

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

GABRIELA POLL MORAES

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DA PROTEASE BRUTA DE *BACILLUS* SP. CL14:
ABORDAGENS PARA A VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS
E RECUPERAÇÃO DE PRATA

CERRO LARGO
2025

GABRIELA POLL MORAES

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DA PROTEASE BRUTA DE *BACILLUS* SP. CL14:
ABORDAGENS PARA A VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS
E RECUPERAÇÃO DE PRATA**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

CERRO LARGO

2025

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Moraes, Gabriela Poll

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DA PROTEASE BRUTA DE BACILLUS
SP. CL14:: ABORDAGENS PARA A VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS E RECUPERAÇÃO DE PRATA / Gabriela Poll
Moraes. -- 2025.

68 f.

Orientador: Dr. Daniel Joner Daroit

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e
Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo, RS, 2025.

1. Subprodutos agroindustriais. Produção de enzimas.
Recuperação de prata; Hidrolisados proteicos;. I.
Daroit, Daniel Joner, orient. II. Universidade Federal
da Fronteira Sul. III. Título.

GABRIELA POLL MORAES

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DA PROTEASE BRUTA DE *BACILLUS* SP. CL14:
ABORDAGENS PARA A VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS
E RECUPERAÇÃO DE PRATA**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós -
Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis
da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS),
como requisito para obtenção do título de Mestre em
Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 18/03/2025.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
DANIEL JONER DAROIT
Data: 28/04/2025 10:10:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Daniel Joner Daroit - UFFS
Orientador



Documento assinado digitalmente
SERGIO LUIZ ALVES JUNIOR
Data: 28/04/2025 10:15:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior - UFFS
Avaliador



Documento assinado digitalmente
EVELISE BACH
Data: 28/04/2025 10:38:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Evelise Bach - UFRGS
Avaliadora

“Dedico este trabalho a Deus, por iluminar meu caminho, dar-me forças nos momentos difíceis e proporcionar as oportunidades que tornaram possível esta conquista. Ao professor Dr. Daniel Joner Daroit, cuja orientação, paciência e incentivo foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sua dedicação à pesquisa e ao ensino é uma fonte constante de inspiração”.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi uma jornada de desafios, aprendizado e crescimento, na qual contei com o apoio inestimável de muitas pessoas, às quais sou profundamente grata.

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder forças nos momentos difíceis, por guiar meus passos e permitir que eu chegasse até aqui. Sem fé e perseverança, esta caminhada teria sido ainda mais árdua.

Aos meus pais, Erani e Sônia, dedico minha eterna gratidão pelo amor incondicional, pelos sacrifícios feitos para que eu pudesse estudar e pelo incentivo constante, mesmo nos momentos de dúvida e exaustão. Seu apoio e ensinamentos sempre foram a base da minha jornada acadêmica e da minha vida.

Ao meu orientador, Daniel Daroit, sou imensamente grata por sua paciência, dedicação e pelo rigor acadêmico com que guiou este trabalho. Se hoje chego ao fim desta jornada com orgulho do caminho trilhado, é porque tive ao meu lado alguém que me ensinou com sabedoria, me apoiou com generosidade e acreditou no meu potencial até mesmo quando eu duvidei de mim mesma. Serei eternamente grata por cada conselho, por cada palavra de incentivo e, acima de tudo, pelo acolhimento que encontrei em você. Esta dissertação carrega muito mais do que conhecimento, carrega a marca de um mestre que soube ser guia, amigo e, acima de tudo, uma inspiração.

Ao meu Amado Rodrigo, que nesta jornada desafiadora, seu amor e apoio foram minha maior força. Nos momentos de cansaço, foi sua paciência que me acalmou; nos desafios, suas palavras me motivaram a seguir em frente. Obrigada por estar ao meu lado, acreditando em mim quando eu mais precisava. Esta conquista não é apenas minha, mas nossa. Seu companheirismo, carinho e incentivo foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Com todo meu amor e gratidão, obrigada por ser meu porto seguro.

À minha querida amiga América, sua amizade e apoio foram essenciais nesta caminhada. Obrigada por estar ao meu lado, pelas boas risadas por cada palavra de incentivo e por tornar essa jornada mais leve e especial.

A minha querida Laika sua companhia, carinho e lealdade tornaram esta jornada mais leve. Nos dias difíceis, seu olhar atento e suas brincadeiras trouxeram alegria e conforto. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

"Em um mundo invisível aos nossos olhos, microrganismos sustentam a vida e moldam o futuro da humanidade." (Louis Pasteur)

RESUMO

A produção econômica de enzimas microbianas é um tópico significativo, considerando a importância tecnológica de processos biocatalíticos. Dentre estes processos, o uso de proteases para recuperar a prata de filmes de raios X, bem como a aplicação destas enzimas para obter hidrolisados proteicos bioativos, vêm sendo explorados. Assim, diversos substratos orgânicos foram inicialmente avaliados para maximizar a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL14. Em seguida, a enzima bruta foi aplicada para remover a camada de gelatina-prata de filmes de raios X residuais, e para obter hidrolisados bioativos a partir de substratos de origem animal ricos em proteína. Dentre 19 substratos (10 g/L), os maiores rendimentos de protease foram obtidos após 5 dias de cultivo com farelo de canola (1.976,8 U/mL), que foi 132% maior do que a peptona (849,2 U/mL, dia 4). Com o aumento da concentração de farelo de canola para 30 g/L, a produção de enzimas foi elevada em 49% (2.950,4 U/mL, dia 4). A adição de cosubstratos orgânicos (5 g/L) não resultou em efeito benéfico sobre os rendimentos de protease. A protease bruta e suas diluições (4:1, 1:1, 1:4) removeram efetivamente a camada de gelatina-prata dos filmes de raios X residuais (4-8 min; 55 °C), e o biocatalisador pode ser usado por pelo menos cinco ciclos sucessivos de remoção. Além disso, a enzima bruta hidrolisou penas moídas, farinha de penas hidrolisada, farinha de sangue, farinha de carne e ossos e farinha de vísceras (FV), sendo que os hidrolisados exibiram elevada habilidade de eliminação de radicais, quelação de Fe^{2+} e poder redutor. Experimentos de hidrólise da FV, realizados usando diferentes tempos (0-360 min) e relações enzima/substrato (E/S; 7.250 e 3.480 U/g de substrato), indicaram que a liberação de proteínas solúveis e as atividades antioxidantes aumentaram ao longo do tempo, inicialmente em taxas mais rápidas e depois tendendo a se estabilizar em períodos mais longos. As atividades antioxidantes máximas foram alcançadas em menores tempos de hidrólise (240 min) com o uso da maior E/S. Em suma, biomassas de baixo custo, abundantemente disponíveis na agroindústria brasileira, foram substratos promissores para obter uma protease bacteriana, que pode ser empregada para a recuperação segura e econômica de prata de filmes de raios X e para a valorização de farinhas de origem animal. Particularmente, a produção de hidrolisados antioxidantes pode expandir a aplicabilidade destas farinhas, com potenciais usos na tecnologia de rações e de alimentos.

Palavras-chave: Subprodutos agroindustriais. Produção de enzimas. Recuperação de prata; Hidrolisados proteicos; Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Economical production of microbial enzymes is a significant matter, considering the technological importance of biocatalysis. Among enzyme-based processes, the use of proteases to recover silver from used X-ray films and to generate bioactive protein hydrolysates has been explored. Thus, diverse organic substrates were initially evaluated to maximize protease production by *Bacillus* sp. CL14. The crude enzyme was then assessed for silver recovery and for the production of bioactive hydrolysates from protein-rich animal substrates. Among 19 substrates (10 g/L), highest protease yields were obtained after 5 days of cultivation with canola meal (1,976.8 U/mL), which was 132% higher than peptone (849.2 U/mL, day 4). By increasing canola meal concentration to 30 g/L, enzyme production was further increased by 49% higher (2,950.4 U/mL, day 4). Addition of selected organic co-substrates (5 g/L) had no beneficial effect on protease yields. The crude protease and its dilutions (4:1, 1:1, 1:4) effectively removed the gelatin-silver layer of waste X-ray films (4-8 min; 55 °C), and biocatalyst might be used for at least five successive removal cycles. In addition, the crude enzyme hydrolyzed milled feathers, hydrolyzed feather meal, blood meal, meat and bone meal, and viscera meal (VM), and the hydrolysates displayed increased radical-scavenging, Fe²⁺-chelating and reducing power abilities. Experiments of VM hydrolysis, performed at different times (0-360 min) and enzyme-to-substrate ratios (E/S; 7,250 and 3,480 U/g substrate), indicated that the release of soluble proteins and the antioxidant activities were increased over time, initially at faster rates and then tending to stabilize at longer periods. Maximal antioxidant activities were reached earlier (240 min) during hydrolysis with the higher E/S. In summary, low-cost biomasses, abundantly available from the Brazilian agroindustry, were promising substrates to obtain a bacterial protease, which might be employed for the safe and cost-effective recovery of silver from X-ray films, and for the valorization of rendered animal protein meals. Particularly, the production of antioxidant hydrolysates might expand the applicability of such meals, with potential uses in feed and food technology.

Keywords: Agro-industrial by-products; Enzyme production; Silver recovery; Protein hydrolysates; Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de protease por <i>Bacillus</i> sp. CL14 com diferentes substratos (10 g/L), em comparação com peptona (controle).....	37
Figura 2 - Produção de protease por <i>Bacillus</i> sp. CL14 durante SmF em meios com diferentes concentrações de farelo de canola.....	40
Figura 3 - Produção de protease por <i>Bacillus</i> sp. CL14 durante SmF em meios contendo farelo de canola (30 g/L) adicionado de diferentes cosubstratos (5 g/L).....	41
Figura 4 - Tratamento de filmes de raios-X residuais com a protease bruta de <i>Bacillus</i> sp. CL14.....	42
Figura 5 - Proteína solúvel e potencial antioxidante <i>in vitro</i> em hidrolisados de penas moídas e de farinhas de origem animal, e seus respectivos controles	45
Figura 6 - Hidrólise de farinha de vísceras (FV) pela protease bruta de <i>Bacillus</i> sp. CL14 em função do tempo e relação E/S.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de produtos microbianos obtidos a partir da bioconversão de subprodutos agroindustriais.	19
Tabela 2 - Produção de enzimas microbianas usando subprodutos como substratos.....	20
Tabela 3 - Uso de subprodutos agroindustriais como substratos para a produção de proteases por <i>Bacillus</i> spp. em cultivos submersos.....	23
Tabela 4 - Alguns microrganismos produtores de proteases usadas na recuperação da prata contida em filmes de raios-X.....	27
Tabela 5 - Exemplos de proteases microbianas e subprodutos de origem animal utilizados na produção de hidrolisados proteicos antioxidantes.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
E/S	Relação enzima/substrato
F	Farinha
Far	Farelo
FCO	Farinha de carne e ossos
FPH	Farinha de penas hidrolisadas
FS	Farinha de sangue
FV	Farinha de vísceras
Lev	Levedura
PCA	Ágar Padrão para Contagem
PET	Politereftalato de etileno
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
SmF	Fermentação submersa
SSF	Fermentação em estado sólido
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo geral	15
1.1.2 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E PERSPECTIVAS DE VALORIZAÇÃO	16
2.2 PROTEASES MICROBIANAS: OBTENÇÃO E USOS	21
2.2.1 Produção de proteases	22
2.2.2 Aplicações de proteases microbianas	25
2.2.2.1 Degelatinização de filmes de raios-X para a recuperação de prata	26
2.2.2.2 Proteases microbianas e subprodutos animais: produção de hidrolisados proteicos antioxidantes	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 MICRORGANISMO E PREPARO DE INÓCULOS	31
3.2 SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE	31
3.3 PRODUÇÃO DE PROTEASE POR <i>BACILLUS</i> SP. CL14	31
3.3.1 Avaliação da atividade proteolítica	32
3.4 HIDRÓLISE DE GELATINA EM FILMES DE RAIOS-X	32
3.5 PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS DE SUBSTRATOS DE ORIGEM ANIMAL	33
3.5.1 Determinação de proteína solúvel e atividades antioxidantes	34
3.5.1.1 Determinação de proteínas solúveis	34
3.5.1.2 Determinação de atividades antioxidantes in vitro	35
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 PRODUÇÃO DE PROTEASE POR <i>BACILLUS</i> SP. CL14	37

4.2 DEGELATINIZAÇÃO DE FILMES DE RAIOS-X	42
4.3 PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS A PARTIR DE SUBPRODUTOS ANIMAIS	44
5 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio, que envolve a obtenção, o processamento e a comercialização de produtos da agricultura, pecuária e silvicultura, é fundamental à economia brasileira. No entanto, estas atividades dão origem a vastas quantidades de efluentes, resíduos e subprodutos que demandam correto manejo (Martinez-Burgos et al., 2021; Siqueira et al., 2022). A biotecnologia surge neste cenário com um amplo conjunto de processos que objetivam, entre outros, a conversão destas biomassas em produtos úteis (Liguori et al. 2013; Bilal et al., 2024).

As enzimas, biomoléculas proteicas que catalisam reações químicas, estão entre estes produtos. A especificidade e a eficiência destes biocatalisadores os tornam relevantes em diversas aplicações tecnológicas. Enzimas hidrolíticas, ou seja, aquelas que utilizam moléculas de água para clivar ligações químicas, são as mais usadas, destacando-se as carboidrases, as proteases e as lipases (Thapa et al., 2019), que respondem por cerca de 44%, 27% e 6% do mercado mundial de enzimas, respectivamente (Allied Market Research, 2022).

Bactérias e fungos são as principais fontes de enzimas utilizadas em nível comercial e industrial. Nesta perspectiva, há incessante busca por microrganismos com a capacidade de produzir enzimas apropriadas para diferentes processos catalíticos. De modo complementar, estudos têm procurado obter estes biocatalisadores a custos reduzidos, o que enseja avaliações sobre o uso de resíduos e subprodutos gerados pela agroindústria como substratos para os cultivos microbianos (Ravindran et al., 2018; Sharma et al., 2022).

Enzimas proteolíticas são utilizadas em vários setores, incluindo indústrias de detergentes, alimentos, rações e couros. No manejo de resíduos, as proteases vêm sendo propostas como agentes para a recuperação da prata contida em filmes utilizados pela indústria fotográfica e pelo setor de saúde (filmes de raios-X) (Naveed et al., 2021). Além disso, proteases são investigadas na obtenção de hidrolisados proteicos bioativos, dados os potenciais benefícios destes hidrolisados à saúde humana, à tecnologia de alimentos e ao desenvolvimento de fármacos, destacando-se a tendência crescente de produção destes hidrolisados a partir de subprodutos agroalimentares (Borrajó et al., 2019; Görgüç et al., 2020).

Proteases microbianas não-comerciais vêm sendo consideradas tanto para a recuperação de prata (Keshapaga et al., 2023) quanto para produção de hidrolisados proteicos bioativos (Brandelli; Daroit, 2024). Neste contexto, *Bacillus* sp. CL14 é uma bactéria proteolítica isolada de solo, e a protease bruta desta linhagem já demonstrou ser útil para a obtenção de hidrolisados antioxidantes a partir de proteína isolada de soro de queijo (Lermen et al., 2023), caseinato de sódio bovino e proteína isolada de soja (Kopplin et al., 2024). Entretanto, nestes estudos prévios, a produção de proteases extracelulares por *Bacillus* sp. CL14 ocorreu em meios de cultura comerciais e, com isso, de alto custo.

Assim, o presente trabalho justifica-se pela exploração de biomassas de baixo custo, amplamente disponíveis na perspectiva da economia brasileira, como substratos em processos microbianos, visando à produção de proteases de *Bacillus* sp. CL14, e também como substratos em processos enzimáticos, no intuito de obter hidrolisados proteicos antioxidantes. Ademais, considerando a relevância da prata como metal valioso e de diversas aplicações, esforços também se justificam na busca por proteases convenientes para a recuperação da prata a partir de resíduos do setor de saúde, especificamente de filmes de raios-X.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar a produção e aplicações da protease bruta de *Bacillus* sp. CL14.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar substratos de baixo custo para obter proteases em cultivos submersos;
- Determinar o melhor substrato e suas concentrações para a produção de proteases, bem como os efeitos de cosubstratos sobre o rendimento enzimático;
- Avaliar a habilidade da protease para recuperar prata de filmes de raios-X;
- Aplicar a protease bruta na obtenção de hidrolisados proteicos antioxidantes a partir de subprodutos de origem animal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E PERSPECTIVAS DE VALORIZAÇÃO

As atividades agroindustriais, fundamentais para a produção de alimentos, vêm crescendo globalmente e em ritmo acelerado para suprir as necessidades da população. Contudo, diversos subprodutos são gerados de forma abundante e inevitável no âmbito agroindustrial durante o processamento das matérias-primas para a obtenção de itens alimentícios (Sadh et al., 2018).

Em abatedouros e frigoríficos, o sangue, pelos, penas, escamas, ossos, aparas de carne, peles, gorduras, vísceras e órgãos internos são os principais subprodutos. Considerando a obtenção da carne de bovinos, suínos, aves e peixes, os subprodutos representam cerca de 49%, 44%, 37% e 57% do peso vivo destes animais, respectivamente (Cheng et al., 2021a). No mundo, estima-se que aproximadamente 150 milhões de toneladas de subprodutos sejam derivados das atividades de abatedouros e frigoríficos (Limeneh et al., 2022).

Quanto aos subprodutos do processamento vegetal, estes são representados por cascas e sementes de frutas e legumes, bagaços, farelos derivados do beneficiamento de cereais e da extração de óleos a partir de grãos, dentre outros (Pilafidis et al., 2022). Mundialmente, os quantitativos de subprodutos como os farelos de arroz, trigo e aveia atingem as marcas de 68 milhões de toneladas (Spaggiari et al., 2021), 187 milhões de toneladas (Cheng et al., 2022) e cerca de 7 milhões de toneladas (Călinoiu et al., 2019) por ano, respectivamente.

No caso dos farelos de sementes oleaginosas (também denominados de tortas), resultantes da extração de óleos, pelo menos 20, 39 e 247 milhões de toneladas de farelo de girassol (Karefyllakis et al., 2019), farelo de canola (Wongsirichot et al., 2022) e farelo de soja (Pope et al., 2023), respectivamente, são gerados anualmente como subprodutos em escala global.

A indústria cervejeira também é responsável pela produção de elevadas quantidades de subprodutos, somando cerca de 45 milhões de toneladas anuais, especialmente nas formas de bagaço de malte (~85%) e leveduras cervejeiras residuais (~15%) (Jaeger et al., 2020; Umego; Barry-Ryan, 2024).

A destinação apropriada dos subprodutos agroindustriais é um desafio relevante à qualidade do ambiente e à saúde humana (Pilafidis et al., 2022). O descarte descontrolado e a queima a céu aberto, ainda utilizados particularmente nos países em desenvolvimento, acarretam sérios riscos devido à contaminação e poluição do solo, água e ar. Alternativamente, a disposição dos resíduos e subprodutos em aterros sanitários representa uma forma adequada de manejo; contudo, além de demandar vastas áreas, são necessários rígidos controles para evitar problemas ambientais. A incineração controlada de resíduos e subprodutos também é aplicada como estratégia de manejo, resultando em rápida e drástica diminuição do volume de resíduos sólidos (90-93%) (Limeneh et al., 2022).

Independentemente das formas de manejo tradicionalmente usadas, a potencial problemática ambiental dos subprodutos agroindustriais não está relacionada somente ao modo de descarte, mas também ao próprio descarte. Em outras palavras, deve ser considerado que a produção das matérias-primas que darão origem a alimentos e subprodutos está atrelada ao uso intensivo do solo e da água. Deste modo, atenção vem sendo voltada ao aproveitamento e reciclagem dos subprodutos agroindustriais, minimizando seu descarte e, com isso, otimizando o uso dos recursos naturais (Pereira et al., 2024).

Neste sentido, vários subprodutos são comestíveis e possuem considerável valor nutricional; no entanto, seu uso de modo direto para fins alimentícios depende de variados fatores. Conforme Javourez et al. (2021), o consumo humano de vísceras e órgãos internos de animais, como fígado, coração, pulmões e intestinos, depende de aspectos relacionados à tradição, cultura e religião da população. Em relação aos subprodutos de origem vegetal, além de sua complexidade estrutural, que prejudica a biodegradabilidade durante o processo digestivo, podem conter fatores antinutricionais que interferem na absorção de nutrientes.

Como destino alternativo, os subprodutos agroindustriais vêm sendo utilizados como fertilizantes na agricultura e também na nutrição animal (Almaraz-Sánchez et al., 2022; Limeneh et al., 2022; Taneja et al., 2023). No caso de subprodutos de origem animal, como aparas de carne, ossos, penas, vísceras e sangue, estes são usualmente submetidos a processos hidrotérmicos em graxarias (também denominadas de indústrias de reciclagem animal), sendo convertidos em produtos denominados de farinhas, que podem então ser adicionadas como ingredientes em rações ou formulações fertilizantes (Kerr et al., 2017).

Diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas no sentido do aproveitamento dos subprodutos agroindustriais, objetivando maior agregação de valor. É possível citar, nesta direção, o uso de gorduras de origem animal na produção de biodiesel (Toldrá-Reig et al., 2020). Constituintes como carboidratos, proteínas, fibras, minerais, enzimas e moléculas bioativas podem ser extraídos a partir de subprodutos agroalimentares por meio de processos físicos e/ou químicos, com aplicabilidade em indústrias de alimentos, no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, cosméticos, dentre outros (Ancuța; Sonia, 2020; Freitas et al., 2021).

Além disso, processos de base microbiana têm lugar de destaque no que refere à sustentabilidade industrial e ambiental. A compostagem, neste sentido, é uma técnica valiosa para a agricultura, visto que o composto orgânico, resultante da biodegradação aeróbia de materiais orgânicos por uma complexa comunidade microbiana, favorece a fertilidade e promove a biodiversidade do solo (Aguilar-Paredes et al., 2023). Em outro contexto, a bioconversão por microrganismos é reconhecida por modular de forma positiva a digestibilidade e também por incrementar as propriedades nutricionais de subprodutos agroindustriais para aplicações na alimentação animal (Yafetto et al., 2023).

Esforços também vêm sendo concentrados no uso de subprodutos agroindustriais para a obtenção de combustíveis. É o caso do metano, constituinte do biogás resultante da digestão anaeróbia de materiais orgânicos por microrganismos, e também do etanol, produzido através de processos fermentativos geralmente realizados por leveduras. Cabe ressaltar que pré-tratamentos (biológicos/enzimáticos, físicos, químicos) podem ser necessários para incrementar o potencial destas biomassas como matérias-primas para a produção de biocombustíveis e outros produtos microbianos (Chavan et al., 2022; Xu et al., 2022).

Ademais, subprodutos agroindustriais vêm sendo amplamente descritos como substratos em potencial para diversos bioprocessos que visam obter produtos microbianos como biopolímeros, surfactantes, antibióticos, pigmentos, ácidos orgânicos, compostos bioativos, dentre outros, aplicáveis em diferentes setores (Sadh et al., 2018; Ancuța; Sonia, 2020; Torres-León et al., 2021; Lemes et al., 2022; Taneja et al., 2023). A Tabela 1 apresenta alguns destes bioprodutos.

Tabela 1 - Exemplos de produtos microbianos obtidos a partir da bioconversão de subprodutos agroindustriais.

Microrganismo	Substrato(s)	Bioproduto(s)	Referência
<i>Actinoplanes</i> sp. ATCC 33076	Extratos de farinhas de peixe, aves, carne e ossos	Ramoplanina (antibiótico)	Erkan; Kayali (2016)
<i>Aspergillus niger</i> B60	Casca de romã	Ácido cítrico	Roukas; Kotzekidou (2020)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL-3	Melaço e polpa de beterraba	Ácidos glucônico, cítrico e oxálico	Kelleci et al. (2023)
<i>Bacillus subtilis</i> 3–10	Farelo de canola	Iturina (antimicrobiano)	Jin et al. (2014)
<i>Bacillus pumilus</i> 2A	Bagaço de malte	Glicolipídios (surfactante)	Marchut-Mikołajczyk et al. (2021)
<i>Bacillus velezensis</i> P#02	Água de maceração de milho	Poli ácido glutâmico (polímero) e Surfactina (surfactante)	Correia et al. (2024a)
<i>Brevibacterium casei</i> NK8	Farelo de arroz, palha de milho, torta de coco	Lipopeptídeos, Fosfolipídios (surfactantes)	Khondee et al. (2022)
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Farinha de penas	Flexirubinas (pigmentos)	Gemelli et al. (2024)
<i>Enterococcus mundtii</i> CRL35	Soro de queijo	Enterocina CRL35 (bacteriocina)	Farizano et al. (2022)
<i>Exiguobacterium</i> sp. GM010	Carapaça de camarão, farinha de penas, escamas de peixe	Carotenoides (pigmentos)	Mekala et al. (2023)
<i>Halomonas alkaliantarctica</i> DSM 15686	Soro de queijo	Polihidroxicanoatos (polímeros)	Mozejko-Ciesielska et al. (2023)
<i>Komagataeibacter rhaeticus</i> UNIWA AAK2	Bagaço de malte e levedura cervejeira residual	Celulose bacteriana (polímero)	Tsouko et al. (2023)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 20072	Bagaço de malte	Ácido láctico	Akermann et al. (2020)
<i>Serratia marcescens</i> NCIM 5246	Farelo de trigo	Prodigiosina (pigmento)	Maurya et al. (2024)
<i>Streptomyces lydicus</i> PM7	Batatas descartadas	Actinorodina (pigmento)	Astudillo et al. (2024)

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Enzimas microbianas também são importantes insumos biotecnológicos. O mercado global de enzimas alcançou US\$ 5,8 bilhões em 2021, com expectativa de atingir US\$ 10,2 bilhões em 2031. Cerca de 80% dos biocatalisadores comerciais são obtidos a partir de microrganismos, comparados com as enzimas de origem animal e vegetal, que respondem por aproximadamente 16% e 4%, respectivamente (Allied Market Research, 2022). A partir destes dados é possível inferir a relevância das enzimas microbianas no mercado mundial.

De acordo com Teigiserova et al. (2021), o preço de diferentes enzimas varia de US\$ 90/kg a US\$ 2.479/kg, o que caracteriza estes biocatalisadores como produtos de elevado valor. Neste panorama, as enzimas estão entre os produtos microbianos mais valorizados e interessantes que podem ser obtidos por meio de abordagens de biorrefinaria, ou seja, através de processos ecologicamente amigáveis e a partir de matérias-primas abundantes e ambientalmente problemáticas (Rojas et al., 2022). A Tabela 2 apresenta alguns estudos onde subprodutos foram usados como substratos para a produção de enzimas microbianas.

Tabela 2 - Produção de enzimas microbianas usando subprodutos como substratos.

Microrganismo	Substrato(s) avaliados(s)	Enzima(s) produzida(s)	Referência
<i>Aspergillus flavus</i> SH71	Melaço de cana e Farelo de linhaça	Protease	Shikha et al. (2023)
<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Farelo de canola	Celulase, endoglucanase, β -glicosidase	Alhomodi et al. (2022)
<i>Aureobasidium pullulans</i> Y-2311-1	Farelos de trigo e aveia, sabugo de milho, bagaço de malte, radículas de malte	Xilanase	Yegin et al. (2017)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Farelos de soja, girassol, aveia	Lipase	Mazhar et al. (2023)
<i>Bjerkandera adusta</i> TMF1, <i>Fomes fomentarius</i> TMF2, <i>Schizophyllum commune</i> TMF3,	Bagaço de malte, farelos de girassol e soja, resíduos de café	Amilase, pectinase, xilanase, celulase, lacase	Ilić et al. (2023)
<i>Citrobacter freundii</i> haritD11	Farelo de trigo e escamas de peixe	Quitinase	Meruvu; Meruvu (2019)

Continua

Tabela 2 - Continuação.

Microorganismo	Substrato(s) avaliados(s)	Enzima(s) produzida(s)	Referência
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> PS41	Penas de frango	Protease	Siddharthan et al. (2022)
<i>Paenibacillus lactis</i> OPSA3	Cascas de banana, batata e mandioca, farelo de soja, farinha de sangue	Amilase	Ugwuoji et al. (2023)
<i>Penicillium notatum</i>	Farelos de canola e linhaça	Lipase	Rehman et al. (2011)
<i>Penicillium glabrum</i>	Farelo de canola	β -glicosidase	Martins et al. (2020)
<i>Streptomyces</i> sp. GS-1	Farelo de trigo	Protease	Sarkar; Suthindhiran (2020)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Bagaço de malte	Lipase	Casas-Godoy et al. (2023)

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

2.2 PROTEASES MICROBIANAS: OBTENÇÃO E USOS

As proteases formam um amplo grupo de enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, liberando peptídeos de menor tamanho e aminoácidos livres (Gurumallesh et al., 2019). Nos ambientes, bactérias e fungos utilizam proteases extracelulares para despolimerizar substratos proteicos macromoleculares, sendo que os produtos da hidrólise são absorvidos para o crescimento microbiano. A atividade destas enzimas é essencial à ciclagem do nitrogênio, visto que a proteólise é etapa limitante da mineralização deste elemento, ou seja, da conversão de formas orgânicas de nitrogênio (material proteico) para a forma mineral (íon amônio) (Greenfield et al., 2021; Piotrowska-Długosz et al., 2022).

Em parte, abordagens biotecnológicas utilizam como premissa o reconhecimento de processos que ocorrem naturalmente, transferindo-os para ambientes controlados e otimizando-os. No caso das proteases, para além da importância ecológica, estas enzimas vêm sendo utilizadas para diversas finalidades tecnológicas que, em comum, demandam a hidrólise de ligações peptídicas (Singh; Bajaj, 2017a; Matkawala et al., 2021).

A predominância das enzimas proteolíticas microbianas em relação às aquelas obtidas de fontes animais e vegetais justifica-se pela maior facilidade de produzir enzimas microbianas, através de processos estabelecidos de cultivo, a necessidade de espaços reduzidos, o fato de não haver impedimentos sazonais, bem como a obtenção de rendimentos enzimáticos elevados em curtos períodos de tempo (Razzaq et al., 2019; Naveed et al., 2021).

Ademais, a prospecção da enorme diversidade microbiana pode fornecer enzimas proteolíticas com diferentes propriedades bioquímicas e catalíticas, que podem ser apropriadas para usos distintos (Souza et al., 2023). Por sua ampla gama de aplicações, a produção mais eficiente e econômica de proteases microbianas também vem sendo investigada (Ravindran et al., 2018).

2.2.1 Produção de proteases

Investigações acerca da obtenção de proteases microbianas comumente são iniciadas pelo isolamento de microrganismos a partir de diferentes locais, amostras e condições ambientais. Avalia-se então a capacidade dos isolados microbianos em produzir estas enzimas, por meio de métodos qualitativos e/ou quantitativos, sendo selecionados os microrganismos mais promissores. Em etapas subsequentes, usualmente são determinadas as condições mais propícias para a produção de enzimas proteolíticas (Kasana et al., 2011; Brandelli; Daroit, 2024).

A obtenção de proteases, assim como de outras enzimas microbianas, geralmente ocorre através de cultivos em estado sólido (SSF) ou em condições submersas (SmF). Nos SSF, os microrganismos são cultivados em meios que contêm os substratos sólidos com pouca ou nenhuma água livre aparente, enquanto que nos SmF os cultivos ocorrem em meios líquidos, onde os substratos estão dissolvidos ou em suspensão (Lemes et al., 2022).

Segundo Solanki et al. (2021), os SmF oferecem algumas vantagens em relação aos SSF. Dentre estas, estão a melhor homogeneização dos constituintes do meio de cultura, assim como a maior facilidade de controle dos parâmetros de processo e a praticidade na recuperação das enzimas, geralmente extracelulares, a partir dos meios de cultura. Nesta perspectiva, aproximadamente 90% das enzimas microbianas de uso industrial/comercial são produzidas via SmF.

Vários fatores influenciam a produção de proteases, incluindo a temperatura e pH dos cultivos, homogeneização, aeração, tempo de incubação, e a composição nutricional dos meios de cultura (Aguilar; Sato, 2018). Considerando que os microrganismos explorados como produtores de proteases são majoritariamente quimioheterotróficos, as fontes orgânicas de carbono e energia desempenham papel crucial no rendimento enzimático. Outros nutrientes, como nitrogênio e fósforo, também devem ser disponibilizados, e íons metálicos (como Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+}) podem ser necessários (Kamal et al., 2017; Sharma et al., 2017).

Matérias-primas de baixo custo e subprodutos agroindustriais vêm sendo propostos como substratos orgânicos, uma vez que podem servir como excelentes fontes de nutrientes capazes de sustentar o crescimento e a consequente produção de enzimas pelos microrganismos (Avci et al., 2022; Pereira et al., 2024). Considerando que cerca de 50% dos custos de produção de proteases são atribuídos à composição dos meios de cultura, o emprego destes substratos alternativos, além de reduzir os custos de produção de enzimas, contribui para a valorização e gestão de biomassas (Brandelli; Daroit, 2024).

Embora vários isolados bacterianos e fúngicos sejam explorados na obtenção de proteases, bactérias do gênero *Bacillus* são especialmente investigadas (Contesini et al., 2018). A Tabela 3 apresenta estudos abrangendo a produção de proteases por representantes do gênero *Bacillus* através de SmF utilizando subprodutos agroindustriais como principais substratos.

Tabela 3 - Uso de subprodutos agroindustriais como substratos para a produção de proteases por *Bacillus* spp. em cultivos submersos.

Microrganismo	Subproduto(s) agroindustrial(is) ^a	Condições de cultivo	Referência
<i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	Soro de queijo (5 g/L) e Farinha de cascas de maracujá (2,5 g/L)	50 °C; pH inicial 7,5-8,0, 150 rpm; 2 dias	Barbosa et al. (2014)
<i>Bacillus</i> sp. CL18	Escamas de peixe (30 g/L) e Farinha de penas (5 g/L)	30 °C; pH inicial 7,5; 125 rpm; 4 dias	Bernardo et al. (2023)
<i>B. amyloliquefaciens</i> 35 M	Farelo de soja (36,5 g/L) e Farelo de milho (6,25 g/L)	37 °C; pH inicial 7,2; 200 rpm; 5 dias	Xie et al. (2022)
<i>B. cereus</i> NS-2	Farelo de trigo (10 g/L) e Torta de algodão (10 g/L)	37 °C; pH inicial 7,2; 200 rpm; 3 dias	Bajaj et al. (2013)

Continua

Tabela 3 - *Continuação.*

Microrganismo	Subproduto(s) agroindustrial(is)^a	Condições de cultivo	Referência
<i>B. cereus</i> PCM 2849	Bagaço de malte (20 g/L)	28 °C; pH inicial 7,2; 200 rpm; 5 dias	Łaba et al. (2017)
<i>B. invictae</i> AH1	Farelo de trigo (50 g/L)	37 °C; pH inicial 9,0; 225 rpm; 40 h	Hammami et al. (2020)
<i>B. licheniformis</i> ALW1	Melaço de cana (80 g/L) e Farelo de trigo (50 g/L)	37 °C; pH inicial 8,0; 280 rpm; 7 dias	Emran et al. (2020a)
<i>B. licheniformis</i> ER- 15	Pelos de cabra (5 g/L) e Farelo de soja (5 g/L)	37 °C; pH inicial 7,0; 250 rpm; 1 dia	Bindal et al. (2022)
<i>B. pumilus</i> c172	Farelo de milho (60 g/L) e Farelo de soja (40 g/L)	37 °C; pH inicial 7,0; (?) rpm; 2 dias	Feng et al. (2001)
<i>B. pumilus</i> NJM4	Farinha de sangue (20 g/L)	37 °C; pH inicial 8,67; 200 rpm; 1 dia	Yao et al. (2012)
<i>B. subtilis</i>	Músculos de cauda de atum (10 g/L)	37 °C; pH inicial 7,0; 180 rpm; 3 dias	Sisa et al. (2024)
<i>B. subtilis</i> 3–10	Farelo de canola (90 g/L)	28 °C; pH 7,0; aeração 2 vvm; 600 rpm (biorreator); 70 h	Jin et al. (2014)
<i>B. subtilis</i> AU-2	Farelo de soja (10 g/L)	37 °C; pH inicial 7,0; 60 rpm; 2 dias	Patel et al. (2019)
<i>B. subtilis</i> B22	Torta de amendoim (5 g/L)	37 °C; pH inicial 8,0; 150 rpm; 3 dias	Elumalai et al. (2020)
<i>B. subtilis</i> K-1	Farelo de soja (18,3 g/L), Farelo de mostarda (18,1 g/L) e Farelo de trigo (15,2 g/L)	37 °C; pH inicial 9,0; 180 rpm; 67 h	Singh; Bajaj (2015)
<i>B. subtilis</i> PF1	Farinha de penas (12,5 g/L), Casca de batatas (12,5 g/L) e Farelo de canola (6 g/L)	37 °C; pH inicial 7,2; 125 rpm; 3 dias	Bhange et al. (2016)
<i>B. tropicus</i> KS3	Farinha de penas (5 g/L)	37 °C; pH inicial 7,0; 120 rpm; 15 dias	Latafat et al. (2024)

^a Apresenta-se somente os subprodutos agroindustriais que constituíram os meios de cultura.
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Bacillus spp. são encontrados nos mais distintos ambientes, têm a habilidade de utilizar variados substratos para seu crescimento, adaptando-se rapidamente a condições de abundância ou escassez de nutrientes (Jagadeesan et al., 2024). Esta versatilidade é um dos aspectos que justifica o elevado número de investigações com este gênero bacteriano. Somam-se a isto a facilidade de cultivo, a segurança em seu

manuseio, a reconhecida capacidade de produzir quantidades elevadas de enzimas extracelulares e rápidas taxas de crescimento, que permitem ciclos curtos de cultivo, além da possibilidade de manipulações genéticas (Contesini et al., 2018; Danilova; Sharipova, 2020; Ngalimat et al., 2021).

2.2.2 Aplicações de proteases microbianas

Diversos processos e produtos fazem uso de proteases. Na indústria coureira, enzimas proteolíticas são aplicadas, por exemplo, na etapa de depilação. Neste processo, proteases incapazes de digerir o colágeno (principal proteína dos couros), mas hábeis na hidrólise de proteínas dos folículos pilosos, facilitam a remoção dos pelos íntegros (Razzaq et al., 2019). Esta abordagem, além de originar couros de qualidade superior, também resulta em efluentes de tratamento menos complexo, visto que nos processos químicos tradicionais ocorre a gelatinização dos pelos, gerando efluentes com elevada carga orgânica e toxicidade (Singh; Bajaj, 2017a).

Enzimas proteolíticas vêm sendo adicionadas como ingredientes biológicos em sabões e detergentes para a lavagem de roupas, substituindo parcialmente os insumos químicos. A capacidade hidrolítica das proteases é benéfica para a efetiva remoção de sujidades de natureza proteica, como sangue e ovos, dentre outras (Gurumallesh et al., 2019). Além da eficácia, o uso das proteases pode mitigar os efeitos ecológicos adversos associados ao amplo uso de sabões e detergentes de base exclusivamente química (Sharma et al., 2019).

Outra aplicação relaciona-se à reciclagem da prata a partir de filmes de raios-X e fotográficos (Matkawala et al., 2021). Proteases também são usadas em processos da indústria têxtil, como na otimização da degomagem da seda e na diminuição do encolhimento da lã (Solanki et al., 2021). Indústrias de cosméticos e fármacos são beneficiadas por enzimas proteolíticas, visto que podem ser usadas em produtos para a remoção de pelos e esfoliação da pele, na dissolução de coágulos sanguíneos, no processo de cicatrização de ferimentos, na melhoria da penetração de drogas de uso tópico, e mesmo como agentes anticâncer, imunomodulatórios e anti-inflamatórios (Naveed et al., 2021; Ghahfarrokhi et al., 2023).

A indústria de alimentos é também reconhecida pelo uso de proteases. Estas enzimas encontram aplicação no processo de amaciamento de carnes, ao hidrolisar proteínas estruturais do tecido animal; na coagulação enzimática do leite, como etapa

fundamental para a produção de queijos; vêm sendo usadas na manipulação das propriedades viscoelásticas do glúten em produtos de panificação; na modificação dos atributos funcionais de proteínas alimentares, como solubilidade e formação de espumas e géis; podem intensificar sabores em alimentos e diminuir o amargor relacionado a certos peptídeos; podem ser úteis na degradação de alérgenos alimentares, entre outros usos (Song et al., 2023; Souza et al., 2023).

A hidrólise de proteínas vem recebendo intenso e crescente interesse devido à possibilidade de liberação de peptídeos que demonstram atividades biológicas. Os hidrolisados proteicos podem exibir capacidades antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana, antidiabética, dentre outras (Naeem et al., 2022). Assim, diversas proteases vêm sendo aplicadas na produção de hidrolisados bioativos a partir de diferentes proteínas, especialmente aquelas utilizadas pela indústria alimentícia, como as do leite, carnes, ovos e soja (Daroit; Brandelli, 2021; Mahgoub et al., 2023).

Dentre as aplicações acima elencadas, a recuperação de prata a partir de filmes de raios-X residuais e a produção de hidrolisados proteicos antioxidantes serão brevemente exploradas nas próximas subseções.

2.2.2.1 Degelatinização de filmes de raios-X para a recuperação de prata

Os filmes de raios-X, e também os filmes fotográficos, são constituídos por uma base polimérica, geralmente de politereftalato de etileno (PET), coberta por uma emulsão de gelatina e sais de prata, sendo que o conteúdo de prata nestes filmes é de aproximadamente 1,5% a 2,0% (m/m) (Urriquia et al., 2020).

Estima-se que 2 bilhões de filmes de raios-X sejam gerados anualmente no âmbito mundial pelo setor de saúde (Argumedo-Delira; Alducin-Ruiz, 2024). Pelo elevado valor da prata, sua recuperação é temática importante. A reciclagem a partir dos filmes também é relevante na perspectiva ambiental, uma vez que implica em menores impactos diretos, pela poluição causada pelos filmes descartados de modo inadequado, e indiretos, pela menor necessidade de extração de minério de prata (Nagrath et al., 2024). A prata recuperada de filmes fotográficos e de raios-X atinge cerca de 536 toneladas por ano, o que representa 10% do mercado global de reciclagem deste metal (The Silver Institute, 2024).

A recuperação da prata contida nos filmes de raios-X é prática corrente, sendo que os métodos convencionalmente usados são a incineração ou a extração química.

A incineração resulta em odores desagradáveis, a base polimérica (PET) não pode ser recuperada, e também envolve altos custos, relacionados tanto ao gasto energético do processo quanto ao tratamento de fuligens e gases (Cavello et al., 2013). Na extração química, geralmente são usados ácidos ou bases concentrados para a lixiviação da prata, resultando em efluentes potencialmente tóxicos de destinação e tratamento problemáticos (Bhavikatti et al., 2020).

Neste contexto, a hidrólise enzimática da matriz proteica (gelatina) é considerada como uma alternativa viável para a recuperação da prata, e também da base de PET, a partir de filmes de raios-X. O uso de proteases microbianas tem se apresentado eficiente para tal finalidade, representando uma tecnologia segura, visto que ocorre em condições moderadas e não necessita da adição de compostos químicos tóxicos (Matkawala et al., 2021). Ademais, apresenta menor demanda energética, diminuída carga de trabalho e reduzido impacto ambiental, quando comparada aos processos tradicionais, o que implica em maior sustentabilidade (Liya et al., 2023). A Tabela 4 apresenta alguns microrganismos produtores de proteases utilizadas com êxito na extração de prata a partir de filmes de raios-X.

Tabela 4 - Alguns microrganismos produtores de proteases usadas na recuperação da prata contida em filmes de raios-X.

Microrganismo	Protease	Condições de reação	Referência
<i>Aspergillus niger</i> WA 2017	Parcialmente purificada	60 °C; pH 10,0; 60 min	Wahab; Ahmed (2018)
<i>Aspergillus flavus</i>	Bruta	40 °C; pH 8,0; 50 min	Asgher et al. (2018)
<i>Bacillus brevis</i>	Bruta	40 °C; pH 8,0; 40 min	Qamar et al. (2020)
<i>Bacillus cereus</i> TSA5	Bruta	80 °C; pH 8,4; 120 min	Thomas et al. (2021)
<i>Bacillus licheniformis</i> K-3	Parcialmente purificada	60 °C, pH 9,0; 20 min	Singh; Bajaj (2017b)
<i>Bacillus</i> sp. Mar64	Purificada	55 °C; pH 11,0; 120 min	Kotb et al. (2023)
<i>Bacillus subtilis</i> A4	Bruta	37 °C; 20 min	Keshapaga et al. (2023)
<i>Bacillus subtilis</i> AKAL7	Parcialmente purificada	40 °C, pH 9,0; 24 h	Hakim et al. (2018)
<i>Brevundimonas vesicularis</i> MF276770	Parcialmente purificada	35 °C; pH 7,0; 24 h	Sameena et al. (2019)

Continua

Tabela 4 - *Continuação.*

Microrganismo	Protease	Condições de reação	Referência
<i>Chryseobacterium cucumeris</i> SARJS-2	Parcialmente purificada	Temp. ambiente; 10 min	Bhavikatti et al. (2020)
<i>Purpureocillium lilacinum</i> LPS # 876	Bruta	60 °C; pH 9,0; 6 min	Cavello et al. (2013)
<i>Pyxidicoccus</i> sp. S252	Bruta	40 °C; pH 8,0 ou 12,0; 25 min	Sharma et al. (2021)
<i>Thermoactinomyces</i> sp. RS1	Bruta	80 °C; 90 min	Verma et al. (2014)

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

2.2.2.2 Proteases microbianas e subprodutos animais: produção de hidrolisados proteicos antioxidantes

Hidrolisados proteicos são misturas complexas de peptídeos e aminoácidos derivados da quebra de ligações peptídicas em substratos proteicos. Na perspectiva tecnológica, estes hidrolisados são majoritariamente produzidos com o uso de enzimas proteolíticas (Akbarian et al., 2022). A produção de hidrolisados antioxidantes vem sendo particularmente explorada considerando os potenciais aplicações destes hidrolisados na saúde humana e animal, e também nas indústrias alimentícia e farmacêutica (Tavano et al., 2018).

Ao inativar radicais livres e moléculas oxidantes e/ou prevenir sua formação, os peptídeos contidos nos hidrolisados podem atuar no combate ao estresse oxidativo, uma condição relacionada ao surgimento e progressão de doenças crônicas e degenerativas, como aterosclerose e câncer. A capacidade de inativar radicais reativos, de quelar íons metálicos, e de inibir reações indesejáveis como a oxidação lipídica, torna os hidrolisados proteicos interessantes aditivos naturais, em contraponto aos antioxidantes sintéticos, para a conservação das propriedades sensoriais e da segurança dos alimentos (Lorenzo et al., 2018; Wu; Chen, 2022).

As bioatividades dos hidrolisados são determinadas pelos peptídeos liberados pela ação de enzimas proteolíticas sobre os substratos proteicos. Deste modo, investigações vêm sendo realizadas no sentido de avaliar diferentes proteases na obtenção destes hidrolisados, visto que enzimas com especificidades distintas podem

dar origem a diferentes peptídeos. No caso de enzimas microbianas, são especialmente exploradas as proteases disponíveis comercialmente; contudo, proteases alternativas (não-comerciais) têm se apresentado como promissores biocatalisadores para a produção de hidrolisados bioativos (Brandelli; Daroit, 2024).

O substrato proteico, pela sequência de aminoácidos e pela presença de ligações peptídicas passíveis (ou não) de hidrólise por determinada protease, também define os peptídeos liberados e, com isso, as bioatividades dos hidrolisados proteicos. Embora especial atenção esteja voltada para o uso de proteínas alimentares como substratos nos processos hidrolíticos, crescentes esforços têm sido dedicados ao uso de substratos alternativos para obter hidrolisados antioxidantes. Dentre estes, enquadram-se diferentes biomassas de origem animal ricas em proteínas, derivadas das atividades de abatedouros, frigoríficos e graxarias (Borrajó et al., 2019; Ibarz-Blanch et al., 2023; Boboua et al., 2024).

Logo, para além de processos de base microbiana (Tabelas 1-3), subprodutos agroindustriais também podem ser empregados como substratos em processos enzimáticos. Neste contexto, a Tabela 5 compila alguns estudos onde proteases microbianas foram utilizadas na enzimólise de subprodutos animais visando obter hidrolisados proteicos antioxidantes.

Tabela 5 - Exemplos de proteases microbianas e subprodutos de origem animal utilizados na produção de hidrolisados proteicos antioxidantes.

Protease comercial (PC)* ou Microrganismo produtor de protease não-comercial (NC)	Subproduto(s) hidrolisado(s)	Referência
Alcalase (PC)	Cabeças de salmão	Pires et al. (2024)
	Escamas de tilápia	Sierra et al. (2021)
	Traqueia de frango	Pramualkijja et al. (2021)
	Sangue de frangos	Nikhita; Sachindra (2021)
	Vísceras de pregado	Vázquez et al. (2020)
	Farinha de ossos	Londoño-Zapata et al. (2022)
Alcalase (PC) ou Protamex (PC)	Fígado de frangos	Chen et al. (2024)
	Farinha de sangue	Berraquero-García et al. (2022)

Continua

Tabela 5 - *Continuação.*

Protease comercial (PC)* ou Microrganismo produtor de protease não-comercial (NC)	Subproduto(s) hidrolisado(s)	Referência
Alcalase (PC) + Flavourzyme (PC)	Pulmões bovinos	Martinez et al. (2023)
	Farinha de vísceras	Aguilar et al. (2020)
Alcalase (PC) + Protamex (PC)	Rins, Pâncreas ou Pulmões bovinos	Damgaard et al. (2015)
	Fígado bovino	Arslan et al. (2024)
Flavourzyme (PC)	Fígado suíno	Borrajó et al. (2020)
Neutrase (PC)	Farinha de penas	Jeampakdee et al. (2020)
Savinase (PC)	Músculos de cabeça de espadarte	Elgaoud et al. (2024)
<i>Anoxybacillus caldiproteolyticus</i> 1A02591 (NC)	Colágeno de ossos bovinos	Cheng et al. (2021b)
<i>Bacillus</i> sp. CL18 (NC)	Pulmões e Rins de bovinos e suínos	Hoffmann et al. (2024)
<i>Bacillus subtilis</i> (NC)	Gelatina da pele da cauda de atum	Sisa et al. (2024)
<i>Bacillus</i> sp. P45 (NC)	Farinha de penas	Cunha et al. (2023)
<i>Bacillus siamensis</i> F2 (NC)	Penas de frango	Rathod et al. (2024)
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> TK1-21 (NC)	Penas (frango), Pelos e Cascos (suínos)	Kaewsalud et al. (2023)

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

* Fonte microbiana das proteases comerciais (PC): Alcalase (*Bacillus licheniformis*), Protamex (*Bacillus* sp.), Flavor protease (não especificada), Flavourzyme (*Aspergillus oryzae*), Savinase (*Bacillus lentus*), Neutrase (*Bacillus amyloliquefaciens*).

A produção de hidrolisados antioxidantes a partir de tais substratos, abundantes, baratos e comumente subutilizados, é considerada como uma estratégia pertinente para sua valorização e, de forma simultânea, para a diminuição de potenciais problemas ambientais causados por sua destinação inadequada (Lafarga et al., 2017; Boboua et al., 2024).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO E PREPARO DE INÓCULOS

Bacillus sp. CL14 foi utilizado como produtor de proteases extracelulares. Para o preparo dos inóculos, esta linhagem foi inicialmente cultivada em placas de PCA (30 °C, 24 h) e, após este período, a biomassa bacteriana foi coletada e adicionada a solução salina (8,5 g/L NaCl) estéril. As suspensões resultantes, ajustadas para densidade óptica de ~1,0 a 600 nm em espectrofotômetro, foram usadas para inocular os meios de cultura para a produção de proteases.

3.2 SUBSTRATOS PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE

Dezenove substratos foram avaliados na produção de protease. Peptona (Neogen) foi usada como substrato-controle. Farelo de milho, farelo de aveia, farinha de centeio, farinha de linhaça, farinha de cascas de maracujá, e levedura seca inativa (*Saccharomyces cerevisiae*), foram adquiridos de mercados locais. Ainda, foram avaliados farelo de canola, farelo de girassol (Celena Alimentos S.A.), farelo de arroz, farelo de soja (Warpol Agroindustrial Ltda.), farelo de trigo (Moinho Jaeschke Ltda.), farinha de sangue (FS), farinha de carne e ossos (FCO; Ecofeed Indústria de Produtos de Origem Animal Ltda.), farinha de vísceras (FV), farinha de penas hidrolisadas (FPH; Base Indústria e Comércio de Óleos e Proteínas Ltda.), bagaço de malte, levedura residual de cervejaria (*Saccharomyces pastorianus*) (Uzzina da Cerveja Indústria Ltda.), e escamas de peixe (obtidas junto a pescadores locais).

As farinhas de origem animal doadas para este estudo (FPH, FV, FCO e FV) não foram adicionadas de antioxidantes.

3.3 PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *BACILLUS* SP. CL14

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio mineral (K₂HPO₄, 0,3 g/L; KH₂PO₄, 0,4 g/L; NaCl, 0,5 g/L; pH 7,5) e diferentes substratos orgânicos. Inicialmente, cada substrato foi avaliado individualmente em concentração de 10 g/L. Após esterilização em autoclave (121 °C, 15 min) e

resfriamento, os meios foram inoculados, em triplicatas, com 1 mL de suspensão bacteriana. As incubações ocorreram a 30 °C, 125 rpm, por 0-6 dias (d0-d6). Amostras (0,5 mL) foram coletadas a cada dia, centrifugadas ($10.000 \times g$, 10 min), e os sobrenadantes usados na avaliação da atividade proteolítica.

O melhor substrato, em termos de rendimento enzimático, foi selecionado para verificar os efeitos de suas concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 g/L) na produção de protease, em cultivos realizados por 2-6 dias (d2-d6). Na sequência, a melhor concentração de substrato foi fixada para investigar o efeito de cosubstratos (5 g/L) nos SmF (d2-d5). As inoculações, incubações, e a obtenção dos sobrenadantes de cultivo (protease bruta), ocorreram como especificado acima.

3.3.1 Avaliação da atividade proteolítica

Sobrenadantes de cultivo (5 µL), adicionados de 195 µL de tampão Tris-HCl (100 mM; pH 9,0) e 300 µL de azocaseína (10 g/L, em tampão), foram incubados a 60 °C por 15 min (Lermen et al., 2023). As reações foram finalizadas com 600 µL de ácido tricloroacético (TCA; 100 g/L). Após centrifugação ($10.000 \times g$, 5 min), os sobrenadantes da reação (800 µL) foram adicionados de 200 µL de NaOH (1,8 M), e a absorbância (Abs) foi mensurada a 420 nm.

Testes em branco foram preparados usando água destilada no lugar dos sobrenadantes. Nos controles, adicionou-se o TCA antes dos sobrenadantes. Os ensaios foram realizados em triplicata. Definiu-se uma unidade de protease (U) como a quantidade de enzima a elevar 0,1 unidade de Abs a 420 nm nas condições do ensaio. A atividade (U/mL) foi então calculada:

$$\text{Atividade proteolítica (U/mL)} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{controle}}) / (0,005 \times 0,1)$$

onde $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ indica a Abs nos ensaios, $\text{Abs}_{\text{controle}}$ a Abs nos controles, 0,005 o volume de sobrenadante utilizado (em mL), e 0,1 indica o fator de conversão para U.

3.4 HIDRÓLISE DE GELATINA EM FILMES DE RAIOS-X

Os filmes de raios-X residuais foram inicialmente lavados com água destilada, limpos com algodão impregnado com etanol, secos (40 °C, 30 min) e cortados ($\sim 2 \times$

2 cm). Para os ensaios, 10 mL de protease bruta (2.900 U/mL) ou suas diluições (4:1, 1:1, 1:4, em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 9,0) foram adicionados de CaCl₂ (5 mM de concentração final), pré-incubados (55 °C, 10 min) e as reações iniciadas pela adição de dois pedaços de raios-X (~0,225 g). As incubações (55 °C) foram realizadas até a completa remoção da camada de emulsão gelatina-prata. A temperatura de ensaio, o pH do tampão e a adição de Ca²⁺ basearam-se na atividade ótima e na estabilidade térmica da protease bruta de *Bacillus* sp. CL14 (Lermen et al., 2023). Nos testes em branco e nos controles, a enzima (ou suas diluições) foi substituída por tampão e pela protease bruta inativada termicamente (100 °C, 10 min), respectivamente. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

A reutilização da protease também foi avaliada a 55 °C. Após a remoção completa da gelatina (ciclo 1), as bases de PET dos filmes foram retiradas e dois novos pedaços de filme de raios-X foram adicionados à mistura reacional restante (iniciando o ciclo 2). A incubação prosseguiu até que a remoção completa da gelatina fosse observada, e esse procedimento foi repetido até o 5º ciclo. O tempo (min) necessário para a remoção da gelatina em cada ciclo foi registrado (Cavello et al., 2013). Os testes de reuso foram realizados em triplicatas.

3.5 PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS DE SUBSTRATOS DE ORIGEM ANIMAL

Penas moídas, FPH, FS, FCO e FV foram utilizados como substratos proteicos. Para a obtenção das penas moídas, penas brancas de frango (obtidas junto a abatedouro) foram inicialmente tratadas com etanol 95% (1:3, m/v; 1 h) para remoção de gorduras, lavadas com água destilada, submetidas a secagem em estufa (60 °C; 24 h) e então processadas utilizando moinho analítico.

Os substratos restantes (FPH, FS, FCO e FV) foram tratados com etanol 95% (1:3, m/v), por 1 h sob agitação, para eliminar gorduras e concentrar proteínas. Após centrifugação (10.000 × *g*, 30 min), o precipitado foi coletado, submetido a novo tratamento com etanol, e então centrifugado. Os precipitados finais, após secagem (50 °C, 24 h), foram usados nos experimentos de hidrólise (Silva; Castro, 2020).

As hidrólises ocorreram em frascos Erlenmeyer (125 mL), contendo 23,75 mL de tampão Tris-HCl (100 mM; pH 9,0; 5 mM CaCl₂) e um dos substratos (20 g/L). Após pré-incubação (55 °C, 20 min) para estabilização da temperatura, as hidrólises foram iniciadas pela adição de 1,25 mL de protease bruta (5%, v/v_{total}; 2.900 U/mL). As

reações foram realizadas a 55 °C, sob agitação recíproca constante, por 4 h. Os frascos foram então sacrificados em triplicatas e seus conteúdos submetidos à fervura para encerrar as reações. Após resfriamento e centrifugação ($10.000 \times g$, 50 min), os sobrenadantes (denominados de hidrolisados) foram coletados e avaliados quanto à concentração de proteínas solúveis e atividades antioxidantes *in vitro*. Os controles foram realizados da mesma forma, exceto pela utilização da protease bruta inativada termicamente (100 °C, 10 min).

O substrato mais promissor, em termos de atividades antioxidantes dos hidrolisados resultantes, foi selecionado para avaliar o processo de hidrólise e as atividades antioxidantes em função do tempo de hidrólise e da relação enzima-substrato (E/S; U/g substrato). O substrato (0,5 g) foi adicionado de tampão Tris-HCl de modo a atingir concentração de 20 g/L (concentração final após a adição da enzima). Seguindo-se a pré-incubação, as reações foram iniciadas pela adição de 3.625 ou 1.740 U da protease bruta (equivalentes a relações E/S de 7.250 e 3.480 U/g substrato). As reações foram realizadas a 55 °C por diferentes períodos (0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 min; t_0 - t_{360}). Em cada tempo, frascos Erlenmeyer foram sacrificados em triplicatas e processados (fervidos, resfriados e centrifugados) conforme descrito no parágrafo anterior. Os sobrenadantes resultantes (hidrolisados) foram coletados para determinações de proteína solúvel e atividades antioxidantes.

3.5.1 Determinação de proteína solúvel e atividades antioxidantes

3.5.1.1 Determinação de proteínas solúveis

Para estas determinações, utilizou-se o método de 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), dissolvidos em NaOH (2 M; 50 mL/L)] e “B” [sulfato de cobre (5 g/L)], para obter a solução “C” (“A”:“B”; 50:1).

Após adicionar 100 µL dos hidrolisados/controles e 2,5 mL da solução “C” em tubos de ensaio, esta mistura foi incubada por 15 min (no escuro). Adicionou-se 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1 N) e, após incubação por 30 min (no escuro), a Abs foi mensurada a 750 nm. Testes em branco foram realizados usando água destilada (100 µL) em substituição às amostras. Curva padrão de albumina sérica

bovina (1 mg/mL) foi preparada para interpretação dos valores de Abs, sendo os resultados expressos como mg proteína/mL.

3.5.1.2 Determinação de atividades antioxidantes in vitro

As atividades antioxidantes foram avaliadas usando quatro ensaios, realizados conforme Hoffmann et al. (2024). A captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi avaliada adicionando-se 25 µL de amostra (hidrolisados/controles) a 1 mL de radical DPPH (60 µM, em metanol). Após incubação (12 h) em temperatura ambiente e em local escuro, mensurou-se a Abs a 517 nm. Brancos foram confeccionados substituindo a amostra por água destilada.

Para os testes de captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), este radical foi preparado misturando-se 5 mL de solução de ABTS (7 mM) e 88 µL de solução de persulfato de potássio (140 mM). Esta mistura foi incubada por 12-16 h em temperatura ambiente e em local escuro antes do uso. A solução do radical foi então diluída com tampão fosfato salino (5 mM; pH 7,4) até atingir Abs de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. Nos ensaios, 1 mL do radical ABTS foi adicionado a 10 µL de amostra (hidrolisados/controles) e, após 10 min de incubação em temperatura ambiente em local escuro, a Abs a 734 nm foi mensurada. Brancos foram confeccionados adicionando-se água destilada em substituição às amostras.

Nos ensaios com os radicais DPPH e ABTS, os resultados de Abs foram empregados para calcular a porcentagem de eliminação dos respectivos radicais:

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

A capacidade de quelação de íons ferrosos (Fe^{2+}) foi avaliada pelo método da ferrozina. Nestes ensaios, 100 µL de amostra (hidrolisados/controles) foram misturados a 3,7 mL de água destilada e 100 µL de sulfato ferroso (2 mM). Seguindo-se incubação por 5 min, 200 µL de ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina; 5 mM) foram adicionados. Após 10 min, a Abs a 562 foi mensurada. Brancos foram confeccionados adicionando-se água destilada em substituição às amostras. Os resultados de Abs foram empregados para calcular a porcentagem de quelação de Fe^{2+} :

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

O potencial antioxidante também foi avaliado através da capacidade de redução do ferricianeto de potássio. Para tanto, adicionou-se 2,5 mL de tampão fosfato de sódio (200 mM; pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio (10 g/L) a 1 mL de amostra (hidrolisados/controles). Seguindo-se incubação a 50 °C (20 min) e a adição de 2,5 mL de ácido tricloroacético (TCA; 100 g/L), esta mistura foi então centrifugada (3.000 × g; 10 min). Aos sobrenadantes resultantes (2,5 mL) foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (1 g/L). Na sequência, mensurou-se a Abs a 700 nm (Abs700) em espectrofotômetro. Brancos foram confeccionados usando água destilada em substituição às amostras. Os resultados de Abs foram usados para calcular o poder redutor:

$$\text{Poder redutor (Abs700)} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})$$

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das replicatas são apresentados como média ± desvio padrão. Comparações entre médias foram realizadas por meio de análise de variância, seguida pelo teste de Tukey, e as médias foram consideradas distintas se $p < 0,05$. No caso de comparações entre médias de hidrolisados e controles obtidos em tempo fixo de hidrólise, utilizou-se o teste t de Student, e as médias foram consideradas distintas se $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

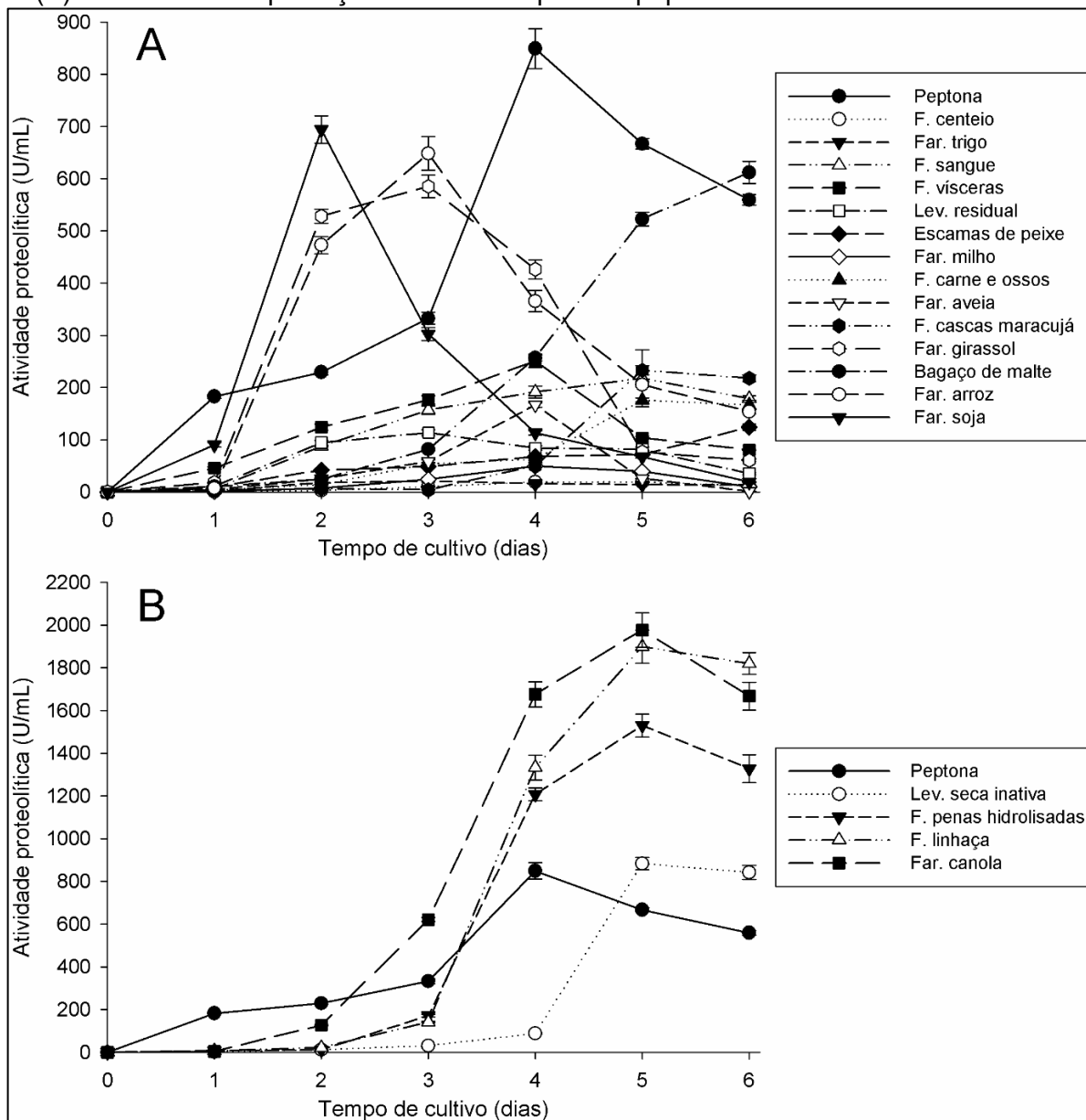
4.1 PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *BACILLUS* SP. CL14

A produção de enzimas proteolíticas por *Bacillus* sp. CL14 foi inicialmente avaliada utilizando 19 substratos orgânicos (Fig. 1). Em meio contendo peptona como substrato-controle, a máxima produção ocorreu no 4º dia (d4) de cultivo (894,2 U/mL).

Figura 1 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL14 com diferentes substratos (10 g/L), em comparação com peptona (controle).

(A) substratos com produção inferior à peptona.

(B) substratos com produção similar ou superior à peptona.



Em comparação à peptona, produções máximas inferiores ($p < 0,05$) foram detectadas com os substratos farinha de centeio (19,2 U/mL, d4), farelo de trigo (20,5 U/mL, d3), farelo de milho (49,5 U/mL, d4), levedura residual de cervejaria (113,6 U/mL, d3), escamas de peixe (124,3 U/mL, d6), farelo de aveia (166,4 U/mL, d4), farinha de carne e ossos (176,0 U/mL, d5), farinha de sangue (217,8 U/mL, d5), farinha de cascas de maracujá (233,1 U/mL, d5), farinha de vísceras (250,9 U/mL, d4), farelo de girassol (585,4 U/mL, d3), bagaço de malte (611,9 U/mL, d6), farelo de arroz (648,2 U/mL, d2) e farelo de soja (694,1 U/mL, d2) (Fig. 1A).

No meio contendo levedura seca inativa, a produção de proteases (842,2-883,1 U/mL, d5-d6) foi comparável ($p > 0,05$) àquela com peptona (Fig. 1B). Em estudo prévio, este substrato de baixo custo foi usado como uma das fontes de nitrogênio para a produção de β -galactosidase por *Lactobacillus reuteri* B-14171, em substituição ao extrato de levedura (Gomes et al., 2018). O uso de leveduras secas inativas como fonte de nitrogênio foi adequado à produção de amilase por *Laceyella sacchari* P43 (Khetkorn et al., 2024) e de quitosanase por *Comamonas koreensis* HANWOO (Kim et al. 2018). Contudo, aparentemente não há relatos do uso deste substrato na obtenção de proteases microbianas.

Produções de protease superiores à peptona ($p < 0,05$) foram mensuradas nos SmF com farinha de penas hidrolisadas (1.530,1 U/mL, d5), farinha de linhaça (1.899,4 U/mL, d5) e farelo de canola (1.976,8 U/mL, d5) (Fig. 1B). As máximas produções com farelo de canola e farinha de linhaça foram similares entre si ($p > 0,05$), mas superiores àquela detectada com farinha de penas hidrolisadas ($p < 0,05$).

Os substratos que resultaram nas maiores produções de protease são amplamente disponíveis. Por exemplo, a produção de farinha de penas hidrolisadas, considerando somente o Brasil e os Estados Unidos, atinge aproximadamente 1,1 milhão de toneladas por ano (ABRA, 2024; Downing, 2024). A produção mundial de linhaça é de 4 milhões de toneladas anuais (Selge et al., 2024), e cerca de 39 milhões de toneladas de farelo de canola são geradas anualmente (Wongsirichot et al., 2022).

O uso destes substratos para a produção de proteases microbianas vem sendo descrito. Alahyaribeik et al. (2020) verificaram que a farinha de penas foi apropriada para a produção de proteases, via SmF, por *Bacillus pumilus* PTCC 1733, *Geobacillus stearothermophilus* PTCC 1713, *Rhodococcus erythropolis* PTCC 1767 e *Bacillus licheniformis*. Este substrato foi selecionado para a obtenção de enzimas proteolíticas

de *Pseudomonas aeruginosa* YK17 (Moonnee et al., 2021), *Ochrobactrum intermedium* NKIS 1 (Sharma; Kango, 2021), *Bacillus velezensis* HFS_F2 (Saravanan et al., 2024) e *Aspergillus* sp. (Correia et al., 2024b), por meio de SmF.

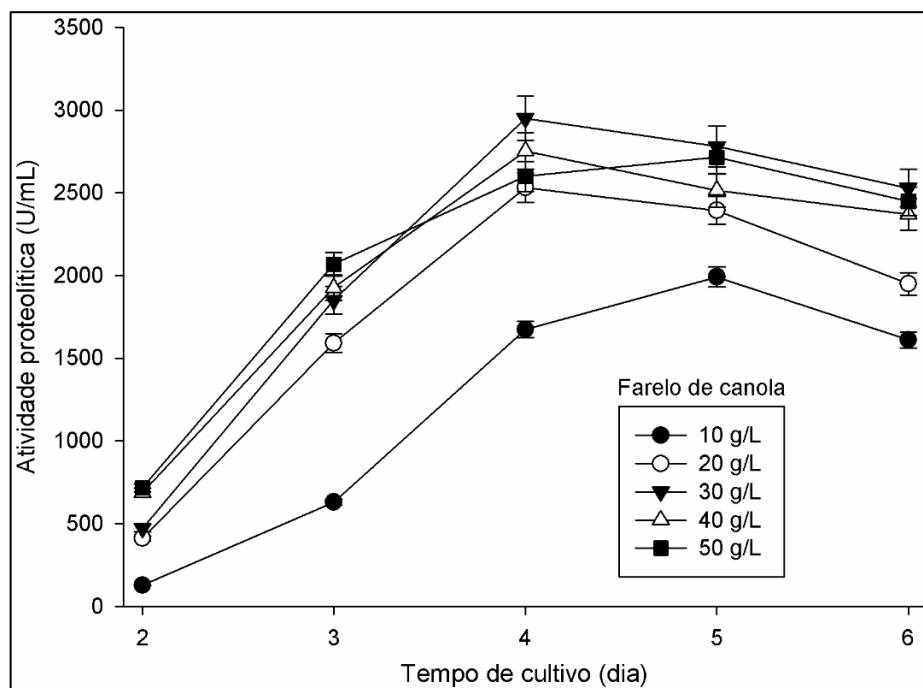
Já o farelo de canola e a farinha de linhaça parecem ser mais avaliados como substratos na produção de proteases microbianas via SSF. Neste modo de cultivo, o farelo de canola foi reportado, por exemplo, na obtenção de enzimas proteolíticas de *Aspergillus oryzae* CCBP 001 (Freitas et al., 2015), *Penicillium camemberti* AM83 (Boratyński et al., 2018) e *Yarrowia lipolytica* CDBB-L-232 (López-Trujillo et al., 2023). A farinha de linhaça foi usada como um dos substratos para a produção de proteases por *Streptomyces rochei* NAM-19 (El-Shazly et al., 2024).

Considerando estudos com cultivos do tipo SmF, o farelo de canola sustentou a produção de proteases por *Bacillus subtilis* 3–10, que foi cinco vezes superior do que aquela detectada com peptona (Jin et al., 2014). Contudo, Mukhtar; Haq (2013) observaram que a produção de proteases por *Bacillus subtilis* IH-72 com farelo de canola representou 52% daquela obtida com farelo de soja (melhor substrato). *Bacillus subtilis* B22 foi capaz de produzir proteases com farelo de linhaça; no entanto, a produção foi 13% inferior àquela com o melhor substrato (torta de amendoim) (Elumalai et al., 2020). Já Nadeem et al. (2024) reportaram rendimentos enzimáticos 60% inferiores com o uso de farelo de linhaça durante SmF com *Aspergillus viridi* FCBP-SF-1033, em comparação com cascas de banana (melhor substrato).

O farelo de canola foi então selecionado para dar continuidade às investigações, considerando o menor custo e a maior disponibilidade em relação à farinha de linhaça. Neste sentido, cabe notar que a canola tem aumentado de importância como cultura de inverno no Rio Grande do Sul (RS), com cerca de 151,7 mil ha cultivados em 2024. As regiões Noroeste e Missões, na zona de abrangência da UFFS, representam aproximadamente 60% da área cultivada, com produção de 142 mil toneladas (EMATER/RS, 2024). Ademais, nestas regiões situam-se as principais indústrias de processamento e extração de óleo de canola no Estado, o que viabiliza elevadas quantidades de farelo de canola produzido localmente.

A elevação da quantidade de farelo de canola (20, 30, 40 e 50 g/L) resultou em maiores produções de protease ($p < 0,05$) em comparação àquela observada nos cultivos iniciais (10 g/L) (Fig. 2). O pico de produção foi observado com 30 g/L de farelo de canola (d4; 2.950,4 U/mL), e rendimento similar ($p > 0,05$) foi mensurado em cultivos realizados com 40 g/L deste substrato (d4; 2.811,6 U/mL).

Figura 2 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL14 durante SmF em meios com diferentes concentrações de farelo de canola.



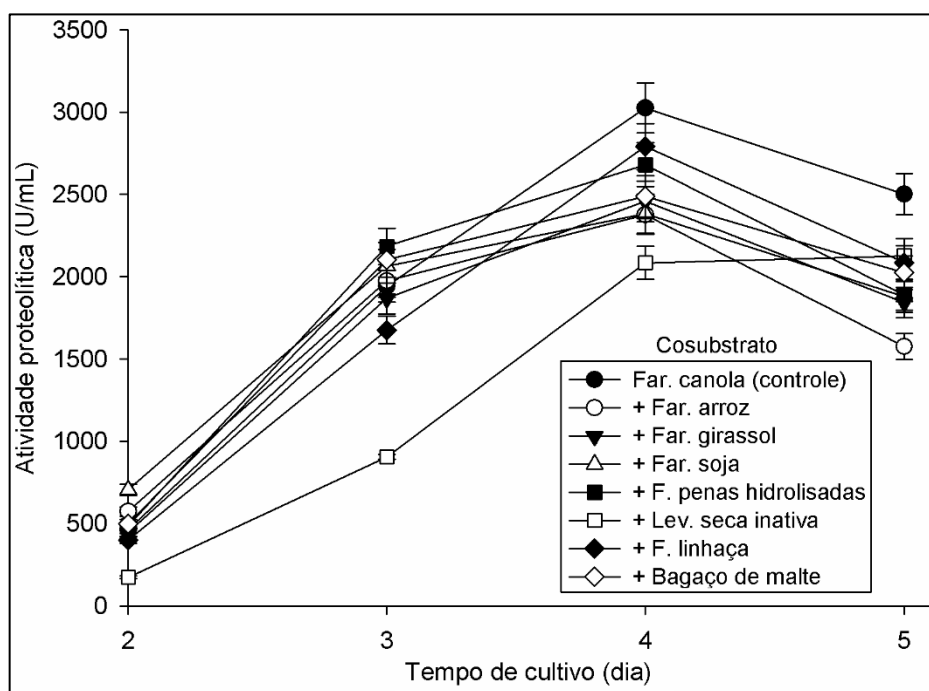
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

É possível inferir que as menores concentrações de farelo de canola (10 e 20 g/L) tenham representado limitações nutricionais ao crescimento microbiano e à produção de proteases (Pal et al., 2021). Já a tendência de redução na produção de enzimas proteolíticas, observada na maior concentração de substrato, pode estar relacionada, por exemplo, ao incremento da viscosidade do meio, o que torna menos eficiente a transferência de massa, limitando assim a disponibilidade de oxigênio para os microrganismos (Clerici et al., 2021; Sisa et al., 2023).

A máxima produção de protease com 30 g/L de farelo de canola (d4) foi 49% superior àquela mensurada com 10 g/L deste substrato (d5) (Fig. 2), ou seja, maiores rendimentos enzimáticos foram obtidos com menor tempo de cultivo. Assim, a concentração de 30 g/L de farelo de canola foi fixada para avaliar os efeitos de diferentes cosubstratos (5 g/L) sobre a produção de protease.

Os cosubstratos investigados foram aqueles mais promissores, excetuando-se o farelo de canola (Fig. 1). Observou-se que a adição de farelo de arroz, farelo de girassol, farelo de soja, levedura seca inativa, farinha de penas hidrolisadas, farinha de linhaça ou bagaço de malte ao farelo de canola não elevou a produção de enzimas proteolíticas protease por *Bacillus* sp. CL14 (Fig. 3).

Figura 3 - Produção de protease por *Bacillus* sp. CL14 durante SmF em meios contendo farelo de canola (30 g/L) adicionado de diferentes cosubstratos (5 g/L).



Nota: Nas legendas, F.: Farinha; Far.: Farelo; Lev.: Levedura.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Em investigações anteriores, a combinação de diferentes biomassas demonstrou incrementar a produção de proteases por representantes do gênero *Bacillus*. Nesta perspectiva, os substratos distintos serviriam para um melhor equilíbrio nutricional, superando potenciais limitações observadas durante cultivos realizados com substratos únicos (Singh; Bajaj, 2015; Bhange et al., 2016; He et al., 2022; Xie et al., 2022; Bernardo et al., 2023), o que aparentemente não ocorreu no presente estudo (Fig. 3). Além dos aspectos nutricionais, há também que considerar potenciais efeitos da adição dos cosubstratos sobre a viscosidade do meio, como acima indicado.

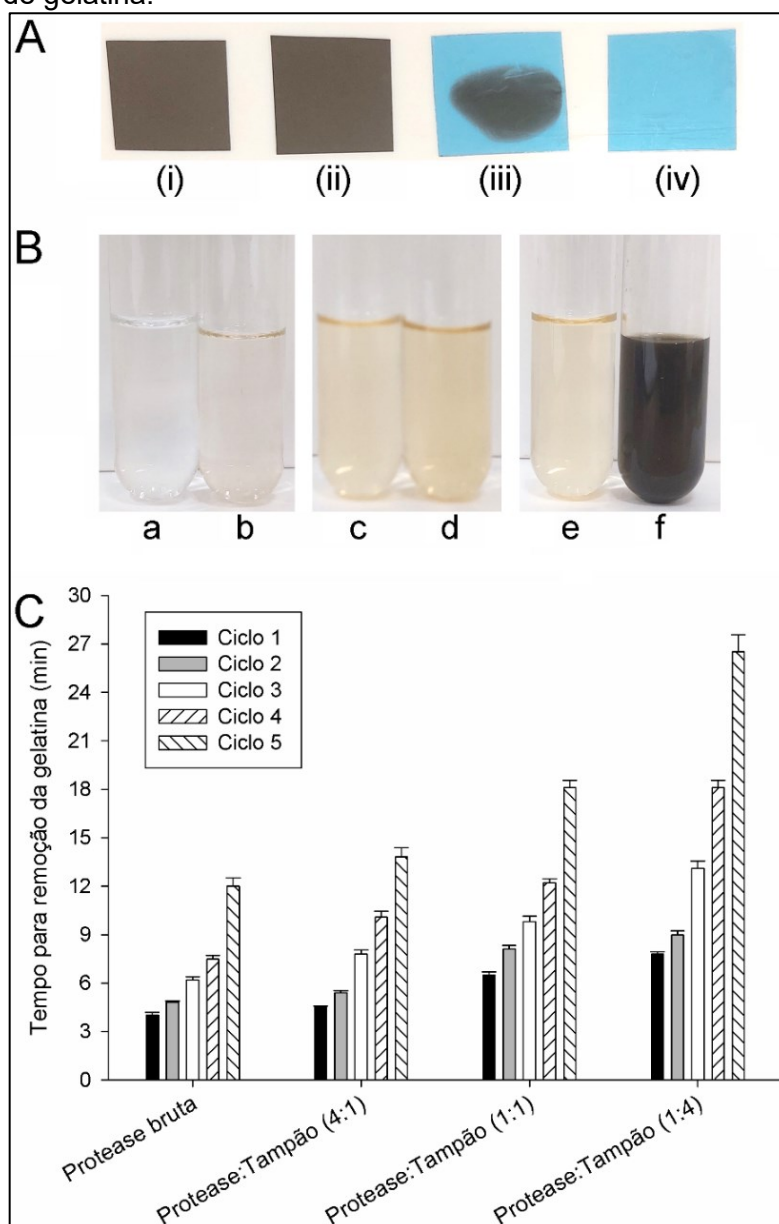
Os resultados obtidos (Fig. 1-3), somados àqueles de investigações prévias, reforçam o caráter fundamental da avaliação de diferentes substratos para incrementar os rendimentos de protease, visto que não há meio de cultura universal que resulte na máxima produção destas enzimas por diferentes microrganismos (Kasana et al., 2011). Neste sentido, o farelo de canola (30 g/L) foi utilizado como substrato único nos SmF visando obter a protease bruta de *Bacillus* sp. CL14, para então averiguar seus potenciais aplicações.

4.2 DEGELATINIZAÇÃO DE FILMES DE RAIOS-X

A aplicação da protease bruta foi inicialmente avaliada quanto à habilidade de degradar a camada de gelatina contida em filmes de raios-X residuais. Os resultados são apresentados na Fig. 4.

Figura 4 - Tratamento de filmes de raios-X residuais com a protease bruta de *Bacillus* sp. CL14.

- (A) Remoção da camada de gelatina dos filmes com tampão (i), protease bruta inativa (ii) e protease bruta ativa por 2 min (iii) e 4 min (iv).
 (B) Coloração dos meios reacionais antes (a, c, e) e após (b, d, f) cinco ciclos de tratamento com tampão (a, b), protease bruta inativa (c, d) e protease bruta ativa (e, f).
 (C) Efeito da diluição da protease bruta e dos ciclos de reutilização sobre o tempo para a remoção de gelatina.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A protease bruta e suas diluições (4:1, 1:1, 1:4) demonstraram capacidade de remover, de forma efetiva, a emulsão gelatina-prata dos filmes. O tratamento enzimático resultou na base polimérica (PET) limpa (Fig. 4A, iv) e em aumentos correspondentes na turbidez do meio reacional com a liberação de óxido de prata, de coloração preta (Fig. 4B, f), sendo que isto não ocorreu nos testes em branco (tampão) e nos controles (enzima inativa).

No primeiro ciclo de reação, a remoção completa da gelatina pela protease bruta ocorreu após 4 min de incubação (Fig. 4C). Em estudos prévios, a remoção da gelatina ocorreu após 120 min de tratamento (80 °C, pH 8,4) com uma protease parcialmente purificada de *Bacillus cereus* (Thomas et al., 2020) e após 40 min (40 °C, pH 8,0) com uma protease bruta de *Bacillus brevis* (Qamar et al., 2020).

A degradação da gelatina ocorreu em 15 min (37 °C) usando a protease bruta de *Bacillus subtilis* A4 (Keshapaga et al., 2023) e em 6 min (60 °C, pH 9,0) com a protease bruta de *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876 (Cavello et al., 2013). Já para a protease bruta de *Bacillus licheniformis* KBDL4 foram necessárias 24 h (37 °C) para completa remoção (Pathak; Deshmukh, 2012).

A eficácia do processo diminuiu conforme a diluição da enzima aumentou, sendo que as remoções completas foram observadas aos 4,5 min, 6,5 min e 7,8 min nas diluições 4:1, 1:1 e 1:4, respectivamente (Fig. 4C). Este comportamento, também observado em outros estudos, está relacionado à menor concentração inicial de biocatalisador (Shankar et al., 2010; Engidayehu; Sahu, 2020).

Ainda, a protease bruta e suas diluições continuaram a degradar a camada de gelatina até o 5º ciclo avaliado, embora o tempo necessário para a remoção da gelatina tenha aumentado em cada ciclo subsequente (Fig. 4C). Tal fenômeno, anteriormente reportado, sugere que a protease tenha sido parcialmente desnaturada e/ou que a preparação enzimática tenha sofrido inibição pelos produtos liberados pela hidrólise (Masui et al., 1999; Shankar et al., 2010).

Especificamente, a protease bruta levou 4,8, 6,2, 7,5 e 12 min para a remoção completa da camada de gelatina-prata no 2º, 3º, 4º e 5º ciclos, respectivamente (Fig. 3C). Hamza (2017) indicou que a protease bruta de *Bacillus* sp. THZ14 foi capaz de digerir a camada de gelatina por quatro ciclos subsequentes (40 °C), levando 40 min no 1º ciclo e 119 min no 4º ciclo. A protease de *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876 removeu de forma efetiva a gelatina de filmes de raios-X (60 °C) em 15 min no 2º ciclo,

23 min no 3º ciclo, e resultando em remoção incompleta após 45 min no 4º ciclo (Cavello et al., 2013). Estes últimos autores reportaram que o uso de glicerol como agente protetor contra a desnaturação térmica permitiu o reuso da enzima até o 7º ciclo (32 min). No presente estudo, utilizou-se Ca^{2+} para a estabilização térmica da protease bruta (Lermen et al., 2023).

Neste cenário, os resultados (Fig. 4) permitem sugerir que a protease bruta de *Bacillus* sp. CL14 foi eficaz na recuperação de prata e da base plástica a partir de filmes de raios-X. Este processo representa uma abordagem segura, ecológica e econômica para este fim, em comparação aos processos tradicionais (Bhavikatti et al., 2020; Mahmood et al., 2022). Além disso, como já demonstrado, a imobilização da enzima pode ser explorada visando aprimorar a estabilidade e a reutilização do biocatalisador para a recuperação de prata (Asgher et al., 2018; Qamar et al., 2020).

4.3 PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS A PARTIR DE SUBPRODUTOS ANIMAIS

No Brasil, cerca de 6 bilhões de frangos são abatidos anualmente (IBGE, 2024). Considerando que o abate de 165 mil aves origina 18,5 toneladas de penas (IPEA, 2012), isso indica que 670 mil toneladas de penas são produzidas como resíduo no país. Usualmente, as penas são enviadas a graxarias para processamento hidrotérmico sob pressão, dando origem à FPH (Ferreira et al., 2018).

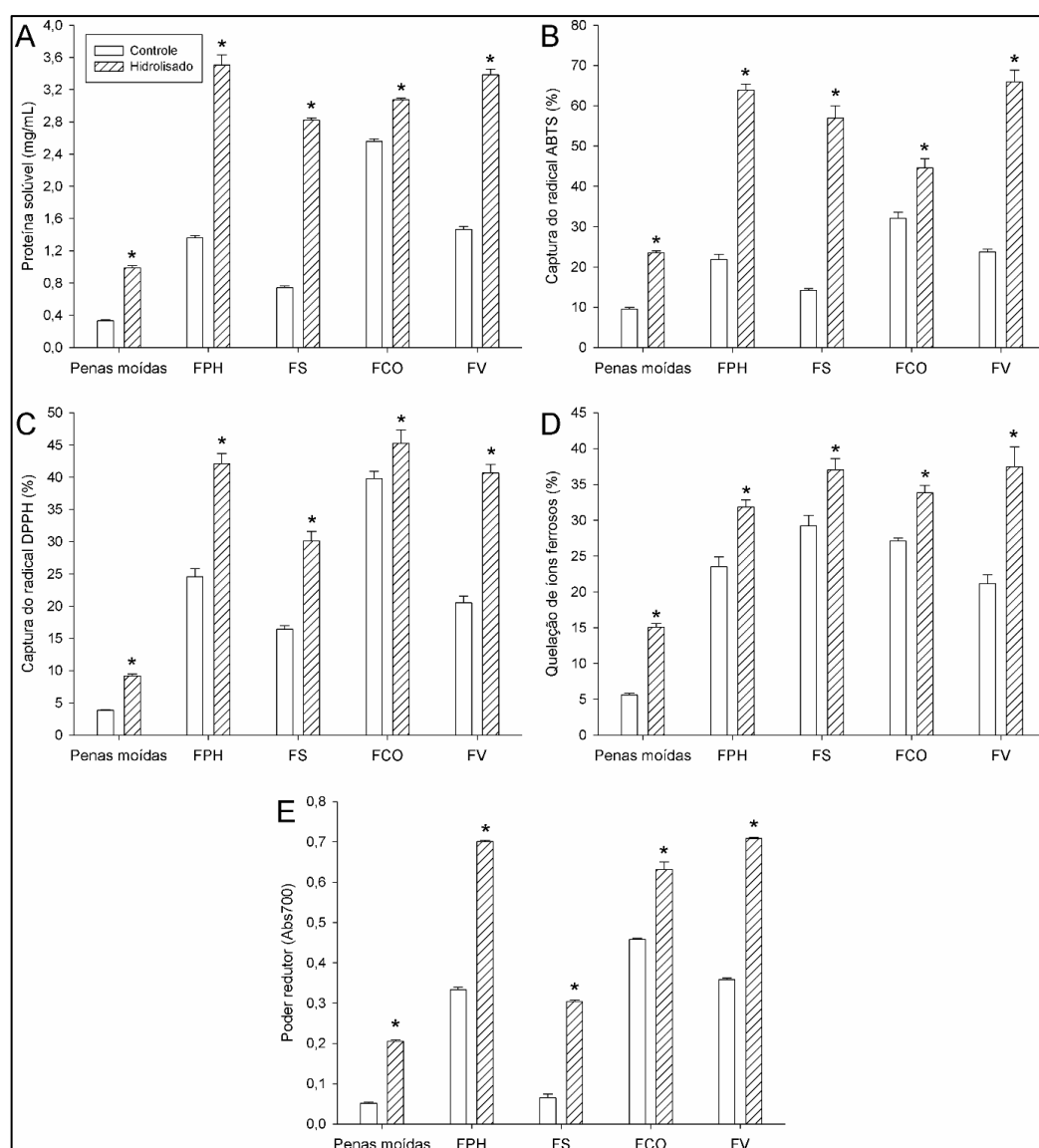
Graxarias também processam, de modo similar, outros subprodutos de abatedouros. No contexto nacional, 3,8 milhões de toneladas de farinhas animais foram geradas em 2023. Deste total, FCO, FV, FPH e FS representaram 60,4, 18,7, 16,0, e 3,4%, respectivamente (ABRA, 2024). Esses materiais possuem altos teores proteicos, de cerca de 80-90% nas penas (Cunha et al., 2023) e também na FPH e FS, atingindo 60-65% na FV, e 45-65% na FCO (Kerr et al., 2017; Silva; Castro, 2020; Ferreira et al., 2024; Hussain et al., 2024).

Farinhas animais apresentam baixo custo, sendo usadas em rações animais, o que contribui para a sustentabilidade da produção animal (Ferreira et al., 2018). No entanto, versatilidade e aplicabilidade superiores, com maior agregação de valor no contexto de uma economia circular, pode ser alcançada por meio de abordagens de biorrefinaria. Nesta lógica enquadra-se a bioconversão enzimática das penas e das farinhas de origem animal em hidrolisados proteicos antioxidantes (Jeampakdee et al., 2020; Alves et al., 2021).

Assim, avaliou-se a habilidade da protease bruta de *Bacillus* sp. CL14 em hidrolisar penas moídas, FPH, FS, FCO e FV. Após 4 h de incubação, maiores teores de proteína solúvel foram observados nos tratamentos com a protease bruta, em comparação com a protease bruta inativa ($p < 0,05$) (Fig. 5A).

Figura 5 - Proteína solúvel e potencial antioxidante *in vitro* em hidrolisados de penas moídas e de farinhas de origem animal, e seus respectivos controles.

- (A) Proteína solúvel.
 (B) Captura de radicais ABTS.
 (C) Captura de radicais DPPH.
 (D) Capacidade quelante de Fe^{2+} .
 (E) poder redutor.



Nota: Em cada painel, o asterisco (*) indica diferenças significativas entre hidrolisados e seus respectivos controles ($p < 0,05$). FPH: farinha de penas hidrolisadas; FS: farinha de sangue; FCO: farinha de carne e ossos; FV: farinha de vísceras.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Portanto, embora proteínas solúveis estejam presentes nos substratos investigados, a protease bruta foi capaz de hidrolisar essas biomassas proteicas, liberando peptídeos de menor massa molecular que permaneceram em solução (Doan et al., 2022).

Foi possível notar que as penas moídas apresentaram menor concentração de proteínas solúveis em comparação à FPH, tanto nos controles quanto nos hidrolisados (Fig. 5A). Isso se deve ao tratamento industrial empregado para a produção da FPH. O processamento hidrotérmico (170 °C, ~304 kPa) desestabiliza as proteínas (queratinas) que constituem as penas, rompendo pontes dissulfeto e liberando proteínas solúveis (Moritz et al., 2001; Machado et al., 2021). Esta descaracterização estrutural das penas também é fundamental para processos de hidrólise enzimática, pois aumenta a acessibilidade e a interação das proteases com o substrato e sítios de hidrólise (Kaewsalud et al., 2023).

As atividades antioxidantes também foram superiores após a hidrólise (4 h) com a protease bruta em comparação aos controles ($p < 0,05$), indicando que tais aumentos estiveram relacionados aos peptídeos liberados (Ketnawa et al., 2016). Nos ensaios com o radical ABTS, as porcentagens de eliminação deste radical atingiram 23,5, 44,6, 56,9, 63,8 e 65,9% nos hidrolisados de penas moídas, FCO, FS, FPH e FV, respectivamente, enquanto que eliminações de 9,5, 32,1, 14,2, 21,9 e 23,7% foram detectadas nos respectivos controles (Fig. 5B).

Quanto aos testes com o radical DPPH, os hidrolisados apresentaram maiores capacidades de eliminação deste radical ($p < 0,05$) em comparação com os controles (9,2 vs. 3,9% com penas moídas; 42,1 vs. 24,6% com FPH; 30,1 vs. 16,4% com FS; 45,3 vs. 39,8% com FCO; e 40,6 vs. 20,5% com FV) (Fig. 5C). Em conjunto, os testes de captura de radicais (ABTS e DPPH) indicam que os peptídeos liberados dos substratos pela ação da protease bruta possuem maior habilidade de transferência de elétrons e/ou de átomos de hidrogênio capazes de neutralizar radicais livres (Munteanu; Apetrei, 2021).

A capacidade quelante de Fe^{2+} dos substratos de origem animal também foi beneficiada pela hidrólise ($p < 0,05$). Especificamente, a quelação nos controles de penas moídas, FPH, FS, FCO e FV (5,6, 23,5, 29,2, 27,1 e 21,2%, respectivamente) foi aumentada para 15,0, 31,9, 37,0, 33,8 e 37,4% (Fig. 5D). Além da eliminação de radicais livres, a capacidade de quelar íons metálicos pró-oxidantes é uma

propriedade importante dos hidrolisados proteicos. Os íons ferrosos, por exemplo, estimulam a oxidação de lipídios e catalisam a geração de radicais reativos. Portanto, por meio da quelação, os antioxidantes previnem ou retardam a peroxidação lipídica induzida direta e/ou indiretamente por tais íons metálicos (Shahidi; Zhong, 2015).

A hidrólise também incrementou a habilidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} ($p < 0,05$), visto que os hidrolisados de penas moídas, FPH, FS, FCO e FV apresentaram maior poder redutor (0,205, 0,701, 0,303, 0,632 e 0,709 Abs700) do que os respectivos controles (0,051, 0,332, 0,065, 0,458 e 0,359 Abs700) (Fig. 5E). Isso reforça a capacidade de doação de elétrons como um dos mecanismos antioxidantes dos peptídeos liberados pela hidrólise enzimática (Munteanu; Apetrei, 2021). Tal atividade, por exemplo, pode contribuir para reduzir intermediários oxidados do processo de peroxidação lipídica (Vogel et al., 2023).

Recentemente, hidrolisados com potencial antioxidante, avaliado por meio da captura de radicais e redução de Fe^{3+} , foram obtidos a partir da FV usando uma mistura das proteases comerciais Alcalase (de *Bacillus licheniformis*) e Flavourzyme (de *Aspergillus oryzae*) (Amaral; Castro, 2024). Hidrolisados de FPH (Hong et al., 2022) e de farinha de sangue (Alves et al., 2021), obtidos com Alcalase, também apresentaram tais capacidades antioxidantes. A eliminação dos radicais ABTS e DPPH foi reportado para hidrolisados de farinha de ossos obtidos com uma protease comercial (Zheng et al., 2021).

Proteases microbianas alternativas, não disponíveis no mercado, também vêm sendo avaliadas na produção de hidrolisados proteicos bioativos a partir de subprodutos animais. Uma protease de *Anoxybacillus caldiproteolyticus* (expressa intracelularmente em *Escherichia coli*) hidrolisou com sucesso o colágeno extraído de ossos bovinos, e os hidrolisados exibiram propriedades de captura de radicais (Cheng et al., 2021b). A capacidade antioxidante de hidrolisados de gelatina (extraída da cauda de atum albacora) obtidos com uma protease de *Bacillus subtilis* foi demonstrada por meio da captura do radical DPPH (Sisa et al., 2024).

A neutralização do radical DPPH e a atividade quelante de Fe^{2+} foram superiores, em comparação com controles não hidrolisados, após o tratamento de subprodutos de frango com uma protease parcialmente purificada de *Bacillus siamensis* F2 (Rathod et al., 2024). A hidrólise de penas autoclavadas e moídas com proteases de *Bacillus* sp. P45 (Cunha et al., 2023) e *Bacillus haynesii* ALW2 (Emran et al., 2020b) também originou hidrolisados com a habilidade de neutralizar radicais.

Neste contexto, os resultados (Fig. 5) sugerem que a protease bruta de *Bacillus* sp. CL14 pode ser particularmente apropriada para a obtenção de hidrolisados antioxidantes a partir de farinhas animais oriundas de graxarias. Isto reforça a relevância da prospecção de proteases microbianas para a obtenção de peptídeos bioativos. Ainda, a hidrólise enzimática de tais farinhas representa uma estratégia promissora para fomentar o crescimento sustentável e a eficiência econômica da indústria da carne, beneficiando a qualidade ambiental (Brandelli; Daroit, 2024).

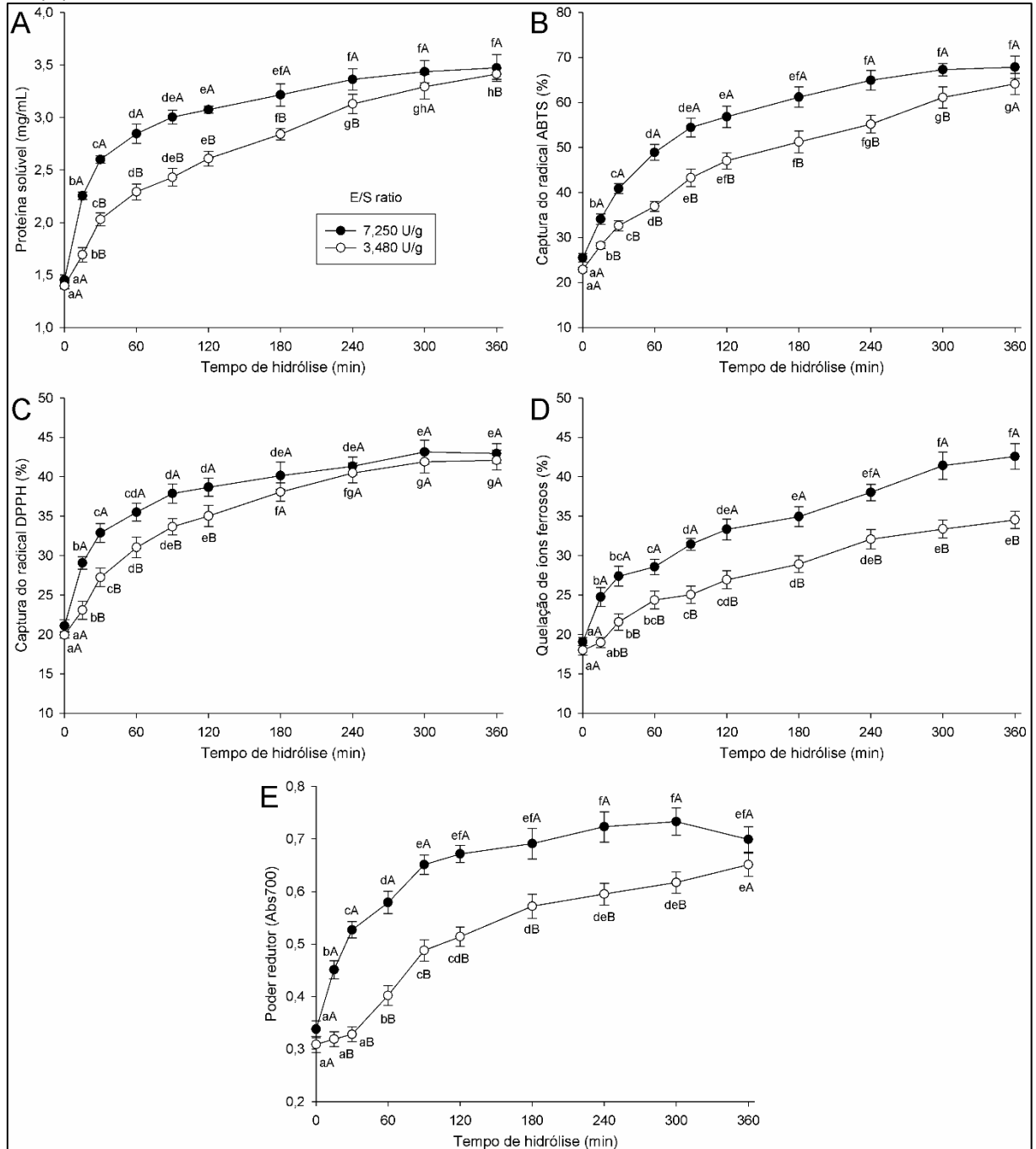
Considerando as maiores elevações nas atividades antioxidantes mensuradas nos hidrolisados de farinha de vísceras (em comparação com os controles; Fig. 5), este substrato foi selecionado para avaliar o efeito do tempo de hidrólise, em duas E/S, sobre a liberação de proteína solúvel e o potencial antioxidante. A maior E/S (7.250 U/g) foi semelhante àquela dos experimentos de hidrólise anteriores (Fig. 5).

Aumentos mais acentuados na concentração de proteína solúvel ocorreram nos períodos iniciais de hidrólise, mas as taxas de liberação diminuíram em tempos de hidrólise mais longos (Fig. 6A). Isso é comumente relatado durante a produção de hidrolisados proteicos, refletindo a maior abundância de ligações peptídicas cliváveis no substrato; no entanto, menor número de ligações peptídicas ficam disponíveis à medida que a enzimólise continua diminuindo assim as taxas de hidrólise (Doan et al., 2022; Lermen et al., 2023).

Quanto às diferentes E/S, a concentração reduzida de protease (menor E/S) retardou a liberação de proteínas solúveis até t240, em comparação com a maior E/S ($p < 0,05$) (Fig. 6A). Portanto, pode-se indicar que, em t15-t240, os conteúdos de proteína solúvel foram afetados principalmente pela concentração de protease, ou seja, uma maior disponibilidade de sítios catalíticos de enzimas (maior E/S) levou a uma hidrólise mais rápida das ligações peptídicas (Cunha et al., 2023; Amaral; Castro, 2024). No entanto, os conteúdos de proteína solúvel foram semelhantes ($p > 0,05$) entre ambas as E/S em t300-t360 (Fig. 6A), sugerindo que a máxima concentração de proteínas solúveis nos hidrolisados foi determinada pela exaustão de ligações peptídicas acessíveis no substrato (Hoffmann et al., 2024).

Figura 6 - Hidrólise de farinha de vísceras (FV) pela protease bruta de *Bacillus* sp. CL14 em função do tempo e relação E/S (●, 7.250 U/g; ○, 3.480 U/g).

- (A) Proteína solúvel.
 (B) Captura de radicais ABTS.
 (C) Captura de radicais DPPH.
 (D) Capacidade quelante de Fe^{2+} .
 (E) poder redutor.



Nota: Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de hidrólise para cada relação E/S; letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre relações E/S para o mesmo tempo de hidrólise.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

As atividades antioxidantes *in vitro* dos hidrolisados de farinha de vísceras foram então avaliadas. A eliminação de radicais ABTS pelos hidrolisados produzidos com E/S mais alta aumentou de 25,4% (t0) para 48,9% em t60, 56,8% em t120 e atingiu 64,9-67,8% em t240-t360 (Fig. 6B). Em hidrolisados obtidos com E/S mais baixa, a eliminação em t0 (22,9%) foi aumentada para 36,9% (t60), 47,0% (t120) e 61,1-64,1% em (t300-t360). Potenciais superiores de neutralização do radical ABTS ($p < 0,05$) foram geralmente detectados nos hidrolisados produzidos com E/S mais alta (t15-t300), exceto para aqueles obtidos em t360, cujo potencial de neutralização foi análogo ($p > 0,05$) entre as E/S (Fig. 6B).

A eliminação de radicais DPPH pelos hidrolisados obtidos é apresentada na Fig. 6C. Com a E/S mais alta, as atividades antioxidantes máximas foram observadas em t180-t360 (40,2-43,1%), em comparação com t0 (21,1%). Em t15-t120, as capturas do radical DPPH pelos hidrolisados produzidos com a maior E/S foram superiores às aquelas observadas nos hidrolisados produzidos com a E/S mais baixa ($p < 0,05$); no entanto, em t180-t360, as taxas de captura foram semelhantes ($p > 0,05$) entre E/S.

A atividade quelante de Fe^{2+} da farinha de vísceras não hidrolisada (19,1%; t0) foi aumentada durante a hidrólise. Para hidrolisados obtidos com a E/S mais alta, a quelação atingiu 28,6% (t60), 34,9% (t180) e 41,4-42,5% (t300-t360) (Fig. 6D). Capacidades quelantes comparativamente menores ($p > 0,05$) foram mensuradas em hidrolisados produzidos com E/S mais baixa, atingindo 24,3% (t60), 28,9% (t180) e 32,1-34,5% (t240-t360).

Em relação ao poder redutor, a capacidade dos hidrolisados obtidos com a E/S mais alta em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} foi aumentada de 0,338 Abs700 (t0) para 0,579 Abs700 em t60 e para 0,723-0,733 Abs700 em t240-t300 (Fig. 6E). Usando a E/S mais baixa, o poder redutor da farinha de vísceras não hidrolisada (0,309 Abs700; t0) foi elevado para 0,402 Abs700 (t60) e 0,595-0,617 Abs700 (t240-t300). Em t360, os valores obtidos não foram diferentes ($p > 0,05$) entre as E/S.

As atividades antioxidantes e os conteúdos de proteína solúvel dos hidrolisados aparentaram-se aparentemente relacionados (Fig. 6). O tempo de hidrólise e a E/S são reconhecidos como parâmetros de importantes no processo de produção de hidrolisados proteicos bioativos, uma vez que afetam a extensão da proteólise e os peptídeos liberados (Ketnawa et al., 2016; Zhang et al., 2022).

De fato, o potencial antioxidante dos hidrolisados de farinha de vísceras dependeu de ambas as variáveis (Fig. 6B-E), visto que as bioatividades aumentaram

em função do tempo de processo, mais rapidamente no início das hidrólises e tendendo a se estabilizar em períodos de hidrólise mais longos (particularmente para a E/S mais alta) (Pramualkijja et al., 2021; Amaral; Castro, 2024).

Para atingir as máximas atividades antioxidantes, a hidrólise da farinha de vísceras com a E/S mais alta pode ser realizada por 240 min, enquanto períodos estendidos (t300-t360) foram necessários com a E/S mais baixa (Fig. 5B-E). Isso é geralmente observado durante a produção de hidrolisados a partir de diferentes proteínas, uma vez que maiores concentrações de enzimas atuam acelerando a liberação de peptídeos bioativos (Jeampakdee et al., 2020; Hoffmann et al., 2024).

Além dessas variáveis, as enzimas usadas na hidrólise são cruciais para obter hidrolisados bioativos, pois determinam os tipos de peptídeos liberados (Zhang et al., 2022; Brandelli; Daroit, 2024). A protease bruta de *Bacillus* sp. CL14, por exemplo, é composta principalmente por serino proteases, que são endoproteases que hidrolisam ligações peptídicas próximas a resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e/ou aromáticos (Lermen et al., 2023).

A partir dessa especificidade, espera-se que os peptídeos liberados possuam propriedades hidrofóbicas, conforme indicado para a enzima comercial Alcalase, que possui a mesma especificidade (Tacias-Pascacio et al., 2020). Nesse sentido, atividades antioxidantes mais elevadas são comumente atribuídas a peptídeos contendo aminoácidos hidrofóbicos em suas sequências, incluindo as regiões C-terminal e N-terminal (Zou et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

Bacillus sp. CL14 produziu proteases durante SmF com diversos substratos. Os rendimentos enzimáticos foram 80,2, 123,6 e 132,8% superiores com FPH, farinha de linhaça e farelo de canola, respectivamente, em comparação com a peptona. A produção máxima de protease pela linhagem CL14 ocorreu após 4 dias de SmF com 30 g/L de farelo de canola. O uso de substratos alternativos é uma abordagem pertinente para obter biocatalisadores a custos mais baixos.

A enzima bruta foi efetiva na hidrólise da camada de gelatina de filmes de raios X residuais. A concentração de protease afetou o tempo de remoção, que aumentou com diluições mais altas. A remoção enzimática foi viável por pelo menos cinco rodadas sucessivas; contudo, os tempos de remoção aumentaram em cada ciclo subsequente. Esse processo, incluindo o reuso da protease, é considerado uma estratégia barata e ambientalmente correta para a recuperação da prata.

Demonstrou-se a hidrólise de cinco substratos ricos em proteína, e os hidrolisados exibiram atividades antioxidantes. Maiores aumentos na concentração de proteína solúvel e na capacidade antioxidante foram detectados em hidrolisados de farinhas animais oriundas de graxarias. De nosso conhecimento, proteases microbianas não-comerciais não foram anteriormente aplicadas na obtenção de hidrolisados antioxidantes a partir de FS, FCO e FV.

O teor de proteína solúvel e a atividade antioxidante dos hidrolisados de FV foram afetadas pelo tempo de hidrólise e pela E/S. Na E/S mais alta (7.250 U/g), os hidrolisados com as maiores atividades de eliminação de radicais, quelação de Fe^{2+} e redução de Fe^{3+} foram obtidos após 4 h de hidrólise. Em geral, capacidades antioxidantes semelhantes podem ser obtidas usando a E/S mais baixa (3.480 U/g), utilizando tempos de hidrólise mais longos.

A produção de hidrolisados bioativos por meio de proteólise enzimática fornece uma perspectiva interessante para avanços na direção da valorização das farinhas de origem animal produzidas em graxarias. Esforços futuros de pesquisa devem ser concentrados na separação e identificação dos peptídeos antioxidantes contidos nos hidrolisados de farinha de vísceras.

REFERÊNCIAS

- ABRA – Associação Brasileira de Reciclagem Animal. **Anuário ABRA 2023**. Brasília: ABRA, 2024.
- AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253–262, 2018.
- AGUILAR, J. G. S. *et al.* Enzymatic hydrolysis of chicken viscera to obtain added-value protein hydrolysates with antioxidant and antihypertensive properties. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 717–725, 2020.
- AGUILAR-PAREDES, A. *et al.* Microbial community in the composting process and its positive impact on the soil biota in sustainable agriculture. **Agronomy**, v. 13, Artigo 542, 2023.
- AKBARIAN, M. *et al.* Bioactive peptides: synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, Artigo 1445, 2022.
- AKERMANN, A. *et al.* Brewers' spent grain liquor as a feedstock for lactate production with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. **Engineering in Life Sciences**, v. 20, p. 168–180, 2020.
- ALAHYARIBEIK, S. *et al.* Bioconversion of chicken feather wastes by keratinolytic bacteria. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 135, p. 171–178, 2020.
- ALHOMODI, A. F. *et al.* Estimation of cellulase production by *Aureobasidium pullulans*, *Neurospora crassa*, and *Trichoderma reesei* during solid and submerged state fermentation of raw and processed canola meal. **Bioresource Technology Reports**, v. 18, Artigo 101063, 2022.
- ALLIED MARKET RESEARCH. **Enzymes market - Opportunities and forecast, 2021-2031**. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>. Acesso em: 15 jan. 2025.
- ALMARAZ-SÁNCHEZ, I. *et al.* Processing agroindustry by-products for obtaining value-added products and reducing environmental impact. **Journal of Chemistry**, v. 2022, Artigo 3656932, 2022.
- ALVES, F. E. S. B. *et al.* Valorization of an abundant slaughterhouse by-product as a source of highly technofunctional and antioxidant protein hydrolysates. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, p. 263–279, 2021.
- AMARAL, Y. M. S.; CASTRO, R. J. S. Unraveling the biological potential of chicken viscera proteins: a study based on their enzymatic hydrolysis to obtain hydrolysates with antioxidant properties. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 54, p. 809–818, 2024.
- ANCUȚA, P.; SONIA, A. Oil press-cakes and meals valorization through circular economy approaches: a review. **Applied Sciences**, v. 10, Artigo 7432, 2020.
- ARGUMEDO-DELIRA, R.; ALDUCIN-RUIZ, J. Recovery of silver from used X-ray film for *Sphingomonas paucimobilis* MX8. In: SUYAL, N. *et al.* (Ed). **Biomedical waste management: Bioremediation and Recycling**. Boston: De Gruyter, 2024. p. 273-282.

ARSLAN, B. *et al.* Antioxidant properties of bovine liver protein hydrolysates and their practical application in biphasic systems. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 104, p. 2980–2989, 2024.

ASGHER, M. *et al.* 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.

ASTUDILLO, A. *et al.* Recycling potato waste for the production of blue pigments by *Streptomyces lydicus* PM7 through submerged fermentation. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 11, Artigo 90, 2024.

AVCI, A. *et al.* Investigation of lentil flour utilization for the production of protease by *Bacillus subtilis* ZBP4. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 40, p. 75–81, 2022.

BAJAJ, B. K. *et al.* Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS-2 using cotton seed cake as nitrogen source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 204–209, 2013.

BARBOSA, J. B. *et al.* Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, p. 244–250, 2014.

BERNARDO, B. S. *et al.* Bioconversion of fish scales and feather wastes by *Bacillus* sp. CL18 to obtain protease and bioactive hydrolysates. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, p. 1045–1056, 2023.

BERRAQUERO-GARCÍA, C. *et al.* Valorisation of blood protein from livestock to produce haem iron-fortified hydrolysates with antioxidant activity. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 57, p. 2479–2486, 2022.

BHANGE, K. *et al.* Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 94–104, 2016.

BHAVIKATTI, J. S. *et al.* Statistical optimisation of protease production using a freshwater bacterium *Chryseobacterium cucumeris* SARJS-2 for multiple industrial applications. **3 Biotech**, v. 10, Artigo 279, 2020.

BILAL, M. *et al.* Biotechnological strategies and perspectives for food waste treatment: the role of lactic acid and microbial biomass. **Waste and Biomass Valorization**, 2024 (*no prelo*). <https://doi.org/10.1007/s12649-024-02705-y>.

BINDAL, S. *et al.* In-situ and cell-free goat hair hydrolysis by a consortium of proteases from *Bacillus licheniformis* strain ER-15: hair hydrolysate valorization by melanin extraction. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, p. 3265–3282, 2022.

BOBOUA, S. Y. B. *et al.* Valorization of animal waste proteins for agricultural, food production, and medicinal applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 8, Artigo 1366333, 2024.

BORATYŃSKI, F. *et al.* Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. **Scientific Reports**, v. 8, Artigo 10157, 2018.

BORRAJO, P. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of peptides extracted from meat by-products: a review. **Food Analytical Methods**, v. 12, p. 2401–2415, 2019.

BORRAJO, P. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of porcine liver hydrolysates using Flavourzyme. **Applied Sciences**, v. 10, Artigo 3950, 2020.

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**, v. 64, p. 4714–4745, 2024.

CĂLINOIU, L. F. *et al.* Solid-state yeast fermented wheat and oat bran as a route for delivery of antioxidants. **Antioxidants**, v. 8, Artigo 372, 2019.

CASAS-GODOY, L. *et al.* Revalorization of untreated Brewer's spent grain: novel and versatile feedstock to produce cellulases, lipases, and yeast biomass in a biorefinery approach. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, p. 1659–1670, 2023.

CAVELLO, I. A. *et al.* Enzymatic hydrolysis of gelatin layers of X-ray films and release of silver particles using keratinolytic serine proteases from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 1133–1139, 2013.

CHAVAN, S. *et al.* Bioconversion of organic wastes into value-added products: a review. **Bioresource Technology**, v. 344, Artigo 126398, 2022.

CHEN, Q. *et al.* Unlocking the potential of chicken liver byproducts: Identification of antioxidant peptides through *in silico* approaches and anti-aging effects of a selected peptide in *Caenorhabditis elegans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 272, Artigo 132833, 2024.

CHENG, D. *et al.* Sustainable enzymatic technologies in waste animal fat and protein management. **Journal of Environmental Management**, v. 284, Artigo 112040, 2021a.

CHENG, J.-H. *et al.* Potential of thermolysin-like protease A69 in preparation of bovine collagen peptides with moisture-retention ability and antioxidative activity. **Marine Drugs**, v. 19, Artigo 676, 2021b.

CHENG, W. *et al.* Wheat bran, as the resource of dietary fiber: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, p. 7269–7281, 2022.

CLERICI, N. J. *et al.* Agro-industrial by-products as substrates for the production of bacterial protease and antioxidant hydrolysates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, Artigo 102174, 2021.

CONTESINI, F. J. *et al.* An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, p. 321–334, 2018.

CORREIA, J. *et al.* Surfactin and poly- γ -glutamic acid co-production by *Bacillus velezensis* P#02 using a corn steep liquor-based medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 211, Artigo 109461, 2024a.

CORREIA, T. C. *et al.* Bioconversion of poultry residues for the production of proteases by *Aspergillus* sp. isolated from Amazonian forest soil. **Ciência Rural**, v. 54, Artigo e20220444, 2024b.

CUNHA, I. C. *et al.* Feather meal as a source of peptides with antioxidant activity from enzymatic hydrolysis. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, p. 421–430, 2023.

DAMGAARD, T. *et al.* Antioxidant capacity of hydrolyzed animal by-products and relation to amino acid composition and peptide size distribution. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6511–6519, 2015.

DANILOVA, I.; SHARIPOVA, M. The practical potential of Bacilli and their enzymes for industrial production. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, Artigo 1782, 2020.

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. *In vivo* bioactivities of food protein-derived peptides – a current review. **Current Opinion in Food Science**, v. 37, p. 120–129, 2021.

DOAN, C. T. *et al.* Potential of the liquid fermentation of fishery waste by *Paenibacillus elgii* for metalloprotease production. **Polymers**, v. 14, Artigo 741, 2022.

DOWNING, D. J. US Market Report. **Render**, v. 53, p. 10–18, 2024.

EL-SHAZLY, A. I. *et al.* Immobilization of alkaline protease produced by *Streptomyces rochei* strain NAM-19 in solid state fermentation based on medium optimization using central composite design. **3 Biotech**, v. 14, Artigo 161, 2024.

ELGAOUD, I. *et al.* Production of hydrolysates from swordfish (*Xiphias gladius*) head muscle as new protein source: evaluation of nutritional, antioxidant and functional properties. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, p. 1065–1080, 2024.

ELUMALAI, P. *et al.* Agricultural waste materials enhance protease production by *Bacillus subtilis* B22 in submerged fermentation under blue light-emitting diodes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 821–830, 2020.

EMATER/RS. **Safra de Inverno 2024 (2ª estimativa; novembro de 2024)**. Porto Alegre: EMATER/ASCAR, 2024.

EMRAN, M. A. *et al.* Production of detergent stable thermophilic alkaline protease by *Bacillus licheniformis* ALW1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, Artigo 101631, 2020a.

EMRAN, M. A. *et al.* Valorization of feather via the microbial production of multi-applicable keratinolytic enzyme. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, Artigo 101674, 2020b.

ENGIDAYEHU, A.; SAHU, O. Enzymatic recovery of silver from waste radiographic film: Optimize with response surface methodology. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 15, Artigo 100224, 2020.

ERKAN, D.; KAYALI, H. A. Replacement of soybean meal with animal origin protein meals improved ramoplanin a2 production by *Actinoplanes* sp. ATCC 33076. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 306–321, 2016.

FARIZANO, J. V. *et al.* Biotechnological use of dairy by-products for the production and microencapsulation of the food preservative Enterocin CRL35. **FEMS Microbiology Letters**, v. 369, Artigo fnac033, 2022.

FENG, Y. Y. *et al.* Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 153–160, 2001.

FERREIRA, A. *et al.* Brazilian poultry activity waste: Destinations and energetic potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 3081–3089, 2018.

FERREIRA, R. L. *et al.* Apparent digestibility coefficients of nutrients and energy from animal-origin proteins for *Macrobrachium rosenbergii* juveniles. **Fishes**, v. 9, Artigo 341, 2024.

FREITAS, A. C. *et al.* Bioprocess development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 173–182, 2015.

FREITAS, L. C. *et al.* From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products? **Resources, Conservation & Recycling**, v. 169, Artigo 105466, 2021.

GEMELLI, S. *et al.* Production, extraction and partial characterization of natural pigments from *Chryseobacterium* sp. kr6 growing on feather meal biomass. **Biomass**, v. 4, p. 530–542, 2024.

GHAHFARROKHI, S. S. M. *et al.* Collateral beauty in the damages: an overview of cosmetics and therapeutic applications of microbial proteases. **Archives of Microbiology**, v. 205, Artigo 375, 2023.

GOMES, T. A. *et al.* Increase in an intracellular β -galactosidase biosynthesis using *L. reuteri* NRRL B-14171, inducers and alternative low-cost nitrogen sources under submerged cultivation. **International Journal of Food Engineering**, v. 14, Artigo 20170333, 2018.

GÖRGÜÇ, A. *et al.* Bioactive peptides derived from plant origin by-products: biological activities and techno-functional utilizations in food developments – A review. **Food Research International**, v. 136, Artigo 109504, 2020.

GREENFIELD, L. M. *et al.* Synthesis of methods used to assess soil protease activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 158, Artigo 108277, 2021.

GURUMALLESH, P. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.

HAKIM, A. *et al.* 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.

HAMMAMI, A. *et al.* Response-surface methodology for the production and the purification of a new H₂O₂-tolerant alkaline protease from *Bacillus invictae* AH1 strain. **Biotechnology Progress**, v. 36, Artigo e2965, 2020.

HAMZA, T. A. Isolation of protease producing bacteria from soil for polyester and silver recovery from waste X-ray film. **American Journal of BioScience**, v. 5, p. 74–79, 2017.

HE, F. *et al.* Optimization of fermentation conditions for production of neutral metalloprotease by *Bacillus subtilis* SCK6 and its application in goatskin-dehairing. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, p. 789–799, 2022.

HOFFMANN, R. G. *et al.* Enzymatic processing of animal by-products: production of antioxidant hydrolysates with *Bacillus* sp. CL18 crude protease. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, p. 26737–26746, 2024.

HONG, C. *et al.* Effects of dual-frequency slit ultrasound on the enzymolysis of high-concentration hydrolyzed feather meal: Biological activities and structural characteristics of hydrolysates. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 89, Artigo 106135, 2022.

HUSSAIN, S. M. *et al.* A review on the prospects and potentials of fishmeal replacement with different animal protein sources. **International Aquatic Research**, v. 16, p. 7–16, 2024.

IBARZ-BLANCH, N. *et al.* Chicken slaughterhouse by-products: a source of protein hydrolysates to manage non-communicable diseases. **Trends in Food Science & Technology**, v. 139, Artigo 104125, 2023.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária (out.-dez. 2023)**. Brasília: IBGE, 2024.

ILIĆ, N. *et al.* Valorization of lignocellulosic wastes for extracellular enzyme production by novel Basidiomycetes: screening, hydrolysis, and bioethanol production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, p. 17175–17186, 2023.

IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Brasília: IPEA, 2012.

JAEGGER, A. *et al.* Brewer's spent yeast (BSY), an underutilized brewing by-product. **Fermentation**, v. 6, Artigo 123, 2020.

JAGADEESAN, Y. *et al.* A scientific version of understanding “Why did the chickens cross the road”? – A guided journey through *Bacillus* spp. towards sustainable agriculture, circular economy and biofortification. **Environmental Research**, v. 244, Artigo 117907, 2024.

JAVOUREZ, U. *et al.* Waste-to-nutrition: a review of current and emerging conversion pathways. **Biotechnology Advances**, v. 53, Artigo 107857, 2021.

JEAMPAKDEE, P. *et al.* The apoptotic and free radical-scavenging abilities of the protein hydrolysate obtained from chicken feather meal. **Poultry Science**, v. 99, p. 1693–1704, 2020.

JIN, H. *et al.* Direct bio-utilization of untreated rapeseed meal for effective iturin A production by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation. **PLoS ONE**, v. 9, Artigo e111171, 2014.

KAWSALUD, T. *et al.* Hydrothermal-enzymatic process for the bio-valorization of keratin wastes by thermostable keratinase from *Thermoactinomyces vulgaris* TK1-21. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 98, p. 1203–1214, 2023.

KAMAL, S. *et al.* Biotechnological valorization of proteases: from hyperproduction to industrial exploitation – A review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 36, p. 511–522, 2017.

KAREFYLLAKIS, D. *et al.* Multicomponent emulsifiers from sunflower seeds. **Current Opinion in Food Science**, v. 29, p. 35–41, 2019.

KASANA, R. C. *et al.* Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, p. 262–276, 2011.

KELLECI, K. *et al.* Valorization of beet-processing sugar factory by-products for in-situ gluconic acid production by using *Aspergillus niger* fermentation. **Sugar Tech**, v. 25, p. 410–421, 2023.

KERR, B. J. *et al.* Nutrient composition, digestible and metabolizable energy content, and prediction of energy for animal protein byproducts in finishing pig diets. **Journal of Animal Science**, v. 95, p. 2614–2626, 2017.

KESHAPAGA, U. R. *et al.* Characterization of high-yield *Bacillus subtilis* cysteine protease for diverse industrial applications. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 739–752, 2023.

KETNAWA, S. *et al.* Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 192, p. 34–42, 2016.

KHETKORN, W. *et al.* A low-cost production, characterization, and application of raw starch degrading enzyme from the thermophilic filamentous bacterium, *Laceyella sacchari* P43. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 12, p. 153–161, 2024.

KHONDEE, N. *et al.* Bioconversion of lignocellulosic wastes to zwitterionic biosurfactants by an alkaliphilic bacterium: Process development and product characterization. **Biomass and Bioenergy**, v. 165, Artigo 106568, 2022.

KIM, T. I. *et al.* Production of chitinase from *Escherichia fergusonii*, chitosanase from *Chryseobacterium indologenes*, *Comamonas koreensis* and its application in N-acetylglucosamine production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 1115–1121, 2018.

KOPPLIN, B. W. *et al.* Production of antioxidant hydrolysates from bovine caseinate and soy protein using three non-commercial bacterial proteases. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 42, p. 826–834, 2024.

KOTB, E. *et al.* 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.

ŁABA, W. *et al.* Evaluation of brewer's spent grain as a substrate for production of hydrolytic enzymes by keratinolytic bacteria. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 1389–1396, 2017.

LAFARGA, T. *et al.* Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, Artigo e12418, 2017.

LATAFAT *et al.* Isolation and screening of keratinolytic bacteria from feather dumping soil near in Lucknow and Kanpur city, North region of Indian. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 42, p. 68–76, 2024.

LEMES, A. C. *et al.* Biological approaches for extraction of bioactive compounds from agroindustrial by-products: a review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, Artigo 802543, 2022.

LERMEN, A. M. *et al.* Characterization and application of a crude bacterial protease to produce antioxidant hydrolysates from whey protein. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 53, p. 12–21, 2023.

LIGUORI, R. *et al.* Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 6129–6147, 2013.

LIMENEH, D. Y. *et al.* A comprehensive review on utilization of slaughterhouse by-product: current status and prospect. **Sustainability**, v. 14, Artigo 6469, 2022.

LIYA, S. M. *et al.* Optimized production of keratinolytic proteases from *Bacillus tropicus* LS27 and its application as a sustainable alternative for dehairing, destaining and metal recovery. **Environmental Research**, v. 221, Artigo 115283, 2023.

LONDOÑO-ZAPATA, L. *et al.* Valorization of the by-products of poultry industry (bones) by enzymatic hydrolysis and glycation to obtain antioxidants compounds. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, p. 4469–4480, 2022.

LÓPEZ-TRUJILLO, J. *et al.* Temperature and pH optimization for protease production fermented by *Yarrowia lipolytica* from agro-industrial waste. **Fermentation**, v. 9, Artigo 819, 2023.

LORENZO, J. M. *et al.* Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 136–147, 2018.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MACHADO, G. S. *et al.* Determination of the nutritional value of diet containing *Bacillus subtilis* hydrolyzed feather meal in adult dogs. **Animals**, v. 11, Artigo 3553, 2021.

MAHGOUB, S. *et al.* Recent development in bioactive peptides from plant and animal products and their impact on the human health. **Food Reviews International**, v. 39, p. 511–536, 2023.

MAHMOOD, M. S. *et al.* Expression and immobilization of trypsin-like domain of serine protease from *Pseudomonas aeruginosa* for improved stability and catalytic activity. **Proteins**, v. 90, p. 1425–1433, 2022.

MARCHUT-MIKOŁAJCZYK, O. *et al.* Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion. **Microbial Cell Factories**, v. 20, Artigo 40, 2021.

MARTINEZ, F. G. *et al.* Enzymatic hydrolysis as a valorization strategy of bovine lungs: Optimization of process variables and study of antioxidant capacity. **JSFA reports**, v. 3, p. 161–169, 2023.

MARTINEZ-BURGOS, W. J. *et al.* Agro-industrial wastewater in a circular economy: Characteristics, impacts and applications for bioenergy and biochemicals. **Bioresource Technology**, v. 341, Artigo 125795, 2021.

MARTINS, E. H. *et al.* Canola meal as a promising source of fermentable sugars: Potential of the *Penicillium glabrum* crude extract for biomass hydrolysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, Artigo 101713, 2020.

MASUI, A. *et al.* Feasibility study for decomposition of gelatin layers on X-ray films by thermostable alkaline protease from alkaliphilic *Bacillus* sp. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 813–815, 1999.

MATKAWALA, F. *et al.* Microbial alkaline serine proteases: Production, properties and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, Artigo 63, 2021.

MAURYA, K. K. *et al.* Standardization of process parameters for enhanced prodigiosin production from wheat bran using taguchi methodology. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, p. 6159–6170, 2024.

MAZHAR, H. *et al.* Optimization of low-cost solid-state fermentation media for the production of thermostable lipases using agro-industrial residues as substrate in culture of *Bacillus amyloliquefaciens*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 47, Artigo 102559, 2023.

MEKALA, K. P. R. *et al.* Valorization of biowastes as fermentative substrate for production of *Exiguobacterium* sp. GM010 pigment and toxicity effect in rats. **Food Chemistry**, v. 407, Artigo 135131, 2023.

MERUVU, H.; MERUVU, H. B. T. Anticoagulant activity of partially purified chitinase produced by *Citrobacter freundii* str. nov. haritD11 by fermentation of wheat bran coupled with fish scales. **SN Applied Sciences**, v. 1, Artigo 90, 2019.

MOONNEE, Y. A. *et al.* Keratinolytic protease from *Pseudomonas aeruginosa* for leather skin processing. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, Artigo 53, 2021.

MORITZ, J. S.; LATSHAW, J. D. Indicators of nutritional value of hydrolyzed feather meal. **Poultry Science**, v. 80, p. 79–86, 2001.

MOZEJKO-CIESIELSKA, J. *et al.* Production and characterization of polyhydroxyalkanoates by *Halomonas alkaliantarctica* utilizing dairy waste as feedstock. **Scientific Reports**, v. 13, Artigo 22289, 2023.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, Artigo 3380, 2021.

MUKHTAR, H.; HAQ, I. Comparative evaluation of agroindustrial byproducts for the production of alkaline protease by wild and mutant strains of *Bacillus subtilis* in submerged and solid state fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2013, Artigo 538067, 2013.

NADEEM, F. *et al.* Optimization of fermentative parameters for hyperproduction of protease from *Aspergillus viridi* using lignocellulosic byproducts as sole substrate. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, p. 3761–3771, 2024.

NAEEM, M. *et al.* A comprehensive review about bioactive peptides: sources to future perspective. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, Artigo 155, 2022.

NAGRATH, A. *et al.* The environmental impact of x-ray films: understanding the ecological footprint of medical imaging. **Journal of Population Therapeutics & Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 2093–2100, 2024.

NAVEED, M. *et al.* Protease – A versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. **Catalysis Letters**, v. 151, p. 307–323, 2021.

NGALIMAT, M. S. *et al.* review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microorganisms**, v. 9, Artigo 614, 2021.

NIKHITA, R.; SACHINDRA, N. M. Optimization of chemical and enzymatic hydrolysis for production of chicken blood protein hydrolysate rich in angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity. **Poultry Science**, v. 100, Artigo 101047, 2021.

PAL, K. *et al.* Microbial decomposition of crustacean shell for production of bioactive metabolites and study of its fertilizing potential. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 58915–58928, 2021.

PATEL, A. R. *et al.* Production optimisation and characterisation of extracellular protease secreted by newly isolated *Bacillus subtilis* AU-2 strain obtained from *Tribolium castaneum* gut. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, Artigo 101122, 2019.

PATHAK, A.P.; DESHMUKH, K. B. Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: a Lonar soda lake isolate. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, p. 569–576, 2012.

PEREIRA, A. S. *et al.* From agri-food wastes to enzyme production: a systematic review with *Methodi Ordinatio*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 15, p. 5843–5870, 2024.

PILAFIDIS, S. *et al.* Valorization of agro-industrial wastes and residues through the production of bioactive compounds by macrofungi in liquid state cultures: growing circular economy. **Applied Sciences**, v. 12, Artigo 11426, 2022.

PIOTROWSKA-DŁUGOSZ, A. *et al.* Responses of N-cycling enzyme activities and functional diversity of soil microorganisms to soil depth, pedogenic processes and cultivated plants. **Agronomy**, v. 12, Artigo 264, 2022.

PIRES, C. *et al.* Protein hydrolysates from salmon heads and Cape hake by-products: comparing enzymatic method with subcritical water extraction on bioactivity properties. **Foods**, v. 13, Artigo 2418, 2024.

POPE, M. *et al.* Quantifying the value of soybean meal in poultry and swine diets. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 32, Artigo 100337, 2023.

PRAMUALKIJJA, T. *et al.* Valorization of chicken slaughterhouse by-products: Production and properties of chicken trachea hydrolysates using commercial proteases. **International Journal of Food Properties**, v. 24, p. 1642–1657, 2021.

QAMAR, S. A. *et al.* Immobilization of alkaline protease from *Bacillus brevis* using Ca-alginate entrapment strategy for improved catalytic stability, silver recovery, and dehairing potentialities. **Catalysis Letters**, v. 150, p. 3572–3583, 2020.

RATHOD, B. G. *et al.* Production and characterization of a halotolerant protease from *Bacillus siamensis* F2 for chicken byproducts valorization. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 14, p. 1343–1358, 2024.

RAVINDRAN, R. *et al.* A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, Artigo 93, 2018.

RAZZAQ, A. *et al.* Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, Artigo 110, 2019.

REHMAN, S. *et al.* Optimization of process parameters for enhanced production of lipase by *Penicillium notatum* using agricultural wastes. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 19580–19589, 2011.

ROJAS, L. F. *et al.* Agro-industrial waste enzymes: perspectives in circular economy. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 34, Artigo 100585, 2022.

ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 13105–13113, 2020.

SADH, P. K. *et al.* Fermentation: a boon for production of bioactive compounds by processing of food industries wastes (by-products). **Molecules**, v. 23, Artigo 2560, 2018.

SAMEENA, M. F. *et al.* *Brevundimonas vesicularis* MF276770, a new strain for gelatinase production by utilizing chicken feet gelatin. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, p. 278–290, 2019.

SARAVANAN, K. *et al.* Biodegradation of keratin waste by *Bacillus velezensis* HFS_F2 through optimized keratinase production medium. **Current Microbiology**, v. 81, Artigo 179, 2024.

SARKAR, G.; SUTHINDHIRAN, K. Extraction and characterization of alkaline protease from *Streptomyces* sp. GS-1 and its application as dehairing agent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, Artigo 101590, 2020.

SELGE, B. *et al.* Processing of linseed straw: state-of-the-art and further perspectives. **Industrial Crops and Products**, v. 222, Artigo 119518, 2024.

SHAHIDI, F; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015.

SHANKAR, S. *et al.* Recovery of silver from waste X-ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 6, p. 60–69, 2010.

SHARMA, K. M. *et al.* Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115–126, 2017.

SHARMA, M. *et al.* A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. **Industrial Biotechnology**, v. 15, p. 69-78, 2019.

SHARMA, I.; KANGO, N. Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1046–1056, 2021.

SHARMA, S. *et al.* Multipotential alkaline protease from a novel *Pyxidicoccus* sp. 252: ecofriendly replacement to various chemical processes. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, Artigo 722719, 2021.

SHARMA, V. *et al.* Agro-industrial food waste as a low-cost substrate for sustainable production of industrial enzymes: a critical review. **Catalysts**, v. 12, Artigo 1373, 2022.

SHIKHA, S. *et al.* Bioprocess for enhanced production of a fibrinolytic protease with high thrombolytic potential from *Aspergillus flavus* SH71. **Research Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 49–63, 2023.

SIDDHARTHAN, N. *et al.* A novel feather-degrading bacterial isolate *Geobacillus thermodenitrificans* PS41 isolated from poultry farm soil. **Archives of Microbiology**, v. 204, Artigo 565, 2022.

SIERRA, L. *et al.* Antioxidant peptides derived from hydrolysates of red tilapia (*Oreochromis* sp.) scale. **LWT - Food Science and Technology**, v. 146, Artigo 111631, 2021.

SILVA, V. G.; CASTRO, R. J. S. Enzymatic hydrolysis of proteins from chicken viscera in the presence of an ionic liquid enhanced their antioxidant properties. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 3183–3193, 2020.

SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Medium optimization for enhanced production of protease with industrially desirable attributes from *Bacillus subtilis* K-1. **Chemical Engineering Communications**, v. 202, p. 1051–1060, 2015.

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, 2017a.

SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Agroindustrial/forestry residues as substrates for production of thermoactive alkaline protease from *Bacillus licheniformis* K-3 having multifaceted hydrolytic potential. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 453–462, 2017b.

SIQUEIRA, M. U. *et al.* Brazilian agro-industrial wastes as potential textile and other raw materials: a sustainable approach. **Materials Circular Economy**, v. 4, Artigo 9, 2022.

SISA, A. *et al.* Evaluation of by-products from agricultural, livestock and fishing industries as nutrient source for the production of proteolytic enzymes. **Heliyon**, v. 9, Artigo e20735, 2023.

SISA, A. *et al.* Valorization of yellowfin tuna tails: from proteolytic enzyme production to gelatin and antioxidant hydrolysate extraction. **Foods**, v. 13, Artigo 2034, 2024.

SOLANKI, P. *et al.* Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v.11, Artigo 428, 2021.

SONG, P. *et al.* Microbial proteases and their applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, Artigo 1236368, 2023.

SOUZA, T. S. P. *et al.* Microbial peptidase in food processing: current state of the art and future trends. **Catalysis Letters**, v. 153, p. 114–137, 2023.

SPAGGIARI, M. *et al.* Rice bran by-product: from valorization strategies to nutritional perspectives. **Foods**, v. 10, Artigo 85, 2021.

TACIAS-PASCACIO, V. G. *et al.* Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2143–2196, 2020.

TANEJA, A. *et al.* Value addition employing waste bio-materials in environmental remedies and food sector. **Metabolites**, v. 13, Artigo 624, 2023.

TAVANO, O. L. *et al.* Biotechnological applications of proteases in food technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 412–436, 2018.

TEIGISEROVA, D. A. *et al.* Closing the loop of cereal waste and residues with sustainable technologies: An overview of enzyme production via fungal solid-state fermentation. **Sustainable Production and Consumption**, v. 27, p. 845–857, 2021.

THAPA, S. *et al.* Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular Biotechnology*, v. 61, p. 579–601, 2019.

THE SILVER INSTITUTE. **World Silver Survey**. Washington: The Silver Institute and Metals Focus, 2024.

THOMAS, N. N. *et al.* Isolation and characterization of a protease from *Bacillus* sp. **Materials Today: Proceedings**, v. 41, p. 685–691, 2021.

TOLDRÁ-REIG, F. *et al.* Trends in biodiesel production from animal fat waste. **Applied Sciences**, v. 10, Artigo 3644, 2020.

TORRES-LEÓN, C. *et al.* Recent advances on the microbiological and enzymatic processing for conversion of food wastes to valuable bioproducts. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 40–45, 2021.

TSOUKO, E. *et al.* Bioconversion of underutilized brewing by-products into bacterial cellulose by a newly isolated *Komagataeibacter rhaeticus* strain: a preliminary evaluation of the bioprocess environmental impact. **Bioresource Technology**, v. 387, Artigo 129667, 2023.

UGWUOJI, E. T. *et al.* Detergent-stable amylase production by *Paenibacillus lactis* strain OPSA3 isolated from soil; optimization by response surface methodology. **Biotechnology Reports**, v. 39, Artigo e00808, 2023.

UMEGO, E. C.; BARRY-RYAN, C. Review of the valorization initiatives of brewing and distilling by-products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, p. 8231–8247, 2024.

URRIQUIA, J. C. *et al.* Optimization of silver recovery from waste X-ray radiographic films by oxalic acid extraction with response surface methodology. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, Artigo 100294, 2020.

VÁZQUEZ, J. A. *et al.* Production, characterization, and bioactivity of fish protein hydrolysates from aquaculture turbot (*Scophthalmus maximus*) wastes. **Biomolecules**, v. 10, Artigo 310, 2020.

VERMA, A. *et al.* Alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. RS1 mitigates industrial pollution. **Protoplasma**, v. 251, p. 711–718, 2014.

VOGEL, C. *et al.* Swine plasma peptides obtained using pepsin: In silico and in vitro properties and biological activities. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 41, p. 108–122, 2023.

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.

WONGSIRICHOT, P. *et al.* Recent advances in rapeseed meal as alternative feedstock for industrial biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 180, Artigo 108373, 2022.

WU, Y.-H. S.; CHEN, Y.-C. Trends and applications of food protein-origin hydrolysates and bioactive peptides. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 30, Article 1, 2022.

XIE, F. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* 35 M can exclusively produce and secrete proteases when cultured in soybean-meal-based medium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 209, Artigo 112188, 2022.

XU, M. *et al.* Bioconversion of biowaste into renewable energy and resources: a sustainable strategy. **Environmental Research**, v. 214, Artigo 113929, 2022.

YAFETTO, L. *et al.* Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case. **Heliyon**, v. 9, Artigo e14814, 2023.

YAO, D. *et al.* Production and characterization of alkaline protease from hemoglobin-degrading *Bacillus pumilus* NJM4 to produce fermented blood meal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 626–631, 2012.

YEGIN, S. *et al.* Exploitation of agricultural wastes and by-products for production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 xylanase: screening, bioprocess optimization and scale up. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 999–1010, 2017.

ZHANG, H. *et al.* Optimization of enzymatic hydrolysis of *Perilla* meal protein for hydrolysate with high hydrolysis degree and antioxidant activity. **Molecules**, v. 27, Artigo 1079, 2022.

ZHENG, Z. *et al.* Effect of microwave combined with ultrasonic pretreatment on flavor and antioxidant activity of hydrolysates based on enzymatic hydrolysis of bovine bone. **Food Bioscience**, v. 44, Artigo 101399, 2021.

ZOU, T.-B. *et al.* The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**, v. 21, Artigo 72, 2016.