

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS CERRO LARGO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS**  
**SUSTENTÁVEIS**

**CAROLINA BECKER DA SILVA**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *BACILLUS* SP. CL18 EM  
CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO E APLICAÇÕES DA ENZIMA BRUTA**

**CERRO LARGO**  
**2024**

**CAROLINA BECKER DA SILVA**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *BACILLUS* SP. CL18 EM  
CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO E APLICAÇÕES DA ENZIMA BRUTA**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

**CERRO LARGO**

**2024**

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

, Carolina Becker da Silva  
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASE POR BACILLUS SP.  
CL18 EM CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO E APLICAÇÕES DA ENZIMA  
BRUTA / Carolina Becker da Silva . -- 2024.  
72 f.:il.

Orientador: Doutor Daniel Joner Daroit

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e  
Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo,RS, 2024.

1. Biotecnologia. I. Daroit, Daniel Joner, orient.  
II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CAROLINA BECKER DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *BACILLUS* SP. CL18  
EM CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO E APLICAÇÕES DA ENZIMA BRUTA**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias.

Área de Concentração: Monitoramento, Controle e Gestão Ambiental

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de Processos e Tecnologias

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

Esta Dissertação foi defendida e aprovada pela banca em: 29/04/2024

**BANCA EXAMINADORA**



Documento assinado digitalmente

**DANIEL JONER DAROIT**

Data: 04/06/2024 15:16:17-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

**Prof. Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS**



Documento assinado digitalmente

**LUCIANEMARIA COLLA**

Data: 05/06/2024 17:57:53-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

**Profa. Dra. Luciane Maria Colla – UPF**



Documento assinado digitalmente

**SERGIO LUIZ ALVES JUNIOR**

Data: 04/06/2024 19:17:54-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

**Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior- UFFS**

## RESUMO

Enzimas proteolíticas representam a maior parcela do mercado global de enzimas. Aplicadas em diversos setores industriais, há a preferência por proteases microbianas, considerando tanto a maior facilidade de sua obtenção quanto aspectos da diversidade de processos em que podem ser utilizadas. Neste sentido, há contínuos esforços no sentido de obter essas enzimas a custos menores. Este trabalho objetivou avaliar e otimizar a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 em cultivos em estado sólido (SSF) utilizando subprodutos agroindustriais como substratos, bem como averiguar potenciais aplicações da protease recuperada dos cultivos. Observou-se que os substratos fornecidos ao microrganismo, o agente umidificante, os níveis de umidade e de inóculo, bem como a presença de cosubstratos e a temperatura de cultivo, afetaram marcadamente o rendimento enzimático. Dentre as aplicações da protease, a enzima bruta foi capaz de coagular leite, apresentou compatibilidade com um detergente comercial, demonstrou habilidade de remover manchas de sangue em tecido de algodão e de incrementar a capacidade de remoção de manchas do detergente comercial. A protease também exibiu eficiência na remoção da camada de emulsão prata-gelatina de filmes fotográficos e de raios-X. Ainda, foi utilizada com sucesso na produção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de subprodutos da indústria da carne. Deste modo, os resultados obtidos reforçam a relevância da biotecnologia para o desenvolvimento de processos produtivos alinhados à sustentabilidade, bem como o potencial de enzimas microbianas não-comerciais neste cenário.

**Palavras-chave:** Proteases microbianas; Subprodutos agroindustriais; Fermentação em estado sólido; Biocatálise; Aplicações de enzimas; Hidrolisados antioxidantes.

## ABSTRACT

Proteolytic enzymes represent the largest share of the global enzyme market. Applied in various industrial sectors, there is a preference for microbial proteases, considering both the ease of obtaining them and aspects of the diversity of processes in which they can be used. In this sense, there are continuous efforts to obtain these enzymes at lower costs. This work aimed to evaluate and optimize the production of proteases by *Bacillus* sp. CL18 in solid state cultivations (SSF) using agro-industrial byproducts as substrates, as well as to investigate potential applications of the protease recovered from the cultures. It was observed that the substrates provided to the microorganism, the moisturizing agent, the moisture and inoculum levels, as well as the presence of co-substrates and the cultivation temperature, markedly affected the enzyme yield. Among protease applications, the crude enzyme was capable of clotting milk, displayed compatibility with a commercial detergent, demonstrated the ability to remove blood stains from cotton fabric and to increase the stain-removing capacity of the detergents. The protease was also efficient in removing the silver-gelatin emulsion layer from photographic and X-ray films. Furthermore, it has been successfully used in the production of antioxidant protein hydrolysates from meat industry by-products. Therefore, the obtained results reinforce the relevance of biotechnology for the development of production processes aligned to sustainability, as well as the potential of non-commercial microbial enzymes in this scenario.

**Keywords:** Microbial proteases; Agro-industrial by-products; Solid state fermentation; Biocatalysis; Enzyme applications; Antioxidant hydrolysates.

## **AGRADECIMENTOS**

Expresso minha profunda gratidão a Deus, minha família e meus amigos, cujo amor, apoio e compreensão foram fundamentais em cada etapa deste percurso acadêmico.

Quero dedicar um agradecimento especial ao meu orientador, o Prof. Dr. Daniel Joner Daroit, por sua orientação excepcional, incentivo constante e disponibilidade incansável. Sua expertise e comprometimento foram essenciais para o desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço também à coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis (PPGATS) por proporcionarem um ambiente propício ao aprendizado e à pesquisa.

Às colegas do laboratório de Microbiologia, Rubia Godoy Hoffmann, Gabriela Poll Moraes, Tainara Lenz Goettems e Bernardete da Silva Bernardo, expresso minha gratidão pela colaboração nos experimentos e pela amizade construída ao longo desse período.

Agradeço à Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) pelo apoio financeiro concedido através dos subprojetos PES-2020-0264 e PES-2023-0080, que viabilizou a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o sucesso deste trabalho, seja com suporte técnico, incentivo moral ou troca de conhecimentos. Vocês foram peças fundamentais nessa jornada acadêmica.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 após 4 dias de SSF usando diferentes subprodutos como substratos. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....39
- Figura 2 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 durante SSF usando descarte de silagem como substrato e diferentes agentes umidificantes. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada um dos agentes umidificantes; os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre agentes umidificantes para o mesmo tempo de cultivo.....41
- Figura 3 - Produção de protease durante SSF em diferentes níveis de umidade, usando descarte de silagem como substrato e solução mineral como agente umidificante. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada um dos níveis de umidade; os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre níveis de umidade para o mesmo tempo de cultivo....42
- Figura 4 - Efeito do volume de inóculo sobre a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 usando descarte de silagem como substrato, solução mineral (agente umidificante) e umidade de 80%. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada volume de inóculo; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre volume de inóculo para o mesmo tempo de cultivo. ....43
- Figura 5 - Efeito da substituição parcial do descarte de silagem por cosubstratos (subprodutos agroindustriais) sobre a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada substrato/mistura; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre substratos/misturas para o mesmo tempo de cultivo..44
- Figura 6 - Efeito da substituição de descartes de silagem por concentrações crescentes de farelo de soja sobre a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 durante SSF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada mistura de substratos; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre misturas de substratos para o mesmo tempo de cultivo. ....45

Figura 7 - Efeito da temperatura de incubação sobre a produção de proteases por <i>Bacillus</i> sp. CL18 durante SSF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada temperatura; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre temperaturas para o mesmo tempo de cultivo. ....	46
Figura 8 - Atividade de coagulação de leite (MCA) da protease bruta de <i>Bacillus</i> sp. CL18 em diferentes temperaturas. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Detalhe: leite desnatado reconstituído tratado com a protease ativa (direita) e a protease inativada termicamente (esquerda). ....	47
Figura 9 - <b>(a)</b> Atividade residual da protease frente a detergentes após incubação em temperaturas e tempos distintos, com ou sem $Ca^{2+}$ . <b>(b)</b> Lavagem de manchas de sangue em tecido de algodão com (i) água da torneira, (ii) detergente tratado termicamente, (iii) protease bruta inativa (1:4 em água da torneira), (iv) protease bruta (1:4 em água da torneira), (v) protease bruta (1:4 em detergente tratado termicamente), e (vi) protease bruta (1:2,5 em água da torneira). ....	49
Figura 10 - Aplicação da protease bruta na degradação de gelatina para recuperação de prata a partir de filmes de raios-X <b>(a)</b> e de filmes fotográficos <b>(b)</b> . Em ambos os painéis <b>(a e b)</b> , os filmes foram tratados a 50 °C por 20 min com (i) tampão Tris-HCl, (ii) enzima inativada termicamente, e (iii) a protease bruta ativa.....	51
Figura 11 - Hidrólise de fígado e baço suínos. A concentração de proteína solúvel <b>(a)</b> , eliminação de radicais ABTS <b>(b)</b> , e capacidade quelante de ferro <b>(c)</b> foram avaliados após 0 h e 4 h de incubação com a protease bruta ativa (Enzima) ou inativada termicamente (Controle). Letras distintas indicam diferenças significativas para cada subproduto ( $p < 0,05$ ) .....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de proteases por <i>Bacillus</i> spp. através de SSF usando diferentes substratos.....	20
Tabela 2 - Aplicações de proteases microbianas .....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Ca <sup>2+</sup>	Íons cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
HCl	Ácido clorídrico
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dipotássico
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico
MCA	Atividade de coagulação de leite
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PCA	Ágar Padrão para Contagem
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
SmF	Fermentação submersa
SSF	Fermentação em estado sólido
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris hidroximetil aminometano

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>PROTEASES</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>PROTEASES MICROBIANAS NA PERSPECTIVA TECNOLÓGICA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b>GÊNERO <i>BACILLUS</i></b> .....	<b>16</b>
<b>2.4</b>	<b>FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Substratos e outros parâmetros em SSF</b> .....	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>APLICAÇÕES DAS PROTEASES MICROBIANAS</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação mundial com os problemas ambientais demanda a utilização de tecnologias mais limpas e, conseqüentemente, abordagens biotecnológicas surgem como alternativas promissoras, a fim de encontrar novas soluções para tais desafios. Neste sentido, microrganismos e suas enzimas vêm sendo explorados na bioconversão de biomassas residuais (OLIVEIRA *et al.*, 2017; RIEGER *et al.*, 2017).

O uso do potencial microbiano pode resultar tanto no manejo quanto na agregação de valor a estas biomassas, usualmente representando estratégias eficientes, de baixo custo e ecologicamente seguras. Dessa forma, diversos subprodutos agroindustriais ambientalmente problemáticos podem ser considerados como matérias-primas e não mais como resíduos (WANG *et al.*, 2021).

Enzimas microbianas estão entre os produtos úteis produzidos em tais bioprocessos. Normalmente, o custo elevado dos substratos utilizados nos meios de cultura para a produção comercial de enzimas microbianas é um fator limitante (SINGH; BAJAJ, 2016; SOBUCKI; RAMOS; DAROIT, 2017). Portanto, a busca por substratos alternativos pode contribuir para diminuir o custo final da produção de enzimas e, conseqüentemente, reduzir os custos dos processos em que as enzimas são empregadas. Resíduos de atividades agroindustriais podem ser utilizados como potenciais substratos, por sua ampla disponibilidade e baixo valor (SALIM *et al.*, 2019).

A fermentação em estado sólido (SSF) vem ganhando espaço na produção de enzimas, uma vez que é um processo de baixo custo, bem como apresenta como vantagem o uso dos resíduos e subprodutos agroindustriais como potenciais substratos para o crescimento microbiano (SALIM *et al.* 2017). Além disso, geralmente resulta em alta produtividade enzimática, menos mão-de-obra, menor produção de efluentes, entre outros (SINGH; BAJAJ, 2016).

Dentre as enzimas microbianas de interesse tecnológico, as proteases têm lugar de destaque. Estes biocatalisadores, que atuam na hidrólise de ligações peptídicas em proteínas, vêm sendo aplicadas em diversas áreas industriais, como na indústria de detergentes, couros e alimentos (CONTESINI; MELO; SATO, 2018; KANDASAMY *et al.*, 2016).

Neste cenário, *Bacillus* sp. CL18, bactéria isolada de solo no município de Cerro Largo, região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, foi previamente descrita como sendo capaz de degradar penas de frango (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Estudos subsequentes indicaram que este isolado é capaz de produzir proteases extracelulares durante cultivos submersos. A protease bruta desta linhagem de *Bacillus* já foi caracterizada, e sua aplicação demonstrada especialmente na hidrólise de caseína e proteína de soja (RIEGER *et al.*, 2017).

Assim, este estudo justifica-se pela (i) avaliação da capacidade de *Bacillus* sp. CL18 em produzir proteases extracelulares durante SSF, (ii) a otimização da produção de proteases, e (iii) a proposição de uma protease microbiana não-comercial como biocatalisador em potencial para aplicações tecnológicas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Otimizar a produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 via SSF e averiguar aplicações da protease bruta.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para a produção de proteases;
- Investigar o efeito de diferentes cosubstratos, agentes umidificantes, teores de umidade, volumes de inóculo e temperaturas de cultivo sobre o rendimento enzimático;
- Investigar a protease bruta como agente de coagulação de leite;
- Averiguar a compatibilidade da protease bruta com detergentes comerciais e sua eficiência na remoção de manchas em tecido de algodão;
- Avaliar a protease bruta na hidrólise de gelatina em filmes fotográficos e de raios-X;
- Investigar o uso da protease bruta na obtenção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de subprodutos de abatedouros de suínos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PROTEASES

Enzimas são biocatalisadores, ou seja, aceleram reações químicas em sistemas biológicos, sendo que enzimas diferentes usualmente catalisam reações distintas e atuam sobre substratos específicos (THAPA *et al.*, 2019). As proteases, neste sentido, hidrolisam proteínas e peptídeos, liberando peptídeos de menor tamanho e mesmo aminoácidos livres. Além de sua produção por todos os seres vivos, desempenhando diferentes funções, as proteases representam parcela significativa das enzimas industriais, alcançando cerca de 60% do mercado global de enzimas (SHARMA *et al.*, 2017).

As proteases podem ser classificadas em exopeptidases e endopeptidases, com base em sua ação nas regiões amino ou carboxi terminais do substrato proteico, ou nas regiões internas (distantes das regiões terminais) de cadeias polipeptídicas (SONG *et al.*, 2023). Estas enzimas também são classificadas como serino proteases, proteases aspárticas, cisteíno proteases, metaloproteases, dentre outras, dependendo da natureza dos grupos funcionais no sítio ativo (NAVEED *et al.* 2021).

Além destas, as proteases possuem ainda outras classificações, de acordo com relações evolutivas, onde são classificadas em famílias e subdivididas em clãs, de acordo com a divergência ou convergência com um ancestral comum. Elas ainda podem ser segregadas conforme o substrato que hidrolisam, como colágeno (colagenase), elastina (elastase), queratina (queratinase), e dependendo das condições de pH no qual apresentam atividade, sendo classificadas como proteases ácidas, neutras ou alcalinas (MATKAWALA *et al.*, 2021; SOLANKI *et al.*, 2021).

### 2.2 PROTEASES MICROBIANAS NA PERSPECTIVA TECNOLÓGICA

Embora proteases sejam produzidas por vegetais, animais e microrganismos, estes últimos são as fontes preferenciais destas enzimas vislumbrando aplicações tecnológicas. Isso pois a obtenção de proteases de origem vegetal requer um maior tempo, disponibilidade de área para cultivo e condições climáticas adequadas. Já para

as proteases de origem animal, depende-se da disponibilidade de rebanho para abate e, ainda, o processo de obtenção das proteases torna-se dispendioso, podendo-se enfrentar aspectos éticos (SOLANKI *et al.*, 2021).

De fato, proteases microbianas representam cerca de metade da produção comercial mundial de enzimas (KANDASAMY *et al.*, 2016). Isso se deve à possibilidade de cultivar microrganismos em grandes quantidades, em tempos relativamente curtos, por métodos de fermentação estabelecidos, produzindo um suprimento abundante e regular do produto desejado. Também considera-se a elevada diversidade microbiana, que pode prover enzimas mais adequadas para diferentes processos. Além disso, as proteínas microbianas têm uma vida útil maior, podendo ser armazenadas em condições abaixo das ideais por semanas, sem perder as funções de modo significativo (SHARMA *et al.*, 2017).

As proteases produzidas por microrganismos podem ser extracelulares ou intracelulares, sendo as extracelulares as principais do ponto de vista de sua aplicação, já que são facilmente recuperadas após os cultivos microbianos. A produção de proteases é influenciada por alguns fatores, como a concentração do inóculo, nutrientes e fatores físico-químicos, tais como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono, sais inorgânicos, homogeneização e concentração de oxigênio dissolvido. Estas enzimas são detectadas através de vários métodos usando diferentes substratos, naturais ou sintéticos, sendo os mais comuns a caseína e a azocaseína (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011).

Proteases microbianas extracelulares são amplamente utilizadas em diversos processos e produtos na indústria de detergentes, alimentos, produtos farmacêuticos, químicos, couros, seda, além do tratamento de resíduos (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2013). A performance da protease é influenciada por diferentes fatores, como pH, força iônica e temperatura. Sendo assim, enzimas com novas propriedades que possam otimizar processos industriais estão sempre em demanda (SHARMA *et al.*, 2017).

### 2.3 GÊNERO *BACILLUS*

As bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas, em forma de bastonete, formadoras de endósporos, aeróbias ou anaeróbias. Bactérias deste gênero são

agrupadas conforme suas exigências físico-químicas, nutricionais, genéticas e, embora sejam fenotipicamente similares entre si, podem ser facilmente identificadas e diferenciadas por estudos de DNA (CONTESINI; MELO; SATO, 2018).

A maioria das proteases comerciais, principalmente neutras e alcalinas, são produzidas por organismos pertencentes ao gênero *Bacillus* (XU *et al.*, 2023) Isso se dá pelo fato de que os organismos deste gênero possuem diversas características apropriadas, como altas taxas de crescimento, a habilidade de secretar grandes quantidades de proteínas (incluindo enzimas) para o meio extracelular e a capacidade de utilizar diversos substratos como fontes de carbono, nitrogênio e energia (GOVARTHANAN *et al.*, 2013). Além disso, diversos benefícios podem ser citados no uso de *Bacillus* spp., como a não patogenicidade da vasta maioria das linhagens, bem como a facilidade de manipulação e cultivo (LAKOWITZ *et al.*, 2018).

A produção de proteases por *Bacillus* sp. é intensamente influenciada por fatores físicos tais como o pH, temperatura e tempo de incubação, além de fatores como os constituintes dos meios de cultura, sendo sugerido que a produção de proteases extracelulares seja uma manifestação da limitação de nutrientes. O meio de cultura, no caso destes microrganismos, deve conter pelo menos fonte(s) de carbono e fonte(s) de nitrogênio, além de outros nutrientes, como o fósforo (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

## 2.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Processos de fermentação são vastamente utilizados na produção de diversos compostos importantes que têm aplicações na indústria farmacêutica, química, alimentícia, entre outras. A necessidade de obtenção sustentável de produtos, buscando atender às exigências do mercado de maneira econômica e ambientalmente adequada, tem representado uma demanda desafiadora no intuito de investigar e otimizar os processos fermentativos (SINGH *et al.*, 2017).

As proteases e outras enzimas microbianas podem ser obtidas através de dois processos distintos: fermentação submersa (SmF) e fermentação em estado sólido (SSF). Apesar de as SmF frequentemente resultarem em rendimentos enzimáticos inferiores, são responsáveis pela produção de cerca de 90% das enzimas comerciais. Nesse método, o crescimento microbiano ocorre em um meio líquido, caracterizado

por uma alta proporção de água onde os nutrientes estão dissolvidos e/ou em suspensão (CONTESINI; MELO; SATO, 2018).

Já as SSF são processos que ocorrem em uma matriz sólida, ou seja, são conduzidos na (quase) ausência de água livre. No entanto, o substrato utilizado deve conter quantidade adequada de umidade para sustentar o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos (KANDASAMY *et al.*, 2016). Inicialmente, acreditava-se que a SSF não seria apropriada ao metabolismo bacteriano, devido à disponibilidade limitada de água. A SSF ainda vem sendo mais explorada para a produção de enzimas fúngicas; no entanto, várias enzimas bacterianas, como amilases, cutinases, celulases, proteases, queratinases e xilanases, vêm sendo produzidas com sucesso através de SSF (GOVARTHANAN *et al.*, 2013).

A SSF é caracterizada por sua simplicidade, exigindo investimentos mínimos e dispensando equipamentos complexos. Além disso, requer pouco espaço para sua realização e consome menos energia em comparação com a SmF. Outra vantagem da SSF é a facilidade de controle da contaminação devido aos baixos níveis de umidade presentes no processo. Adicionalmente, a SSF resulta em uma menor produção de águas residuais e possibilita uma melhor recuperação do produto final (AL FARRAJ *et al.*, 2020, CONTESINI; MELO; SATO, 2018; ESAKKIRAJ *et al.*, 2011; KANDASAMY *et al.*, 2016).

A SSF é uma abordagem atraente para a produção de proteases microbianas. Um dos fatores-chave para essa produção via SSF é a seleção cuidadosa do microrganismo, que deve ser capaz de se desenvolver em condições de umidade reduzida. Para otimizar a produção de proteases através da SSF, é crucial avaliar as condições de fermentação mais adequadas, incluindo a escolha dos substratos, a temperatura, teores de umidade, dentre outros parâmetros. Essas considerações são essenciais para maximizar o rendimento e a eficiência do processo de fermentação em estado sólido (CONTESINI; MELO; SATO, 2018; SINGH *et al.*, 2017).

#### **2.4.1 Substratos e outros parâmetros em SSF**

A seleção de substratos orgânicos adequados é ponto de elevada relevância buscando obter proteases microbianas, visto que atuam como fontes de carbono e energia, além de outros macronutrientes, para os microrganismos. Considerando a

ampla diversidade microbiana, não é esperado que um mesmo substrato resulte em máxima produção destas enzimas por microrganismos distintos. Assim, a triagem de substratos é, comumente, a primeira etapa para a otimização da produção de proteases microbianas (SALIM *et al.*, 2017). A seleção de substratos ideais depende de vários fatores que, além de sustentar a produção das enzimas de interesse pelo microrganismo, estão relacionados ao custo e à disponibilidade do material (KANDASAMY *et al.*, 2016).

Geralmente, matérias-primas não (ou moderadamente) processadas e resíduos agrícolas são empregados como substratos. Estes materiais são gerados em grandes quantidades ao longo do ano, são recursos renováveis abundantes, e possuem baixo valor comercial. Usualmente apresentam elevadas concentrações de carboidratos (GOVARTHANAN *et al.*, 2014) e, além disso, podem fornecer, de modo parcial ou total, outros nutrientes necessários ao crescimento microbiano (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

O uso de subprodutos ou resíduos orgânicos provenientes de atividades agroindustriais como substratos também representa uma alternativa interessante para o manejo de resíduos e com vistas à sustentabilidade. Assim, produtos de elevado potencial comercial, como é o caso das enzimas, podem ser obtidos por meio de processos microbianos utilizando biomassas potencialmente problemáticas na perspectiva ambiental (GOVARTHANAN *et al.*, 2014).

Em alguns casos, o uso combinado de dois ou mais substratos diferentes pode elevar os rendimentos enzimáticos, em comparação ao uso de substratos separadamente. Ainda, pode ser relevante submeter os resíduos a pré-tratamentos, que frequentemente envolvem uma etapa de moagem para diminuição do tamanho de partícula dos substratos (SHARMA *et al.*, 2017).

Resíduos de leguminosas vêm sendo averiguados, por exemplo, como substratos adequados à produção de proteases por *Bacillus*, pelo fato de possuírem teores mais elevados de nitrogênio orgânico (PRAKASHAM; RAO; SARMA, 2006). Diversos outros estudos também reportam a produção de proteases por *Bacillus* spp. por meio de SSF utilizando subprodutos agroindustriais como substratos. Algumas destas investigações estão compiladas na Tabela 1.

Tabela 1 - Produção de proteases por *Bacillus* spp. através de SSF usando diferentes substratos.

<b>Microrganismo</b>	<b>Origem do microrganismo</b>	<b>Substrato(s)</b>	<b>Parâmetros de cultivo avaliados</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus halodurans</i>	Sedimentos marinhos	Casca, farelo e palha de arroz; resíduos de frutas; resíduos vegetais; farelo de trigo e serragem	pH, temperatura, fontes de carbono e nitrogênio, cloreto de sódio, umidade	Balachandran <i>et al.</i> (2021)
<i>Bacillus siamensis</i> YC-9	Ninho de cupins	Farelo de soja, girassol e de trigo; pericarpo de milho; farelo de arroz e palha de trigo	Tempo de incubação, pH, temperatura e volume de inóculo	Wang <i>et al.</i> (2021)
<i>Bacillus</i> sp.	Descartes de resíduos agrícolas	Polpa de café e espigas de milho;	Tempo de incubação, pH e temperatura	Kandasamy <i>et al.</i> (2016)
<i>Bacillus</i> sp.	Solo	Farelo de trigo e casca de lentilha	Tempo de incubação, teor de umidade, concentração de inóculo	Uyar e Baysal (2004)
<i>Bacillus</i> sp. TMF-1	Alimentos, solo e resíduos coletados de fontes distintas, bem como alguns microrganismos disponíveis comercialmente;	Farelo de soja, milhos, trigo e girassol; pericarpo de milho; bagaço de azeitona	Umidade	Salim <i>et al.</i> (2017)
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> AT	Leite bovino Arroz fermentado	Farelo de soja Casca de maçã e banana; esterco bovino; palha de arroz e farelo de trigo;	Umidade; Tempo, umidade, inóculo, tamanho de partícula, fontes de carbono e nitrogênio	Salim <i>et al.</i> (2019) Vijayaraghavan, Lazarus e Vincent (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> NCIMB-10144		Farelo de soja	Tempo, umidade, inóculo, temperatura, fontes de carbono, pH;	Abdullah <i>et al.</i> (2022)
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Iwo</i>	Massa fermentada	Grão de bico	Tempo de incubação;	Li e Wang (2020)
<i>Bacillus subtilis</i> DB100		Penas de frango	Tempo, umidade, inóculo, tamanho de partícula	El Salamony <i>et al.</i> (2024)

Fonte: autora (2024)

A área superficial disponível no substrato desempenha papel importante na fixação microbiana, na transferência de massa e na disponibilidade de nutrientes, com efeitos sobre o crescimento microbiano e produção de enzimas (PRAKASHAM; RAO; SARMA, 2006). Partículas menores oferecem uma área superficial maior para o

ataque microbiano, mas podem resultar em aglomeração do substrato, prejudicando a aeração. Já partículas maiores proporcionam melhor aeração, mas têm uma superfície limitada para o ataque microbiano (SHARMA *et al.*, 2017).

O teor de umidade no meio também influencia a SSF para a produção de enzimas. A elevação da umidade reduz a porosidade do substrato, limitando, por exemplo, a transferência de oxigênio e a difusão dos nutrientes. Por outro lado, teores de umidade mais baixos podem resultar em menor solubilidade dos nutrientes do substrato (SHARMA *et al.*, 2017).

Na SSF, o teor de água do substrato é influenciado pela capacidade de absorção, pelas forças capilares do substrato, pela temperatura de incubação do meio e pela quantidade de calor metabólico gerado. Assim, o nível de umidade nas SSF, além do impacto sobre as propriedades do substrato, também afeta direta e indiretamente o crescimento microbiano. Logo, é essencial fornecer teores de umidade que favoreçam a fermentação para alcançar a máxima produção de proteases (PRAKASHAM; RAO; SARMA, 2006).

Há grande variação no teor ótimo de umidade requerido por diferentes linhagens de *Bacillus*. Balachandran *et al.* (2021) relataram que 85% de umidade inicial resultou em máxima produção de proteases por *Bacillus halodurans*, enquanto que 78% de umidade foi reportado para *Bacillus subtilis* ACCC 01746 (YIN; JIA; HUANG, 2019). Umidade de 75% foi indicada para *B. subtilis* DB100 (EL SALAMONY *et al.*, 2024) e 54% para *Bacillus cereus* AT (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2013). Já Abdullah *et al.* (2022) reportaram 30% como teor ótimo de umidade para *Bacillus subtilis* NCIMB-10144.

Ainda, a produção de proteases é influenciada por variáveis como pH e temperatura, por seus efeitos sobre a fisiologia e metabolismo microbianos. Para microrganismos neutrofilicos, o pH inicial dos cultivos usualmente varia de pH 7,0 a 9,0. Para microrganismos mesofílicos, a temperatura ideal para a produção de proteases situa-se geralmente entre 30 e 40 °C (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2012; POURYAFAR *et al.*, 2015). Em relação à temperatura, estudos descrevem máxima produção de proteases, por exemplo, a 30 °C para *Bacillus halodurans* (BALACHANDRAN *et al.*, 2021), a 40 °C para *Bacillus subtilis* NCIMB-10144 (ABDULLAH *et al.* 2022) e a 50 °C para *Bacillus cereus* AT (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2013).

A carga de inóculo microbiano também pode afetar a produção de proteases, visto que influencia, por exemplo, o tempo necessário para que seja atingido o rendimento enzimático máximo. Outro fator relevante é o tempo de cultivo. Geralmente, o tempo necessário para a produção máxima de protease por microrganismos pode variar de 2 a 9 dias (SHARMA *et al.*, 2017). Estudos com *Bacillus subtilis* Iwo indicaram uma maior produção de protease em 48 horas (LI; WANG, 2020), usando como substrato grão de bico; já na investigação de El Salamony *et al.* (2024), 5 dias de incubação foram necessários para *B. subtilis* DB100, tendo como substrato resíduos de penas de frango.

## 2.5 APLICAÇÕES DAS PROTEASES MICROBIANAS

As proteases microbianas são importantes biocatalisadores industriais, úteis em vasta gama de aplicações (Tabela 2). Estas enzimas, por exemplo, desempenham um papel fundamental na produção de queijos por sua atuação na coagulação do leite através da rápida clivagem das principais proteínas do leite, as caseínas. O coalho de bezerro é tradicionalmente usado; no entanto, a escassez global de coalho, preocupações com o bem-estar animal e o aumento da produção de queijo levaram à busca por enzimas alternativas de coagulação do leite. Particular interesse está focado em fontes microbianas, que podem fornecer um fornecimento regular de enzimas proteolíticas a custos mais baixos, evitando também preocupações de cunho ético, dietético e culturais relacionadas ao uso de enzimas de origem animal (ALJAMMAS *et al.*, 2022; GULERIA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2023).

Também são utilizadas no processo de amaciamento de carnes. A maciez da carne é destacada como uma característica altamente valorizada pelos consumidores, enfatizando assim a relevância das proteases na indústria alimentícia para atender às preferências dos consumidores em relação à textura. As proteases atuam especificamente nas proteínas do tecido conjuntivo, como colágeno e elastina, proporcionando os incrementos na maciez da carne (BUREROS *et al.*, 2020; GERELT; IKEUCHI; SUZUKI, 2000; POOJA *et al.*, 2022).

Na panificação, as proteases são aplicadas especialmente na modificação das propriedades do glúten. Esta modulação resulta em um aumento na capacidade de absorção de água e óleo do produto final (RAZZAQ *et al.*, 2019). Ao mesmo tempo,

essas enzimas melhoram a extensibilidade da massa e sua maleabilidade (HEREDIA-SANDOVAL *et al.* 2016). Assim, as proteases contribuem para a produção de uma variedade de produtos, como *waffles*, pães e outros produtos assados (SHAIKH *et al.*, 2023). Ainda, enzimas microbianas podem contribuir para a melhoria da qualidade de pães sem glúten (HAMADA *et al.*, 2013).

Tabela 2 - Aplicações de proteases microbianas.

Origem	Aplicações	Referência
<i>Bacillus halodurans</i>	Remoção de manchas proteicas em tecidos	(BALACHANDRAN <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bacillus pumilus</i>	Suplementação com protease para o crescimento de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	(HASSAAN <i>et al.</i> , 2021)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Coagulação de leite	(ALJAMMAS <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus velezensis</i> YH-1	Coagulação de leite	(WANG <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bacillus licheniformis</i> ALW1	Compatibilidade com detergentes e remoção de manchas.	(EMRAN <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bacillus subtilis</i> KT004404	Depilação de couro, remoção de manchas e compatibilidade com detergentes.	(REHMAN <i>et al.</i> , 2017)
<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i> 1A02591	Produção de peptídeos (antioxidantes).	(CHENG <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bacillus subtilis</i>	Amaciante de carne.	(BUREROS <i>et al.</i> , 2020)
<i>Laceyella sacchari</i> YNDH	Depilação de couro e remoção de manchas.	(GODA <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bacillus subtilis</i> ZMS-2	Depilação de couro.	(KHAN <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bacillus cereus</i>	Depilação de couro	(VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2013).
<i>Bacillus nakamurai</i> PL4	Remoção de manchas, degradação de penas e depilação de couro.	(SHAIKH <i>et al.</i> , 2023)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> .	Recuperação de prata de filme de raios X	(AL-ABDALAL; AL-KHALDI, 2016)

*Continua*

Tabela 2 - Continuação.

Origem	Aplicações	Referência
<i>Bacillus sp.</i> SB12	Depilação de couro	(BRIKI; HAMDÍ; LANDOULSI, 2016)
<i>Saccharomonospora viridis</i> Hw G550	Atividade nematocida	(DARWESH <i>et al.</i> , 2019)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> N4	Atividade nematocida	(JANKIEWICZ; LARKOWSKA; BRZEZINSKA, 2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Instabilidade proteica e prevenção de turbidez em vinho.	(BENUCCI <i>et al.</i> , 2022)
<i>Aspergillus niger</i> WA 2017	Estabilidade e compatibilidade de solventes orgânicos e detergentes e recuperação de prata de filme de raios X	(WAHAB; AHMED, 2018)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Melhoria na qualidade de pão sem glúten	(HAMADA <i>et al.</i> , 2013)
Hidrolase	Pré-tratamento de resíduos de lodo ativado	(PANG <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bacillus sp.</i> SP II-4	Limpeza de lentes de contato	(REJISHA; MURUGAN, 2021)
<i>Aspergillus kawachi</i>	Produção de etanol	(TIEN <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus safensis</i> FO-36bMZ836779	Desgomagem de seda	(EL-SAYED <i>et al.</i> , 2022)
<i>Bacillus flexus</i>	Agente fibrinolítico	(AL FARRAJ <i>et al.</i> , 2020)
<i>Serratia marcescens sp.</i>	Compostagem de carcaças suínas	(ZHAI <i>et al.</i> , 2022)
<i>Talaromyces leycettanus</i> JCM12802	Clarificação de sucos	(GUO <i>et al.</i> , 2019)
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Melhoramento da qualidade e desenvolvimento de sabor de linguiça	(WANG <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: Autora.

As proteases são usadas na produção de bebidas. Nas indústrias de cerveja e vinho branco, são empregadas com o objetivo de aprimorar o sabor, cor e aparência dos produtos. Na vinificação, são utilizadas para remover complexos polifenóis-proteínas, prevenindo a turvação e possibilitando um armazenamento prolongado do vinho (BENUCCI *et al.*, 2022). Em sucos, como os de maçã, laranja e uva, a presença de proteínas das frutas pode causar turvação nas bebidas, reduzindo seu valor

comercial e vida de prateleira. Uma alternativa proposta para superar esse problema é a hidrólise enzimática destas proteínas (GUO *et al.*, 2019).

A hidrólise enzimática de proteínas alimentares também é relevante quanto a aspectos do sabor dos alimentos. A atuação de endopeptidases pode liberar oligopeptídeos que exibem uma variedade de sabores, incluindo doce, amargo, azedo ou salgado, que depende da composição e tamanho dos peptídeos (WANG *et al.*, 2022).

Proteases vem sendo aplicadas na melhoria das propriedades funcionais de proteínas alimentares, tais como a solubilidade, capacidade de retenção de água e gordura, formação de géis e espumas, contribuindo para propriedades sensoriais de alimentos processados. Mais recentemente, proteases têm sido avaliadas na hidrólise de proteínas alimentares considerando que hidrolisados proteicos podem exercer diferentes atividades biológicas, como atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antidiabética, dentre outras, atribuídas aos peptídeos liberados durante a hidrólise (SOUZA *et al.*, 2023).

Para além da indústria de alimentos, proteases vêm sendo empregadas na aquicultura. Neste caso, a aplicação de proteases pode ser separada em duas categorias. Primeiramente, como aditivo alimentar, e em segundo lugar, para o pré-tratamento de fontes alimentares alternativas à farinha de peixe. Em ambos os casos, um dos principais objetivos é a melhoria da digestibilidade dos nutrientes pelos animais aquáticos, com ênfase nas proteínas. Além disso, a quebra de grandes moléculas proteicas estimula a formação de peptídeos bioativos e a degradação de antinutrientes proteicos específicos. Esses efeitos não apenas têm impactos positivos na saúde e no crescimento dos peixes cultivados, mas também proporcionam benefícios econômicos (CHEN *et al.*, 2024).

As proteases são usadas em larga escala na indústria de detergentes. O uso de proteases por este setor representa 20% das vendas globais de enzimas. Enzimas proteolíticas são incorporadas em diversos produtos destinados à limpeza e lavagem de roupas, louças e lentes de contato. Estas enzimas, utilizadas como aditivos em detergentes para lavagem de roupas, são eficientes na remoção de sujidades em períodos mais curtos de agitação (SONG *et al.*, 2023). Além disso, enzimas proteolíticas são relevantes como alternativas renováveis para mitigar os efeitos ecológicos prejudiciais relacionados à ampla utilização de detergentes de base química (RAZZAQ *et al.*, 2019; SOLANKI *et al.*, 2021).

No contexto do processamento de couros, uma parcela substancial da carga poluente provém dos resíduos gerados durante as operações de depilação. O método tradicional emprega cal e sulfeto de sódio, resultando na gelatinização dos pelos. Assim, além da presença de compostos químicos nos efluentes, há elevada carga orgânica facilmente decomponível, o que eleva a demanda bioquímica de oxigênio, contribuindo de maneira significativa para o potencial poluente dos efluentes. A substituição da depilação química pelo uso de proteases tem apresentado resultados promissores, reduzindo a carga poluente e originando couros de qualidade similar ou superior àquela obtida pelos métodos tradicionais (AKRAM; HAQ; JABBAR, 2020; PILLAI; MANDGE; ARCHANA, 2011; SINGHAL; NIGAM; VIDYARTHI, 2012) TIAN *et al.*, 2019). Dada a crescente demanda, há a necessidade premente de proteases capazes de atender às exigências específicas do processo, ao mesmo tempo em que mitigam os impactos ambientais adversos associados às práticas convencionais (BRIKI; HAMDÍ; LANDOULSI, 2016).

A degomagem da seda, tradicionalmente associada ao alto consumo de energia, água e produtos químicos, com a liberação de efluentes altamente alcalinos, pode ser mais sustentável por meio da aplicação de proteases. Essa estratégia não apenas conserva recursos, mas também realiza a remoção eficaz da sericina, uma proteína aderida à fibroína, que é a proteína de interesse. O processamento enzimático da seda bruta pode, inclusive, resultar em fibras com características (como brilho e elasticidade) mais adequadas quando comparadas aos métodos químicos (EL-SAYED *et al.*, 2022).

Também na indústria têxtil, a aplicação de proteases microbianas pode auxiliar no controle do encolhimento de fibras de lã, substituindo a utilização de produtos químicos que causam impactos negativos ao meio ambiente. Estas enzimas ainda auxiliam em outros processos, tais como, o acabamento que incluiu a limpeza, branqueamento ou tingimento da lã, processos estes que também causam a descarga de uma variedade de produtos químicos tóxicos. Assim o uso de enzimas é considerado como uma alternativa ecologicamente segura que vem sendo explorada em vários processos de acabamentos têxteis (GUPTA *et al.*, 2013).

As proteases podem ser empregadas no controle de fitoparasitas, como é o caso dos fitonematóides. Estes parasitas causam consideráveis perdas em diversas culturas agrícolas. Atualmente, seu controle é realizado por meio de nematicidas químicos que, além de apresentarem riscos ambientais, são também tóxicos para os

seres humanos. Na busca por abordagens alternativas e sustentáveis para o manejo dessas infecções, estudos indicam que a atividade nematicida de metabólitos microbianos está relacionada às enzimas, especialmente quitinases e proteases. Essas enzimas desempenham um papel crucial na degradação da cutícula ou casca do ovo do nematoide, compostas principalmente por quitina e proteínas (DARWESH *et al.*, 2019; JANKIEWICZ; LARKOWSKA; BRZEZINSKA, 2016).

A variedade de aplicações das proteases inclui também a saúde humana, especialmente nos ramos médico e farmacêutico. Enzimas proteolíticas microbianas podem ser utilizadas como agentes fibrinolíticos na dissolução de coágulos sanguíneos (AL FARRAJ *et al.*, 2020).

Em viés distinto, as proteases podem ser empregadas na produção de etanol. Neste caso, a utilização dessas enzimas visa hidrolisar fontes orgânicas de nitrogênio disponíveis na matéria-prima, resultando na redução do tempo de fermentação e na melhoria do rendimento de etanol (TIEN *et al.*, 2022).

Como apresentado acima, embora o foco da aplicação de proteases microbianas seja o aumento da eficiência de processos/produtos nos níveis industrial e comercial, há outras vantagens concomitantes, especialmente no que se refere à diminuição de impactos aos ambientes. Entretanto, em determinadas situações, o uso das enzimas proteolíticas tem como finalidade o tratamento de efluentes e o manejo de subprodutos e resíduos agroindustriais (SOLANKI *et al.*, 2021).

Neste contexto, as proteases podem ser usadas na solubilização de resíduos proteicos, acelerando a diminuição da demanda biológica de oxigênio em sistemas de tratamento de efluentes (MATKAWALA *et al.*, 2021). Segundo Pang *et al.* (2020), as proteases podem ser empregadas no pré-tratamento de lodo ativado residual, facilitando sua bioconversão anaeróbia para obter ácidos graxos de cadeia curta.

Além disso, as enzimas desempenham papel significativo na recuperação de prata de filmes fotográficos e de raios-X descartados. Estes filmes são comumente compostos de uma base polimérica sobre a qual é depositada uma emulsão de gelatina e haletos de prata. O teor de prata nesses filmes é de cerca de 0,5-1,5% (m/m), e sua reciclagem supre 18-20% da demanda mundial por este metal. No entanto, as principais estratégias para a recuperação da prata envolvem a queima ou a hidrólise química, que são dispendiosas e levantam preocupações ambientais (NAKÍBOĞLU; TOSCALI; NİSLİ, 2003; SINGHAL; NIGAM; VIDYARTHI, 2012). Consequentemente, a hidrólise enzimática da gelatina se destaca como uma

alternativa mais sustentável (AL-ABDALAL; AL-KHALDI, 2016), e vem ganhando importância como um processo ecologicamente correto e econômico para recuperação de prata (e do filme polimérico), exigindo também menos mão de obra (ASGHER; BASHIR; IQBAL, 2018; BHAVIKATTI *et al.*, 2020; JOSHI; SATYANARAYANA, 2013).

Proteases microbianas vêm sendo investigadas na degradação de resíduos de origem animal. Esta abordagem caracteriza-se como uma prática sustentável que objetiva a gestão eficiente de recursos, redução de desperdícios e minimização de impactos ambientais (SHAIKH *et al.*, 2023). A degradação enzimática de penas de frango, resíduos abundantes da indústria avícola, é um dos exemplos. Cerca de 24 bilhões de frangos são abatidos anualmente em escala global, gerando cerca de 8,5 bilhões de toneladas de penas. Ricas em queratinas, proteínas de difícil degradação, o descarte das penas contribui para a poluição ambiental e no desperdício de uma fonte valiosa de proteínas. Assim, a degradação enzimática das penas vem sendo proposta como uma estratégia interessante no intuito de converter as penas em ingredientes de rações e fertilizantes (SINGH; BAJAJ, 2017).

Além das penas, abatedouros e frigoríficos geram enormes quantidades de outros subprodutos, como peles, sangue, vísceras e órgãos internos. Estima-se que os subprodutos gerados pelo abate e processamento de animais de açougue para a produção de carne representem cerca de 35-45% do peso vivo (MARTÍNEZ-ALVAREZ; CHAMORRO; BRENES, 2015). Estes subprodutos, por seu elevado teor de proteínas, podem ser interessantes substratos para processos de hidrólise enzimática visando obter hidrolisados bioativos. A produção de hidrolisados proteicos antioxidantes tem sido particularmente investigada, considerando a sua potencial relevância para a saúde humana e animal. Este tipo de estratégia de manejo vem ganhando importância para reduzir os impactos causados ao meio ambiente, bem como uma abordagem pertinente de biorrefinaria para a valorização destes subprodutos (BORRAJO *et al.*, 2019).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão apresentados na seção 3.1, na forma de um artigo científico. Neste estudo, realizou-se a otimização da produção de proteases pelo isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL18 através de SSF. Foram explorados diferentes substratos e cosubstratos, bem como foram investigadas outras condições dos cultivos. Além disso, o artigo aborda as aplicações em potencial da protease bruta recuperada dos SSF.

### 3.1 ARTIGO CIENTÍFICO

#### **Otimização da produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 em cultivos em estado sólido e aplicações da enzima bruta**

##### **RESUMO**

Proteases microbianas são ferramentas biotecnológicas relevantes. A sua produção utilizando meios de baixo custo é um importante tópico, e os cultivos em estado sólido (SSF) representam uma abordagem simples e econômica para este fim. Assim, parâmetros dos SSF foram investigados para incrementar a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 e, em seguida, foram avaliadas aplicações potenciais da enzima bruta. Entre os substratos usados nos SSF (5 g), a maior produção de proteases foi alcançada utilizando descartes de silagem de milho, em comparação com outros cinco subprodutos agroindustriais. Os rendimentos foram maiores com 80% de umidade inicial, utilizando um agente umidificante à base de sais, e 1 mL de inóculo. A substituição parcial do descarte de silagem por farelo de soja (80:20%) elevou a produção de protease, que atingiu rendimento máximo em SSF realizados a 30 °C. A protease bruta exibiu capacidade de coagular leite, com atividade ótima a 55 °C. A preparação enzimática foi compatível com um detergente em pó para lavagem de roupas (86-96% de atividade residual), removendo manchas de sangue de tecido de algodão e melhorando o desempenho de lavagem do detergente. Também foi capaz de remover, em 15 min, a camada de gelatina de filmes fotográficos e de raios-X usados. A protease bruta hidrolisou fígado e baço suínos, e os hidrolisados proteicos demonstraram capacidades superiores de eliminação de radicais e quelação de Fe<sup>2+</sup>. Em suma, uma protease bacteriana versátil foi obtida através de SSF utilizando um resíduo pouco explorado como substrato. Além de suas aplicações mais tradicionais, a protease bruta pode ser particularmente promissora na obtenção de hidrolisados bioativos a partir de subprodutos abundantes e subvalorizados de abatedouros.

**Palavras-chave:** Proteases microbianas; Subprodutos agroindustriais; Fermentação em estado sólido; Biocatálise; Aplicações de enzimas; Hidrolisados antioxidantes.

## ABSTRACT

Microbial proteases are relevant biotechnological tools. Its production using cost-effective media is an important topic, and solid-state cultivation (SSF) represents a simple and economical approach to this end. Thus, SSF parameters were investigated to increase protease production by *Bacillus* sp. CL18, and then potential applications of the crude enzyme were evaluated. Among SSF substrates (5 g), enhanced protease production was achieved using corn silage discards, as compared to five other agro-industrial by-products. Yields were higher at 80% initial moisture, using a salts-based moistening agent, and 1 mL inoculum. Partial replacement of silage discards with soybean meal (80:20%) further augmented protease production, reaching maximal yields at 30 °C. The crude protease exhibited milk-clotting activity, which was optimal at 55 °C. The enzyme preparation was compatible with a laundry detergent (86-96% of residual activity), removing blood stains and enhancing the detergent washing performance. It was also able to remove the gelatin layer from used X-ray and photographic films within 15 min. The crude protease hydrolyzed porcine liver and spleen, and the obtained hydrolysates showed increased radical-scavenging and Fe<sup>2+</sup>-chelating activities. Therefore, a versatile bacterial protease was obtained through SSF using an underexplored waste as substrate. Besides its more traditional applications, the crude protease might be particularly promising in the expanding field of bioactive hydrolysates produced from abundant and undervalued slaughterhouse by-products.

**Keywords:** Microbial proteases; Agro-industrial by-products; Solid-state fermentation; Biocatalysis; Enzyme applications; Antioxidant hydrolysates.

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são biocatalisadores eficientes e específicos empregados em muitos processos e produtos industriais, incluindo seu uso como alternativas à catálise química. Nessa perspectiva, aproximadamente 80% das enzimas industriais derivam de microrganismos, com destaque especial para as hidrolases, como celulases, amilases e proteases (THAPA *et al.*, 2019). Tal predominância está relacionada, por exemplo, às rápidas taxas de crescimento microbiano, altos rendimentos de produção, menor necessidade de espaço e maior estabilidade enzimática, em comparação com enzimas de animais e plantas (SOUZA *et al.*, 2023).

A produção de enzimas microbianas é realizada através de cultivos submersos (SmF) ou em estado sólido (SSF). A primeira técnica, onde o crescimento microbiano ocorre em meio com elevado teor de água livre, é responsável pela produção de 90% das enzimas industriais. Nos SSF, o desenvolvimento dos microrganismos ocorre na (quase) ausência de água livre, com umidade adequada para sustentar suas atividades (SOLANKI *et al.*, 2021). Em comparação com os SmF, os SSF podem ser vantajosos devido às maiores concentrações de produto (enzima), uso de equipamentos mais simples e menor demanda energética (MATKAWALA *et al.*, 2021).

Ademais, os SSF expandem a possibilidade de exploração de subprodutos agroalimentares como substratos para o crescimento microbiano. O uso destas biomassas, além de diminuir as preocupações e problemas ambientais relacionados ao seu descarte inadequado, reduzem os custos de produção de enzimas, beneficiando a sustentabilidade industrial na perspectiva de uma economia circular. Os SSF apresentam particular interesse econômico e estratégico em países que geram grandes quantidades de resíduos agroindustriais (MATKAWALA *et al.*, 2021), como é o caso do Brasil (SIQUEIRA *et al.*, 2022).

As proteases microbianas são biocatalisadores importantes, representando cerca de 40% do mercado global de enzimas. Tais enzimas são utilizadas, por exemplo, em formulações de detergentes para remoção de sujidades proteicas e, na indústria do couro, as proteases são aplicadas em processos de depilação (SOLANKI *et al.*, 2021). Nas indústrias de alimentos, enzimas proteolíticas são empregadas na coagulação do leite, amaciamento de carnes, modulação de propriedades funcionais de proteínas, redução da alergenicidade proteica, produção de hidrolisados proteicos bioativos, entre outros usos (SOUZA *et al.*, 2023). As proteases de origem microbiana

podem ser úteis na degomagem da seda bruta, processamento de lã, recuperação de prata a partir de filmes fotográficos e de raios-X, encontrando também aplicações nas indústrias farmacêutica, biomédica e cosmética (NAVEED *et al.*, 2021).

A partir das várias aplicações de tais enzimas, a notável diversidade microbiana é continuamente prospectada para obter proteases biotecnologicamente importantes e versáteis. As bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente distribuídas, seguras para o trabalho, fáceis de cultivar e notáveis produtoras de enzimas proteolíticas (DANILOVA; SHARIPOVA, 2020). A produção de proteases por *Bacillus* é realizada principalmente através de SmF. Embora os SSF aparentem ser mais adequados ao crescimento de fungos, esta técnica vem sendo investigada para a obtenção de proteases bacterianas, incluindo aquelas produzidas por linhagens de *Bacillus* (BALACHANDRAN *et al.*, 2021; SALIM *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2021).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 através de SSF, explorando biomassas subutilizadas e de baixo custo como substratos. Após investigar diversos parâmetros dos SSF visando aumentar os rendimentos de protease, a protease bruta foi examinada em relação às suas potenciais aplicações.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Microrganismo e preparo do inóculo**

*Bacillus* sp. CL18, isolado de solo (RIEGER *et al.*, 2017), foi utilizado como produtor de protease. A linhagem foi mantida rotineiramente em placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA) a 7 °C. Para a preparação do inóculo, o isolado foi inicialmente semeado em placas de PCA e incubado a 30 °C durante 24 h. Em seguida, a biomassa bacteriana foi coletada assepticamente, adicionada a solução salina estéril (8,5 g/L NaCl) e a absorbância (Abs) das suspensões celulares resultantes foi ajustada para ~1,0 unidade a 600 nm.

### **2.2 Triagem de substratos orgânicos para produção de proteases em SSF**

Os substratos avaliados foram penas de frango, escamas de peixe, uma mistura de subprodutos de peixe (pele, espinhaço e nadadeiras), farelo de soja,

subproduto de cervejaria, e descartes de silagem de milho (planta inteira). Esses substratos foram secos em estufa (60 °C) até massa constante e, depois, processados para obtenção de tamanhos de partícula de ~2-5 mm.

Os substratos (5 g, base seca) foram introduzidos em Erlenmeyers (250 mL) e adicionados de água destilada. Após esterilização em autoclave (121 °C, 30 min) e resfriamento, os frascos foram inoculados com a suspensão bacteriana (1 mL). A umidade inicial foi fixada em 80% (m/m<sub>total</sub>; substrato:líquido = 1:4), considerando os volumes de água destilada e inóculo. Os SSF foram realizados em triplicatas. Após inoculação, os frascos foram incubados a 30 °C, por 4 dias, em condição estática. Subsequentemente, procedeu-se à extração da enzima. O substrato que resultou na maior produção de protease foi selecionado para experimentos subsequentes de SSF.

### **2.3 Extração da protease e atividade proteolítica**

A extração enzimática foi realizada adicionando 50 mL de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) aos frascos dos SSF. Após agitação (150 rpm, 30 min), o conteúdo foi centrifugado (10.000 × g, 30 min) e os sobrenadantes coletados como protease bruta.

A atividade proteolítica foi determinada usando 300 µL de azocaseína (10 g/L, em tampão Tris-HCl, 100 mM, pH 8,0), 190 µL do tampão e 10 µL dos extratos enzimáticos. Após incubação (55 °C, 15 min), as reações foram encerradas com 600 µL de ácido tricloroacético (TCA; 100 g/L). Seguindo-se centrifugação (10.000 × g, 5 min), 800 µL dos sobrenadantes da reação foram misturados a 200 µL de NaOH 1,8 M e a absorbância (Abs) mensurada a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para elevar 0,1 unidade de Abs nas condições de ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como U por g de substrato utilizado nos SSF (U/gds).

### **2.4 Efeito de parâmetros dos SSF na produção de protease**

O substrato orgânico que resultou em maior produção de protease foi utilizado nestes experimentos. Para verificar o efeito do agente umidificante na produção de protease, a água destilada foi substituída por uma solução mineral (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,3 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L), e os cultivos foram realizados por 0- 6 dias.

O melhor agente umidificante foi selecionado para avaliar o efeito da umidade inicial (60, 70 e 80%, m/m<sub>total</sub>) em cultivos realizados por 1-5 dias. A influência dos volumes de inóculo (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mL) foi avaliada no melhor nível de umidade, em SSF realizados por 2-4 dias. Os volumes de inóculo foram considerados no ajuste da umidade inicial.

Posteriormente, o substrato orgânico foi parcialmente substituído (20%, m/m) por diferentes subprodutos (cosubstratos). O cosubstrato que resultou em maior produção de protease foi então adicionado em níveis crescentes (30, 40 e 50%) e os SSF foram realizados por 2-4 dias. Todos os SSF acima elencados foram realizados a 30 °C. A melhor combinação de substrato e cosubstrato foi então mantida para avaliar os efeitos das temperaturas de cultivo (30, 35 e 40 °C) na produção de protease durante os SSF realizados durante 2-4 dias.

Nos períodos pré-definidos, frascos foram sacrificados em triplicata para extração e determinação da atividade proteolítica, conforme seção anterior.

## **2.5 Aplicações da protease bruta**

A produção da enzima ocorreu em condições ótimas (relação substrato:cosubstrato, agente umidificante, nível de umidade, volume de inóculo, temperatura e tempo de incubação). A protease bruta foi extraída dos SSF e então avaliada para algumas aplicações.

### **2.5.1 Atividade de coagulação de leite (MCA)**

Tubos de ensaio contendo 5 mL de leite desnatado reconstituído (10 g de leite desnatado em pó/100 mL, adicionado de 10 mM CaCl<sub>2</sub>) foram pré-incubados em diferentes temperaturas (40, 45, 50 e 55 °C) por 10 min. Em seguida, 0,5 mL de protease diluída (2,5 vezes) foi adicionado, homogeneizado, e o tempo desde a adição da protease até o primeiro aparecimento de coágulos foi registrado. A MCA (U) foi calculada como:  $U = (2400 \times 5 \times D) / (T \times 0,5)$ , onde D é a diluição da enzima bruta e T é o tempo de coagulação (s) (MAMO *et al.*, 2020). A protease inativada termicamente (100 °C, 10 min) foi usada nos controles.

### 2.5.2 Compatibilidade com detergentes comerciais e desempenho de lavagem

A compatibilidade da protease bruta foi investigada com cinco detergentes comerciais para lavagem de roupas: Omo® (Unilever Brasil Ltda., Brasil), Tixan Ypê® (Química Amparo Ltda., Brasil), Brilhante® (Unilever Brasil Ltda., Brasil), Surf® (Unilever Brasil Ltda., Brasil) e Girando Sol Optical Wash® (Girando Sol Ltda., Brasil). Cada detergente foi diluído em água da torneira e aquecido (65 °C, 1 h) para inativar potenciais enzimas constituintes. Após resfriamento, os detergentes ou água da torneira (800 µL) foram adicionados da protease bruta (200 µL). A concentração final dos detergentes foi ajustada para 10 g/L. Estas misturas, com ou sem 5 mM Ca<sup>2+</sup>, foram incubadas a 25 °C por 60 min, ou a 40 °C por 30 min e 60 min. Os controles foram preparados incubando a protease bruta em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0). A atividade proteolítica residual (%) foi mensurada por meio do ensaio padrão de azocaseína, usando os controles como referência (100%).

Para os testes de lavagem, foram utilizados a enzima bruta e o detergente no qual a protease apresentou maior estabilidade. Inicialmente, pedaços de pano de algodão (~23 cm<sup>2</sup>) foram adicionados de 1 mL de sangue bovino (gentilmente cedido por abatedouro local) e depois submetidos a secagem (40 °C, 6 h). Posteriormente, os panos foram imersos em 25 mL das seguintes soluções: (a) água da torneira; (b) detergente aquecido (8 g/L), em água da torneira; (c) protease bruta inativada termicamente, diluída com água da torneira (1:4); (d) protease bruta, diluída com água da torneira (1:4); (e) protease bruta, diluída (1:4) em detergente (8 g/L, concentração final); ou (f) protease bruta, diluída com água da torneira (1:2,5). Os experimentos foram realizados a 40 °C, durante 30 min, com agitação recíproca. Em seguida, os panos foram enxaguados com água da torneira (2 min), submetidos à secagem (40 °C) e então inspecionados visualmente quanto à remoção das manchas de sangue.

### 2.5.3 Hidrólise de gelatina em filmes fotográficos e de raios-X

Filmes usados foram lavados com água destilada, limpos com algodão impregnado com etanol, e submetidos à secagem a 40 °C por 30 min. Posteriormente, dois pedaços de filme (~2 cm<sup>2</sup>) foram imersos em 10 mL da protease bruta e incubados a 52,5 °C sob agitação contínua. Os pedaços de filme foram inspecionados visualmente (KOTB *et al.*, 2023) durante 15 min para verificar a degradação da

camada de gelatina. Controles foram realizados substituindo a enzima bruta por tampão Tris-HCl ou pela protease bruta inativada termicamente (100 °C, 10 min).

#### 2.5.4 Produção de hidrolisados antioxidantes a partir de baço e fígado suíno

Fígado e baço suínos foram moídos separadamente em água destilada (1:1) e aquecidos (90 °C, 20 min) para inativar enzimas endógenas. O material foi resfriado e então congelado para facilitar a remoção de gordura. Os subprodutos foram descongelados em temperatura ambiente e utilizados para a hidrólise enzimática.

Os subprodutos moídos (2,5 g) foram adicionados de 21 mL de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0, 5 mM Ca<sup>2+</sup>) e esta mistura foi incubada a 52,5 °C por 20 min. A protease bruta foi adicionada (1,5 mL, 1.350 U/mL) e as reações realizadas a 52,5 °C, com agitação recíproca. Frascos de hidrólise foram retirados, em triplicatas, após 0 e 4 h de incubação. O conteúdo dos frascos foi fervido (20 min) para encerrar as reações. Após resfriamento e centrifugação (10.000 × g, 30 min), os sobrenadantes coletados foram denominados de hidrolisados. Os controles foram realizados da mesma maneira, utilizando a protease inativa (100 °C, 10 min).

A concentração de proteínas solúveis nos hidrolisados/controles foi mensurada, em triplicata, pelo método Folin-fenol (LOWRY *et al.*, 1951). Inicialmente preparou-se as soluções "A" (carbonato de sódio, 20 g/L; tartarato de sódio e potássio, 0,2 g/L; e NaOH 2 M, 50 mL/L) e "B" (sulfato de cobre, 5 g/L), para então obter a solução "C" (50 mL de "A" e 1 mL de "B"). Para os ensaios, usou-se 2,5 mL da solução "C" e 100 µL dos hidrolisados/ou controles. Após incubação (15 min, no escuro), foram adicionados 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1 N) e, seguindo-se nova incubação (30 min), a Abs foi determinada a 750 nm. Brancos foram realizados usando água destilada (100 µL) no lugar das amostras. Curva padrão de albumina sérica bovina (1 mg/mL) foi preparada para interpretação dos resultados de Abs.

Em relação à atividade antioxidante, os hidrolisados/controles foram inicialmente submetidos a ensaios *in vitro* de captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). O radical foi preparado por meio da reação de 5 mL de solução de ABTS (7 mM) com 88 µL de solução de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (140 mM). Esta solução permaneceu no escuro, em temperatura ambiente, por 12-16 h antes do uso. Subsequentemente, diluiu-se a solução do radical ativado em tampão fosfato salino (5 mM; pH 7,4) até atingir Abs de 0,70 ± 0,02 a 734 nm. Amostras dos

hidrolisados/controles (10 µL) foram adicionadas a 1 mL da solução do radical ativado e a Abs a 734 nm foi mensurada após 10 min (RE *et al.*, 1999). Nos brancos, utilizou-se água destilada no lugar das amostras. Os resultados foram expressos como:

$$\text{Captura do radical (\%)} = [(Abs_{\text{branco}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{branco}}] \times 100.$$

A atividade antioxidante também foi avaliada através da capacidade de quelação de Fe<sup>2+</sup>. Os hidrolisados/controles (100 µL) foram adicionados de 3,7 mL de água destilada e 100 µL de FeSO<sub>4</sub> (2 mM). Após 5 min, adicionou-se 200 µL de ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina; 5 mM). A Abs foi mensurada a 562 nm após 10 min (CHANG *et al.*, 2007). Brancos foram preparados com água destilada no lugar das amostras. Os resultados foram expressos como:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = [(Abs_{\text{branco}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{branco}}] \times 100.$$

## 2.6 Análise estatística

Os resultados das replicatas são apresentados como média ± desvio padrão. Após análise de variância, comparações entre médias foram realizadas pelo teste de Tukey e consideradas distintas se  $p < 0,05$ .

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Produção de proteases via SSF usando subprodutos agroindustriais

*Bacillus* sp. CL18 produziu diferentes níveis de protease após 4 dias de SSF com distintos subprodutos agroindustriais (Fig. 1).

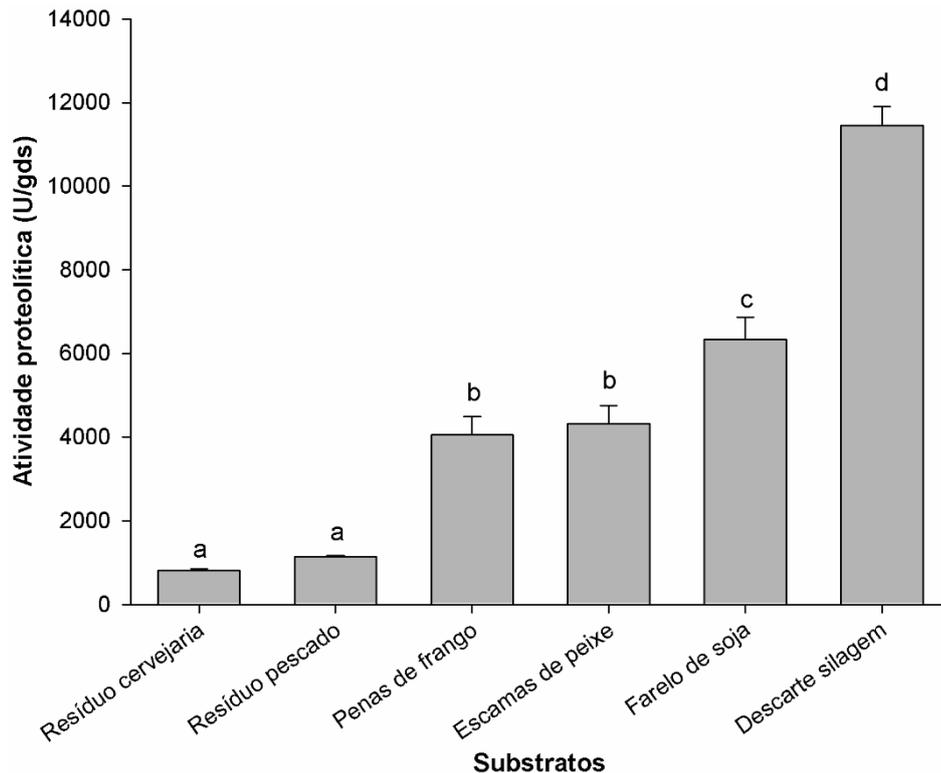


Figura 1 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 após 4 dias de SSF usando diferentes subprodutos como substratos. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Os menores rendimentos enzimáticos foram obtidos usando resíduos de cervejaria (812 U/gds) e resíduos de pescado (1.141 U/gds) (Fig. 1). Em estudo prévio, o uso de resíduos de cervejaria resultou em produção de protease por *Bacillus velezensis* K8 (ZENG *et al.*, 2021). No entanto, nove espécies de fungos produziram lacase e lignina peroxidase, mas não enzimas proteolíticas e celulolíticas durante SSF com este substrato (KHIDZIR *et al.*, 2010).

A aplicação de resíduos de pescado como substratos para SSF também vem sendo explorada. Particularmente, Lazim *et al.* (2009) reportaram a produção de proteases por *Streptomyces* sp. CN902 utilizando peixes secos picados, enquanto Esakkiraj *et al.* (2013) indicaram o uso de farinhas de subprodutos de peixes para a produção de proteases por *Bacillus thuringiensis* AP-CMST.

Comparativamente, maior produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 ocorreu usando penas de frango (4.051 U/gds) e escamas de peixe (4.319 U/gds) como substratos (Fig. 1). Penas de frango, que correspondem a cerca de 10% do peso destas aves, são subprodutos ricos em proteínas recalcitrantes (queratinas),

ocasionando dificuldades para seu manejo. Assim, seu uso em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos úteis torna-se atrativo. Linhagens de *Bacillus* estão entre os microrganismos queratinolíticos mais eficientes, e o uso de penas para produção de proteases em SSF foi demonstrado, por exemplo, para *Bacillus cereus* IIPK35 (JANA *et al.*, 2022) e *Bacillus tequilensis* hsTKB2 (PAUL *et al.*, 2014a).

Em relação às escamas, que representam cerca de 5% dos descartes do processamento de peixes, seu uso em bioprocessos para a produção de enzimas microbianas é pouco reportado. Neste sentido, Gaonkar; Furtado (2021) demonstraram a produção de proteases por *Haloferox lucentensis* GUBF-2 MG076078 através de SmF com este substrato, enquanto que Rebecca *et al.* (2012) indicaram o uso de escamas de peixe como substratos em potencial para a produção de proteases por *Aspergillus niger* através de SSF.

O uso de farelo de soja resultou em produção de protease de 6.342 U/gds (Fig. 1). Este substrato é amplamente explorado para a obtenção de proteases microbianas. Similarmente ao presente estudo, a produção de enzimas proteolíticas durante SSF utilizando farelo de soja como substrato abundante e de reduzido custo, foi relatada, por exemplo, para *Bacillus* sp. TMF-1 (SALIM *et al.*, 2017), *Bacillus siamensis* YC-9 (WANG *et al.*, 2021) e *Bacillus subtilis* K-1 (SINGH; BAJAJ, 2016).

Dentre os substratos avaliados, a maior produção de proteases foi observada com descarte de silagem. Após 4 dias de SSF, o rendimento enzimático atingiu 11.449 U/gds (Fig. 1). A silagem deteriorada, resultante da biodegradação aeróbia durante o armazenamento e desabastecimento dos silos, pode representar 1-7% da silagem total, sendo geralmente descartada (AMARAL *et al.*, 2014; BORREANI; TABACCO, 2014). Além dos inconvenientes econômicos relacionados às perdas de silagem, o descarte do material deteriorado também envolve mão de obra e os custos relacionados (BORREANI; TABACCO, 2014).

Além da utilização da silagem como forragem para vacas leiteiras e bovinos de corte, ela tem sido aplicada para geração de biogás em regiões temperadas. Entretanto, a produção de enzimas microbianas usando silagem como substrato é pouco explorada. Em estudos prévios, três linhagens de *Trichoderma* produziram glucanases, celulasas e xilanases durante SmF usando silagem de milho como substrato (IANNACCONE *et al.*, 2022). A silagem de milho também foi utilizada em SSF para a produção de lignocelulasas por *Trichoderma harzianum* (BAKRI, 2022) e *Pleurotus ostreatus* (GANASH *et al.*, 2021). Entretanto, não há relatos na literatura

científica acerca de bioprocessos microbianos onde silagem descartada tenha sido utilizada a obtenção de enzimas microbianas.

### 3.2 Influência de parâmetros dos SSF na produção de proteases

O descarte de silagem foi selecionado e então avaliou-se o efeito do agente umidificante na produção de protease. A substituição da água destilada por uma solução mineral aumentou os rendimentos de protease ( $p < 0,05$ ) nos dias 2-6. A produção máxima foi observada no 4º dia (17.030 U/gds), ou seja, cerca de 50% superior àquela obtida com água destilada (Fig. 2). Outras investigações encontraram resultados análogos, indicando que os sais da solução mineral podem ter atuado como nutrientes, favorecendo assim o crescimento microbiano e a produção de enzimas (JANA *et al.*, 2022; QURESHI *et al.*, 2016;).

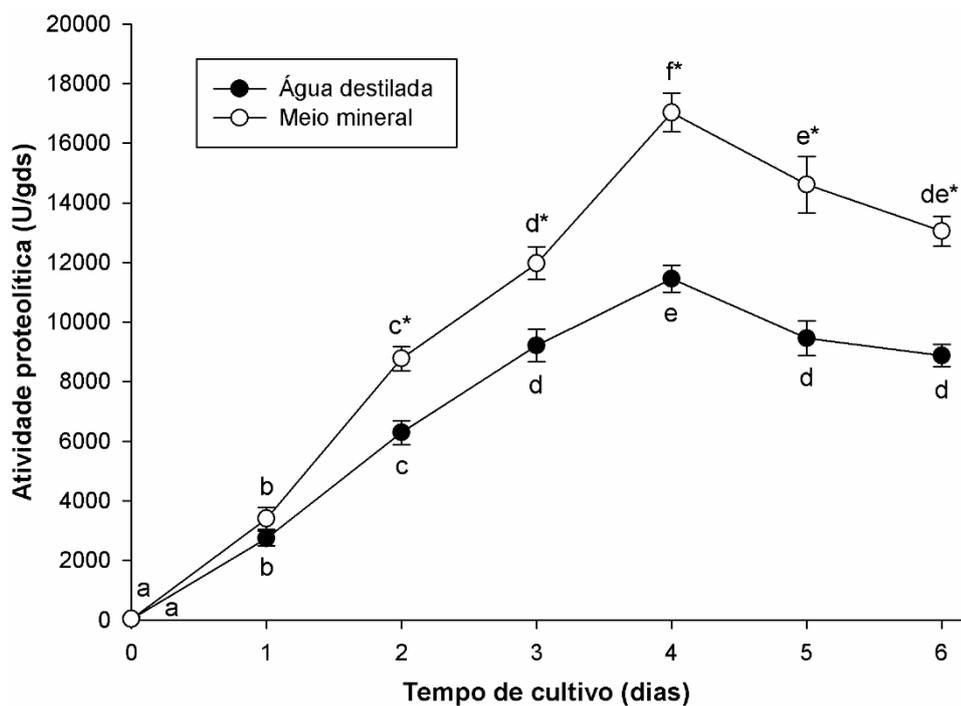


Figura 2 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 durante SSF usando descarte de silagem como substrato e diferentes agentes umidificantes. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada um dos agentes umidificantes; os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre agentes umidificantes para o mesmo tempo de cultivo.

Posteriormente, foram avaliados três níveis de umidade utilizando a solução mineral como agente umidificante. O maior teor de umidade testado foi de 80%, uma vez que água livre tornou-se visível em níveis mais elevados. As umidades mais baixas (60 e 70%) diminuíram a produção de protease em 75-85% ( $p < 0,05$ ) em comparação com aquela detectada com 80% de umidade (Fig. 3). Os efeitos negativos nos menores teores de umidade podem ser atribuídos à menor disponibilidade de água para o crescimento microbiano e limitações na solubilidade e acessibilidade de nutrientes (RAJKUMAR *et al.*, 2011; SALIM *et al.*, 2017).

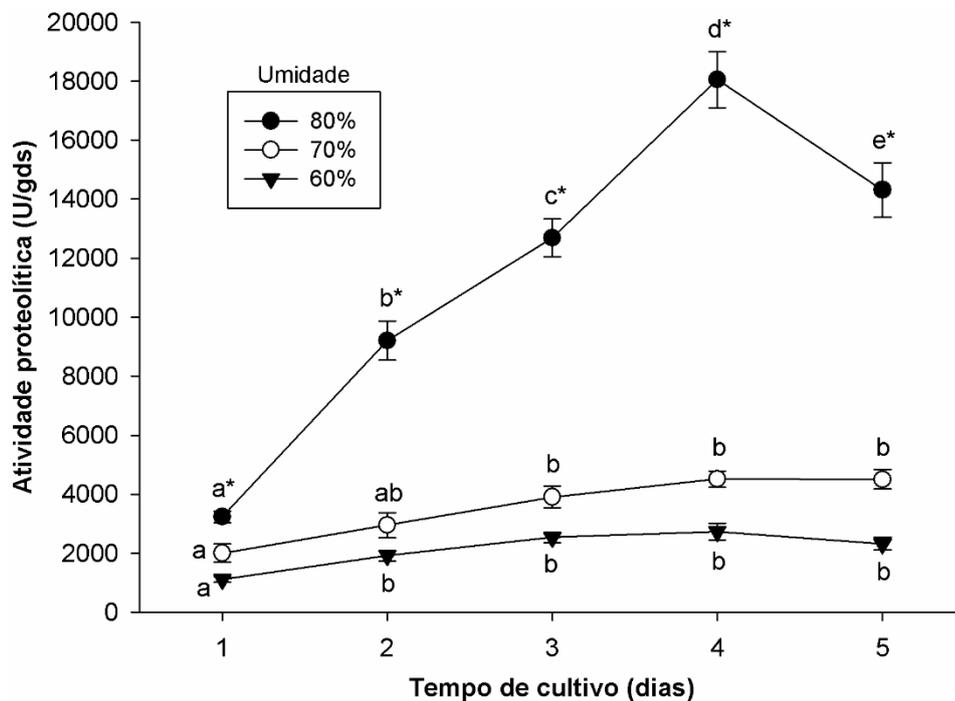


Figura 3 - Produção de protease durante SSF em diferentes níveis de umidade, usando descarte de silagem como substrato e solução mineral como agente umidificante. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada um dos níveis de umidade; os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre níveis de umidade para o mesmo tempo de cultivo.

De maneira similar, Madhuri *et al.* (2022) relataram que 80% de umidade rendeu máxima produção de proteases durante SSF com *Bacillus altitudinis* GVC11 em cascas de mamona. A produção ótima de queratinases por *Paenibacillus woosongensis* TKB2 em SSF, usando penas de frango como substrato, foi alcançada com 83% de umidade (PAUL *et al.*, 2014b), e 85% de umidade resultou em maior produção de protease por *Bacillus thuringiensis* AP-CMST em SSF usando farinha de

subprodutos de peixe (ESAKKIRAJ *et al.*, 2013). No entanto, 50% foi considerado o nível ideal de umidade para a produção de proteases por algumas linhagens de *Bacillus* (MUKHERJEE *et al.*, 2008; PAUL *et al.*, 2014a).

O efeito de volumes de inóculo na produção de protease foi avaliado subsequentemente. O uso de 1,0 e 1,5 mL de inóculo resultou em produção semelhante de proteases ( $p > 0,05$ ). No entanto, foi observada diminuição na produção de enzimas ( $p < 0,05$ ) com o menor volume (0,5 mL) e, especialmente, o maior volume de inóculo (2,0 mL) (Fig. 4).

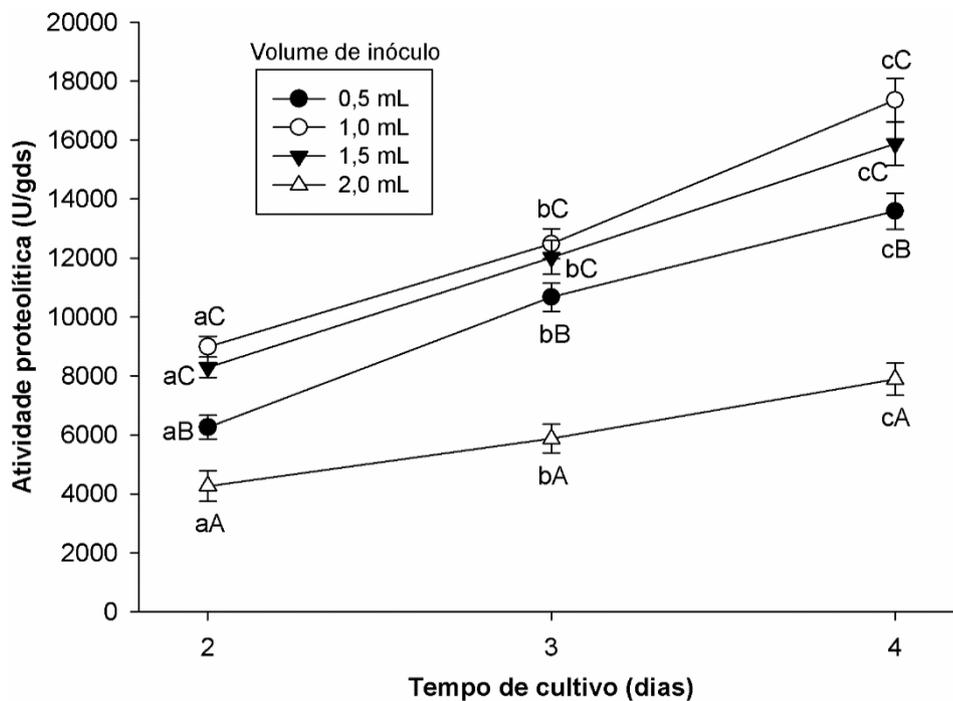


Figura 4 - Efeito do volume de inóculo sobre a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 usando descarte de silagem como substrato, solução mineral (agente umidificante) e umidade de 80%. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada volume de inóculo; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre volume de inóculo para o mesmo tempo de cultivo.

Tais fenômenos também foram relatados anteriormente (RAJKUMAR *et al.*, 2011; PAUL *et al.*, 2014b). De um lado, a produção de protease pode ser retardada com inóculos menores, até que uma população microbiana mais elevada seja alcançada, aumentando assim o tempo de cultivo para obter maiores rendimentos enzimáticos. Por outro lado, grandes cargas de inóculo podem reduzir a produção de

enzimas devido ao rápido esgotamento de nutrientes nos meios de cultivo (CHATTERJEE *et al.*, 2015; SINGH; BAJAJ, 2016; TULY *et al.*, 2022).

Em seguida, avaliou-se a substituição parcial (20%, m/m) do descarte de silagem por outros subprodutos agroindustriais. A substituição por escamas de peixe reduziu a produção de enzimas no dia 4 ( $p < 0,05$ ), enquanto que a substituição por penas não afetou o rendimento de protease nos dias 2-4 ( $p > 0,05$ ), quando comparados aos SSF realizados com descarte de silagem. A substituição do substrato principal por farelo de soja (20%, m/m) aumentou a produção de protease, atingindo 19.590 U/gds no 4º dia de cultivo (Fig. 5), ou seja, um incremento de 12% em relação aos SSF onde o descarte de silagem foi utilizado como único substrato ( $p < 0,05$ ).

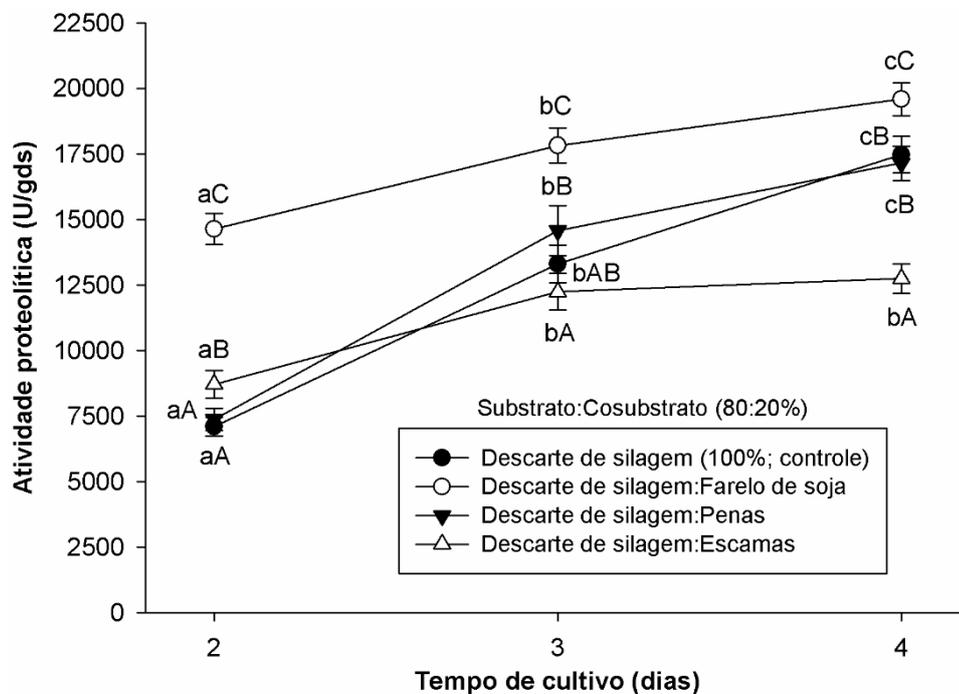


Figura 5 - Efeito da substituição parcial do descarte de silagem por cosubstratos (subprodutos agroindustriais) sobre a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada substrato/mistura; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre substratos/misturas para o mesmo tempo de cultivo.

Considerando o farelo de soja como mais vantajoso à obtenção de proteases, adicionou-se concentrações crescentes deste cosubstrato ao descarte de silagem. No entanto, observou-se diminuição da produção de proteases após 4 dias de cultivo com o incremento das proporções de farelo de soja (Fig. 6).

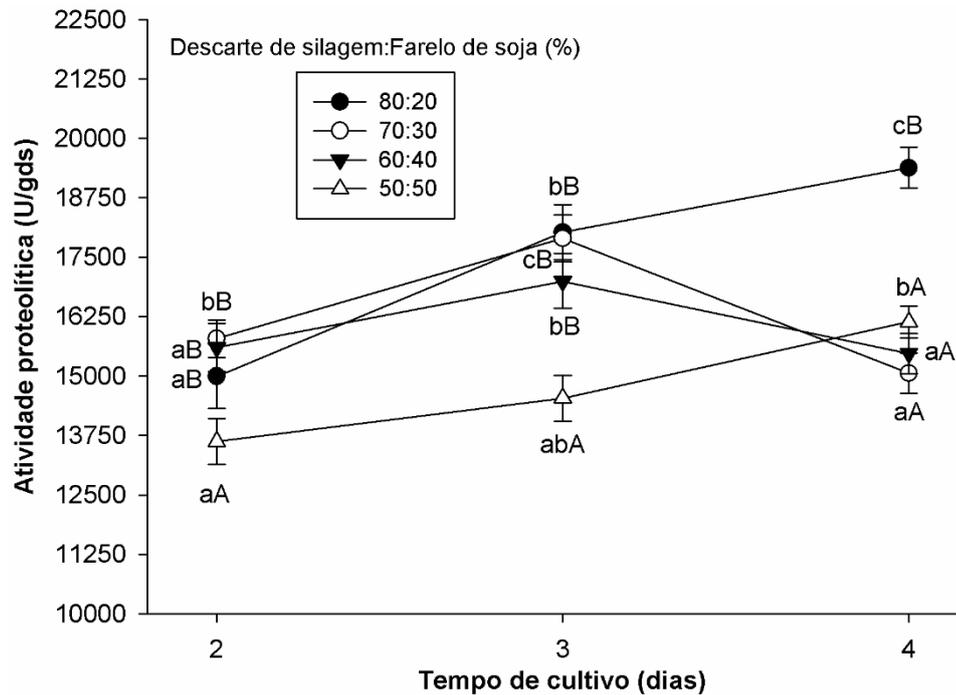


Figura 6 - Efeito da substituição de descartes de silagem por concentrações crescentes de farelo de soja sobre a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 durante SSF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada mistura de substratos; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre misturas de substratos para o mesmo tempo de cultivo.

Diversos estudos também demonstraram efeitos positivos de misturas de subprodutos na produção de proteases bacterianas (LAZIM *et al.*, 2009; SHATA; FARID, 2013) e fúngicas (ALJAMMAS *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2022). Especificamente, Tuly *et al.* (2022) detectaram maior produção de queratinase por *Bacillus licheniformis* PWD-1 em SSF com uma mistura de farinha de penas e okara (subproduto do processamento do extrato hidrossolúvel da soja), em comparação com os substratos separadamente. A produção de protease por *Bacillus amyloliquefaciens* BS-20 usando farelo de trigo foi menor quando comparada com uma mistura de farelo de trigo (60%), farelo de milho (20%) e farelo de soja (20%) (SU *et al.*, 2019). *Bacillus subtilis* DM-04 produziu níveis mais elevados de protease durante SSF com a gramínea *Imperata cylindrica* e casca de batata na proporção de 50:50%, seguida por 80:20%, 90:10% e finalmente os substratos individuais (MUKHERJEE *et al.*, 2008).

Deste modo, os cosubstratos podem incrementar a produção de proteases atuando no fornecimento de nutrientes, superando assim as possíveis limitações nutricionais relacionadas com cultivos do tipo monosubstrato (POURYAFAR *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2023). Embora algumas investigações avaliem fontes de carbono (como glicose e maltose) e fontes orgânicas de nitrogênio (como peptonas e extrato de levedura) relativamente onerosas para a obtenção de maiores rendimentos de proteases, apenas subprodutos agroindustriais foram avaliados no presente estudo visando não elevar os custos de produção da enzima (RAO *et al.*, 2017).

Em relação às temperaturas dos SSF, produção similar de proteases ( $p > 0,05$ ) foi observada a 30 e 35 °C em cultivos de 2-3 dias; entretanto, nesse período, os rendimentos a 30 °C foram superiores àqueles detectados a 40 °C ( $p < 0,05$ ). A maior produção de protease ( $p < 0,05$ ) foi mensurada a 30 °C, aos 4 dias de cultivo (Fig. 7).

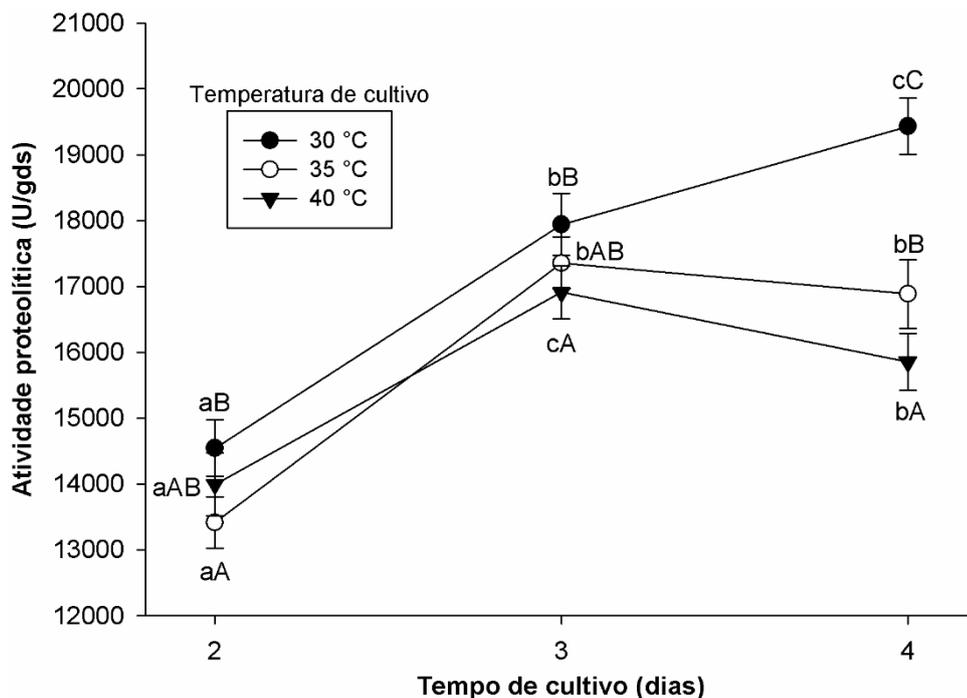


Figura 7 - Efeito da temperatura de incubação sobre a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 durante SSF. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre tempos de cultivo para cada temperatura; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre temperaturas para o mesmo tempo de cultivo.

*Bacillus* sp. CL18 é mesofílico (RIEGER *et al.*, 2017). De modo similar, SSF realizados a 30 °C também resultaram em máxima produção de enzimas proteolíticas

por *Bacillus* mesofílicos, como *Bacillus halodurans* (BALACHANDRAN *et al.*, 2021), *Bacillus cereus* IIPK35 (JANA *et al.*, 2022) e *Bacillus* sp. TMF-1 (SALIM *et al.*, 2017). A temperatura de cultivo, além da influência direta sobre o metabolismo e crescimento microbianos (ESAKKIRAJ *et al.*, 2013; LAZIM *et al.*, 2009; SINGH; BAJAJ, 2016), assume particular importância nos SSF devido aos efeitos sobre a umidade do substrato durante as incubações (ALJAMMAS *et al.*, 2022; JANA *et al.*, 2022).

### 3.3 Aplicações da protease bruta

#### 3.3.1 Atividade de coagulação de leite (MCA)

A protease extraída dos SSF foi inicialmente avaliada quanto à sua MCA. A enzima foi capaz de coagular leite desnatado reconstituído a 40-55 °C, com maior MCA a 55 °C (174,9 U; Fig. 8). Não foi observada coagulação com o extrato enzimático fervido (Fig. 8, *detalhe*).

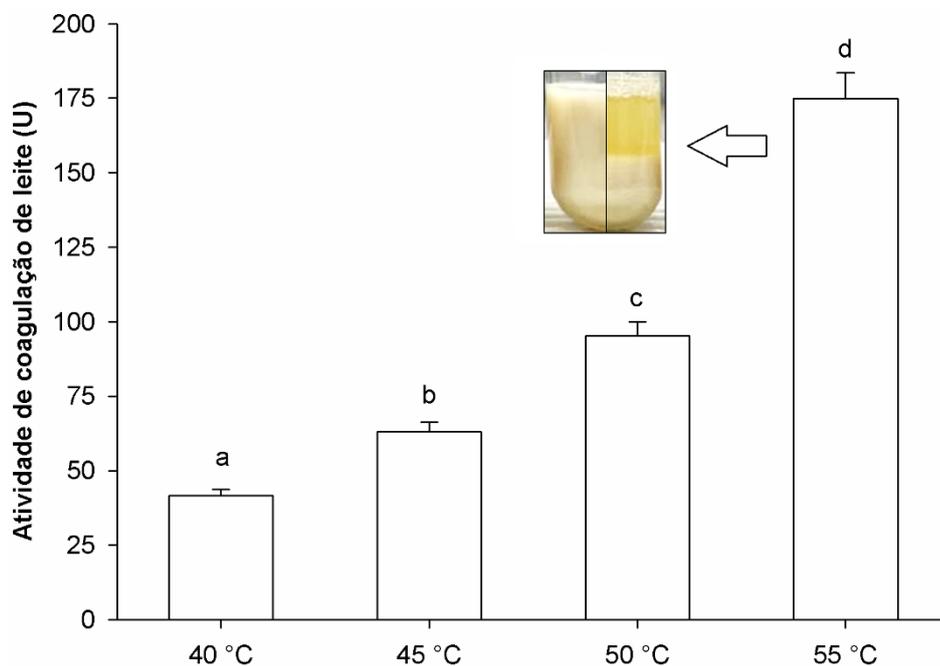


Figura 8 - Atividade de coagulação de leite (MCA) da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 em diferentes temperaturas. Letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Detalhe: leite desnatado reconstituído tratado com a protease ativa (direita) e a protease inativada termicamente (esquerda).

Um extrato enzimático bruto de *Pleurotus albidus* apresentou MCA máxima (222 U) a 55 °C (MARTIM *et al.*, 2021), e uma queratinase de *Bacillus cereus* IIPK35 também exibiu MCA mais elevada (107,6 U) nesta temperatura (JANA *et al.*, 2022). A MCA das enzimas produzidas por seis linhagens de *Aspergillus flavofurcatus* variou de 48,5 a 116,2 U a 50 °C (ALECRIM *et al.*, 2015).

As MCA ótimas de proteases de *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* MK775302 foram observadas a 60 e 70 °C, respectivamente (AHMED *et al.*, 2016; WEHAIDY *et al.*, 2020). Uma protease de *Bacillus licheniformis* 5A5 exibiu MCA máximo (98,3 U) a 75 °C (AHMED; HELMY, 2012). A 35 °C, a MCA de uma protease de *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 foi de 142 U (GULERIA *et al.* 2016), e aquela da protease de *Bacillus subtilis* SMDFS 2B foi de 522 U (MAMO *et al.*, 2020). Assim, a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 apresentou valores de MCA análogos a outras proteases microbianas não-comerciais postuladas como coagulantes para uso na tecnologia de laticínios.

### 3.3.2 Compatibilidade com detergentes comerciais e desempenho de lavagem

O uso de proteases microbianas como aditivos em detergentes foi uma de suas aplicações industriais pioneiras. Assim, avaliou-se a compatibilidade da protease bruta com cinco detergentes para lavagem de roupas (10 g/L, em água da torneira). As pré-incubações realizadas a 25 e 40 °C não afetaram a estabilidade da enzima nos controles (tampão; não mostrado), e a enzima manteve atividade total em água da torneira (Fig. 9a).

Em relação aos detergentes, as atividades residuais variaram de 69,8% (OMO®) a 96,4% (Girando Sol®) após 60 min a 25 °C. A 40 °C, as maiores e menores atividades residuais após 30 min foram de 92,3% (Girando Sol®) e 42,4% (OMO®); após 60 min, a protease bruta reteve 85,9% da atividade inicial com Girando Sol® enquanto apenas 36,9% foram detectadas com OMO® (Fig. 9a). Em ambas as temperaturas (25 e 40 °C), a presença de Ca<sup>2+</sup> (5 mM) não exerceu influência ( $p > 0,05$ ) nas atividades residuais (Fig. 9a), indicando que este íon não é particularmente importante para prevenir o efeito negativo dos constituintes químicos dos detergentes sobre a atividade enzimática, embora seja relevante na proteção à desnaturação térmica da protease (RIEGER *et al.*, 2017).

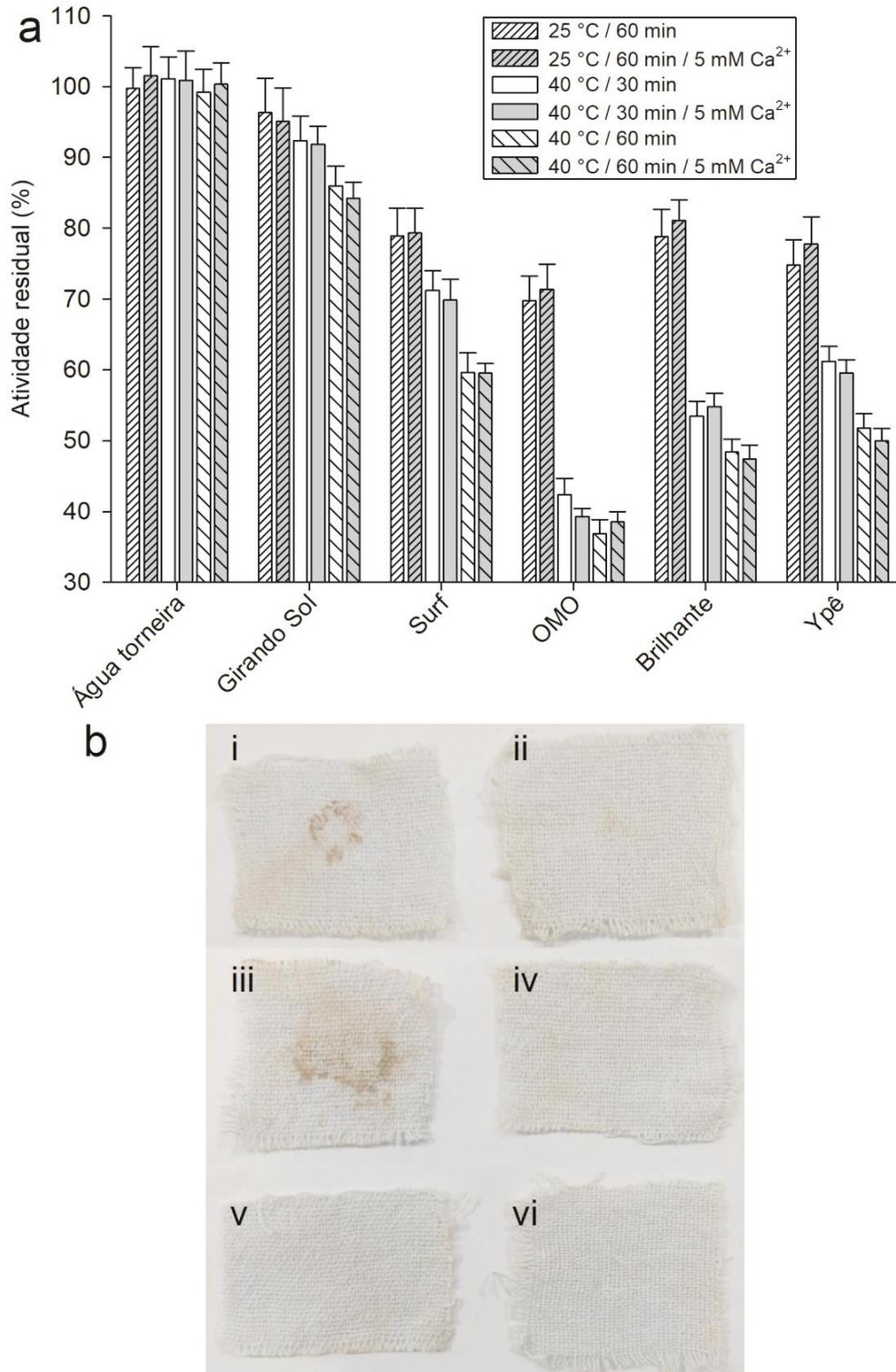


Figura 9 - **(a)** Atividade residual da protease frente a detergentes após incubação em temperaturas e tempos distintos, com ou sem Ca<sup>2+</sup>. **(b)** Lavagem de manchas de sangue em tecido de algodão com (i) água da torneira, (ii) detergente tratado termicamente, (iii) protease bruta inativa (1:4 em água da torneira), (iv) protease bruta (1:4 em água da torneira), (v) protease bruta (1:4 em detergente tratado termicamente), e (vi) protease bruta (1:2,5 em água da torneira).

Para uma certa protease microbiana, a estabilidade enzimática geralmente varia dependendo dos detergentes testados, devido às suas composições químicas distintas (BHAVIKATTI *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2001; KOTB *et al.*, 2023). Particularmente, uma protease de *Pyxidicoccus* sp. S252 apresentou 62-95% de atividade residual após incubação com quatro detergentes (7 g/L) durante 1 h a 40 °C (SHARMA *et al.*, 2021), e uma protease de *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 perdeu 8-31% de sua atividade após incubação (30 min a 35 °C) com cinco detergentes comerciais (10 g/L) (ZAMBARE *et al.*, 2014).

Bhunja; Dey (2012) observaram que uma protease de *Bacillus licheniformis* NCIM 2042 manteve 31,9 a 91% da atividade original após 1 h a 40 °C com quatro detergentes (7 g/L), e que a enzima poderia ser usada como aditivo em detergentes se a atividade residual fosse  $\geq 64\%$ . Venugopal; Saramma (2006) relataram a estabilidade adequada de uma protease de *Vibrio fluvialis* VM10, uma vez que a enzima manteve 53-64% e 42-61% da atividade original após incubações durante 15 min e 1 h, respectivamente, com seis detergentes (7 g/L). No entanto, uma protease de *Penicillium chrysogenum* X5 manteve atividade plena após incubação (40 °C, 1 h) com sete detergentes (7 g/L) (BENMRAD *et al.*, 2018).

A partir da estabilidade da protease (Fig. 9a), foram realizados testes de lavagem com Girando Sol®. A água da torneira e a enzima inativa não resultaram na remoção completa das manchas de sangue [Fig. 9b (i, iii)], e menos sinais de sujidades restaram nos tecidos lavados com detergente aquecido [8 g/L; Fig. 9b (ii)]. A protease bruta, diluída 1:2,5 em água da torneira [Fig. 9b (vi)], foi mais eficaz do que em maior diluição (1:4 em água da torneira) [Fig. 9b (iv)]. No entanto, a combinação da protease bruta com o detergente aquecido (1:4) produziu melhores resultados em comparação com as suas aplicações individuais [Fig. 9b (v)]. Logo, a hidrólise de materiais proteicos do sangue pela protease pode atuar melhorando o desempenho do detergente (BENMRAD *et al.*, 2018; KOTB *et al.*, 2023; SHARMA *et al.*, 2021).

### 3.3.3 Hidrólise de gelatina de filmes de raios-X e fotográficos

A hidrólise enzimática da gelatina é uma estratégia interessante para liberar as partículas de prata misturadas à gelatina na camada de emulsão dos filmes fotográficos e de raios-X. Nesta avaliação, a protease bruta foi capaz de remover

completamente a camada de gelatina/prata em 15 min a 50 °C, restando limpo o material de base dos filmes (Fig. 10).

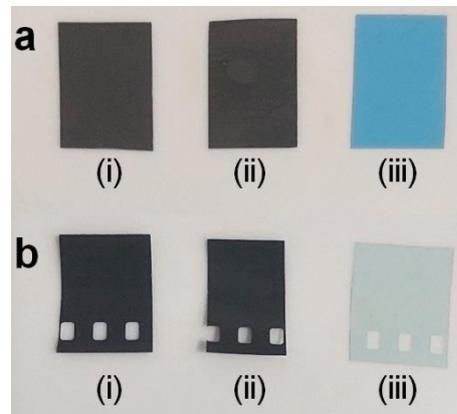


Figura 10 - Aplicação da protease bruta na degradação de gelatina para recuperação de prata a partir de filmes de raios-X (a) e de filmes fotográficos (b). Em ambos os painéis (a e b), os filmes foram tratados a 50 °C por 15 min com (i) tampão Tris-HCl, (ii) enzima inativada termicamente, e (iii) a protease bruta ativa.

Kotb *et al.* (2023) detectaram a remoção parcial da camada de gelatina de filmes de raios-X tratados com uma protease purificada de *Bacillus* sp. Mar64 (3 h a 55 °C, pH 11,0). A decomposição completa da camada de gelatina dos filmes de raios-X por uma protease parcialmente purificada de *Aspergillus niger* WA 2017 ocorreu após 1 h (60 °C, pH 10,0) (WAHAB; AHMED, 2018). Asgher *et al.* (2018) relataram que uma protease de *Aspergillus flavus* removeu a camada de gelatina de filmes de raios-X em 50 min (37 °C, pH 8,0).

Uma protease bruta de *Pyxidicoccus* sp. S252 foi capaz de digerir a camada de gelatina de filmes de raios-X em 25 min (40 °C, pH 8,0 e 12,0) (SHARMA *et al.*, 2021). Um período de 10 min foi suficiente para uma protease de *Chryseobacterium cucumeris* SARJS-2 degradar a camada de gelatina dos filmes de raios-X (BHAVIKATTI *et al.*, 2020), e 8 minutos foram relatados para uma protease bruta de *Bacillus* sp. EMB9 (SINHA *et al.*, 2014); no entanto, foram necessárias 24 h para que proteases de *Bacillus subtilis* AKAL7 (HAKIM *et al.*, 2018) e *Brevundimonas vesicularis* MF276770 (SAMEENA *et al.*, 2019) realizassem tal processo.

A degelatinização de filmes fotográficos também foi relatada. Uma protease de *Bacillus lehensis*, expressa em *Escherichia coli*, removeu a camada de gelatina em 1 h (a 40 °C, pH 12,8) (JOSHI; SATYANARAYANA, 2013). Assim, a protease de *Bacillus*

sp. CL18 pode ser um biocatalisador interessante para a recuperação de prata de filmes usados. Tais métodos enzimáticos são reconhecidos como processos ambientalmente adequados e econômicos, quando comparados aos processos físicos e químicos atualmente empregados na recuperação de prata (BHAVIKATTI *et al.*, 2020; WAHAB; AHMED, 2018).

#### 3.3.4 Produção de hidrolisados antioxidantes a partir de subprodutos de origem animal

A protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 foi aplicada com o objetivo de produzir hidrolisados antioxidantes a partir de fígado e baço suínos. Esta preparação enzimática foi capaz de hidrolisar ambos os substratos, conforme detectado pelo aumento do teor de proteína solúvel após 4 h de incubação (Fig. 11a). Assim, peptídeos com tamanhos reduzidos foram liberados dos constituintes proteicos do fígado e baço durante a digestão enzimática (TEDESCHI *et al.*, 2021).

A atividade antioxidante dos hidrolisados obtidos foi avaliada *in vitro* através dos ensaios de eliminação de radicais ABTS (Fig. 11b) e quelação de  $Fe^{2+}$  (Fig. 11c). Nos controles, realizados com o extrato proteolítico inativado termicamente, as atividades antioxidantes após 4 h foram semelhantes às aquelas determinadas em 0 h. Por outro lado, a eliminação de radicais ABTS pelo fígado não hidrolisado (0 h) (25,8%) e baço (26,7%) foi elevada para 72,1% e 78,3%, respectivamente, após 4 h de incubação com a protease ativa (Fig. 11b). Os incrementos nas capacidades de eliminação de radicais indicam que a hidrólise liberou peptídeos com maior capacidade de transferência de elétrons (ZHU *et al.*, 2022).

A capacidade de quelar  $Fe^{2+}$  foi incrementada para 72,5% e 64,8% nos hidrolisados de fígado e baço (4 h), respectivamente, em comparação com fígado não hidrolisado (0 h; 59,3%) e baço não hidrolisado (0 h; 48,9%) (Fig. 11c). Tal capacidade é uma indicação indireta da atividade antioxidante. Como o  $Fe^{2+}$  é um íon metálico pró-oxidante, a quelação diminui sua disponibilidade para catalisar a geração de radicais livres (GULCIN; ALWASEL, 2022).

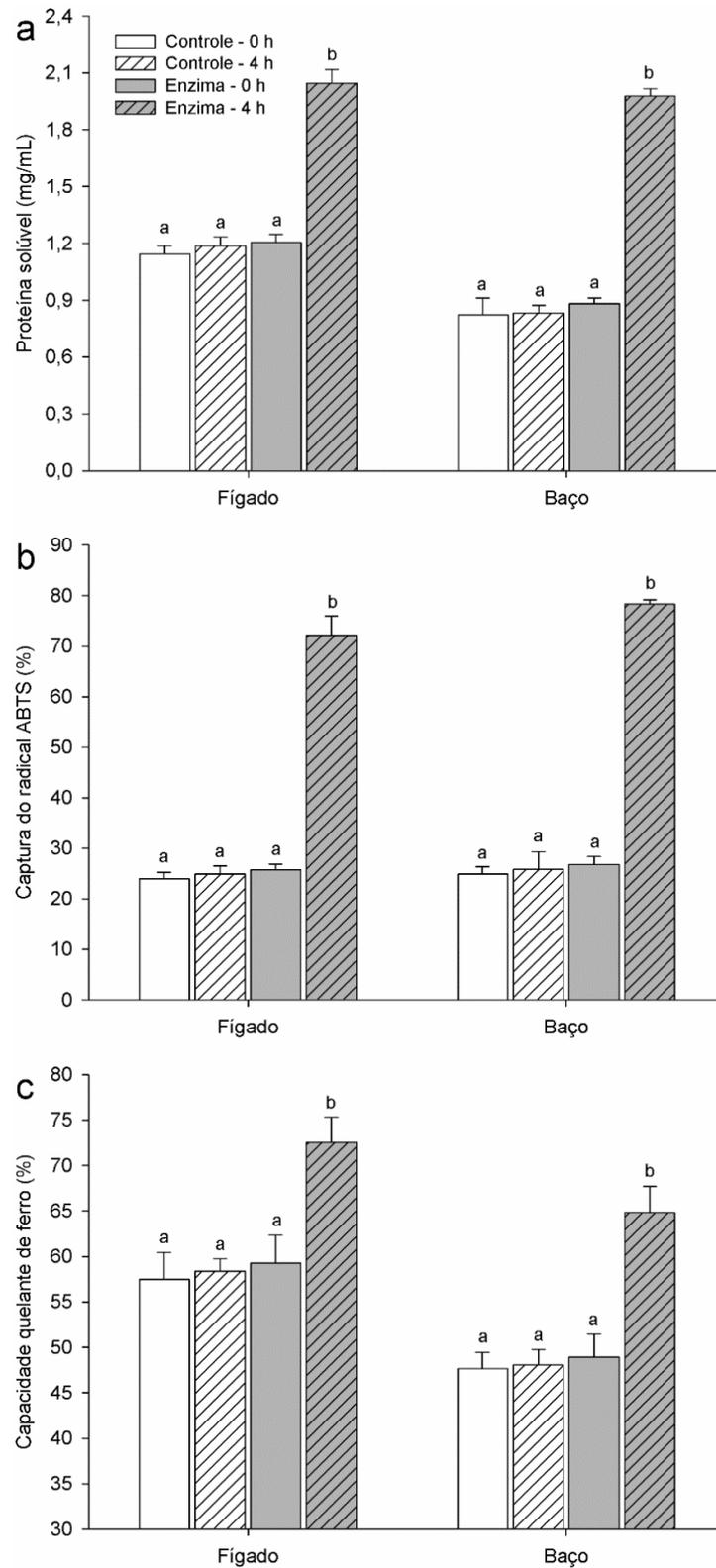


Figura 11 - Hidrólise de fígado e baço suínos. A concentração de proteína solúvel (a), eliminação de radicais ABTS (b), e capacidade quelante de ferro (c) foram avaliados após 0 h e 4 h de incubação com a protease bruta ativa (Enzima) ou inativada termicamente (Controle). Letras distintas indicam diferenças significativas para cada subproduto ( $p < 0,05$ )

Fígados de diferentes espécies animais são reconhecidos como recursos à produção de hidrolisados e peptídeos bioativos (ZOU *et al.*, 2021). A capacidade de eliminação de radicais e/ou quelação de  $Fe^{2+}$  de hidrolisados de fígado suíno vem sendo demonstrada; no entanto, as hidrólises são majoritariamente realizadas com proteases comerciais de origem microbiana, animal ou vegetal (DAMGAARD *et al.*, 2014; LÓPEZ-PEDROUSO *et al.*, 2022; VERMA *et al.*, 2019). Em relação a enzimas não-comerciais, o extrato proteolítico bruto de uma linhagem de *Monascus purpureus* foi aplicado na obtenção de hidrolisados de fígado suíno, que exibiram atividade antirradical e a capacidade de quelar íons ferrosos (YU *et al.*, 2017).

Menor número de investigações está disponível no que se refere à produção de hidrolisados antioxidantes a partir de baço suíno. Han *et al.* (2014) relataram as habilidades de neutralização de radicais e de quelação de  $Fe^{2+}$  por hidrolisados de baço suíno produzidos com Alcalase<sup>®</sup>, uma protease comercial obtida de *Bacillus licheniformis*. No estudo de Liu *et al.* (2023), a hidrólise sequencial de baço suíno com pepsina e tripsina originou hidrolisados com capacidade antirradical. Deste modo, a protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 pode ser adequada à produção de hidrolisados bioativos a partir de subprodutos animais, corroborando o potencial de enzimas alternativas (não-comerciais) como biocatalisadores promissores para tal propósito (BRANDELLI; DAROIT, 2022).

## 4 CONCLUSÃO

*Bacillus* sp. CL18 apresentou capacidade de produzir proteases durante SSF usando descartes de silagem de milho como substrato, um material até então não descrito para esta finalidade. Após a otimização de diversos parâmetros dos SSF, a produção de protease foi incrementada em 70% quando comparada àquela dos cultivos iniciais.

Diversas aplicações em potencial foram demonstradas para a protease bruta produzida por *Bacillus* sp. CL18. Considerando tal multifuncionalidade como uma característica desejável aos biocatalisadores, os resultados obtidos sugerem o valor biotecnológico desta preparação enzimática.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A.; HELMY, W. A. Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 69–76, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322012000100008>
- AHMED, S. A.; WEHAIDY, H. R.; IBRAHIM, O. A.; EL GHANI, S. A.; EL-HOFI, M. A. Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 241–249, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.06.011>
- ALECRIM, M. M.; PALHETA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, I. M. A. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 151–157, 2015. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12677>
- ALJAMMAS, H. A.; YAZJI, S.; AZIZIEH, A. Optimization of protease production from *Rhizomucor miehei* Rm4 isolate under solid-state fermentation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, artigo 82, 2022. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00358-9>
- AMARAL, R. C.; SANTOS, M. C.; DANIEL, J. L. P.; SÁ NETO, A.; BISPO, A. W.; CABEZAS-GARCIA, E. H.; BERNARDES, T. F.; NUSSIO, L. G. The influence of covering methods on the nutritive value of corn silage for lactating dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, p. 471–478, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982014000900003>
- ASGHER, M.; BASHIR, F.; IQBAL, H. M. N. Protease-based cross-linked enzyme aggregates with improved catalytic stability, silver removal, and dehairing potentials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1247–1256, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.107>
- BAKRI, M. M. Evaluating the effects of cellulolytic enzymes and *Lactobacillus bulgaricus* on mycotoxins production and the quality of maize silage. **BioResources**, v. 16, p. 8366–8378, 2021. <https://doi.org/10.15376/biores.16.4.8366-8378>
- BALACHANDRAN, C.; VISHALI, A.; NAGENDRAN, N. A.; BASKAR, K.; HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E. F. Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 4263–4269, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.069>
- BENMRAD, M. O.; MOUJEHED, E.; BEN ELHOUL, M.; MECHRI, S.; BEJAR, S.; ZOUARI, R.; BAFFOUN, A.; JAOUADI, B. Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicillium chrysogenum* strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1002–1016, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.194>
- BHAVIKATTI, J. S.; BODDUCHARL, S. M.; KAMAGOND, R. S.; DESAI, S. V.; SHET, A. R. Statistical optimisation of protease production using a freshwater bacterium

- Chryseobacterium cucumeris* SARJS-2 for multiple industrial applications. **3 Biotech**, v. 10, artigo 279, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02259-5>
- BHUNIA, B.; DEY, A. Statistical approach for optimization of physiochemical requirements on alkaline protease production from *Bacillus licheniformis* NCIM 2042. **Enzyme Research**, v. 2012, 905804, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/905804>
- BORRAJO, P.; PATEIRO, M.; BARBA, F. J.; MORA, L.; FRANCO, D.; TOLDRÁ, F.; LORENZO, J. M. Antioxidant and antimicrobial activity of peptides extracted from meat by-products: a review. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 2401–2415, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01595-4>
- BORREANI, G.; TABACCO, E. Improving corn silage quality in the top layer of farm bunker silos through the use of a next-generation barrier film with high impermeability to oxygen. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 2415–2426, 2014. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7632>
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Unconventional microbial proteases as promising tools for the production of bioactive protein hydrolysates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2022. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2145262>
- CHANG, C. Y.; WU, K. C.; CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1537–1543, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.019>
- CHATTERJEE, J.; GIRI, S.; MAITY, S.; SINHA, A.; RANJAN, A.; RAJSHEKHAR; GUPTA, S. Production and characterization of thermostable alkaline protease of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) from optimized solid-state fermentation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, p. 709–718, 2015. <https://doi.org/10.1002/bab.1309>
- COSTA, A. R.; SALGADO, J. M.; LOPES, M.; BELO, I. Valorization of by-products from vegetable oil industries: Enzymes production by *Yarrowia lipolytica* through solid state fermentation. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, artigo 1006467, 2022. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.1006467>
- DAMGAARD, T. D.; OTTE, J. A. H.; MEINERT, L.; JENSEN, K.; LAMETSCH, R. Antioxidant capacity of hydrolyzed porcine tissues. **Food Science & Nutrition**, v. 2, p. 282–288, 2014. <https://doi.org/10.1002/fsn3.106>
- DANILOVA, I.; SHARIPOVA, M. The practical potential of Bacilli and their enzymes for industrial production. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, artigo 1782, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>
- ESAKKIRAJ, P.; MARUTHIAH, T.; NAWAS, P. M. A.; IMMANUEL, G.; PALAVESAM, A. Solid state protease production by *Bacillus thuringiensis* AP-CMST using trash fish meal as substrate. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 7, p. 2791–2798, 2013.
- GANASH, M.; GHANY, T. M. A.; ABOUD, M. A.; ALAWLAQI, M. M.; QANASH, H.; AMIN, B. H. Lignocellulolytic activity of *Pleurotus ostreatus* under solid state fermentation using silage, stover, and cobs of maize. **BioResources**, v. 16, p. 3797–3807, 2021. <https://doi.org/10.15376/biores.16.2.3797-3807>

GAONKAR, S. K.; FURTADO, I. J. Valorization of low-cost agrowastes residues for the maximum production of protease and lipase haloextremozymes by *Haloferax lucentensis* GUBF-2 MG076078. **Process Biochemistry**, v. 101, p. 72–88, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.10.019>

GULCIN, I.; ALWASEL, S. H. Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. **Processes**, v. 10, artigo 132, 2022. <https://doi.org/10.3390/pr10010132>

GULERIA, S.; WALIA, A.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Optimization of milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, artigo 30, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0108-6>

HAKIM, A.; BHUIYAN, F. R.; IQBAL, A.; EMON, T. H.; AHMED, J.; AZAD, A. K. Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 by using organic municipal solid wastes. **Heliyon**, v. 4, artigo e00646, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00646>

HAN, K.-H.; SHIMADA, K.; HAYAKAWA, T.; YOON, T. J.; FUKUSHIMA, M. Porcine splenic hydrolysate has antioxidant activity *in vivo* and *in vitro*. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 34, p. 325–332, 2014. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.3.325>

IANNACCONE, F.; ALBORINO, V.; DINI, I.; BALESTRIERI, A.; MARRA, R.; DAVINO, R.; DI FRANCIA, A.; MASUCCI, F.; SERRAPICA, F.; VINALE, F. *In vitro* application of exogenous fibrolytic enzymes from *Trichoderma* spp. to improve feed utilization by ruminants. **Agriculture**, v. 12, artigo 573, 2022. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050573>

JANA, A.; KAKKAR, N.; HALDER, S. K.; DAS, A. J.; BHASKAR, T.; RAY, A.; GHOSH, D. Efficient valorization of feather waste by *Bacillus cereus* IIPK35 for concomitant production of antioxidant keratin hydrolysate and milk-clotting metallo-serine keratinase. **Journal of Environmental Management**, v. 324, artigo 116380, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116380>

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 76–85, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.124>

KHIDZIR, K. M.; ABDULLAH, N.; AGAMUTHU, P. Brewery spent grain: chemical characteristics and utilization as an enzyme substrate. **Malaysian Journal of Science**, v. 29, p. 41–51, 2010. <https://doi.org/10.22452/mjs.vol29no1.7>

KOTB, E.; ALABDALALL, A. H.; ALSAYED, M. A.; ALGHAMDI, A. I.; ALKHALDI, E.; ABDULAZEEZ, S.; BORGIO, J. F. Isolation, screening, and identification of alkaline protease-producing bacteria and application of the most potent enzyme from *Bacillus* sp. Mar64. **Fermentation**, v. 9, artigo 637, 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070637>

*Streptomyces* sp. CN902. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 531–537, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0523-6>

LIU, C.; DING, W.-J.; HUO, Y.; LIU, A.-J. Comprehensive assessment of peptide derived from pig spleen: Preparation, bioactivity and structure-activity relationships. **Food Bioscience**, v. 56, artigo 103361, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103361>

LÓPEZ-PEDROUSO, M.; LORENZO, J. M.; BORRAJO, P.; FRANCO, D. In search of antioxidant peptides from porcine liver hydrolysates using analytical and peptidomic approach. **Antioxidants**, v. 11, artigo 27, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11010027>

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)

MADHURI, A.; NAGARAJU, B.; HARIKRISHNA, N.; REDDY, G. Production of alkaline protease by *Bacillus altitudinis* GVC11 using castor husk in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 1199–1207, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9570-6>

MAMO, J.; GETACHEW, P.; KURIA, M. S.; ASSEFA, F. Application of milk-clotting protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for Danbo cheese production. **Journal of Food Quality**, v. 2020, artigo 8869010, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8869010>

MARTIM, S. R.; SILVA, L. S. C.; ALECRIM, M. M.; TEIXEIRA, L. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Milk-clotting proteases from *Pleurotus albidus*: an innovative alternative for the production of Minas frescal cheese. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 43, artigo e57275, 2021. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v43i1.57275>

MATKAWALA, F.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, artigo 63, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03036-z>

MUKHERJEE, A. K.; ADHIKARI, H.; RAI, S. K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 353–361, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.017>

NAVEED, M.; NADEEM, F.; MEHMOOD, T.; BILAL, M.; ANWAR, Z.; AMJAD, F. Protease – A versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. **Catalysis Letters**, v. 151, p. 307–323, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>

PAUL, T.; JANA, A.; DAS, A.; MANDAL, A.; HALDER, S. K.; MOHAPATRA, P. K. D.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Smart cleaning-in-place process through crude keratinase: an eco-friendly cleaning techniques towards dairy industries. **Journal of Cleaner Production**, v. 76, p. 140–153, 2014a. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.04.028>

- PAUL, T.; DAS, A.; MANDAL, A.; JANA, A.; MAITY, C.; ADAK, A.; HALDER, S. K.; DASMOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Effective dehairing properties of keratinase from *Paenibacillus woosongensis* TKB2 obtained under solid state fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, p. 97–107, 2014b. <https://doi.org/10.1007/s12649-013-9217-z>
- POURYAFAR, F.; NAJAFPOUR, G. D.; NOSHADI, N.; JAHANSHAH, M. Thermostable alkaline protease production via solid state fermentation in a tray bioreactor using *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, p. 1127–1134, 2015. <https://doi.org/10.22059/IJER.2015.1001>
- QURESHI, A. S.; KHUSHK, I.; ALI, C. H.; CHISTI, Y.; AHMAD, A.; MAJEED, H. Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 146–151, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.006>
- RAJKUMAR, R.; RANISHREE, J. K.; RAMASAMY, R. Production and characterization of a novel protease from *Bacillus* sp. RRM1 under solid state fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 627–636, 2011. <https://doi.org/10.4014/jmb.1101.01005>
- RAO, R. R.; VIMUDHA, M.; KAMINI, N. R.; GOWTHAMAN, M. K.; CHANDRASEKRAN, B.; SARAVANAN, P. Alkaline protease production from *Brevibacterium luteolum* (MTCC 5982) under solid-state fermentation and its application for sulfide-free unhairing of cowhides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, p. 511–528, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2341-z>
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- REBECCA, L. J.; SHARMILA, S.; DAS, M. P.; SAMUEL, F. A. Production and analysis of protease from *Aspergillus niger* using fish scales as substrate. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 4597–4600, 2012.
- RIEGER, T. J.; OLIVEIRA, C. T.; PEREIRA, J. Q.; BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive feather degradation and hydrolysis of diverse protein substrates. **British Poultry Science**, v. 58, p. 329–335, 2017. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1293229>
- SALIM, A. A.; GRBAVCIC, S.; SEKULJICA, N.; STEFANOVIC, A.; TANASKOVIC, S. J.; LUKOVIC, N.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid-state fermentation of agricultural byproducts: the evaluation of substrate pre-treatments methods. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 193–200, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.081>
- SAMEENA, M. F.; GOEL, R.; KARTHIK, A.; SUHAZSINI, P.; RADHA, P. *Brevundimonas vesicularis* MF276770, a new strain for gelatinase production by utilizing chicken feet gelatin. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, p. 278–290, 2019. <https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1601709>

SHARMA, S.; KUMAR, S.; KAUR, R.; KAUR, R. Multipotential alkaline protease from a novel *Pxydicoccus* sp. 252: ecofriendly replacement to various chemical processes. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, artigo 722719, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.722719>

SHATA, H. M. A. H.; FARID, M. A. F. Medium optimization for keratinase production by a local *Streptomyces* sp. NRC 13S under solid state fermentation. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 56, p. 119–129, 2013. <https://doi.org/10.3839/jabc.2013.020>

SINGH J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 781–785, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00275-2)

SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid state fermentation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, p. 717–724, 2016. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135455>

SINHA, R.; SRIVASTAVA, A. K.; KHARE, S. K. Efficient proteolysis and application of an alkaline protease from halophilic *Bacillus* sp. EMB9. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, p. 680–696, 2014. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.844711>

SIQUEIRA, M. U.; CONTIN, B.; FERNANDES, P. R. B.; RUSCHEL-SOARES, R.; SIQUEIRA, P. U.; BARUQUE-RAMOS, J. Brazilian agro-industrial wastes as potential textile and other raw materials: a sustainable approach. **Materials Circular Economy**, v. 4, artigo 9, 2022. <https://doi.org/10.1007/s42824-021-00050-2>

SOLANKI, P.; PUTATUNDA, C.; KUMAR, A.; BHATIA, R.; WALIA, A. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v. 11, artigo 428, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>

SOUSA, D.; SALGADO, J. M.; CAMBRA-LÓPEZ, M.; DIAS, A.; BELO, I. Biotechnological valorization of oilseed cakes: Substrate optimization by simplex centroid mixture design and scale-up to tray bioreactor. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 17, p. 121–134, 2023. <https://doi.org/10.1002/bbb.2428>

SOUZA, T. S. P.; ANDRADE, C. J.; KOBLITZ, M. G. B.; FAI, A. E. C. Microbial peptidase in food processing: current state of the art and future trends. **Catalysis Letters**, v. 153, p. 114–137, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10562-022-03965-w>

SU, Y-T.; LIU, C.; LONG, Z.; REN, H.; GUO, X-H. Improved production of spores and bioactive metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation by a rapid optimization process. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 921–930, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9474-z>

TEDESCHI, T.; ANZANI, C.; FERRI, M.; MARZOCCHI, S.; CABONI, M.F.; MONARI, S.; TASSONI, A. Enzymatic digestion of calf fleshing meat by-products: antioxidant and anti-tyrosinase activity of protein hydrolysates, and identification of fatty acids. **Foods**, v. 10, artigo 755, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10040755>

THAPA, S.; LI, H.; OHAIR, J.; BHATTI, S.; CHEN, F.-C.; AL NASR, K.; JOHNSON, T.; ZHOU, S. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance

from industrial perspectives. **Molecular Biotechnology**, v. 61, p. 579–601, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>

TULY, J. A.; ZABED, H. M.; NIZAMI, A.-S.; HASSAN, M. M.; AZAM, S. M. R.; AWASTHI, M. K.; JANET, Q.; CHEN, G.; AKPABLI-TSIGBE, N. D. K.; MA, H. Bioconversion of agro-food industrial wastes into value-added peptides by a *Bacillus* sp. mutant through solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 346, artigo 126513, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126513>

VENUGOPAL, M.; SARAMMA, A. V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1239–1243, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.025>

VERMA, A. K.; CHATLI, M. K.; KUMAR, P.; MEHTA, N. *In-vitro* assessment of antioxidant and antimicrobial activity of whole porcine-liver hydrolysates and its fractions. **Animal Production Science**, v. 59, p. 641–646, 2019. <https://doi.org/10.1071/AN17047>

VIJAYARAGHAVAN, P.; VIJAYAN, A.; ARUN, A.; JENISHA, J. K.; VINCENT, S. G. P. Cow dung: a potential biomass substrate for the production of detergent-stable dehairing protease by alkaliphilic *Bacillus subtilis* strain VV. **SpringerPlus**, v. 1, artigo 76, 2012. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-76>

WAHAB, W. A. A.; AHMED, S. A. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 447–458, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.041>

WANG, J.; ZHOU, L.; YIN, C.; GUI, L.; BAO, L.; WU, F.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Production of extracellular enzymes by a termite-nest-related *Bacillus siamensis* YC-9 in solid-state fermentation on agricultural by-products. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, p. 1087–1094, 2021. <https://doi.org/10.1002/bbb.2223>

WEHAIDY, H. R.; WAHAB, W. A. A.; KHOLIF, A. M. M.; ELAASER M.; BAHGAAT, W. K.; ABDEL-NABY, M. A. Statistical optimization of *B. subtilis* MK775302 milk clotting enzyme production using agro-industrial residues, enzyme characterization and application in cheese manufacture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, artigo 101589, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101589>

YU, H.-C.; HSU, J.-L.; CHANG, C.-I.; TAN, F.-J. Antioxidant properties of porcine liver proteins hydrolyzed using *Monascus purpureus*. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, p. 1217–1225, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0166-3>

ZAMBARE, V. P.; NILEGAONKAR, S. S.; KSHIRSAGAR, P. R.; KANEKAR, P. P. Scale up production of protease using *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 and its detergent compatibility. **Journal of Biochemical Technology**, v. 5, p. 698–707, 2014.

ZENG, J.; HUANG, W.; TIAN, X.; HU, X.; WU, Z. Brewer's spent grain fermentation improves its soluble sugar and protein as well as enzymatic activities using *Bacillus*

*velezensis*. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 12–20, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.10.016>

ZHU, Y.; LAO, F.; PAN, X.; WU, J. Food protein-derived antioxidant peptides: molecular mechanism, stability and bioavailability. **Biomolecules**, v. 12, artigo 1622. 2022. <https://doi.org/10.3390/biom12111622>

ZOU, Y.; SHAHIDI, F.; SHI, H.; WANG, J.; HUANG, Y.; XU, W.; WANG, D. Values-added utilization of protein and hydrolysates from animal processing by-product livers: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 432–442, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.033>

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram a habilidade de uma linhagem bacteriana em produzir enzimas proteolíticas por meio de fermentação em estado sólido com diversos subprodutos agroindustriais, indicando estratégia interessante para valorização de biomassas.

Em relação à protease bruta recuperada dos cultivos, a capacidade de coagulação de leite pode ser conveniente para a obtenção de produtos lácteos. A protease pode ser aplicada na reciclagem de prata a partir de filmes fotográficos e de raios-X usados, assim como aditivo em detergentes de base biológica. Finalmente, seu uso para a produção de hidrolisados proteicos bioativos pode ser uma estratégia sustentável para reduzir o desperdício e agregar valor à subprodutos de abatedouros.

Esta investigação contribui potencialmente para o avanço do conhecimento sobre a produção e aplicações de proteases microbianas não-comerciais, oferecendo perspectivas promissoras para a utilização consciente de recursos e o desenvolvimento de processos e produtos biotecnológicos com viés inovador.

## 5 REFERÊNCIAS

- ABDULLAH R., ASIM, M., NADEEM, M., NISAR, K., KALEEM, A., IQTEDAR, M. Optimization, Purification, Kinetic analysis and Applications of alkaline proteases produced from *Bacillus subtilis* utilizing agricultural by products through solid state fermentation **Kuwait Journal of Science**, v. 49, 2022. <https://doi.org/10.48129/kjs.12103>.
- AKRAM, F.; HAQ, I. UL; JABBAR, Z. Production and characterization of a novel thermo- and detergent stable keratinase from *Bacillus* sp. NKSP-7 with perceptible applications in leather processing and laundry industries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 371–383, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.146>.
- AL-ABDALALL, A.H., AL-KHALDI, E.M. Recovery of silver from used X-ray film using alkaline protease from *Bacillus subtilis sub sp. Subtilis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, 2016. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15340>.
- AL FARRAJ D.A., KUMAR T.S.J., VIJAYARAGHAVAN P., ELSHIKH M.S., ALKUFEIDY R.M., ALKUBAISI N.A., ALSHAMMARI M.K., Enhanced production, purification and biochemical characterization of therapeutic potential fibrinolytic enzyme from a new *Bacillus flexus* from marine environment, **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, p. 3174-3180, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.09.004>.
- ALJAMMAS, H. A., YAZJI, S., AZIZIEH, A. Optimization of protease production from *Rhizomucor miehei* Rm4 isolate under solid-state fermentation, **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, 2022. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00358-9>
- ASGHER, M., BASHIR, F., IQBAL, H. M. Protease-based cross-linked enzyme aggregates with improved catalytic stability, silver removal, and dehairing potentials. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 1247-1256, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.107>
- BALACHANDRAN, C., VISHALI, A., NAGENDRAN, N. A., BASKAR, K., HASHEM, A., ABD\_ALLAH, E. F. Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.069>
- BENUCCI I., LOMBARDELLI C., MUGANU M., MAZZOCCHI C., ESTI M. A. Minimally Invasive Approach for Preventing White Wine Protein Haze by Early Enzymatic Treatment, **Foods**, v.15, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11152246>.
- BHAVIKATTI, J. S.; BODDUCHARL, S. M.; KAMAGOND, R. S.; DESAI, S. V.; SHET, A. R. Statistical optimisation of protease production using a freshwater bacterium *Chryseobacterium cucumeris* SARJS-2 for multiple industrial applications. **3 Biotech**, v. 10, artigo 279, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02259-5>
- BORRAJO, P.; PATEIRO, M.; BARBA, F. J.; MORA, L.; FRANCO, D.; TOLDRÁ, F.; LORENZO, J. M. Antioxidant and antimicrobial activity of peptides extracted from

meat by-products: a review. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 2401–2415, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01595-4>

BRIKI, S., HAMDY, O., LANDOULSI, A. Enzymatic dehairing of goat skins using alkaline protease from *Bacillus* sp. SB12. **Protein Expression and Purification**, v. 121, p. 9-16, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.12.021>.

BUREROS, K. J. C., DIZON, E.I., ISRAEL, K.A.C., ABANTO O.D., TAMBALO F.Z. Physicochemical and sensory properties of carabeef treated with *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn protease as meat tenderizer. **Journal of Food Science and Technology**, v.57, p. 310–318, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04062-4>.

CHEN, S., MAULU, S., WANG, J., XIE, X., LIANG, X., WANG, H., WANG, J., XUE, M. The application of protease in aquaculture: Prospects for enhancing the aquafeed industry. **Animal Nutrition**, v.16, p.105-121, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.11.001>.

CHENG J-H, ZHANG X-Y, WANG Z, ZHANG X, LIU S-C, SONG X-Y, ZHANG Y-Z, DING J-M, CHEN X-L, XU F. Potential of Thermolysin-like Protease A69 in Preparation of Bovine Collagen Peptides with Moisture-Retention Ability and Antioxidative Activity. **Marine Drugs**. v. 19, 676. 2021. <https://doi.org/10.3390/md19120676>.

CONTESINI, F. J., MELO, R. R. DE, SATO, H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. In **Critical Reviews in Biotechnology** (Vol. 38, Issue 3, pp. 321–334). 2018. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>.

DAROIT, D. J., BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology** Informa Healthcare, 2014. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.794768>.

DARWESH, O.M., EL-HAWARY, A.S., EL KELANY, E.U.A., EL-SHERBINY, G.M., Nematicidal activity of thermostable alkaline protease produced by *Saccharomonospora viridis* strain Hw G550. **Biotechnology Reports**, v. 24, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00386>.

EL SALAMONY, D.H. HASSOUNA, M.S.E., ZAGHLOUL, T.I., ABDALLAH, H.M., Valorization of chicken feather waste using recombinant *Bacillus subtilis* cells by solid-state fermentation for soluble proteins and serine alkaline protease production, **Bioresource Technology**, v. 393, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130110>.

EL-SAYED, H., MOWAFI, S., EL-FIKY, A.F., KHALIL, E.M. Low temperature water-saving bio-degumming of natural silk using thermophilic protease, **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 27, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100681>.

EMRAN, M. A., ISMAIL, S. A., HASHEM, A.M. Production of detergent stable thermophilic alkaline protease by *Bacillus licheniformis* ALW1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101631>.

ESAKKIRAJ, P., SANKARALINGAM, S., USHA, R. PALAVESAM, A., IMMANUEL G., Solid-state protease production using anchovy waste meal by moderate halophile

*Serratia proteamaculans* AP-CMST isolated from fish intestine. **Annals Microbiol** 61, 749–755, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0191-4>.

GERELT B., IKEUCHI Y., SUZUKI A. Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration, **Meat Science**, v. 56, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00060-7).

GODA, D.A., BASSIOUNY, A.R., MONEM, N. M.A., SOLIMAN, N. A., FATTAH, Y.R. A. Effective multi-functional biotechnological applications of protease/keratinase enzyme produced by new Egyptian isolate (*Laceyella sacchari* YNDH). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.18, 2020. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00037-7>.

GOVARTHANAN, M., PARK, S. H., KIM, J. W., LEE, K. J., CHO, M., KAMALA-KANNAN, S., OH, B. T. Statistical optimization of alkaline protease production from brackish environment *Bacillus* sp. SKK11 by SSF using horse gram husk. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 44(2), 119–131. 2013. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.792277>.

GULERIA, S.; WALIA, A.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Optimization of milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 isolated from apple rhizosphere. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, artigo 30, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0108-6>.

GUO, Y., TU, T., YUAN, P., WANG, Y., REN, Y., YAO, B., LUO, H. High-level expression and characterization of a novel aspartic protease from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and its potential application in juice clarification. **Food chemistry**, v. 281, p. 197-203, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.096>.

GUPTA, R.; RAJPUT, R.; SHARMA, R.; GUPTA, N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 9931-9940, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5292-0>.

HAMADA, S., SUZUKI, K., AOKI, N. E SUZUKI, Y. Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Cereal Science**, v. 57, p. 91-97, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.10.008>.

HASSAAN, M.S., MOHAMMADY, E.Y., SOAUDY, M.R., ELASHRY, M.A., MOUSTAFA, M.M.A., WASSEL, M.A., EL-GARHY, H.A.S., EL-HAROUN, E.R., ELSAIED, H.E. Synergistic effects of *Bacillus pumilus* and exogenous protease on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, gut microbes, immune response and gene expression fed plant protein diet. **Animal Feed Science and Technology**, v.275, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114892>.

HEREDIA-SANDOVAL N.G., VALENCIA-TAPIA M.Y., CALDERÓN DE LA BARCA A.M., ISLAS-RUBIO A.R. Microbial Proteases in Baked Goods: Modification of Gluten and Effects on Immunogenicity and Product Quality. **Foods**, v.5, 2016. <https://doi.org/10.3390/foods5030059>.

- JANKIEWICZ, U., LARKOWSKA, E., BRZEZINSKA, M.S. Production, characterization, gene cloning, and nematocidal activity of the extracellular protease from *Stenotrophomonas maltophilia* N4. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, p. 614-618, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.11.011>.
- JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 76–85, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.124>.
- KANDASAMY, S., MUTHUSAMY, G., BALAKRISHNAN, S., DURAISAMY, S., THANGASAMY, S., SERALATHAN, K.K., CHINNAPPAN, S. Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus* sp. by SSF. 3 **Biotech**, 6(2). 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0481-z>.
- KASANA, R. C.; SALWAN, R., YADAV, S. K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, 2011. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.577029>.
- KHAN, Z., SHAFIQUE, M., JABEEN, N., NAZ, S.A., YASMEEN, K., EJAZ, U., SOHAIL, M. Protease from *Bacillus subtilis* ZMS-2: Evaluation of production dynamics through Response Surface Methodology and application in leather tannery. **Journal of King Saud University - Science**, v.35, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102643>.
- LAKOWITZ, A., GODARD, T., BIEDENDIECK, R., KRULL, R. Mini review: recombinant production of tailored bio-pharmaceuticals in different *Bacillus strains* and future perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 126, p. 27-39, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.008>.
- LI, W., WANG, T. Effect of solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* lwo on the proteolysis and the antioxidative properties of chickpeas, **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108988>.
- MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; CHAMORRO, S.; BRENES, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International**, v. 73, p. 204–212, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>.
- MATKAWALA, F.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, artigo 63, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03036-z>
- NAKİBOĞLU, N., TOSCALI, D., NISLI, G., A Novel Silver Recovery Method from Waste Photographic Films with NaOH Stripping, **Turk. J. Chem.** 25, 349-353, 2003.
- NAVEED, M.; NADEEM, F.; MEHMOOD, T.; BILAL, M.; ANWAR, Z.; AMJAD, F. Protease – A versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. **Catalysis Letters**, v. 151, p. 307–323, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>

- OLIVEIRA, C. T., PEREIRA, J. Q., BRANDELLI, A., DAROIT, D. J. Prospecting soil bacteria from subtropical Brazil for hydrolases production. **Biologia** (Poland), 72(2), 130–139. 2017. <https://doi.org/10.1515/biolog-2017-0025>.
- PANG, H., PAN, X., LI, L., HE, J., ZHENG, Y., QU, F., MA Y., CUI B. NAN J. LIU, Y. An innovative alkaline protease-based pretreatment approach for enhanced short-chain fatty acids production via a short-term anaerobic fermentation of waste activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 312, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123397>.
- PILLAI, P.; MANDGE, S., ARCHANA, G. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1110–1117, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.030>.
- POOJA, K.M., RANI, S., PAL, P., PAL, G.K. Chapter 4 - Application of microbial enzymes for the tenderization of meat, Editor(s): Bhanu Prakash, **Research and Technological Advances in Food Science**, p. 91-107,2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824369-5.00001-4>.
- POURYAFAR, F.; NAJAFPOUR, G. D.; NOSHADI, N.; JAHANSHAHI, M. Thermostable alkaline protease production via solid state fermentation in a tray bioreactor using *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, p. 1127–1134, 2015. <https://doi.org/10.22059/IJER.2015.1001>
- PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. S., SARMA, P. N. Green gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 13, p. 1449–1454, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.015>.
- RAZZAQ, A., SHAMSI, S., ALI, A., ALI, Q., SAJJAD, M., MALIK, A., ASHRAF, M. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.7, 2019. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>.
- REHMAN, R., AHMED, M., SIDDIQUE, A. HASAN, F., HAMEED, A. JAMAL, A. Catalytic Role of Thermostable Metalloproteases from *Bacillus subtilis* KT004404 as Dehairing and Destaining Agent. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 181, p. 434–450, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2222-5>.
- REJISHA, R.P. MURUGAN, M. Alkaline protease production by halophilic *Bacillus* sp. strain SP II-4 and characterization with special reference to contact lens cleansing, **Materials Today: Proceedings**, v. 45, p. 1757-1760, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.624>.
- RIEGER, T. J., DE OLIVEIRA, C. T., PEREIRA, J. Q., BRANDELLI, A., DAROIT, D. J. Proteolytic system of *Bacillus* sp. CL18 is capable of extensive feather degradation and hydrolysis of diverse protein substrates. **British Poultry Science**, 58(3), 329–335, 2017. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1293229>.
- SALIM, A. A., GRBAVČIĆ, S., ŠEKULJICA, N., STEFANOVIĆ, A., JAKOVETIĆ TANASKOVIĆ, S., LUKOVIĆ, N., KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Production of enzymes by a newly isolated *Bacillus* sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-

products: The evaluation of substrate pretreatment methods. **Bioresource Technology**, 228, 193–200. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.081>.

SALIM, A. A., GRBAVČIĆ, S., ŠEKULJICA, N., VUKAŠINOVIĆ-SEKULIĆ, M., JOVANOVIĆ, J., JAKOVETIĆ TANASKOVIĆ, S., LUKOVIĆ, N., KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Enzyme production by solid-state fermentation on soybean meal: A comparative study of conventional and ultrasound-assisted extraction methods. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 66(3), 361–368. 2019. <https://doi.org/10.1002/bab.1732>.

SHAIKH, I.A., TURAKANI, B., MALPANI, J., GOUDAR, S.V., MAHNASHI, M.H., AL-SERWI, R.H, GHONEIM M.M., EL-SHERBINY M., MANNASAHEB B.A., ALSAIKHAN F., SINDAGIMATH V., KHAN A. A., MUDDAPUR U.M., AZZOUZ S., IQUBAL T.M. Extracellular Protease Production, Optimization, and Partial Purification from *Bacillus nakamurai* PL4 and its Applications. **Journal of King Saud University – Science**, v. 35, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102429>.

SHARMA, K. M., KUMAR, R., PANWARB, KUMAR, A., Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115–126, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.02.001>.

SINGH, S., BAJAJ, B. K. Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid-state fermentation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 46(7), 717–724. 2016. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135455>.

SINGH, V., HAQUE, S., NIWAS, R., SRIVASTAVA, A., PASUPULETI, M., TRIPATHI, C. K. M. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. **Frontiers in Microbiology**, 7. 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>.

SINGH, S., BAJAJ, B.K. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. **Energy, Ecology and Environment**. v. 2, p. 370–386, 2017. <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0076-5>.

SINGHAL, P.; NIGAM, V. K.; VIDYARTHI, A. S. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases International **Journal of Advanced Biotechnology and Research**. 2012.

SOBUCKI, L., RAMOS, R. F., DAROIT, D. J. Protease production by the keratinolytic *Bacillus* sp. CL18 through feather bioprocessing. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(29), 23125–23132. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9876-6>

SOLANKI, P., PUTATUNDA, C., KUMAR, A., BHATIA R., WALIA A., Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v.11, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>

SONG P., ZHANG X., WANG S., XU W., WANG F., FU R., WEI F. Microbial proteases and their applications. **Frontiers in Microbiol.** 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236368>.

SOUSA, D.; SALGADO, J. M.; CAMBRA-LÓPEZ, M.; DIAS, A.; BELO, I. Biotechnological valorization of oilseed cakes: Substrate optimization by simplex centroid mixture design and scale-up to tray bioreactor. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 17, p. 121–134, 2023. <https://doi.org/10.1002/bbb.2428>.

SOUZA, T. S. P.; ANDRADE, C. J.; KOBLITZ, M. G. B.; FAI, A. E. C. Microbial peptidase in food processing: current state of the art and future trends. **Catalysis Letters**, v. 153, p. 114–137, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10562-022-03965-w>.

THAPA, S.; LI, H.; OHAIR, J.; BHATTI, S.; CHEN, F.-C.; AL NASR, K.; JOHNSON, T.; ZHOU, S. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. **Molecular Biotechnology**, v. 61, p. 579–601, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>.

TIAN, J., XU, Z., LONG, X., TIAN, Y., SHI, B. High-expression keratinase by *Bacillus subtilis* SCK6 for enzymatic dehairing of goatskins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 135, 119–126. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.131>.

TIEN, TN, NGUYEN, TC, NGUYEN, CN, NGUYEN, TT, PHAM, TA, PHAM, NH, CHU-KY, S. Protease increases ethanol yield and decreases fermentation time in no-cook process during very-high-gravity ethanol production from rice. **Process Biochemistry**, v.117, p. 10-18, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.005>.

UYAR, F., BAYSAL, Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, 39(12), 1893–1898. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.016>.

VIJAYARAGHAVAN, P., LAZARUS, S., VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 21(1), 27–34. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.010>.

XU, Y., XUAN, X., GAO, R. E XIE, G. Increased Expression Levels of Thermophilic Serine Protease TTHA0724 through Signal Peptide Screening in *Bacillus subtilis* and Applications of the Enzyme. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 24, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms242115950>.

ZHAI, W., LI, X., DUAN, X., GOU, C., WANG, L., GAO, Y. Development of a microbial protease for composting swine carcasses, optimization of its production and elucidation of its catalytic hydrolysis mechanism. **BMC biotechnology**, v. 22, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12896-022-00768-0>.

ZHU, W., LUAN, H., BU, Y., LI, J., LI, X., ZHANG, Y. Changes in taste substances during fermentation of fish sauce and the correlation with protease activity, **Food Research International**, v. 144, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110349>

WAHAB, W.A.A., AHMED, S.A. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 447-458, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.041>

WANG, J., ZHOU, L., YIN, C., GUI, L., BAO, L., WU, F., ZHANG, Y., ZHANG, Y. Production of extracellular enzymes by a termite-nest-related *Bacillus siamensis* YC-9 in solid-state fermentation on agricultural by-products. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. 2021. <https://doi.org/10.1002/bbb.2223>.

WANG, H., XU, J., LIU, Q., XIA, X., SUN, F., KONG, B. Effect of the protease from *Staphylococcus carnosus* on the proteolysis, quality characteristics, and flavor development of Harbin dry sausage, **Meat Science**, v. 189, 2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108827>.

WANG, Y., AZIZ, T., HU, G., LIU, J., MIN, Z., ZHENNAI, Y., ALHARBI, M., ALSHAMMARI, A., ALASMARI, A. F., Production, purification, and characterization of a novel milk-clotting metalloproteinase produced by *Bacillus velezensis* YH-1 isolated from traditional Jiuqu, **LWT- Food Science and Technology**, v. 184, 2023.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115080>.

YIN, H., JIA, F., HUANG, J., The variation of two extracellular enzymes and soybean meal bitterness during solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*, **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, p. 39-43, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.05.001>.