004; YEH; WEI; CHANG, 2008)
	Subtilisina	<i>Bacillus</i>	(DESAI; BANAT, 1997; SUNG <i>et al.</i> , 2010)
	Polimixinas	<i>B. polymyxa</i>	(BALAJI; BALIGA; JEREMIAH, 2011; DESAI; BANAT, 1997)
	Viscosina, anfisina e putisolvina	<i>Pseudomonas</i>	(DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008; DESAI; BANAT, 1997)
Poliméricos	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	(CIRIGLIANO; CARMAN, 1985; DESAI; BANAT, 1997)
	Emulsan, Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008; DESAI; BANAT, 1997; SHABTAI; GUTNICK, 1985)
	Manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>	(DESAI; BANAT, 1997; KAPPELI <i>et al.</i> , 1984)
	Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(DESAI; PATEL, 1988; DESAI; BANAT, 1997)
Particulados	Vesículas e fimbrias	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(DESAI; BANAT, 1997; KÄPPELI; FINNERTY, 1979)
	Células	Variedade de bactérias	(DESAI; BANAT, 1997; FATTOM, 1985)

Fonte: CHEN; JUANG; WEI (2015).

Os biossurfactantes lipopeptídicos, objetos de estudo desse trabalho, pertencem à classe de moléculas tensoativas que constituem uma cadeia de ácidos graxos (de comprimentos variados) e uma porção peptídica. Dependendo de suas estruturas, os lipopeptídicos podem ser divididos em várias famílias. As três principais famílias são surfactina, iturina e fengicina (INÈS; DHOUHA, 2015).

Surfactantes lipopeptídicos são produzidos por uma gama de microrganismos aeróbicos incluindo bactérias, leveduras, fungos e actinomicetos. As bactérias do gênero *Bacillus*, que compreende bactérias gram-positivas, em formato de bastonete, mesofílicas, formadoras de endósporos, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, normalmente não patogênicas, são amplamente reconhecidas como produtoras de biossurfactantes lipopeptídicos (RAAIJMAKERS *et al.*, 2010). As famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas produzidos por espécies de *Bacillus* são as mais conhecidas e estudadas atualmente (INÈS; DHOUHA, 2015).

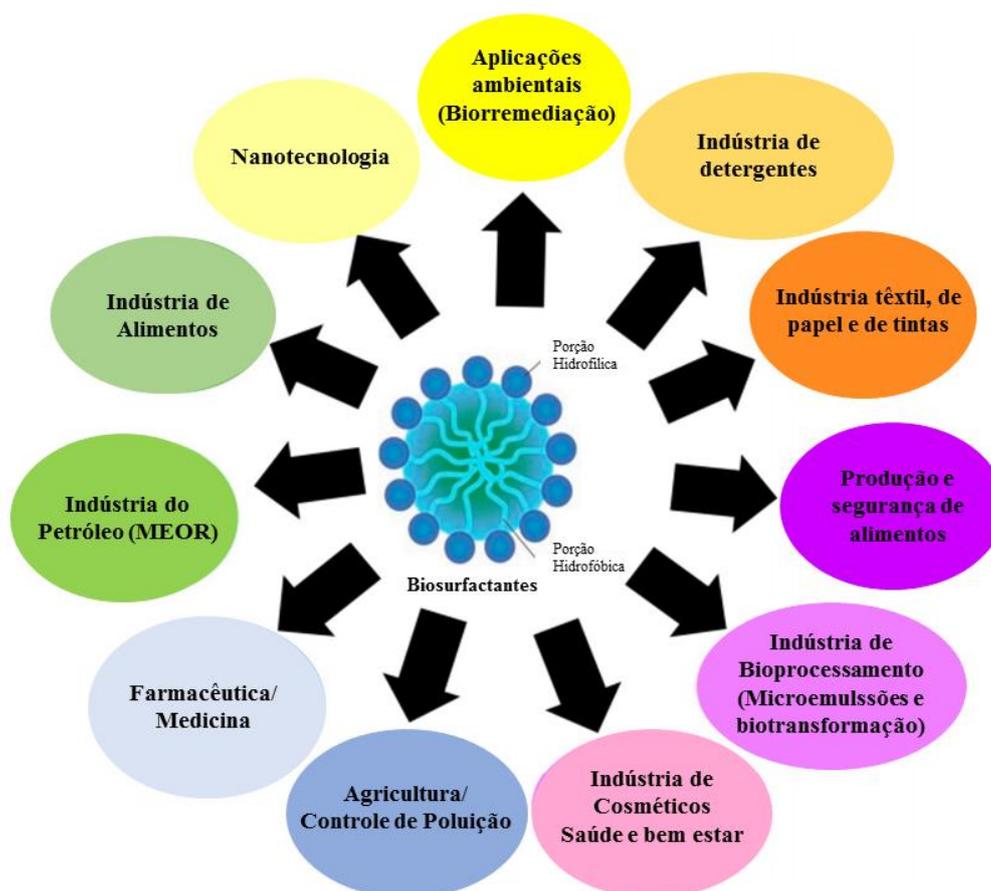
Geralmente uma mistura de famílias e isoformas de lipopeptídicos são produzidas por um mesmo organismo. Farias *et al.*, em 2018, avaliaram quatro estirpes de *Bacillus* e caracterizaram as isoformas de surfactinas, iturinas e fengicinas produzidas por elas. Os autores também reportaram que as composições de lipopeptídicos eram fortemente influenciadas pela concentração de NaCl no meio de cultivo, confirmando que a síntese dessas moléculas está sob influência genética e ambiental.

Os maiores gargalos da utilização de biossurfactantes são o baixo rendimento e alto custo de produção (DE ALMEIDA *et al.*, 2016). O rendimento depende de alguns parâmetros, incluindo a estirpe produtora, nutrientes, temperatura, pH, oxigênio e protocolo de fermentação (SANTOS *et al.*, 2016). Com o objetivo de superar esses desafios, as pesquisas tem se voltado para a descoberta de novas linhagens de microrganismos produtores, uso de linhagens recombinantes, otimização dos parâmetros de fermentação e dos processos de purificação.

Além das vantagens já apresentadas, vale a pena ressaltar que os biossurfactantes são produzidos a partir de fontes renováveis e sua produção pode ser realizadas com fontes de carbono mais baratas como farelo de trigo, soro de leite, resíduos de graxa e de óleo de cozinha e outros rejeitos industriais (GAUTAM, 2014; SANTOS *et al.*, 2016).

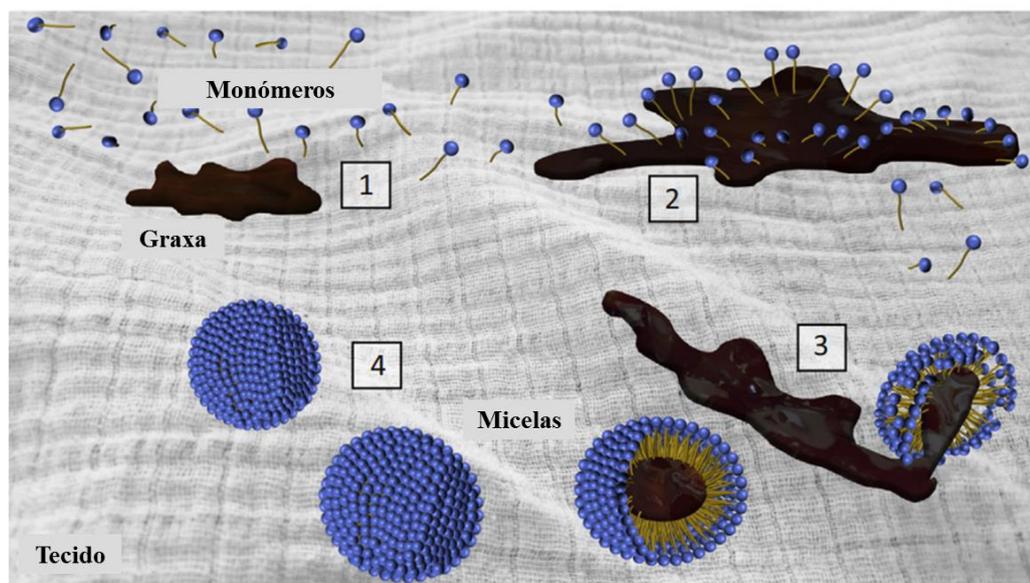
Devido as diferentes propriedades tensoativas, os biossurfactantes são aplicados em vários setores industriais, assim como na biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos (Figura 2).

Figura 2 - Aplicações industriais de biossurfactantes.



Um detergente é um surfactante ou uma mistura de surfactantes e outros componentes que apresentam propriedades de limpeza de materiais e superfícies. De forma semelhante, os biossurfactantes e bioemulsionantes conseguem agir como os detergentes, retirando manchas de tecido (Figura 3), de tanques e dutos da indústria de petróleo e podem compor a formulação de cosméticos.

Figura 3 - Ação de detergentência de biossurfactantes na remoção de manchas em tecidos.



Fonte: PERFUMO; BANAT; MARCHANT (2018). Legenda: Biossurfactantes são dissolvidos em água na forma de monômeros (1) e sua porção hidrofóbica interage com a graxa impregnada no tecido (2). Os monômeros começam a se agregar e formam micelas ao redor da graxa com a ajuda de agitação mecânica (3) a mancha é lavada (4).

Yoneda *et al.*, 2006, avaliaram a incorporação de lipopeptídeos em um produto para a limpeza cosmética exibindo excelentes resultados e irritação cutânea extremamente baixa. Além disso, Mukherjee em 2007, avaliaram o potencial de biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* em formulações de detergentes para roupas e mostraram a eficácia de uma mistura de surfactina e subtilisina A, ou seja, formulações de limpeza totalmente renováveis com ótimo desempenho.

2.3 Indústria de detergentes

A palavra “detergente” é originalmente derivada da palavra latina “detergere” - que significa limpar/remover. Na antiguidade os primeiros humanos utilizavam água fresca para lavar seus materiais têxteis e depois descobriram que a água da chuva (água mole) era melhor para a limpeza devido à prevenção de precipitações de cálcio no couro. Logo depois,

verificou-se que os têxteis poderiam ser limpos de uma forma mais eficaz se os mesmos fossem pisoteados na lama as margens do rio e depois lavados várias vezes. Esse método de lavagem foi então aprimorado com a adição de sabão de óleos vegetais e cinzas de madeira, que serviam como fonte de álcalis para a produção de componentes ativos de superfície (SCHEPER, 2007).

Já no fim dos anos 1700, a fabricação de carbonato de sódio foi ampliada, novas tecnologias foram desenvolvidas e no fim do século XIX o sabão em pó se tornou popular devido à conveniência de se obter roupas lavadas utilizando apenas uma etapa. Através do processo de sulfatação de álcoois graxos, o problema com a precipitação de sabão em água dura foi reduzido e o primeiro detergente sintético foi produzido por volta de 1930 (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

Em 1913, um cientista alemão chamado Otto Röhm emitiu uma patente na qual protegia a aplicação de extrato pancreático (Tripsina) para fins de lavagem (Patente Alemã GP283923, 1913). Na patente ele menciona que com o uso da enzima o tecido poderia ser limpo em menos tempo, sem a utilização de esforço físico e a uma temperatura muito abaixo do ponto de ebulição da água. Além disso, com a lavagem utilizando o extrato enzimático o tecido apresentou melhorias na aparência e menos sabão era necessário para a sua lavagem (JAKOB *et al.*, 2015; SCHEPER, 2007).

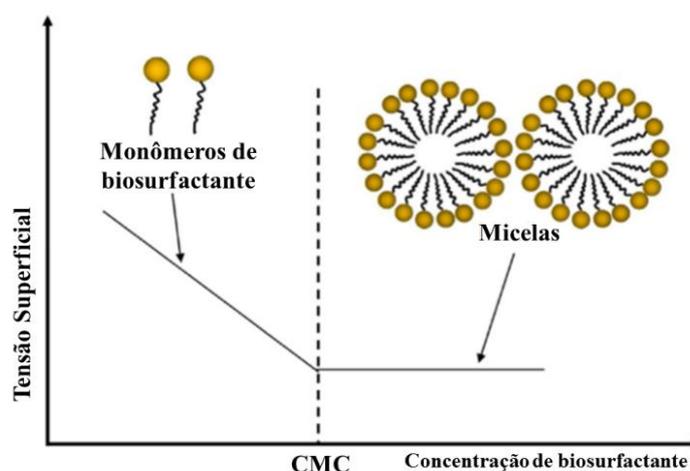
A empresa dinamarquesa *Novozymes* em 1958 iniciou um programa de pesquisa com enzimas de várias origens para melhorar a lavagem de roupas de trabalhadores da indústria de carnes e peixes, difíceis de limpar pelos métodos tradicionais. Como resultado a empresa desenvolveu um novo método de lavagem utilizando uma protease alcalina de *B. licheniformis*, denominada alcalase. Em 1963, a protease de *B. licheniformis* chegou aos consumidores holandeses na forma de um detergente chamado Biotex e, em pouco tempo, ganhou 20% do mercado holandês de detergentes. Uma melhor compatibilidade das enzimas usadas com os sistemas detergentes estimulou muito o desenvolvimento de outros detergentes contendo enzimas. Hoje, amilases, lipases e celulasas também estão disponíveis comercialmente (KUMAR *et al.*, 2008).

O uso de enzimas como aditivos em formulações de detergentes representa a maior parcela de aplicação de enzimas industriais. A venda de enzimas para a indústria de detergente teve uma porcentagem de 25-30% do total de vendas de enzimas no ano de 2015, a projeção é de que para o período de 2015-2021 esse valor aumente cerca de 11,5% (BBC REASERCH, 2018).

Em 2013, A Associação Internacional de Sabões, Detergentes e Produtos de Manutenção (AISE) promoveu uma iniciativa da criação de uma campanha de lavagem a baixas temperaturas e a redução do uso de surfactantes petroquímicos como detergentes primários, em esforços para reduzir as taxas de emissão de carbono e desenvolver formulações de detergentes mais sustentáveis. Porém um pouco antes, a multinacional britânica-neerlandesa Unilever desenvolveu o projeto SUSCLEAN (2007–2010) que focou em descobrir e selecionar novas enzimas e biosurfactantes para a formulações de detergentes na ausência de sequestradores e tampões inorgânicos. Esse projeto também buscava a redução do nível de materiais químicos nos detergentes e a redução das temperaturas de lavagem (PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018).

Os biosurfactantes quando comparados aos surfactantes sintéticos apresentam baixos valores de CMC (concentração micelar crítica) que é a concentração mínima onde ocorre a formação de micelas (Figura 4). Isso significa uma economia da quantidade de biosurfactantes necessário para que aja a formação de micelas (JIMOH; LIN, 2019). Um outro conceito que deve ser levado em consideração quando se deseja aplicar biosurfactantes em formulações de detergentes é a temperatura Krafft, que se caracteriza como a temperatura onde abaixo dela os surfactantes se cristalizam e isso leva à perda das suas atividades superficiais, como dispersão, emulsificação e capacidade crítica de formação de micelas (PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018).

Figura 4 – Relação entre a concentração micelar crítica (CMC) e tensão superficial.



Fonte: AKBARI *et al.* (2018).

Algumas empresas já produzem biosurfactantes comercialmente. Randhawa e Rahman, em 2014, compilaram uma lista de empresas produtoras de biosurfactantes em todo

o mundo (Tabela 3). O estudo definiu que os ramnolipídeos são os biossurfactantes mais produzidos em grande escala, ficando na frente dos sorolipídeos, glicolipídeos e lipopeptídeos. Uma patente que utiliza uma combinação de ramnolipídeos e enzimas foi patenteado pela empresa Unilever e é utilizado em formulações de detergentes líquidos para aplicações em lavanderias, shampoos e sabões (PARRY *et al.*, 2011). Em formulações líquidas os biossurfactantes são mais vantajosos por possuírem ponto de Krafft reduzido e serem estáveis em uma ampla faixa de temperatura, pH e salinidade (RIZZO *et al.*, 2014; VECINO BELLO *et al.*, 2012). Já foi provado que misturas contendo biossurfactantes parecem fornecer um maior grau de tolerância a uma redução de temperatura de lavagem (25 °C para 10 °C) do que apenas formulações contendo surfactantes químicos, o que sugere que a incorporação dessas moléculas em formulações de detergentes provavelmente melhoraria sua faixa operacional em temperaturas mais baixas (PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018).

Tabela 3 - Empresas produtoras de biossurfactantes e o setor de aplicação.

Empresa	Sede	Produto	Setor de atividade
TeeGeneBiotech	UK	Ramnolipídeos e Lipopeptídeos	Farmacêutico, cosmética, agentes antimicrobianos e ingredientes para drogas anti-câncer
AGAE Technologies LLC	EUA	Ramnolipídeos	Farmacêutico, cosmética, higiene pessoal, biorremediação, Recuperação avançada de petróleo (EOR)
Jeneil Biosurfactant Co.LLC	EUA	Ramnolipídeos	Produtos de limpeza e EOR
FraunhoferIGB	Alemanha	Glicolipídeos , lipídios de celobiose e lipídeos de manosileritritol (MEL's)	Produtos de limpeza, gel de banho, Shampoo, detergente líquido, produtos farmacêuticos
Ecover Belgium	Bélgica	soforolipídeos	Produtos de limpeza, cosmética, biorremediação, controle de pragas, farmacêutico

Fonte: RANDHAWA; RAHMAN (2014).

Além dos biossurfactantes, a adição de enzimas nos detergentes comerciais contribuiu significativamente para o desenvolvimento de detergentes mais efetivos e com uma diversidade maior de aplicações (SCHEPER, 2007). Várias enzimas como proteases, lipases, amilases, oxidases, peroxidases e celulasas são adicionadas para remover manchas e melhorar a performance de lavagem (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002). Além de remover manchas, as enzimas atuam cortando as fibras de algodão danificadas, melhoram a brancura e a cor do tecido.

O uso de enzimas e biossurfactantes contribui para a diminuição de energia gasta no processo de lavagem, pela diminuição da temperatura do sistema de lavagem na presença de enzimas. Ao reduzir a temperatura de lavagem de 60 °C para 40 °C com a adição de uma protease tradicional foi mostrado uma forte diminuição na emissão de CO₂ e, portanto, potencial contribuição para a diminuição do aquecimento global pela redução do consumo de energia (SCHEPER, 2007).

Em 1913, as enzimas tripsina e quimiotripsina se tornaram as primeiras enzimas aplicadas como ingredientes ativos em detergentes, para remover manchas de natureza proteica de tecidos. Essas enzimas são encontradas em todos os organismos, onde são elementos chave para vários processos metabólicos e fisiológicos (POGSON; GEORGIU; IVERSON, 2009).

As proteases são muito diversas, dessa forma a classificação dessas enzimas pode ser feita com base no tipo de reação catalisada, na estrutura e no sítio ativo. Em relação ao seu sítio ativo as proteases são classificadas, principalmente, como proteases aspárticas, cisteínicas, serinas e metaloproteases (Tabela 4). Os grupos das proteases também podem ser divididos de acordo com seu local de ação em exopeptidases, que clivam ligações peptídicas próximas aos grupos terminais, e as endopeptidases, que clivam ligações peptídicas no meio da cadeia peptídica (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

Tabela 4 - Classificação de proteases e suas principais características.

Classificação	Massa Molar (kDa)	Faixa ótima de pH	Faixa ótima de temperatura (°C)
Proteases Aspárticas	30–45	3–5	40–55
Proteases Cisteínicas	34–35	2–3	40–55
Metaloproteases	19–37	5–7	65–85
Serino Proteases	18–35	6–11	50–70

Fonte: DOS SANTOS AGUILAR; SATO (2018).

As proteases também podem ser nomeadas de acordo com a faixa de pH que elas agem. Elas podem ser nomeadas como ácidas, neutras e alcalinas (GUPTA *et al.*, 2002). As proteases ácidas são efetivas em baixos valores de pH e sua ação envolve a quebra de ligação peptídica entre aminoácidos aromáticos com grupos laterais volumosos. Proteases neutras por sua vez são efetivas na faixa de pH entre 5-8, já as proteases alcalinas atuam na faixa de pH de 7-11, sendo ótimas no pH 10. Essas enzimas são capazes de hidrolisar ligações contendo tirosina, fenilalanina, leucina (próximo ao grupo carboxila terminal), aspartato, histidina e serina (GUPTA *et al.*, 2002; SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

Uma protease candidata para adição em formulações de detergente precisa ter algumas características como um desempenho de lavagem eficiente em amplas faixas de pH alcalino e temperatura (baixas temperaturas para fibras sintéticas a altas temperaturas para algodão). Além disso a protease deve degradar e retirar com eficiência manchas proteicas dos tecidos, apresentar compatibilidade com os outros componentes do detergentes (por exemplo, surfactantes não iônicos e aniônicos, agentes complexantes, perfumes e outras enzimas), estabilidade na presença de agentes oxidantes (por exemplo, alvejantes e peróxido de hidrogênio) e um amplo prazo de validade em formulações detergentes (VOJCIC *et al.*, 2015).

Dentre as proteases, as serino proteases se destacam como o tipo mais abundante na natureza. Esse tipo de protease contém um resíduo de serina no seu sítio ativo que é essencial para a catálise enzimática. Essa enzima inicia um ataque nucleofílico em ligações peptídicas com a ajuda de outros dois aminoácidos vizinhos presentes no sítio ativo, histidina e ácido aspártico (VOJCIC *et al.*, 2015). A classificação adicional de serino proteases depende da especificidade do substrato e da homologia estrutural de proteases bem estabelecidas (MORIHARA, 2006). As principais subclasses de serino proteases microbianas são subtilisina, quimotripsina, serina-carboxipeptidase II, prolil oligopeptidase II, prolil oligopeptidase, proteases de *Myxobacter* α -lítica e de estafilococos (GUPTA *et al.*, 2002).

A subtilisina (EC 3.4.21.14) pertence à segunda maior família de serino proteases e proteínas secretadas extracelularmente por muitos microrganismos, incluindo estirpes de *Bacillus*. O nome subtilisina deriva do nome da espécie *B. subtilis*, da qual a enzima foi isolada pela primeira vez (OTTESEN; SVENDSEN, 1970). Várias subtilisinas de *Bacillus* spp. foram estudadas em relação a estrutura e função, entretanto não são enzimas encontradas somente neste gênero. Estão amplamente distribuídas nos domínios Bacteria, Archaea e Eucarya, além dos vírus.

As subtilisinas são facilmente distinguíveis dos outros representantes desse grupo (quimiotripsina, carboxipeptidase e peptidase A) pela sua sequência de aminoácidos e sua estrutura tridimensional. A tríade catalítica das subtilisinas contém um ácido aspártico, uma histidina e uma serina, sendo essa última a responsável pelo ataque nucleofílico que inicia a reação de hidrólise. A massa molecular das subtilisinas varia de 18 kDa a 90 kDa, porém as mais utilizadas na indústria de detergente tem 27 kDa (MAURER, 2004).

O sucesso das subtilisinas é baseado em vários fatores, incluindo alta estabilidade e especificidade relativamente baixa do substrato - características comuns em proteases extracelulares. O fato de ser uma enzima extracelular é uma característica bastante favorável já que após a produção sua separação da biomassa é relativamente simples. Outro ponto importante é a capacidade das estirpes de *Bacillus* secretarem enzimas por um período muito curto no caldo de fermentação (MAURER, 2004).

Devido a sua grande diversidade, disponibilidade e ampla especificidade de substratos, as subtilisinas são bastantes úteis como biocatalisadores industriais. A sua característica alcalina é adequada para aplicações na indústria de detergente devido a sua estabilidade sob condições operacionais consideradas adversas incluindo altos valores de pH e temperatura e compatibilidade com surfactantes e agentes oxidantes (GULMEZ *et al.*, 2018). Além da indústria de detergentes as subtilisinas são utilizados nas indústrias farmacêutica e cosmética, em curtumes e no tratamento de efluentes (GUPTA *et al.*, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Este estudo teve como objeto avaliar o potencial de enzimas e de biossurfactantes produzidos pela estirpe de *Bacillus subtilis* TIM27 como aditivos de detergentes.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação da produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas por TIM27;
- Avaliação da produção de biossurfactantes por TIM27;
- Purificação parcial do extrato enzimático e de lipopeptídeos;
- Identificação enzimática por espectrometria de massas;
- Efeito da concentração de NaCl e pH na atividade tensoativa;
- Efeito da concentração de NaCl e pH na atividade proteolítica;
- Efeito da temperatura, íons metálicos, detergentes sintéticos e biossurfactantes na atividade proteásica;
- Efeito dos inibidores β -mercaptoethanol (β -Mer), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e do fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) na atividade proteásica;
- Avaliação de proteases e biossurfactantes como aditivos em detergentes comerciais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pesquisa de atividades esterásica e proteásica em sobrenadantes de culturas de TIM27

O trabalho teve início com a reativação da estirpe de *Bacillus subtilis* TIM27, que se encontra armazenada na coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Essa estirpe foi previamente isolada de sedimentos do manguezal Timonha, município de Barroquinhas, Ceará, sendo confirmada como produtora de biossurfactantes em testes de emulsificação de uma mistura água-querosene, o que motivou sua escolha para este estudo.

A cultura estocada em freezer -80 °C foi reativada em caldo nutritivo (5,0 g de peptona; 5,0 g de cloreto de sódio (NaCl); 1,5 g de extrato de carne; 1,5 g de extrato de levedura por litro de meio) e incubada (incubadora Tecnal[®], modelo TE-420) a 30 °C, 150 rpm por 16 h. Em seguida, a cultura foi inoculada em ágar nutritivo contendo 0,1% de tributirina ou 1% de leite desnatado para a pesquisa de atividade lipolítica e proteásica respectivamente. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas e a formação de halo de hidrólise ao redor das colônias foi interpretada como positiva para referida atividade enzimática.

4.2 Produção e purificação parcial de enzimas

Para a produção de proteases, um pré-inóculo foi feito em caldo nutritivo contendo 0.2% de glicerol como fonte de carbono. Após 16 h de agitação e incubação o pré-inóculo foi ajustado para uma densidade ótica de 1,0 (600_{nm}) em espectrofotômetro (Thermo Fischer Scientific, modelo Genesys[™] 6, Madison, WI, EUA), e 5% da cultura foram adicionados em 400 mL de Caldo Nutritivo em Erlenmeyer de 2 L. Os frascos foram incubados durante 48 h a 30 °C sob agitação de 150 rpm. Para a obtenção do sobrenadante livre de células, a cultura foi centrifugada a 8.000 g a 4 °C por 10 min.

A purificação de proteínas do sobrenadante foi feita por precipitação com sulfato de amônio em três diferentes faixas de saturação a 10 °C: 0-40%(F_{0-40%}); 40-70%(F_{40-70%}) e 70-90%(F_{70-90%}). Ao final do processo, os extratos de cada faixa de saturação foram dialisados contra água destilada. A pesquisa da atividade enzimática de interesse foi feita aplicando 50

μL de cada faixa de saturação em placas de ágar nutritivo contendo 0,1% de tributirina ou 1% de leite desnatado, para esterases e proteases, respectivamente. A formação de halos ao redor dos poços foi avaliada após a incubação a 30 °C por 6 h. A concentração de proteína presente na fração que apresentou atividade foi determinada seguindo o método de BRADFORD (1976).

4.3 Produção e purificação parcial dos biossurfactantes lipopeptídeos

Para induzir a produção de biossurfactantes, a estirpe TIM27 foi cultivada em caldo surfactina (Morán et al., 2000, com modificações) contendo a seguinte composição por litro: 5 g extrato de levedura, 2,7 g NaCl, 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 0,6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 g glicose, pH 7,0, esterilizado a 110 °C por 15 min. O caldo surfactina foi suplementado com 0,1% (v/v) de uma solução de micronutrientes composta por 10,95 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,54 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,39 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,25 g de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,17 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ por litro de água e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 μm (Millipore, USA).

A cultura foi então incubada sob agitação contínua de 150 rpm, a 30 °C por 16 h (incubadora Tecnal®, modelo TE-420), quando sua absorbância foi ajustada para 0,15 a 600 nm em espectrofotômetro (Thermo Fischer Scientific, modelo Genesys™ 6, Madison, WI, EUA). Em seguida, a cultura foi inoculada em 600 mL de caldo surfactina na proporção de 10% (v/v) e incubada (incubadora Lab Companion®, modelo IS-971) nas mesmas condições anteriores por 48 h. Ao final, foi centrifugada a 7.000 g por 15 min, 4 °C.

Para purificação dos biossurfactantes, o sobrenadante livre de células foi submetido à precipitação ácida de acordo com a metodologia proposta por PEREIRA et al. (2013). Para tanto, o sobrenadante foi ajustado a pH 2,0 com HCl 12M e deixado em repouso por 24 h a 4 °C. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 15.000 g, 4 °C por 30 min e lavado duas vezes com água destilada acidificada (pH 2,0), sob centrifugação (Hettich®, rotina 420R). O precipitado foi dissolvido em água desmineralizada o suficiente para ressolubilização e o pH foi ajustado para 7,0 usando NaOH 1M. Essa solução concentrada de biossurfactantes foi liofilizada (Analítica, Christ alpha 1-2 LD plus).

4.4 Índice de emulsão (IE24) e redução da tensão superficial (TS)

A atividade emulsificante foi avaliada seguindo a metodologia proposta por IQBAL; KHALID; MALIK (1995). O procedimento foi realizado agitando-se 2 mL de querosene e 2,0 mL de soluções de biossurfactante, nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm, em vortex por 2 min. Em seguida, os tubos foram deixados em repouso por 24 h a 25 °C, quando foi determinado o índice de emulsificação, que consiste na razão entre a camada de emulsão e a camada total multiplicada por 100. Os aspectos das emulsões produzidas foram avaliados em microscópio óptico com auxílio de lâmina e lamínula utilizando o aumento de 10x. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A redução da tensão superficial da água foi mensurada utilizando 20 mL da solução de biossurfactantes na menor concentração capaz de provocar emulsificação, em tensiômetro Krüss (Hamburgo, Alemanha, modelo K20) utilizando o método do Anel Du Nöuy (DU NOUY, 1925). O tensiômetro foi previamente calibrado com água destilada (72 mN/m) a 25 °C e realizada pelos menos três medidas com a amostra-teste.

4.5 Revelação de atividade enzimática em gel (Zimograma)

Para a realização do zimograma, um gel de eletroforese de poliacrilamida SDS (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987) foi realizado e teve-se o cuidado de não aquecer a amostra para evitar-se a desnaturação de enzimas. Após eletroforese, o gel foi lavado com 100 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 suplementado com 1% de Triton X-100 por 30 min com agitação de 120 rpm para renaturar as proteínas (MOHAMED *et al.*, 2009). Depois o gel foi lavado três vezes com 100 mL de tampão Tris-HCl pH 8,0.

Para a detecção de atividade proteásica, o gel de eletroforese foi imerso em 50 mL de uma solução contendo 2% de gelatina em tampão Tris-HCl, pH 8,0, por 30 min a 4 °C, a fim de permitir que o substrato se difundisse no gel com atividade enzimática (GARCIACARRENO; DIMES; HAARD, 1993). Em seguida, o gel foi incubado a 37 °C por 60 min para a digestão do substrato. Depois disso, o gel foi lavado com 100 mL de água destilada e imediatamente fixado com Azul de Coomassie G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1988).

Para a detecção de atividade esterásica o gel foi imerso em 100 mL de uma solução contendo 0,1% da solução de substrato (1% de α -Acetato naftila preparado em acetona, p/v) e 2,5% da solução do corante (*fast blue* B a 2% preparado em água destilada) em

tampão Tris-HCl, pH 8,0, por 10 min a 37 °C. A reação foi interrompida mergulhando o gel em ácido acético 1% por 1 min (SINGH *et al.*, 2006).

4.6 Análises cromatográficas da fração F_{40-70%}

Para a purificação e identificação das enzimas proteolíticas e lipolíticas, duas técnicas de cromatografia foram realizadas com o auxílio do sistema de purificação de proteínas ÄKTA (GE Healthcare, Reino Unido). Primeiramente, 7 mg da fração 40-70% (F_{40-70%}) em 50 mM de tampão Glicina-NaOH pH 9,6 foram aplicados em uma coluna de troca aniônica HiTrap Q HP 1 mL (GE Healthcare, Reino Unido) previamente equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo foi estabelecido em 1 mL/min e a eluição ocorreu em tampão glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6 sob gradiente de 200, 400, 600, 800 e 1000 mM de NaCl, sendo aplicados 7 vezes o volume da coluna para cada concentração. Ao final do processo, os cromatogramas foram analisados e os tubos contendo os picos evidentes de cada concentração de sal foram submetidos a atividade em placas utilizando 0,1% de tributirina ou 1% de leite desnatado como substrato e eletroforese Tricina SDS.

Seguiu-se o processo de purificação do pico eluído da coluna de troca iônica com 200 mM de NaCl, com uma cromatografia hidrofóbica utilizando a coluna HiTrap Phenyl HP 5 mL (GE Healthcare, Reino Unido) previamente equilibrada em 50 mM de tampão fosfato pH 7 contendo 1 M de sulfato de amônio. O fluxo foi estabelecido em 5 mL/min e a eluição se deu com um gradiente decrescente e linear de 50 mM de tampão fosfato pH 7 contendo 1–0 M de sulfato de amônio. Os volumes de cada pico foram dialisados contra água ultrapura e as atividades enzimáticas verificadas. Os tubos com atividade enzimática foram analisados por SDS-PAGE Tricina (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987) com o aquecimento da amostra a 100 °C e revelados por nitrato de Prata (BLUM *et al.*, 1987) e por coloração com Azul de Coomassie G-250 (NEUHOFF *et al.*, 1988). As bandas de interesse foram excisadas do gel corado com Azul de Coomassie G e digeridas com tripsina (15 µg/mL em NH₄CO₃) e analisadas por espectrometria de massas (HUYNH; RUSSELL; WALSH, 2009).

4.7 Identificação de enzimas por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)

Os peptídeos trípticos resultantes da excisão do gel de eletroforese foram injetados em uma nanocoluna de fase reversa C18 (Waters nanoACQUITY UPLC BEH130 100 mm x 75 µm; 1,7 µm tamanho de partícula), equilibrada com ácido fórmico 0,1%,

acoplado a uma fonte nano-spray de um espectrômetro de massa (Synapt HDMS ESI/MALDI-IMS-oToF/MS - Waters). O espectrômetro foi previamente calibrado na faixa de 50 a 1600 m/z com os fragmentos do íon de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. Nos experimentos de LC-MS/MS foi utilizada a função aquisição dependente de dados (DDA), selecionando os íons precursores duplamente ou triplamente protonados. Os íons selecionados foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), utilizando uma rampa de energia de colisão de acordo com o estado de carga e a m/z do íon precursor. A faixa de m/z dos espectros MS dos íons precursores foi de 300 a 3000, e para os espectros de fragmentação a faixa de m/z de 50 a 3000. Os espectros de MS, obtidos durante a cromatografia de separação dos peptídeos, e os espectros de MS/MS, gerados a partir da fragmentação dos íons precursores selecionados, foram processados e analisados utilizando o programa Proteinlynx® 2.4 (Waters). Em seguida, os dados processados foram submetidos a uma busca em bancos de dados utilizando a ferramenta Mascot MS/MS ion search, usando como parâmetros a massa dos íons precursores e o padrão de fragmentação dos mesmos. Para os íons não identificados pelos programas de busca, a sequência de aminoácidos dos peptídeos foi obtida através da interpretação manual dos espectros de fragmentação, através do programa Mass lynx 4.1.

4.8 Efeitos da concentração de NaCl e pH nas atividades tensoativas dos biossurfactantes lipopeptídeos

Para avaliar o efeito do NaCl na atividade emulsificante dos lipopeptídeos, foram preparadas soluções do biossurfactante (300 ppm) em diferentes concentrações de NaCl: 100, 150, 200, 250 e 300 g/L. Já para analisar o efeito do pH na redução da tensão superficial da água e emulsão em querosene, uma solução de 300 ppm do biossurfactante teve seu pH alterado com adição de 50 mM de soluções fosfato de sódio (pH 7), Tris-HCl (pH 8), Borato de sódio (pH 9) e glicina-NaOH nos pHs 10 e 11.

4.9 Atividade proteásica

A atividade proteásica foi mensurada espectrometricamente pelo método de hidrólise da azocaseína (SARATH; MOTTE; WAGNER, 1989). Resumidamente, 200 µL de azocaseína a 1% (p/v) (A2765; Sigma-Aldrich) foram colocados em um tubo de

microcentrífuga ao qual foram adicionados 250 μL de tampão e 50 μL da fração 40-70%. Após isso, a mistura de reação foi incubada a 37 °C por 30 min. A reação foi encerrada pela adição de 300 μL de Ácido Tricloroacético (TCA) a 12% (v/v) e centrifugado por 5 min a 12.000 g. Em seguida, 250 μL do sobrenadante foram coletados e neutralizados pela adição de 750 μL de NaOH 2M e a absorbância a 420 nm foi medida em espectrofotômetro (U-2800; Hitachi High Technologies, Tóquio, Japão). Um ensaio controle foi realizado sem a adição de enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produziu um aumento na $A_{420\text{nm}}$ de 0,01 em 30 minutos a 37 °C (GUIJARRO, 1999).

4.10 Efeito do pH, da temperatura e concentração de NaCl na atividade enzimática

O pH ótimo da atividade proteásica foi avaliado incubando-se a enzima em 50 mM de tampão na faixa de pH de de 6-11. Os tampões utilizados foram: Acetato de sódio para o pH 6,0; Tampão fosfato pH 7; Tampão Tris-HCl pH 8; Tampão borato de sódio pH 9; e Tampão glicina-NaOH nos pHs 10 e 11.

A temperatura ótima da atividade enzimática foi determinada no intervalo de 20-80 °C em Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. A influência de sal na atividade enzimática foi avaliada nas seguintes concentrações de NaCl: 100, 150, 200, 250 e 300 g/L. Em todos os testes o valor máximo da atividade enzimática foi considerado 100%.

4.11 Efeito de íons metálicos na atividade proteásica

O efeito de íons metálicos foi avaliado incubando-se a preparação da enzima com K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} na concentração de 5 mM a 37 °C por 30 min. Depois do período de incubação as atividades esterásica e proteásica foram mensuradas como descrito previamente. A atividade enzimática sem a adição de íons metálicos foi considerada como 100%.

4.12 Avaliação das preparações enzimáticas para aplicações em detergentes

Para determinar o potencial da fração 40-70% na formulação de um detergente, foi investigada a sua compatibilidade com o detergente comercial OMO[®] (Unilever), agentes oxidantes (H_2O_2), surfactantes (Triton X-100, SDS, Tween 80) e biosurfactante (TIM 27). No

ensaio foi usado uma preparação do detergente comercial OMO[®] na concentração sugerida pelo fabricante (7 mg/mL), 1% de surfactantes, 1% de agente oxidante e 300 ppm do biossurfactante (concentração ótima de emulsificação) produzido pela estirpe TIM27 foram incubadas com a fração 40-70% por 30 min a 37 °C. Após a incubação as atividades foram realizadas sob condições padrões para as atividades esterásica e proteásica. A atividade enzimática sem adição dos agentes testados foi considerada como 100%. Atividades enzimáticas do próprio detergente comercial foram inativadas por aquecimento a 70 °C por 1 h (BOUACEM *et al.*, 2015).

4.13 Efeito de inibidores na atividade proteásica

O efeito dos inibidores enzimáticos, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etileno-diamina-tetraacético (EDTA) e β -mercaptoetanol (β -mer) foram avaliados pré-incubando a fração 40-70% na presença de 1 e 5 mM de cada inibidor por 30 min a 30 °C. Após isso as atividade enzimáticas foram determinadas sob condições padrões. As atividades na ausência de inibidores foram consideradas como 100%.

4.14 Desempenho da preparação enzimática para limpeza de tecido

A fim de determinar a eficiência da preparação enzimática (F_{40-70%}) como aditivo em detergentes de roupa e, em sintonia com o biossurfactante (BIOS27), tecidos de algodão branco de 3x3 cm foram impregnados com 50 μ L de uma emulsão de gema de ovo e deixados secando em temperatura ambiente por 24 h. Após isso, os pedaços de tecidos manchados foram incubados em vários sistemas de lavagem (20 mL), por 1 h, a 37 °C sob agitação de 150 rpm: C1- Água destilada (controle negativo); C2- Água destilada + OMO[®] (7 mg/mL) (Controle positivo); C3- Somente BIOS27 (300 ppm); C4- BIOS27 (300 ppm) + F_{40-70%} (1000 U); C5- OMO[®] aquecido 70 °C; C6- OMO[®] aquecido + F_{40-70%} (1000 U). Após a lavagem os tecidos foram enxaguados pro imersão em água destilada, 3 vezes, e secos à temperatura ambiente por 24 h (REKIK *et al.*, 2019). Os experimentos foram realizados em duplicatas e os resultados fotografados.

4.15 Análises estatísticas

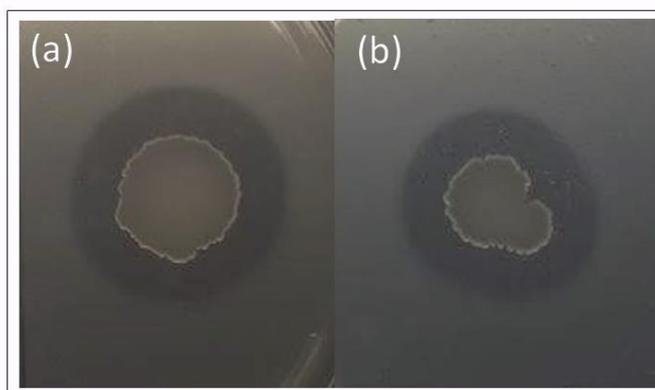
Os resultados foram submetidos a análise de variância pelo método ANOVA com pós-teste de Turkey ou Sidak com significância de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPadPrism 6.01 (San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Pesquisa de atividades esterásica e proteásica no sobrenadante da cultura de TIM27

A secreção de esterases e proteases produzidas por TIM27 foi confirmada pela formação de halos de difusão em meio contendo tributirina e leite desnatado como substratos (Figura 5).

Figura 5 - Detecção das atividades esterásica e proteásica em meio contendo tributirina (a) e (b) caseína.

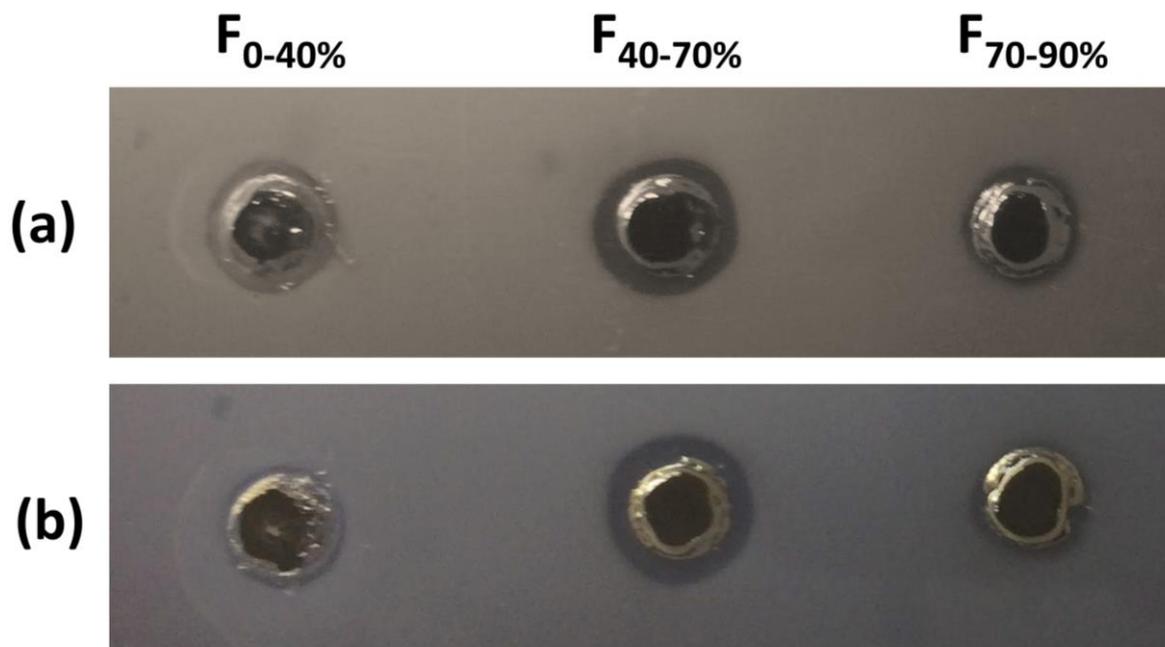


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Produção e purificação parcial de enzimas

Análises das frações obtidas pela precipitação do sobrenadante da cultura de TIM27 com sulfato de amônio, mostrou que as atividades esterásica e proteásica estavam principalmente concentradas na F_{40-70%} (Figura 6). A quantificação de proteínas totais desta fração pelo método de Bradford (1970) revelou a presença de 15 mg de proteínas totais (Tabela 5).

Figura 6 - Atividade enzimática das três frações resultantes da precipitação do sobrenadante da cultura de TIM27 com sulfato de amônio.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Atividades da fração 0-40% (F_{0-40%}), 40-70% (F_{40-70%}) e 70-90% (F_{70-90%}) em (a) 0,1% de tributirina e (b) 1% de leite desnatado.

Tabela 5 - Concentração de proteínas presentes no sobrenadante bruto da cultura de TIM27 e nas frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio.

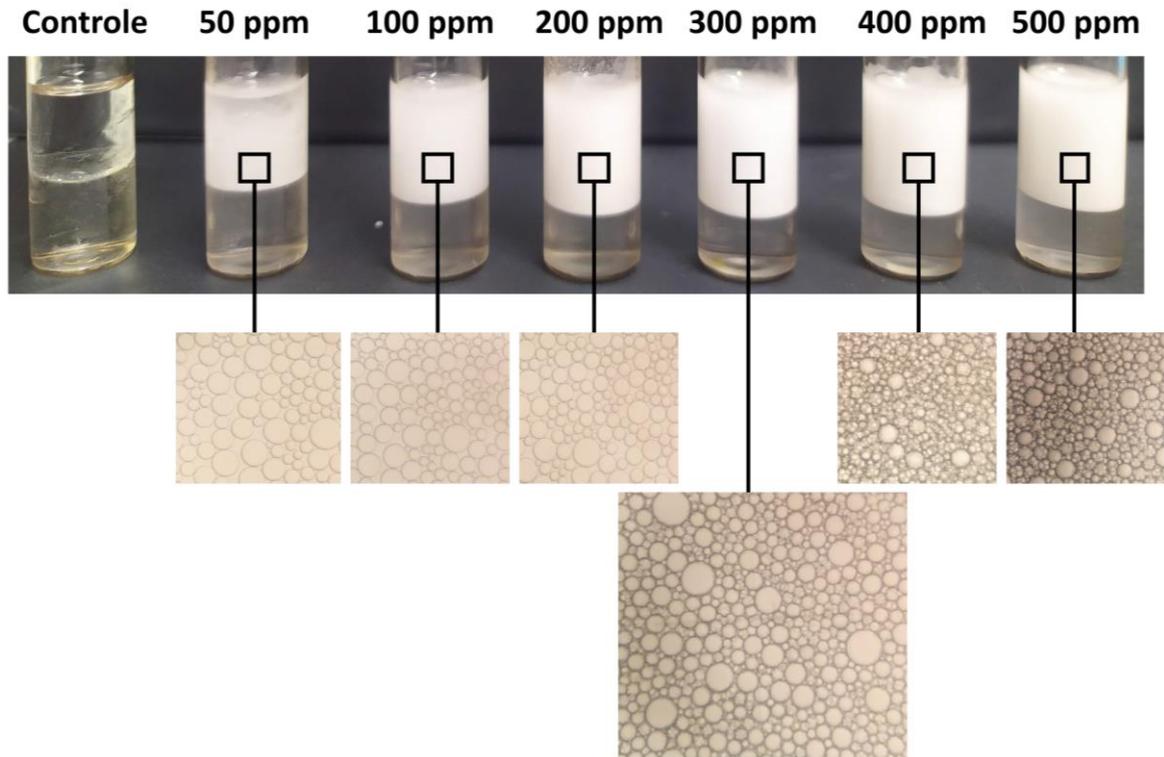
	Volume (mL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Proteínas totais (mg)
Extrato Bruto	400	0,12	48
F_{0-40%}	7	0,7	4,9
F_{40-70%}	7,8	1,92	15
F_{70-90%}	7,5	1,2	9

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Produção e purificação parcial dos biossurfactantes lipopeptídeos

A precipitação ácida do sobrenadante da cultura de TIM27 rendeu 673 mg/L de biossurfactante lipopeptídeos. Essa preparação foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de $71,2 \pm 0,03$ mN/m para $25,3 \pm 0,05$ mN/m. Essa preparação também foi capaz de promover a emulsificação de uma mistura água-querosene, com índice de emulsificação de 67% a partir de 50 ppm, embora, com o auxílio de microscópio óptico, foram observadas gotículas menores e mais estáveis a partir de 300 ppm (Figura 7).

Figura 7 – Atividade emulsificante de mistura água-querosene em diferentes concentrações de biosurfactante lipopeptídeo produzido por TIM27.

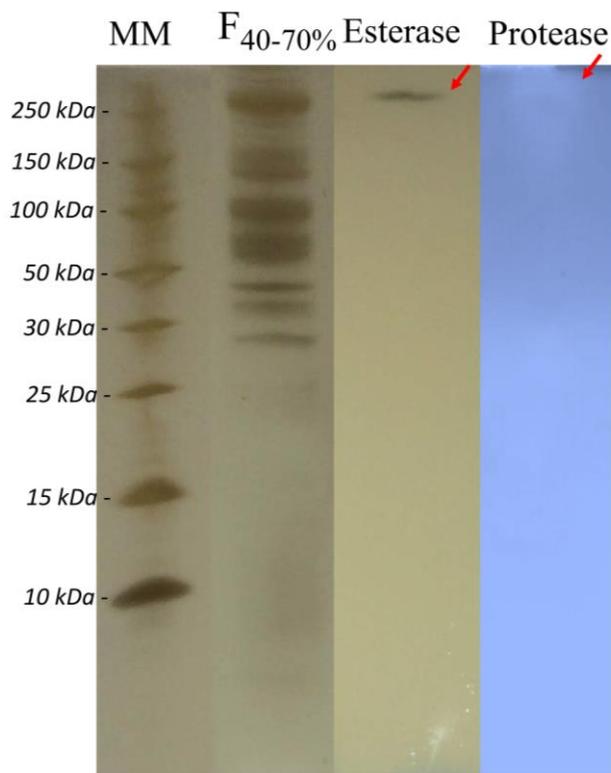


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Detecção de enzimas em gel (Zimograma)

Os zimogramas confirmaram a presença de bandas com atividades esterásica e proteásica na fração F_{40-70%} (Figura 8).

Figura 8 – Detecção de atividade esterásica e proteásica da fração F_{40-70%} em gel.

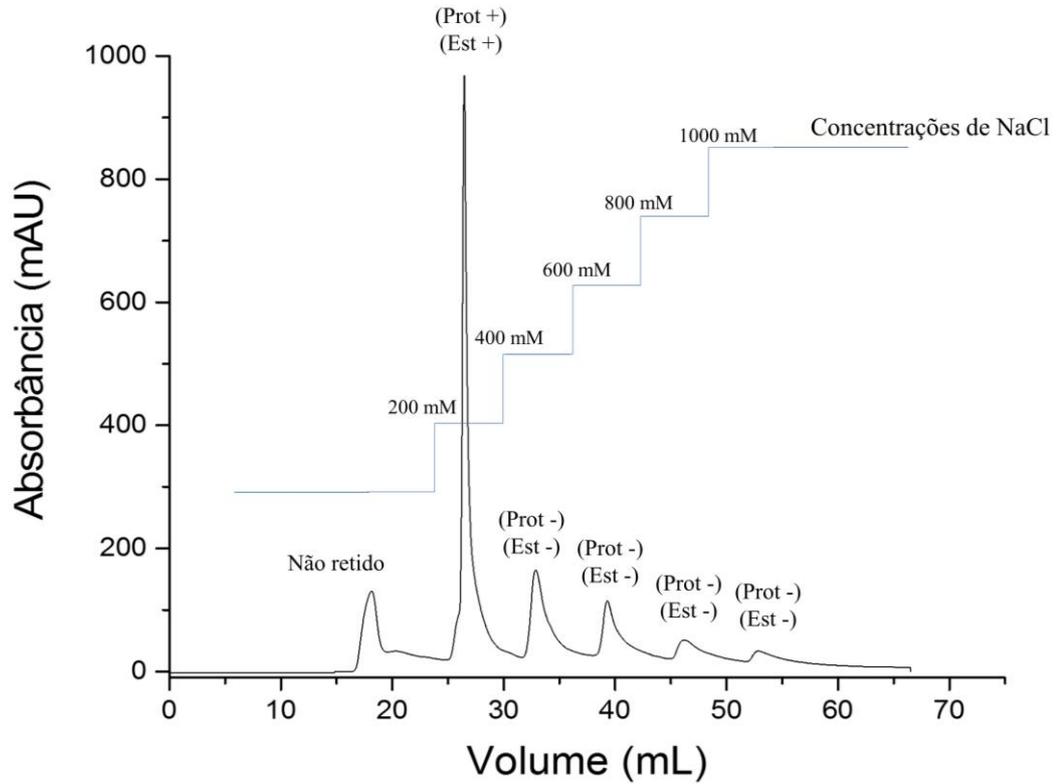


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Análises cromatográficas da fração F_{40-70%}

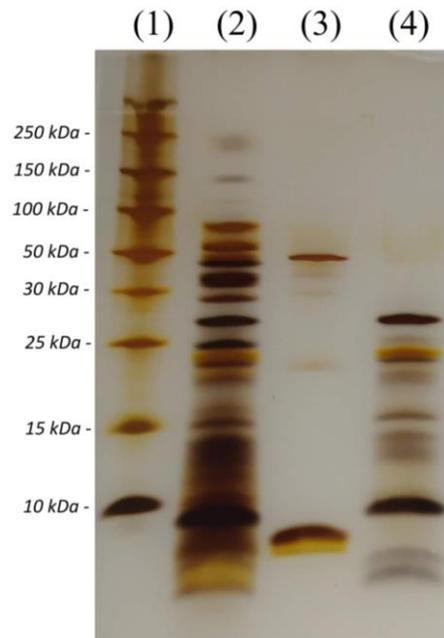
Na cromatografia de troca iônica foi verificado ambas as atividades (esterásica e proteásica) apenas na fração de eluição de 200 mM de NaCl (Figura 9). O perfil eletroforético do pico está sendo mostrado na figura 10. Após isso, o pico da troca iônica (200 mM de NaCl) foi aplicado na coluna hidrofóbica sendo eluída com um gradiente linear de sulfato de amônio de 1-0 M obtendo um pico onde apresentava ambas as atividades (Figura 11a). No gel foi observado que no tubo 61 continha majoritariamente duas bandas denominadas BA e BB (Figura 11b), que foram recortadas do gel corado com comassie e digeridas por tripsina.

Figura 9 – Purificação da F_{40-70%} em coluna de troca iônica eluída com gradiente de NaCl. Detecção das atividades proteásicas e esterásica no pico eluído com 200 mM de NaCl.



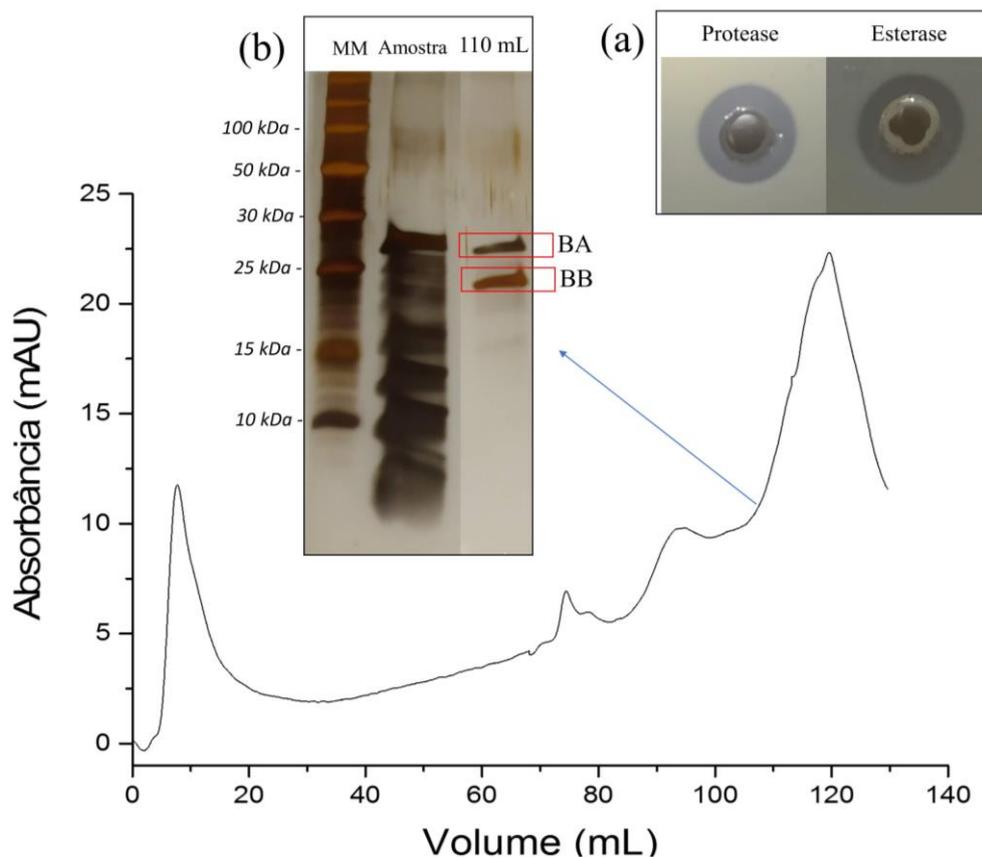
Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: presença(+) ausência(-) atividade proteásica (Prot) esterásica (Est).

Figura 10 - Eletroforese em gel de tricina da F_{40-70%} antes e após purificação em coluna de troca iônica eluída com 200 mM de NaCl.



Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: em (1): Marcador molecular; (2) F_{40-70%}; (3) Pico não retido; (4) Pico 200 mM de NaCl

Figura 11 – Eletroforese em gel de tricina do pico da troca iônica purificado em coluna hidrofóbica eluída com um volume de 1,5 mL por tubo de coleta em um gradiente de sulfato de amônio (b). Atividades proteásica e esterásica (a).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 Identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)

Após o recorte e o tratamento das bandas com tripsina (15 $\mu\text{g/mL}$ em NH_4CO_3) e análise dos fragmentos trípticos por MS/MS foram identificadas duas proteínas diferentes. A primeira, BA, foi identificada como uma subtilisina com uma cobertura de 4% e um *score* de 87. A outra banda se trata de uma β -Glucanase com uma cobertura de 15% sob o *score* de 251 (Tabela 6).

Tabela 6 – Identificação de duas proteínas obtidas na cromatografia hidrofóbica por espectrometria de massas.

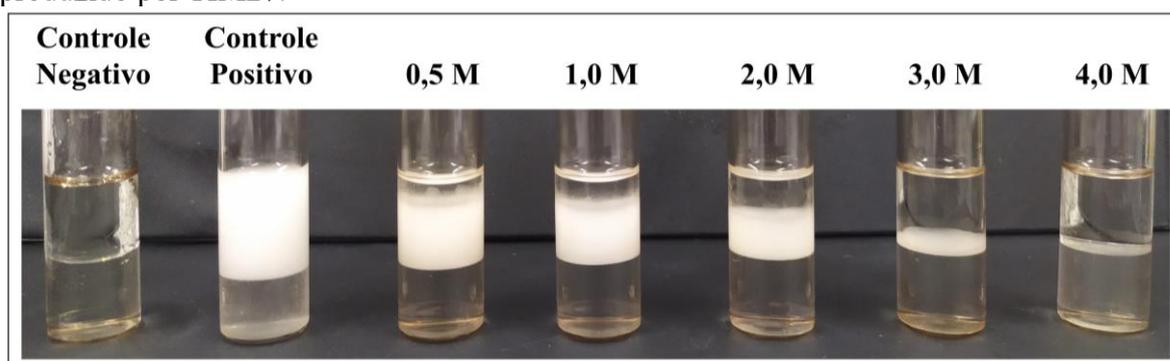
<i>Banda</i>	<i>Proteína</i>	<i>Massa/pI</i>	<i>Referência NCBI</i>	<i>Score</i>	<i>Peptídeo</i>
<i>BA</i>	Subtilisina	39,4/9,04	P35835	87	VAVIDSGIDSSHPDLNVR
				93	ADGYSDGNMFNCTWR
<i>BB</i>	β 1-3,1-4-Glucanase	26,08/ 5,61	CAA81093.1	80	LALTSPSYNK
				78	ANNVSMTSLGEMR

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.7 Efeitos da concentração de NaCl e pH nas atividades tensoativas dos biossurfactantes lipopeptídeos

Avaliando os efeitos da concentração de NaCl na propriedade de formação de emulsão água-querosene verificamos que a partir de 0,5 M de NaCl houve uma leve diminuição na atividade emulsificante, sendo esta totalmente perdida a 3M (Figura 12).

Figura 12 - Efeito de concentrações de NaCl na atividade emulsificante do biossurfactante produzido por TIM27.

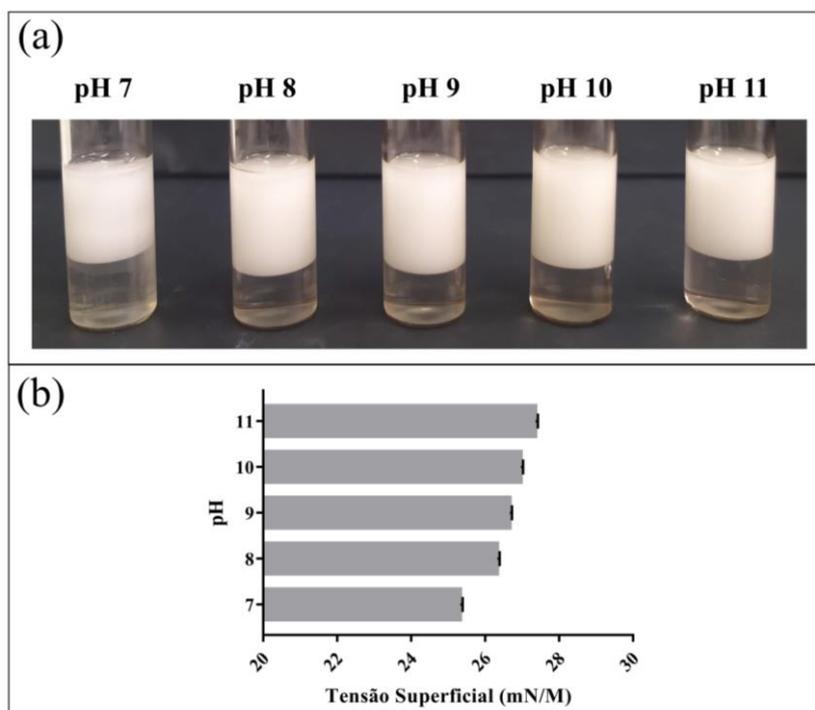


Fonte: Elaborada pelo autor. Controle negativo= meio de cultura; Controle positivo= biossurfactante sem adição de NaCl.

O pH na faixa de 7-11, não promoveu nenhuma alteração na atividade emulsificante (Figura 13a), mas se observou um aumento da tensão superficial com o

aumento do pH (Figura 13b). A redução da tensão superficial da água foi máxima em pH 7, atingindo valor de $25,3 \pm 0,03$ mN/M.

Figura 13 - Efeito do pH na atividade emulsificante e de redução da tensão superficial. Dados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.

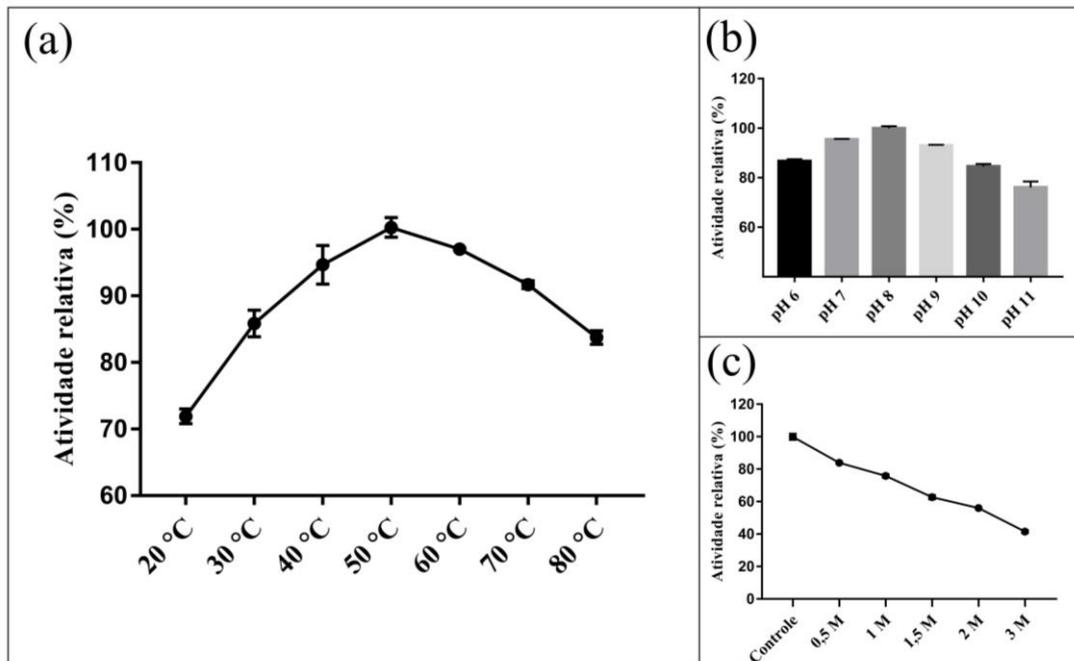


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.8 Efeito do pH, da temperatura e concentração de NaCl na atividade enzimática

A enzima mostrou ótima atividade catalítica na temperatura de 50 °C e em pH 8,0 utilizando azocaseína como substrato. Além disso, os resultados mostraram que a enzima manteve sua atividade em mais de 50% em uma ampla faixa de temperatura que variou de 20 até 80 °C e em pH que variou de 6 até 11, mostrando que a enzima detém uma alta estabilidade (Figura 14a,b). Na análise da estabilidade em diferentes concentrações de NaCl foi identificado também uma alta estabilidade, permanecendo com 56 % de atividade mesmo na concentração de 2 M de NaCl o que corresponde a 11,6% de sal (Figura 14c).

Figura 14 - Temperatura e pH ideal da atividade catalítica da F_{40-70%} e estabilidade da atividade enzimática na presença de NaCl. Dados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.

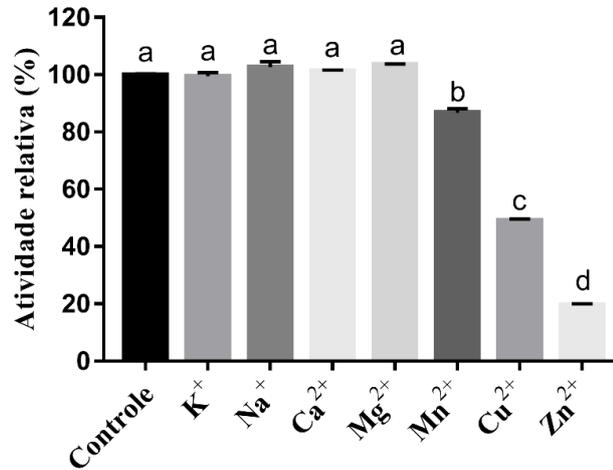


Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda (a) Efeito da temperatura (b) pH e (c) NaCl na atividade proteásica.

5.9 Efeito de íons metálicos

O efeito dos íons metálicos K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} na atividade proteásica está mostrado na Figura 15. A concentração de 5 mM dos íons monovalentes K^+ , Na^+ e os íons bivalentes Ca^{2+} , Mg^{2+} não tiveram efeitos sob a atividade enzimática, entretanto os íons Mn^{2+} e Cu^{2+} inibiram 15% e 50% respectivamente, enquanto o Zn^{2+} inibiu 90% a atividade enzimática.

Figura 15 - Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica de F_{40-70%}. Letras iguais significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.

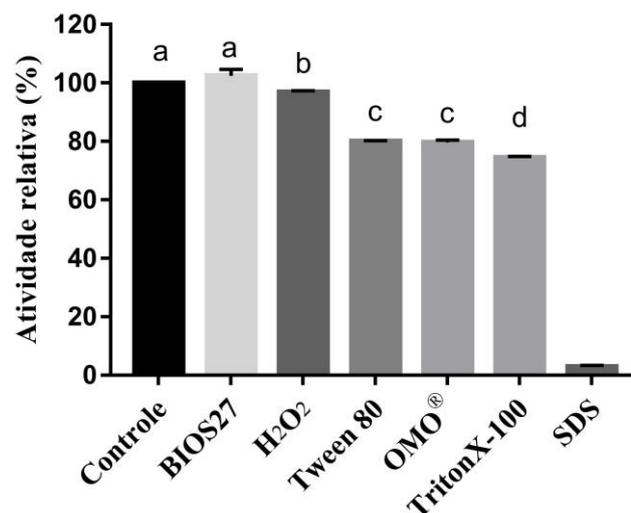


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.10 Avaliação das preparações enzimáticas para aplicações em detergentes

O biossurfactante produzido pela estirpe TIM27 (BIOS27) não interferiu na atividade enzimática, enquanto o peróxido de hidrogênio reduziu 4% a atividade. Os detergentes Tween 80, detergente comercial e Triton X-100 reduziram cerca de 20%. A atividade enzimática foi completamente inibida na presença de SDS (Figura 16).

Figura 16 - Efeito de detergentes, biossurfactantes e agentes oxidantes na atividade proteolítica de F_{40-70%}. Letras iguais significam resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.

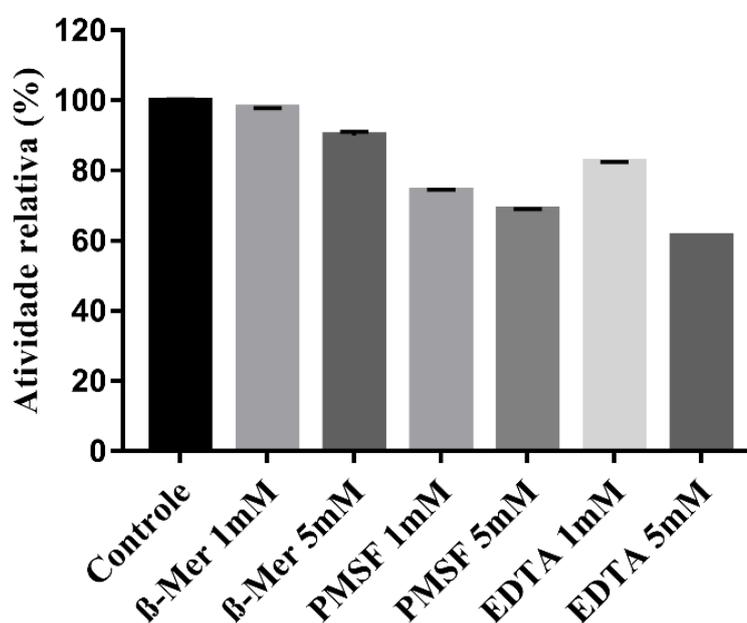


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.11 Efeito de inibidores na atividade proteásica

O efeito de inibidores de proteases comuns foi avaliado em duas concentrações, 1 e 5 mM. A enzima se mostrou altamente resistente ao β -Mer nas concentrações 1 e 5 mM, mantendo mais de 90% da atividade. O PMSF inibiu cerca de 30% em ambas as concentrações e o EDTA na concentração de 5 mM inibiu cerca de 40% (Figura 17).

Figura 17 – Efeito de inibidores proteolíticos na atividade enzimática de F_{40-70%}. Dados estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.

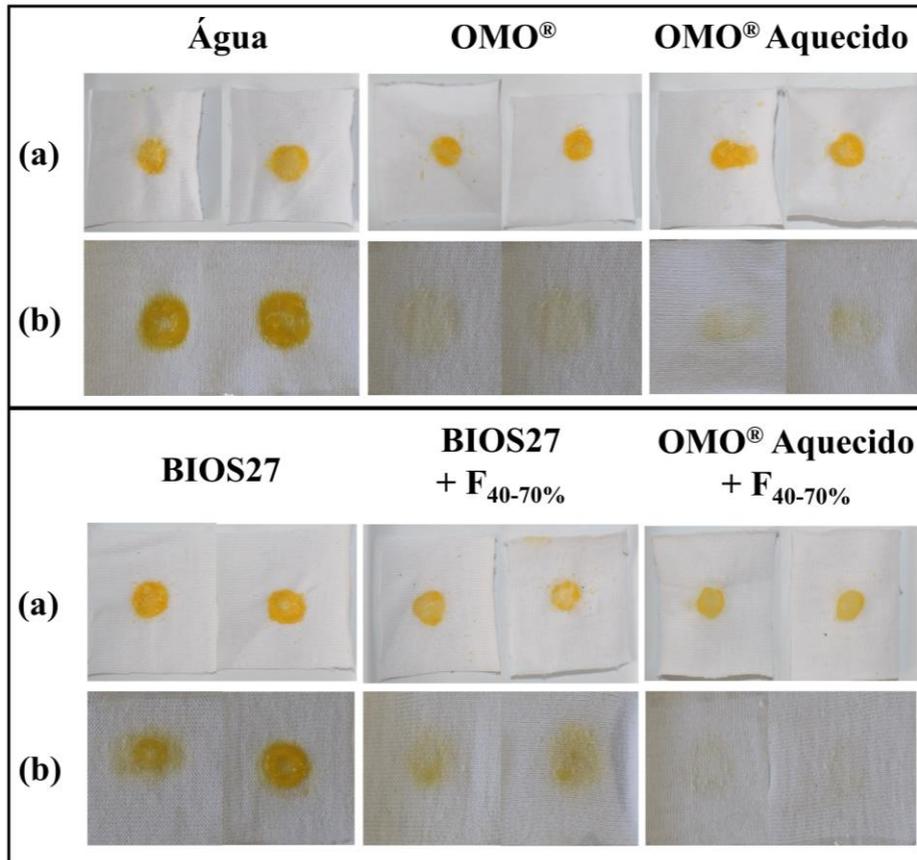


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.12 Desempenho da preparação enzimática para limpeza de tecido

A F_{40-70%} e o biossurfactante de TIM27 (BIOS27) juntos removeram a mancha do tecido de forma significativa comparado ao BIOS27 sozinho, mas essa ação não foi tão eficaz quanto o OMO[®] aquecido ou não. O OMO[®] aquecido adicionado da F_{40-70%} teve desempenho melhor do que o OMO[®] puro, não aquecido (Figura 18).

Figura 18 - Desempenho do biossurfactante lipopeptídico (BIOS27) e da F_{40-70%} de TIM27 na remoção de manchas de gema de ovo em tecidos de algodão em comparação ao detergente comercial OMO[®].



Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: (a) antes e (b) depois do teste.

6 DISCUSSÃO

A produção industrial de produtos de limpeza vem crescendo acentuadamente nas últimas décadas, e junto com aumento da demanda e do mercado, cresce também a preocupação e a pressão social por processos industriais e produtos cada vez menos prejudiciais para o meio ambiente e saúde humana (FRAZZETTO, 2003). O uso de produtos sustentáveis, *ecofriendly*, vem ganhando visibilidade para a substituição de compostos sintéticos, provenientes de fontes não renováveis como o petróleo (SHELDON; WOODLEY, 2018). Pensando em contribuir com soluções sustentáveis para esse problema, esse estudo avaliou dois produtos secretados por uma estirpe GRAS (*Generally Recognized as Safe*) de *Bacillus subtilis* TIM27, como aditivos para formulação de um detergente natural.

Membros do gênero *Bacillus* são conhecidos como grandes produtores de biossurfactantes lipopeptídeos. Essas espécies geralmente produzem uma mistura de lipopeptídeos de diferentes classes e a composição dessa mistura interfere diretamente nas suas propriedades tensoativas (FARIAS *et al.*, 2018; ONGENA; JACQUES, 2007).

O cultivo de TIM27 em meio contendo glicerol como fonte de carbono, rendeu 673 mg/L de biossurfactantes lipopeptídeos, um resultado muito promissor para uma batelada simples, comparado a outras estirpes de *Bacillus* (ABDEL-MAWGOUD; HASSOUNA, 2008; MAKKAR; CAMEOTRA, 1998). Esse rendimento pode ser melhorado otimizando-se o desempenho da cultura e do processo fermentativo. Já foi reportado que as condições de cultivo e composição de meio podem afetar significativamente a produção de biossurfactantes lipopeptídeos, que pode chegar a 3-4 g/L, e dentre os fatores importantes destacam-se as fontes de carbono e nitrogênio, além da temperatura, pH e oxigênio dissolvido (HERYANI; DHARMA, 2017).

Uma outra propriedade importante que deve ser considerado na avaliação de um biossurfactante é sua concentração micelar crítica (CMC), sendo esta a menor concentração onde ocorre a formação de micelas. Quanto menor a CMC de um surfactante, menor será a quantidade necessária deste produto (AKBARI *et al.*, 2018). TIM27 foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de $71,2 \pm 0,03$ mN/m para $25,3 \pm 0,05$ mN/m, e de emulsificar uma mistura água-querosene (IE24>66%) na concentração de 50 mg/L. Esse é um desempenho excelente comparado a um dos mais potentes biossurfactantes conhecidos, a Surfactina, que na forma pura reduz a tensão superficial da água para 27 mN/m a uma concentração de 20 μ M (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999).

Entretanto, a emulsão de TIM27 se torna ainda mais estável a partir de 300 ppm, como confirmado pela presença de gotículas de tamanhos menores, visualizadas ao microscópio óptico (Figura 7). Mesmo nessa concentração (300 ppm) TIM27 ainda é muito promissor, considerando que os surfactantes sintéticos costumam agir em altas concentrações, como o SDS, cuja CMC situa-se entre 2000-2500 mg/L (FU *et al.*, 2015).

Segundo Willumsen e Karlson (1997), um bom agente emulsificante é aquele que apresenta um índice de emulsificação (IE24) superior a 50%. Para Mulligan (2005) um bom tensoativo é aquele capaz de reduzir a tensão superficial (TS) da água de 72 mN/m para 35 mN/m (SOBERÓN-CHÁVEZ; STEINBU, 2011). De acordo com essas definições, TIM27 é um excelente agente tensoativo, já que apresenta IE24 de 67% e reduz a tensão da água para 25 mN/m.

Para aplicação de biossurfactantes na indústria de detergente, o surfactante precisa ser apto a manter suas propriedades tensoativas em pH extremamente alcalino (PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018). Dessa forma, foi avaliada o efeito de um gradiente de pH (6-11) nas atividades tensoativas de TIM27, assim como averigou-se sua estabilidade em diferentes concentrações de NaCl (0.5- 4.0M). TIM27 se mostrou estável em toda a faixa de pH analisada, e na presença de até 1M de NaCl, com IE24 > 50% (Figura 12 e 13). Nitschke e Pastore (2006) avaliaram uma estirpe de *B. subtilis* cujo biossurfactante manteve-se estável na presença de 3,5 M de NaCl. Para aplicações em produtos de limpeza, entretanto, a estabilidade de TIM27 em pH alcalino e 1 M de NaCl já atenderia os requisitos das formulações (PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018).

O NaCl em altas concentrações aumenta a tensão superficial da água. Isso deve-se a interação das moléculas de água com os íons Na^+ e Cl^- dissociados. Essa interação iônica, juntamente com a interação água-água, aumenta a força coesiva e conseqüentemente a tensão superficial (OKUR *et al.*, 2017). Mesmo assim, os biossurfactantes mantêm sua eficácia, diminuindo a tensão superficial.

Além da aplicação de biossurfactantes, enzimas microbianas como lipases, proteases e amilases são amplamente utilizadas em formulações de biodetergentes. A aplicação de enzimas em detergentes comerciais traz diversas vantagens como uma maior performance de lavagem, o aumento da qualidade e vida útil do tecido, uma maior porcentagem de moléculas biodegradáveis nas formulações e uma maior economia de energia por diminuir as temperaturas requeridas nas lavagens (GUPTA *et al.*, 2003).

A produção de um grande acervo catalítico é uma característica apreciada em membros do gênero *Bacillus* que além disso, detém uma alta capacidade de secretar

expressivas quantidades de enzimas no meio extracelular e suas altas taxas de crescimento produzem curtos ciclos de fermentação (CONTESINI; MELO; SATO, 2018), características vantajosas para as suas aplicações industriais. Outra vantagem é a de que a grande maioria deles são GRAS, reconhecidos como seguros para a utilização industrial (SEWALT *et al.*, 2016).

A bactéria TIM27 mostrou atividade proteolítica e esterásica no meio extracelular após seu crescimento em Caldo nutriente suplementado com 0.2% de glicerol, que atuou como um indutor para produção de enzimas lipolíticas (GUPTA; RATHI, 2004). O extrato bruto foi então submetido a precipitação de proteínas com sulfato de amônio, detectando-se as atividades esterásicas e proteásicas na fração precipitada com sulfato de amônio (F_{40-70%}) (Figura 6) que concentrou a maior quantidade de proteínas totais, comparada as outras duas frações (F_{0-40%} e F_{70-90%}) (Tabela 5).

Na análise do perfil eletroforético da F_{40-70%} não aquecida e da atividade enzimática em gel (zimograma) das frações proveniente da precipitação com sulfato de amônio, observou-se uma agregação das proteínas da F_{40-70%} no topo do gel e ambas as atividades enzimáticas se revelaram correspondendo a mesma banda do gel (cerca de 250 kDa) (Figura 8).

A análise cromatográfica da F_{40-70%} em coluna de troca iônica equilibrada com tampão Glicina-NaOH 50 mM, pH 9,6, eluída com gradiente de NaCl, revelou que as duas atividades enzimáticas foram concentradas no pico eluído com 200 mM de NaCl (Figura 9). Esse pico foi submetido a uma cromatografia em coluna hidrofóbica equilibrada com tampão fosfato, 50 mM, pH 7,0 suplementado com 1M de sulfato de amônio, eluída por um gradiente linear decrescente de sulfato de amônio (de 1 a 0 M). Ao final dessa cromatografia, as atividades enzimáticas foram detectadas em um mesmo tubo e com a ajuda de uma eletroforese SDS-PAGE Tricina a presença de duas bandas majoritárias foi detectada (Figura 11). As bandas foram então excisadas do gel, tratadas com tripsina e identificadas por espectrometria de massas.

A banda superior denominada como (BA) foi identificada como uma subtilisina de *Bacillus subtilis* com massa de 39,4 kDa e pI de 9,04 (NCBI: P35835). Já a banda inferior (BB) foi identificada como uma β 1-3,1-4-glicanase (Tabela 6).

Subtilisinas são serino-endopeptidases extracelulares, consideradas como as mais importantes como aditivos em detergentes modernos para a remoção de manchas à base de proteínas, como ovo, leite ou sangue (VOJCIC *et al.*, 2015). Elas também são utilizadas para a degradação de resíduos proteicos recalcitrantes de rejeitos de peixes, abundantemente

disponíveis na natureza, convertendo-os em produtos de baixo valor agregado, como materiais quitinosos, hidrolisado de proteínas ou aminoácidos (MECHRI *et al.*, 2019).

Com os resultados mostrados foi constatado que ambas as atividades proteásicas e esterásica eram provenientes da mesma enzima. De fato, já foi reportado que muitas subtilisinas podem conter atividade esterásica e amidásica, de modo a permitir que substratos hidrofóbicos como a elastina e o colágeno possam ser hidrolisados (CHRISTIAN, 2012). Mechri *et al.*, em 2019, purificaram e caracterizaram uma subtilisina produzida por *Melghiribacillus thermohalophilus* que apresentava ambas as atividades esterásica e amidásica. Em outros estudos uma combinação da estratégia de mutagênese dirigida e modificações químicas foram aplicadas a uma subtilisina produzida por *Bacillus lentus* (SBL) para melhorar sua especificidade de esterase, resultado em um incremento de 52 vezes na atividade esterásica (PLETTNER *et al.*, 1999).

As β -1,3-1,4-Glucanases (EC 3.2.1.73) são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo β -1,3 e β -1,4 presentes em β -D-glucanas, liberando glucose como produto principal (PLANAS, 2000). Estas enzimas são produzidas por fungos filamentosos e leveduriformes, assim como por bactérias (HART, 2017; NIU *et al.*, 2016). As β -glucanases possuem diferentes aplicações biotecnológicas como na indústrias de alimentos, (na produção de bebidas como vinhos e cerveja), e também na obtenção de oligossacarídeos que apresentam atividades funcionais (bioativos) e produção de etanol de biomassa (LEHTOVAARA; GU, 2011).

Após a identificação da subtilisina de TIM27, seguiu-se avaliando as melhores condições de hidrólise bem como a sua estabilidade em diferentes compostos químicos.

A máxima atividade proteásica foi obtida em pH 8,0. O aumento do pH para 9, 10 e 11 reduziu a atividade para 93%, 84% e 73% respectivamente, mostrando a estabilidade dessa protease em uma ampla faixa de pH alcalino (Figura 14b). Como o pH da solução detergente está geralmente entre 9,0 e 10,5, a sua alta estabilidade nesses pHs ratifica o seu potencial como aditivo em detergentes. Várias proteases de diferentes espécies de *Bacillus* possuem atividade máxima em pHs alcalinos (GULERIA *et al.*, 2016; GULMEZ *et al.*, 2018; HAMMAMI *et al.*, 2017; JEONG; BAEK; KIM, 2018) sendo muito utilizadas na indústria de produtos de limpeza.

A temperatura ótima da protease de TIM27 foi 50 °C (Figura 14a). Assim como o pH ótimo, a temperatura ótima de proteases alcalinas produzidas por espécies de *Bacillus* pode variar entre 50 e 70 °C (BOUACEM *et al.*, 2015; GUPTA *et al.*, 2005; JELLOULI *et al.*, 2011). Os valores de atividade enzimática relativa obtidos com 20 °C e 80 °C foram de 72 e

83% respectivamente, demonstrando a sua grande estabilidade no intervalo de temperatura testado. A protease de TIM27 revelou-se mais estável a variação de temperatura do que outras proteases alcalinas de *Bacillus* (GENCKAL; TARI, 2006; PANT *et al.*, 2015).

A bactéria TIM27 foi isolada de sedimentos de um manguezal do semiárido, que são ambientes onde grandes variações diárias de salinidade, pH, temperatura, oxigênio e nutrientes são encontradas (HOLGUIN *et al.*, 2006). Essas condições extremas são fatores seletivos para as espécies que habitam esses ecossistemas, fazendo desses ambientes valiosas fontes para prospecção de novas biomoléculas resistentes para aplicações industriais (COUTO *et al.*, 2010).

Assim como avaliado para o biossurfactante lipopeptídeo produzido por TIM27 (BIOS27), também avaliou-se o efeito da concentração de NaCl na atividade proteolítica da F_{40-70%}. A atividade enzimática mostrou-se bastante estável, retendo 56% de sua atividade a 2M de NaCl (Figura 14c). Esse desempenho foi superior ao observado com a espécie halotolerante *B. aquimaris* que reteve apenas 12% de sua atividade enzimática residual nessa mesma concentração de sal (SHIVANAND; JAYARAMAN, 2009).

A atividade enzimática da F_{40-70%} manteve-se estável na presença de diferentes classes de aditivos usados em detergentes comerciais, tais como surfactantes não aniônicos (Triton X-100 e Tween 80), agente oxidante (H₂O₂). No entanto, na presença do surfactante aniônico SDS, a F_{40-70%} sofreu uma forte inibição, com redução de 97% de atividade após a incubação por 30 min (Figura 16). De fatos é sabido que algumas proteases alcalinas são estáveis na presença de surfactantes não iônicos e fortemente inibidas por detergentes aniônicos como o SDS (HAMMAMI *et al.*, 2017; YAMAGATA; ICHISHIMA, 1995; YILDIRIM *et al.*, 2017).

A atividade proteolítica da F_{40-70%} mostrou-se totalmente estável na presença do biossurfactante produzido por TIM27 (BIOS27), mas observou-se uma pequena redução da atividade (20%) na presença do detergente comercial OMO[®], na concentração de uso sugerido pelo fabricante, 7mg/mL (Figura 16). A atividade enzimática de F_{40-70%} também se manteve ou foi levemente reduzida na presença dos inibidores de proteases PMSF, EDTA e β -Mer (Figura 17). A estabilidade de F_{40-70%} ao β -Mer foi significativamente superior a protease estudada por Bhangé *et al.*, em 2016, que com 0,5 mM desse inibidor teve uma drástica diminuição de atividade (72%).

O PMSF é um inibidor específico de serino-proteases que, conseqüentemente, inibem completamente a atividade de subtilisinas. Entretanto, após a incubação da enzima foi observado apenas a diminuição dos valores de atividade em 26% (1 mM) e 32% (5 mM),

mostrando a presença de outros tipos de proteases na fração.

Com a adição de EDTA obtivemos uma redução das atividades de 18% (1 mM) e 39% (5 mM) sugerindo a presença metelo-proteases na fração F_{40-70%} ou sugerindo de que íons metálicos são necessárias para a atividade ou estabilidade das enzimas presentes (BHANGE; CHATURVEDI; BHATT, 2016; HADJ-ALI *et al.*, 2007; MHAMDI *et al.*, 2017).

Os íons metálicos podem atuar melhorando a atividade enzimática de proteases, estabilizando sua estrutura e protegendo de desnaturação térmica. Geralmente proteases alcalinas exibem suas melhores atividades catalíticas na presença de íons bivalentes como Ca⁺², Mg⁺² e Mn⁺². (KUMAR; TAKAGI, 1999). Entretanto, os resultados com a fração enriquecida F_{40-70%} mostraram os íons Mg⁺², Na⁺ e K⁺ não interferiram na atividade proteolítica. Diferentemente de trabalhos da literatura, a adição de Ca⁺² também não teve nenhuma influência na atividade (JELLOULI *et al.*, 2011; OMRANE *et al.*, 2016). Já a adição de Mn⁺², Cu⁺² e Zn⁺², afetaram negativamente a performance da enzima, provocando redução de 14%, 50% e 80% da atividade relativa (Figura 15). Resultados de inibição de proteases por Cu⁺² e Zn⁺² foram do mesmo modo reportados por Jeong *et al.*, em 2018.

Experimentos de lavagem em tecidos de algodão são comumente utilizados para avaliar as aplicações de enzimas como aditivos em detergentes. Frequentemente usa-se pedaços de tecidos de algodão 3x3cm ou 5x5cm, manchado com ovo, sangue, graxa, manteiga, azeite de oliva ou de qualquer outro substrato que se queira avaliar uma enzima específica (BHANGE; CHATURVEDI; BHATT, 2016; GRBAVČIĆ *et al.*, 2011; REKIK *et al.*, 2019).

Em nossos experimento utilizamos emulsão de gema de ovo em tecidos de algodão de 3x3cm para avaliar a capacidade de remoção das manchas por BIOS27 e F_{40-70%} (Figura 18). A gema de ovo é composta por proteínas (12%), lipídeos (12%), além de carboidratos, minerais e vitaminas. As gemas dos ovos são também ótimas fontes de pigmentos (luteína e zeaxantina) que são carotenoides que dão a pigmentação amarelada a gema, característica que facilitou a visualização da mancha residual após o experimento de lavagem (MAZZUCO, 2008).

As análises mostraram que a combinação da fração F_{40-70%} com o BIOS27 promoveu uma limpeza mais eficiente da mancha de ovo do que BIOS27 sozinho. É provável que os biossurfactantes atuem em sinergia com enzimas extracelulares aumentando a solubilização, a mobilização e, portanto, a biodisponibilidade de resíduos hidrofóbicos para seus organismos produtores (PERFUMO, 2017). Dessa forma, podemos presumir que no experimento realizado as duas moléculas atuaram na lavagem de forma sinérgica: O

biossurfactante (BIOS27) atua na solubilização e na mobilização das proteínas e gorduras do ovo e ajuda nas atividades proteolíticas e esterásicas da fração na quebra dos substratos presentes no ovo, sendo a sujidade arrastada pela lavagem com a água (JAEGER; REETZ, 1998; PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018).

De forma semelhante a adição da fração F_{40-70%} ao detergente comercial OMO[®] melhorou a performance da lavagem quando comparado ao OMO[®] não aquecido e aquecido (com suas enzimas endógenas desnaturadas). Esse resultado mostra que a fração 40-70% não só foi efetiva na remoção da mancha de ovo em conjunto com o detergente comercial, quanto teve um desempenho superior às enzimas endógenas do detergente.

Foi observado também que o OMO[®] aquecido, sem a ação de enzimas endógenas continuou tendo uma ótima performance de lavagem. Isso se deve ao fato de que em sua formulação os detergentes comerciais contém outros compostos químicos que auxiliam na lavagem como: bloqueadores ópticos, para dar uma aparência mais brancas ao tecidos, alvejantes como o perborato de sódio, tensoativos como o alquil benzeno sulfonato de sódio ou o alquil éter sulfonato de sódio, agentes sequestrantes e quelantes como o EDTA, além de corantes e fragrâncias (DIAS DIOGO LOPES, [s.d.]).

A poluição de oceanos e rios com detergentes e cosméticos é uma dura realidade que motiva várias pesquisas industriais para solucionar essa problemática. Em 1972, estudos já alertavam para os riscos da poluição de compostos fosfatados provenientes das formulações de detergentes comerciais (HENION, 1972). Hoje as formulações contam com outros poluentes químicos como agentes branqueadores, corantes, alvejantes e agentes quelantes (DIAS DIOGO LOPES, [s.d.]). Portanto, enzimas microbianas associadas a biossurfactantes, como mostrados nesse estudo, são considerados componentes promissores na adição ou até mesmo na substituição de aditivos químicos usados em várias aplicações industriais como detergentes e produtos de limpeza, produtos para cuidados pessoais e cosméticos (MARCHANT; BANAT, 2012; NYAYANIT, 2014).

7 CONCLUSÃO

A estirpe de *Bacillus subtilis* TIM27 cultivada em meio nutriente contendo glicerol como fonte de carbono secreta enzimas proteolíticas e lipolíticas, e quando inoculada em caldo surfactina produz biossurfactantes lipopeptídeos (BIOS27). Dentre os componentes da fração 40-70% (F_{40-70%}), enriquecida com sulfato de amônio, foi identificada uma subtilisina alcalina de 39,4 kDa de massa molecular, que apresenta atividade proteásica e esterásica. F_{40-70%} e BIOS27 se mostraram bastante estáveis em pH alcalino, temperatura elevada e salinidade elevada, além da atividade proteásica ser bastante resistente a componentes químicos presentes em formulações de detergentes.

De forma qualitativa, a combinação da F_{40-70%}, enriquecida com a subtilisina, ao biossurfactante lipopeptídeo mostrou desempenho equivalente ao detergente OMO[®] comercial para limpeza de mancha de gema de ovo em tecido de algodão. A incorporação de F_{40-70%} a uma solução de OMO[®] aquecido, também provou ter melhor atividade para remoção dessas manchas do que as enzimas endógenas do produto comercial.

Os resultados desse estudo confirmam o potencial dessas biomoléculas como aditivos para essa nova geração de produtos de limpeza mais sustentáveis, demandados pela sociedade atualmente.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; HASSOUNA, N. A. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Appl Biochem Biotechnol**, p. 305–325, 2008.
- AKBARI, S.; ABDURAHMAN, N. H.; YUNUS, R. M.; FAYAZ, F.; ALARA O. R. Biosurfactants-a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, 2018.
- ALI, N. *et al.* Molecular characterization and growth optimization of halo - tolerant protease producing *Bacillus Subtilis* Strain BLK - 1 . 5 isolated from salt mines of Karak , Pakistan. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 395–402, 2016.
- ANJUM, F. *et al.* Biosurfactant production through *Bacillus sp.* MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 262–269, 2016.
- BALAJI, V.; BALIGA, P.; JEREMIAH, S. Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 230, 2011.
- BBC REASERCH. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. **BBC Research**, 2018.
- BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. Biosurfactant from *Paenibacillus dendritiformis* and its application in assisting polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and motor oil sludge removal from contaminated soil and sand media. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 98, p. 354–364, nov. 2015.
- BHANGE, K.; CHATURVEDI, V.; BHATT, R. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease , amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 94–104, 2016.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, n. 9, p. 93–99, 1987.
- BOONYAPAKRON, K. *et al.* Structure-based protein engineering for thermostable and alkaliphilic enhancement of endo- β -1 , 4-xylanase for applications in pulp bleaching. **Journal of Biotechnology**, v. 259, n. April, p. 95–102, 2017.
- BOOTHROYD, B.; THORN, J. A.; HASKINS, R. H. Biochemistry of the ustilaginales. XII. Characterization of extracellular glycolipids produced by *Ustilago sp.* **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 34, n. 1, p. 10–4, jan. 1956.
- BOUACEM, K. *et al.* Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 299–307, 2015.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, p. 248–254, 1976.

CASTRO, R. A. *et al.* Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 382, 2014.

CHANG, C.C. *et al.* Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 5, p. 501–511, 2011.

CHAVES, D. *et al.* The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. **PlosOne** v. 7, n. 6, 2012.

CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158–169, 2015.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.

CHRISTIAN, B. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 3 edição ed. [s.l.] Dezembro de 2012, 2012.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and environmental microbiology**, v. 50, n. 4, p. 846–50, out. 1985.

COLARES, G. B.; MARIA, V.; MELO, M. Relating microbial community structure and environmental variables in mangrove sediments inside *Rhizophora mangle* L. habitats. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 171–177, 2013.

CONTESINI, F. J.; MELO, R. R. DE; SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 321–334, 2018.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 37, n. 1, p. 4–10, jan. 1979.

COUTO, G. H. *et al.* Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 514–523, 2010.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Genetic Regulations of the Biosynthesis of Microbial Surfactants: An Overview. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 25, n. 1, p. 165–186, jan. 2008.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 246–253, ago. 2010.

DE ALMEIDA, D. G. *et al.* Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–14, 2016.

DEGNAN, T. Focus on an International Newsletter Monitoring Technical and use of Catalysts. **Focus on Catalysts**, v. 2016, n. 12, p. 1–2, 2016.

DESAI, A. J.; PATEL, K.M.; DESAI, J. D. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. **Current Science**, v. 57, p. 500–501, 1988.

DENG, M. C. *et al.* Characterization of a novel biosurfactant produced by marine hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter sp.* HZ01. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 889–899, 2016.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, mar. 1997.

DIAS DIOGO LOPES. **Química do sabão em pó**. Disponível em: <https://brasilescola.uol.com.br/quimica/quimica-sabao-po.htm>. Acesso em: 7 jan. 2020.

DOS SANTOS AGUILAR, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, n. October 2017, p. 253–262, 2018.

DU NOUY, L. P. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, p. 625–632, 1925.

FARIAS, B. C. S. *et al.* Cyclic lipopeptide signature as fingerprinting for the screening of halotolerant *Bacillus* strains towards microbial enhanced oil recovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 1179–1190, 2018.

FATTOM, A. Production of emulcyan by *Phormidium* J-1: its activity and function. **FEMS Microbiology Letters**, v. 31, n. 1, p. 3–9, fev. 1985.

FRAZZETTO, G. White Biotechnology. **Science & Society**, v. 4, 2003.

FU, J. *et al.* Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects A new technique for determining critical micelle concentrations of surfactants and oil dispersants via UV absorbance of pyrene. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 484, p. 1–8, 2015.

GARCIACARRENO, F. L.; DIMES, L. E.; HAARD, N. F. Substrate-Gel Electrophoresis for Composition and Molecular Weight of Proteinases or Proteinaceous Proteinase Inhibitors. **Analytical Biochemistry**, v. 214, n. 1, p. 65–69, out. 1993.

GAUTAM, G. A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 04, n. 06, 2014.

GENCKAL, H.; TARI, C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus sp.* isolated from natural habitats. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 703–710, 2006.

GRBAVČIĆ, S. *et al.* Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11226–11233, 2011.

GUIJARRO, J. A. Purification and Characterization of an Extracellular Protease from the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* and Effect of Culture Conditions on Production. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3969–3975, 1999.

GULERIA, S. *et al.* Purification and characterization of detergent stable alkaline protease from *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. **Journal of Basic Microbiology**, p. 138–152, 2016.

GULMEZ, C. *et al.* A novel detergent additive: Organic solvent- and thermo-alkaline-stable recombinant subtilisin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 436–443, 2018.

GUPTA, A. *et al.* One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus sp.* **Journal of chromatografy A**, v. 1075, p. 103–108, 2005.

GUPTA, R. *et al.* An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381–395, 2002.

GUPTA, R. *et al.* Microbial α -amylases : a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, 2003.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, 2004.

HADJ-ALI, N. EL *et al.* Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 515–523, 2007.

HAMMAMI, A. *et al.* Surfactant- and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae* : Characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 272–281, 2017.

HAN, H. *et al.* Improvements of thermophilic enzymes: From genetic modifications to applications. **Bioresource Technology**, v. 279, n. November 2018, p. 350–361, 2019.

HART, G. W. Eng1 and Exg8 Are the Major β -Glucanases Secreted by the Fungal Pathogen *Histoplasma capsulatum*. **The Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 12, p. 4801–4810, 2017.

- HERYANI, H.; DHARMA, M. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus sp.* **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 49–54, 2017.
- HENION, K. E. The Effect of Ecologically Relevant Information on Detergent Sales. **Journal of Marketing Research**, v. 9, n. 1, 1972.
- HOLGUIN, G. *et al.* Mangrove health in an arid environment encroached by urban development—a case study. **Science of The Total Environment**, v. 363, n. 1–3, p. 260–274, 2006.
- HUYNH, M. L.; RUSSELL, P.; WALSH, B. Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. **Two-Dimensional Electrophoresis Protocols**, p. 507–513, 2009.
- INÈS, M.; DHOuha, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, 2015.
- IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 176–179, set. 1995.
- JAKOB, F. *et al.* Advances in protease engineering for laundry detergents. **New biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 629–634, 2015.
- JELLOULI, K. *et al.* Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1 : Purification , characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1248–1256, 2011.
- JEONG, Y. J.; BAEK, S. C.; KIM, H. Cloning and characterization of a novel intracellular serine protease (IspK) from *Bacillus megaterium* with a potential additive for detergents. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.
- JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, n. June, 2019.
- KAPPELI, O. *et al.* Structure of the cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport. **Archives of Microbiology**, v. 138, n. 4, p. 279–282, ago. 1984.
- KÄPPELI, O.; FINNERTY, W. R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of bacteriology**, v. 140, n. 2, p. 707–12, nov. 1979.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Novozymes**, p. 345–351, 2002.
- KÜHNE, W. Über das Verhalten verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente. **Verhandlungen des naturhistorische- medicinischen vereins**, p. 190–193, 1877.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.

KUMAR, A. *et al.* Protein adaptations in extremophiles: An insight into extremophilic connection of mycobacterial proteome. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 84, p. 147–157, 2018.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 7, p. 561–594, 1999.

KUMAR, D. *et al.* Microbial proteases and application as laundry detergent additive. **Research Journal of Microbiology**, 2008.

LAI, C.C. *et al.* Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1–3, p. 609–614, 15 ago. 2009.

LEHTOVAARA, B. C.; GU, F. X. Pharmacological , Structural , and Drug Delivery Properties and Applications of 1 , 3- β -Glucans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 6813–6828, 2011.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, p. 48–52, 1998.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants : challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558–565, 2012.

MARQUÉS, A. M. *et al.* The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 158, n. 2, p. 110–117, abr. 2009.

MAURER, K. H. Detergent proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 330–334, 2004.

MAZZUCO, H. Ovo: alimento funcional, perfeito à saúde. **Avicultura Industrial**, v. 99, n. 1164, p. 12–16, 2008.

MECHRI, S. *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel thermostable and halotolerant subtilisin SAPN , a serine protease from *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A T for chitin extraction from crab and shrimp shell by - products. **Extremophiles**, v. 23, n. 5, p. 529–547, 2019.

MHAMDI, S. *et al.* Evaluation of the biotechnological potential of a novel purified protease BS1 from *Bacillus safensis* S406 on the chitin extraction and detergent formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 739–747, 2017.

MOHAMED, I. A. *et al.* Phytochemistry Dubiumin , a chymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanum dubium* Fresen. **Phytochemistry**, v. 70, n. 4, p. 483–491, 2009.

MORIHARA, K. **Comparative Specificity of Microbial Proteinases**. p. 179–243, 1974.

MORITA, T. *et al.* Isolation and Screening of Glycolipid Biosurfactant Producers from Sugarcane. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 9, p. 1788–1791, 23 set. 2012.

MUKHERJEE, A. K. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 330–335, 2007.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental pollution**, v. 133, p. 183–198, 2005.

NANDY, S. K. Bioprocess Technology Governs Enzyme Use and Production in Industrial Biotechnology: An Overview. **Enzyme Engineering**, v. 05, n. 01, p. 1–5, 2016.

NEUHOFF, V. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255–262, 1988.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336–341, 2006.

NIU, Q. *et al.* Purification and characterization of a thermophilic 1,3-1,4- β -glucanase from *Bacillus methylotrophicus* S2 isolated from booklice. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 5, p. 503–508, 2016.

NOGUEIRA, V. L. R. *et al.* Microbiomes and potential metabolic pathways of pristine and anthropized Brazilian mangroves. **Regional Studies in Marine Science**, v. 2, p. 56–64, 2015.

NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants ' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. December, p. 1–18, 2014.

OKUR, H. *et al.* The Jones-Ray effect reinterpreted: Surface tension minima of low ionic strength electrolyte solutions are caused by electric field induced water-water. **Chemical Physics Letters**, v. 684, p. 433–442, 2017.

OMRANE, M. *et al.* A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 961–972, 2016.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides : versatile weapons for plant disease biocontrol. **Cell Press**, p. 115–125, 2007.

OTTESEN, M.; SVENDSEN, I. The subtilisins. **Methods in enzymology** In: [*s.l.*: *s.n.*]. p. 199–215, 1970.

PANT, G. *et al.* Production , optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Integrative Medicine Research**, v. 9, n. 1, p. 50–55, 2015.

PARRY, A. J. *et al.* **Combinations of rhamnolipids and enzymes for improved cleaning**, 2011.

PERFUMO, A. Biodiversity of Biosurfactants and Roles in Enhancing the (Bio)availability of Hydrophobic Substrates. In: **Cellular Ecophysiology of Microbe**. [s.l.: s.n.]. p. 1–29, 2017.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 277–289, 2018.

PESSOA, T. B. A. *et al.* Metagenomic alkaline protease from mangrove sediment. **Journal of Basic Microbiology**, ago. 2017.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 553–563, 1999.

PLANAS, A. Bacterial 1, 3-1, 4- L -glucanases : structure , function and protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1543, 2000.

PLETTNER, E. *et al.* Modulation of Esterase and Amidase Activity of Subtilisin *Bacillus lentus* by Chemical Modification of Cysteine Mutants. **Journal of the American Chemical Society**, n. 7, p. 4977–4981, 1999.

POGSON, M.; GEORGIU, G.; IVERSON, B. L. Engineering next generation proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 390–397, ago. 2009.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ B. P. L. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 1 jun. 2002.

RAAIJMAKERS, J. M. *et al.* Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas* : more than surfactants and antibiotics. **FEMS microbiology reviews**, 2010.

RANDHAWA, K. K. S.; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 1–7, 2014.

REKIK, H. *et al.* Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1227–1239, 2019.

RIZZO, C. *et al.* Influence of salinity and temperature on the activity of biosurfactants by polychaete-associated isolates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 4, p. 2988–3004, fev. 2014.

ROCHA, L. L. *et al.* Distinct Habitats Select Particular Bacterial Communities in Mangrove Sediments. **International journal of microbiology**, v. 2016, 2016.

RUFINO, R. D. *et al.* Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 1–5, 2011.

SANTOS, D. K. F. *et al.* Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016.

SARATH, G., DE LA MOTTE, R.S., WAGNER, F. W. Protease assay methods. **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach**, p. 25–55, 1989.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, nov. 1987.

SEWALT, V. *et al.* The Generally Recognized as Safe (GRAS) Process for Industrial Microbial Enzymes. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 295–302, out. 2016.

SHABTAI, Y.; GUTNICK, D. L. Exocellular esterase and emulsan release from the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of bacteriology**, v. 161, n. 3, p. 1176–81, mar. 1985.

SHARMA, D. *et al.* Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1–14, 2015.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.

SHIVANAND, P.; JAYARAMAN, G. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. **Process Biochemistry** v. 44, p. 1088–1094, 2009.

SINGH, R. *et al.* A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 679–682, 2006.

SINGH, R. *et al.* Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; STEINBU, A. **Biosurfactants From Genes to Applications**. 2011.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211–220, 2006.

SUNG, J. H. *et al.* Purification, Molecular Cloning, and Biochemical Characterization of Subtilisin JB1 from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* JB1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 3, p. 900–911, 10 out. 2010.

SCHEPER, T. **White Biotechnology**. [*s.l.: s.n.*], 2007.

TADASHI YONEDA, C. Y. *et al.* **Production process of surfactin**, 2006.

THATOI, H. *et al.* Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: A review. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2013.

VECINO BELLO, X. *et al.* Study of the synergistic effects of salinity, pH, and temperature on the surface-active properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1258–1265, 2012.

VOJCIC, L. *et al.* Advances in protease engineering for laundry detergents. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 629–634, 2015.

WEI, Y. H. *et al.* Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 174–178, jan. 2003.

WEI, Y. H. *et al.* Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 769–774, jul. 2008.

WEI, Y. H.; CHEN, W.-C. Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMΔR by medium improvement and oil-supplementation strategies. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 616–622, jun. 2005.

WEI, Y. H.; WANG, L.-F.; CHANG, J.-S. Optimizing Iron Supplement Strategies for Enhanced Surfactin Production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 979–983, 4 jun. 2004.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, p. 415–423, 1997.

YAMAGATA, Y.; ICHISHIMA, E. A New Alkaline Serine Protease from Alkalophilic *Bacillus sp.*: Cloning, Sequencing, and Characterization of an Intracellular Protease. **Current Microbiology**, v. 30, p. 357–366, 1995.

YEH, M.-S.; WEI, Y.-H.; CHANG, J.-S. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1329–1334, 5 set. 2008.

YILDIRIM, V. *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 000, 2017.

ZHANG, Z. *et al.* Synergistic effect of thermostable β -glucosidase TN0602 and cellulase on cellulose hydrolysis. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017.