

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE
PROTEASES OBTIDAS DE UMA NOVA ESPÉCIE DE *Aspergillus ssp.* ISOLADO DO
BIOMA CAATINGA-PE**

**APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN LA
PRODUCCIÓN DE PROTEASA OBTENIDA DE UNA NUEVA ESPECIE DE
Aspergillus ssp. AISLADO DEL BIOMA CAATINGA-PE**

**USE OF AGROINDUSTRIAL WASTE IN THE PRODUCTION OF PROTEASES
OBTAINED FROM A NEW SPECIES OF *Aspergillus ssp.* ISOLATED FROM THE
CAATINGA-PE BIOME**

Luiz Henrique Svintiskas Lino¹; Pietra Gicia Oliveira Gomes da Silva²; Mirthes Ferreira de Albuquerque³
Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa⁴; Daniela de Araújo Viana Marques⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0069>

RESUMO

As proteases são enzimas responsáveis por realizar a hidrólise das ligações peptídicas presentes nas proteínas. Essas enzimas foram as primeiras a serem exploradas no campo da biotecnologia e possuem uma ampla importância, sendo utilizadas em diversos setores, desde a fabricação de detergentes até o potencial uso na indústria farmacêutica. A produção em larga escala de proteases é realizada principalmente por microrganismos, destacando-se os fungos filamentosos. Esses fungos possuem a capacidade de secretar as enzimas para o meio extracelular, o que facilita o processo de purificação. Diante disso, o objetivo deste estudo foi produzir proteases a partir de um fungo filamentoso isolado do bioma Caatinga. Para este trabalho o fungo foi reativado da solução de óleo mineral em meio BDA (Batata – Dextrose – Ágar) sendo mantido por 7 dias a 30°C permitindo assim a esporulação. Os parâmetros utilizados para a fermentação em estado sólido foram de 10 gramas de farelo de trigo como substrato, pH 8,0 e 70% de umidade. Em seguida foi realizado a obtenção do extrato bruto, a precipitação com solventes orgânicos e as determinações da proteína e da atividade proteásica de todas as frações. A maior atividade proteásica foi obtida no tratamento com acetona com 100 U/mL e 247 µg/mL de proteínas. Portanto, o fungo isolado do bioma caatinga apresenta um grande potencial na produção de proteases.

Palavras-Chave: Enzimas; proteínas; fungos filamentosos.

RESUMEN

Las proteasas son enzimas encargadas de llevar a cabo la ruptura hidrolítica de los enlaces peptídicos presentes en las proteínas. Estas enzimas fueron las primeras en ser exploradas en el campo de la biotecnología y tienen una gran importancia, siendo utilizadas en varios sectores, desde la fabricación de detergentes hasta su potencial uso en la industria farmacéutica. La producción a gran escala de proteasas la llevan a cabo principalmente microorganismos, especialmente hongos filamentosos. Estos hongos tienen la capacidad de secretar enzimas al medio extracelular, lo que facilita el proceso de purificación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue producir proteasas a partir de un hongo filamentoso aislado del bioma caatinga. Para este trabajo se reactivó el hongo a partir de la solución de aceite mineral en medio PDA (Papa – Dextrosa – Agar), manteniéndose por 7 días a 30°C, permitiendo así la esporulación, los parámetros utilizados para la fermentación en estado sólido con salvado de trigo

¹ Bolsista de pós graduação, Universidade de Pernambuco, luiz.svintiskas@upe.br

² Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, pietra.givcia@upe.br

³ Médica veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, mirthes.fa@gmail.com

⁴ Prof^a Titular, Universidade de Pernambuco, romero_brandao@yahoo.com.br

⁵ Prof^a Titular, Universidade de Pernambuco, daniela.viana@upe.br

como sustrato y con parámetros de 10 gramos de salvado de trigo, pH 8,00 y 70% de humedad. Luego, se preparó el extracto crudo y se trató con solventes orgánicos. Y realizando la dosificación proteica, proteasa y actividad colagenolítica de todas las fracciones. La mayor actividad proteasa se obtuvo en el tratamiento con Acetona 100U/ml y la mayor actividad colagenolítica 41,96U/mg así como la menor dosificación de proteínas 0,247mg/ml. Por lo tanto, el hongo aislado del bioma caatinga tiene un gran potencial para producir proteasas.

Palabras Clave: Enzimas; proteínas; hongos filamentosos.

ABSTRACT

Proteases are enzymes responsible for carrying out the hydrolytic breakdown of peptide bonds present in proteins. These enzymes were the first to be explored in the field of biotechnology and have a wide importance, being used in several sectors, from the manufacture of detergents to the potential use in the pharmaceutical industry. The large-scale production of proteases is carried out mainly by microorganisms, especially filamentous fungi. These fungi have the ability to secrete enzymes into the extracellular environment, which facilitates the purification process. Therefore, the objective of this study was to produce proteases from a filamentous fungus isolated from the caatinga biome. For this work, the fungus was reactivated from the mineral oil solution in PDA (Potato – Dextrose – Agar) medium, being kept for 7 days at 30°C, thus allowing sporulation, the parameters used for solid state fermentation with wheat bran as substrate and with parameters of 10 grams of wheat bran, pH 8.00 and 70% moisture. Then, the crude extract was prepared and treated with organic solvents. And carrying out the protein dosage, protease and collagenolytic activity of all fractions. The highest protease activity was obtained in the treatment with Acetone 100U/ml and the highest collagenolytic activity 41.96U/mg also the lowest dosage of proteins 0.247mg/ml. Therefore, the fungus isolated from the caatinga biome has a great potential for producing proteases.

Keywords: Enzymes; proteins; filamentous fungi.

INTRODUÇÃO

Estima-se que a produção mundial de resíduos agroindustriais atinja 1,3 bilhão de toneladas por ano, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO). Além disso, cerca de um terço dos alimentos potencialmente destinados ao consumo humano é desperdiçado, seja como resíduos provenientes do processamento ou devido a perdas na cadeia produtiva (FAO 2018).

Dessa forma, as indústrias acabam descartando quantidades significativas de resíduos agroindustriais, porém, aproveitar esses resíduos é uma maneira de minimizar os impactos ambientais decorrentes do seu descarte inadequado. Além disso, esses resíduos podem se tornar matérias-primas interessantes para a produção de produtos com potencial valor agregado. Uma abordagem para o aproveitamento desses resíduos é o processo biotecnológico, que permite a produção de produtos como biocombustíveis (etanol, butanol e hidrogênio) e produtos químicos valiosos, tais como ácidos orgânicos (como ácido butírico, ácido succínico, ácido itacônico, ácido lático, ácido fumárico e ácido málico), triacilgliceróis, polihidroxicanoatos e também enzimas como as proteases (MARZO et al., 2019).

As proteases são um grupo de enzimas de extrema importância, com aplicações abrangentes em diversos setores industriais, como têxtil, farmacêutico, alimentício e detergentes. Na indústria de alimentos, essas enzimas têm diversas utilizações, tais como na

panificação, onde contribuem para reduzir o tempo de mistura e facilitar a manipulação da massa. São empregadas na produção de laticínios para modificar as propriedades funcionais das proteínas do leite e acelerar o processo de cura do queijo. Além disso, as proteases são usadas para amaciar carnes, reduzir a turbidez causada por proteínas em sucos de frutas e bebidas alcoólicas, preparar hidrolisados de soja, gelatina e caseína, e também para a recuperação de proteína de carne. Possuem grande importância e aplicabilidade na indústria farmacêutica (LADEIRA et al. 2012; ORLANDELLI et al. 2012; SOUZA, 2015; JOHNSON et al. 2022; SMITH et al. 2023).

A utilização de processos fermentativos para obter enzimas proteolíticas apresenta vantagens em comparação às fontes animais e vegetais. Esses processos são mais econômicos, oferecem altos rendimentos e permitem a produção em larga escala. No entanto, os extratos fermentados podem conter outras biomoléculas, como outras enzimas, ácidos orgânicos, pigmentos e compostos fenólicos. A presença desses contaminantes pode afetar o potencial biotecnológico das enzimas e, conseqüentemente, sua viabilidade econômica. Portanto, é necessário adotar técnicas eficientes de extração e purificação que preservem a estrutura e funcionalidade nativa das enzimas (SOCCOL et al., 2017; MARZO et al., 2019; AMARAL et al., 2020). Desta forma, o trabalho teve como objetivo obter proteases produzidas por uma espécie de *Aspergillus* spp. isolado do bioma caatinga e purificar parcialmente através da técnica de precipitação.

REFERENCIAL TEÓRICO

Bioma Caatinga

A Caatinga é um bioma exclusivo do Brasil, localizado principalmente na região nordeste do país. É caracterizado por um clima semiárido, com longos períodos de seca e uma vegetação adaptada a essas condições extremas. Apesar das adversidades, a Caatinga abriga uma diversidade de microrganismos com potencial biotecnológico.

Os microrganismos isolados na Caatinga têm despertado interesse na área da biotecnologia devido à sua capacidade de produzir enzimas, metabólitos secundários e outros compostos com aplicações industriais e farmacêuticas. Esses microrganismos têm sido objeto de estudos visando a descoberta de novos recursos biotecnológicos, como enzimas industriais, biocombustíveis, compostos antimicrobianos e antioxidantes (COSTA, M.S. et al 2018; COSTA, M.S. et al., 2022)

Uma pesquisa realizada por Pessoa Jr. et al. (2017) investigou isolados da Caatinga e identificou uma diversidade de bactérias e fungos com potencial biotecnológico. Os fungos

filamentosos, em particular, têm sido objeto de estudos devido à sua capacidade de secretar enzimas extracelulares, facilitando sua aplicação industrial. Os pesquisadores destacaram a importância da preservação desse bioma para a conservação da biodiversidade microbiana e o potencial para o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas.

Outro estudo realizado por Batista et al. (2020) isolou e caracterizou um fungo filamentoso da Caatinga, identificado como *Aspergillus tamaritii*, que apresentou potencial para a produção de frutotransferase, uma enzima com aplicações na indústria de alimentos. Essa descoberta ressalta o potencial biotecnológico dos organismos isolados na Caatinga e sua capacidade de produzir enzimas de interesse industrial.

Essas pesquisas demonstram que a Caatinga é um importante reservatório de microrganismos com potencial biotecnológico e ressaltam a necessidade de preservação desse bioma para a descoberta de novos recursos biotecnológicos. A valorização da biodiversidade microbiana desse ecossistema pode contribuir para o desenvolvimento sustentável da região e oferecer oportunidades de inovação e avanços na indústria biotecnológica.

Resíduos agroindustriais

O Brasil possui uma economia altamente dependente da agricultura e é um dos principais produtores mundiais de café, cana-de-açúcar, soja, trigo e outros produtos agrícolas. Essa atividade gera uma grande quantidade de resíduos e subprodutos. Apenas em 2019, foram produzidas cerca de 3 milhões de toneladas de café e 5,2 milhões de toneladas de trigo, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2019), aproximadamente 14% dos alimentos são perdidos ou desperdiçados antes de chegar aos consumidores finais, e os cereais e leguminosas são os principais alimentos afetados por esse desperdício.

Os resíduos agroindustriais são gerados durante o processamento de alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar, álcool, entre outros. Esses resíduos podem ser líquidos (águas residuárias) ou sólidos, e sua produção é geralmente sazonal, dependendo da maturidade da cultura ou oferta de matéria-prima (DIAZ; BLANDINO; CARO, 2018; KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2017; MARZO et al., 2019). Os resíduos orgânicos incluem rejeitos de culturas, dejetos animais e resíduos das agroindústrias, enquanto os resíduos inorgânicos são embalagens de agrotóxicos, fertilizantes e insumos farmacêuticos veterinários, além dos resíduos domésticos da área rural (BOSSA et al., 2019).

Apesar de não terem aplicação direta, esses resíduos são ricos em nutrientes essenciais para a síntese de produtos bioativos por microrganismos. Essa diversidade de subprodutos

apresenta um potencial significativo para a produção de diferentes produtos (PANESAR et al., 2016).

Fermentação em estado sólido

A produção de proteases por microrganismos pode ocorrer por meio de duas principais técnicas de fermentação: Fermentação Submersa (FS) e Fermentação em Estado Sólido (FES). Na FS, os microrganismos crescem em meios líquidos, enquanto na FES eles se desenvolvem em substratos sólidos com umidade suficiente para sustentar o crescimento dos organismos, especialmente fungos filamentosos (SOCCOL et al., 2017; SANTOS et al., 2018).

A principal diferença entre as duas técnicas está na quantidade de água livre presente. Na FS, a maior quantidade de água permite que os metabólitos sejam diluídos, o que pode tornar o processo de recuperação e purificação do produto (etapa de *downstream*) mais demorado e caro. Por outro lado, na FES, a menor quantidade de água reduz os custos de desidratação nas etapas finais do processo e também diminui o consumo de energia necessário para a esterilização, uma vez que é exigida menos energia para alcançar a temperatura de esterilização (TAVANO, 2017; SOCCOL et al., 2017).

Portanto, a escolha entre FS e FES na produção de proteases leva em consideração o custo, eficiência e características específicas do microrganismo produtor, bem como a viabilidade econômica e a qualidade do produto final (MANAN e WEBB, 2017; SOCCOL et al., 2017).

Vários estudos demonstraram que os fungos filamentosos são potenciais produtores de proteases na FES em comparação com a Fermentação Submersa (FS). Como exemplo, um estudo que utilizou o fungo *Aspergillus oryzae* e um substrato à base de bagaço de tomate obteve uma atividade enzimática de 21309 U/g na FES, enquanto na FS foi de 2343,5 U/g, o que significa que a FES foi cerca de 9 vezes mais eficiente. Outro estudo realizado com o fungo *A. oryzae* por Sandhya et al. (2005) mostrou uma produção de proteases 3,5 vezes maior na FES em comparação com a FS. Esses resultados evidenciam a eficiência da FES como uma técnica promissora para a produção de enzimas, especialmente quando utilizada com fungos filamentosos.

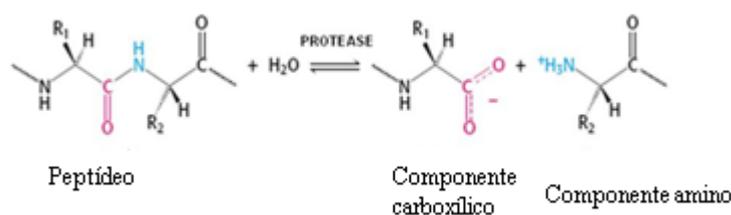
A FES oferece várias vantagens em relação aos processos fermentativos convencionais em meio líquido, como maior concentração celular, maior produtividade de metabólitos, menor consumo de água, menor geração de resíduos líquidos e menor custo operacional. Além disso, a FES permite a utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais como fontes de carbono, contribuindo para a redução do desperdício e promovendo a sustentabilidade (SMITH, A.B., JOHNSON, C.D., 2020).

Diversos microrganismos têm sido utilizados na FES, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Entre eles, os fungos filamentosos são os mais comumente empregados devido à sua capacidade de se desenvolver em substratos sólidos e secretar uma variedade de enzimas (RODRIGUEZ, E.F., MARTINEZ, G.T. 2018).

Proteases

As proteases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas, convertendo proteínas em peptídeos ou aminoácidos livres. Elas podem ser classificadas em endopeptidases e exopeptidases, de acordo com o modo de ação, e em diferentes grupos com base na estrutura química do centro ativo (SOUZA et al., 2015; TAVANO, 2017). A hidrólise enzimática de proteínas é uma alternativa mais sustentável em comparação aos processos químicos, devido às condições suaves de pH e temperatura, menor consumo de água e energia, além do armazenamento mais eficiente e alta especificidade pelo substrato (AGUILAR e SATO, 2018; FIORMARKETS, 2019).

Figura 01: Esquema da função da protease, processo de hidrólise.



Fonte: BERG et al., 2004.

As proteases desempenham papéis vitais em processos metabólicos, como a digestão de proteínas, coagulação sanguínea e apoptose celular. Elas são encontradas em uma variedade de organismos, sendo os microrganismos a principal fonte de proteases industriais devido à facilidade de manipulação genética, crescimento rápido e produção em larga escala em fermentadores industriais (CHANGYOU-SHI et al., 2016; BATISTA et al., 2020).

Essas enzimas têm uma grande demanda comercial e são amplamente utilizadas em diversos setores industriais, como processamento de alimentos e bebidas, indústria farmacêutica, produção de biocombustíveis, produtos de limpeza, papel e couro, e biologia molecular. Exemplos de proteases de interesse comercial incluem proteases alcalinas para produtos de limpeza, colagenases e enzimas fibrinolíticas para aplicações farmacêuticas, e enzimas como a papaína para amaciamento de carnes (PESSOA-JR et al., 2020).

Prevê-se um aumento na demanda por proteases devido às suas inúmeras aplicações, e o mercado global de enzimas é esperado para apresentar um crescimento significativo até 2026, especialmente no segmento de microrganismos (FIORMARKETS, 2019).

Colagenase

As colagenases são enzimas responsáveis pela manutenção e regeneração de órgãos e tecidos. Elas têm a capacidade de clivar o colágeno nativo ou desnaturado em condições fisiológicas de pH e temperatura, tanto in vivo quanto in vitro. Essas enzimas não apresentam atividade em relação a outras proteínas (FERREIRA et al., 2016).

Fisiologicamente, as colagenases podem ser divididas em dois grupos: metalcolagenases, que são colagenases de vertebrados consideradas "verdadeiras"; e serinocolagenases, que têm a capacidade de clivar a porção não helicoidal do colágeno (OLIVEIRA et al., 2017; SORUSHANOVA et al., 2018). As metalcolagenases pertencem à família das metaloproteases e são capazes de degradar a matriz extracelular. Todas as enzimas dessa família são secretadas como pró-enzimas ligadas à membrana celular. Elas têm massa molecular entre 30 e 150 kDa e dependem de íons zinco e cálcio para se manterem estáveis. Essas enzimas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, como reparação tecidual e cicatrização de feridas (SORUSHANOVA et al., 2018).

As serinocolagenases, por sua vez, são geralmente ativas em pH alcalino e neutro, dependem de cálcio e têm massa molecular entre 24 e 30 kDa. Essas enzimas são capazes de clivar a tripla hélice de certos tipos de colágeno e estão relacionadas à produção de hormônios, degradação de outras proteínas e coagulação sanguínea (DABOOR et al., 2010; FERREIRA et al., 2016).

Ambos os tipos de colagenases desempenham papéis importantes em vários processos fisiológicos e têm potencial aplicação no desenvolvimento de pomadas tópicas ou biofilmes para regeneração dérmica ou aceleração da cicatrização de queimaduras (SORUSHANOVA et al., 2018).

METODOLOGIA

Obtenção do fungo

Uma espécie de *Aspergillus spp.* isolados do bioma da Caatinga do Sertão pernambucano e foi isolada pelo método de esgotamento e seguiu para a Coleção de Culturas – MICOTECA URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para identificação. Esse microrganismo está mantido em meio inclinado BDA (Batata Dextrose Agar) para a esporulação.

Meio de manutenção e preparação do inóculo

A inoculação do microrganismo foi realizada em Erlenmeyers de 125mL que continham meio de cultura BDA já esterilizados, onde foram incubados a 30°C em estufa por 7 dias, até

que ocorresse a esporulação. Os esporos foram suspensos com a adição de solução de NaCl (0,9%) e previamente esterilizados. Em seguida, foi realizada a contagem de esporos em câmara de Neubauer, até uma quantidade suficiente para concentração final 10^7 esporos/mL, e foram inoculados nos Erlenmeyers contendo substrato, farelo de trigo obtido no comércio local e autoclavado, para a produção de protease por fermentação em estado sólido (FES).

Produção de proteases por fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada em Erlenmeyer de 125 ml e a concentração de esporos utilizada como inóculo será de 10^7 esporos/grama. Para determinação e garantia da secagem total, todos os substratos foram mantidos um período de uma semana em temperatura ambiente. Os parâmetros utilizados na fermentação foram, 10 gramas de farelo de trigo, pH 8,0 e 70% de umidade, A determinação de umidade foi realizada de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBON et al., 2008).

Figura 02: A; Erlenmeyer contendo farelo de trigo autoclavado. B; farelo de trigo após a inoculação e ajuste da umidade e pH do meio.



Fonte: Própria (2023).

Processo de extração das proteases

A extração das proteases foi realizada em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (7,5 mL/g substrato) em mesa agitadora a 80 rpm durante 5 minutos. Em seguida, os líquidos metabólicos foram filtrados em gaze e com auxílio de bomba à vácuo em papel filtro de 0,22 μ m

Figura 03: esquema de filtração do líquido metabólico, após eluição do fermentado com tampão.



Fonte: Própria (2023).

Precipitação com solventes orgânicos

O processo de precipitação foi realizado empregando a concentração de 70 % dos solventes orgânicos (etanol e acetona). Em seguida, foram homogeneizados e mantidos no refrigerador por um período de 10 min e em seguida centrifugados por 10 min a 4° C numa rotação de 6000 rpm. Após esse processo, foram descartados o sobrenadante e feito a suspensão do precipitado com 1 mL de tampão (o mesmo usado para a preparação do extrato).

Dosagem de proteínas

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Smith et al. 1985 utilizando o ácido bicinonínico-BCA. A albumina utilizada como proteína padrão na curva de calibração.

Atividade proteásica

A determinação da atividade proteásica foi realizada segundo Ginter (1979). Para a reação foram adicionados 150uL da amostra em uma solução contendo 250uL do substrato azocaseína a 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4. Essa mistura será incubada por 1h a 37°C. A reação será interrompida com a adição de 1000uL de ácido tricloracético (TCA) (10%,

p/v) e em seguida centrifugada por 10 min a 4.000 rpm. Dessa solução, reservar 800uL e adicionar 200uL de uma solução de NaOH 1,8M. A leitura da absorbância será realizada em espectrofotômetro(420nm).

Atividade colagenolítica

A determinação da atividade colagenolítica vai ser realizada de acordo com a metodologia modificada, descrita por Chavira et al. (1984). A qual se inicia com a pesagem de 0,005 g do substrato, o azocolágeno, e sua posterior lavagem com o tampão Tris-HCl a 0,1M e pH 7,8. A lavagem vai ser realizada até o substrato não liberar cor após a centrifugação. Para reação enzimática, 50 µL do líquido metabólico e 950 µL de tampão Tris-HCl a 0,1M e pH 7,8 vão ser acrescentados ao substrato lavado. A reação ocorrerá à temperatura de 37°C por uma hora. Passado este tempo, cada ensaio será centrifugado e 1 mL do sobrenadante será retirado para a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda a 520 nm, portanto 1 unidade de atividade enzimática (U) vai ser definida por um aumento de 0,01 na absorbância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade proteásica obtidos da precipitação com solventes orgânicos, etanol e acetona na concentração de 70%, oriundos da fermentação, estão expressos na Tabela 1.

Tabela 01: Resultado das atividades.

Ensaio	Atividades
Extrato Bruto (I Proteínas (EB))	76,66 U/ml 0,88mg/ml
Etanol (E) Ptoteínas (E)	90 U/ml 0,99 mg/ml
Acetona (A) Proteínas (A)	100 U/ml 0,247mg/ml

Fonte: Acervo próprio.

Com os dados obtidos, foi possível observar que o melhor solvente foi a acetona, todavia os valores da atividade proteásica superaram os valores do extrato bruto sem passar pelo processo de pre-purificação. No estudo de Santos et al., 2020 a maior atividade proteásica foi obtida por um *Aspergillus* ssp, sendo de 256 U/mL, utilizando borra de café como substrato. Em outro estudo, o *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279, também isolado do bioma Caatinga, apresentou valores de atividade da enzima inferiores (24 U/mL) ao do presente trabalho

(FERREIRA et al., 2020).

Além das atividade proteolíticas também foi evidenciado a atividade colagenolítica das amostras de extrato bruto, e dos tratamentos com etanol e acetona (1,8 U/mg, 14,16 U/mg e 41,96 U/mg respectivamente), na literatura é evindeniado a atividade colagenolítica de fungos isolados do bioma Caatinga no trabalho de Wanderley, M.C.A et al., (2017); Santos, A.L., (2014); Ferreira, C.M.O. et al., (2016).

CONCLUSÕES

Portanto, pode-se concluir que a espécie de *Aspergillus ssp*, isolado do bioma Caatinga, possui potenciais atividades proteásica e colagenolítica sendo a precipitação por solventes orgânicos, etanol e acetona um método eficaz para concentração e obtenção dessas proteínas.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BATISTA, J. M. S. et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase - rich extract produced by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, 2020.
- BOSSA, L. F. et al. Resíduos agroindustriais para produção de produtos biotecnológicos. In: **Agroecologia : caminho de preservação do meio ambiente**. [s.l: s.n.]. p. 9–25, 2019.
- CHANGYOU-SHI, J. H. et al. Physicochemical Properties Analysis and Secretome of *Aspergillus niger* in **Fermented Rapeseed Meal**. *Plos One*, Apr 6;11(4), 2016.
- COSTA, M.S., Pereira, M.J.B., de Macedo, G.R. et al. Diversity and biotechnological potential of culturable microorganisms isolated from Caatinga, a Brazilian dry forest. **Sci Rep** 11, 2603 (2021). doi: 10.1038/s41598-021-82338-1.
- COSTA, M.S., Pereira, M.J.B., de Macedo, G.R. et al. Biodiversity and biotechnological potential of xylanolytic microorganisms isolated from the Brazilian Caatinga biome. **Appl Microbiol Biotechnol** 102, 9231–9242 (2018). doi: 10.1007/s00253-018-9197-1
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry— A review. **Journal of Food Engineering**, 76, 291–302, 2006.
- DABOOR, S.M., Budge, S.M., Ghaly, A.E., Brooks, S.L., Dave, D. (2010). Extraction and purifications of collagenase enzymes: a critical review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, 6, 239-26.
- DIAZ, A. B.; BLANDINO, A.; CARO, I. Value added products from fermentation of sugars

- derived from agro-food residues. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 52–64, 2018.
- FAO. Desperdício de alimentos tem consequências no clima, na água, na terra e na biodiversidade. Disponível em: <http://www.fao.org.br/dacatb.asp>. Acesso em: 20 de Julho de 2020.
- FERREIRA, C.M.O., Correia, P.C., Brandão-Costa, R.M.P., Albuquerque, W.W.C., Liu, T.P.S.L., Campos-Takaki, G.M., Porto, A.L.F. (2016). Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue. **Biomedical Chromatography**, 31.
- FERNANDEZ-LUCAS, J. et al. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 68, 91-101, 2017.
- FIORMARKETS. Enzymes Market by Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, Others), Source, Application, Regions, Global Industry Analysis, Market Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2019 to 2026. Report ID: 396080, 2019, 250p.
- GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.
- JOHNSON, R. et al. Application of proteases in the production of recombinant protein therapeutics. **Pharmaceutical Biotechnology Journal**, 25(3), 2022, 150-165.
- KUMAR, D.; SINGH, B.; KORSTAD, J. Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, n. October 2015, p. 654–671, 2017.
- MANAN, M. A.; WEBB, C. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v.4, Issue 1, 2017.
- MAPA. Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/18 a 2027/28 projeções de longo prazo: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. – Brasília: MAPA/ACE. [s.l: s.n.].
- MARZO, C. et al. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. **Waste Management and Research**, v. 37, n. 2, p. 149–156, 2019.
- OLIVEIRA, V.M., Nascimento, T.P., Assis, C.R.D., Bezerra, R.S., Porto, A.L.F. (2017). Study on Enzymes of Industrial Interest in Digestive Viscera: Greateramberjack (*Serioladumerili*). **Journal of Coastal Life Medicine**, 5, 233-238. Recuperado de: <https://doi.org/10.12980/jclm.5.2017J6-300>
- PANESAR, P.S., KAUR, R., SINGLA, G., SANGWAN, R.S. Bio-processing of agro-industrial

- wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Appl Food Biotechnol**, v. 3, n. 4, p. 208–227, 2016.
- PESSOA JR., A. et al. (2017). Biodiversity, bioprospecting and biotechnological potential of microorganisms isolated from Brazilian biomes. In: Grube, M., editor. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. **Springer**, pp. 223-239.
- PESSOA-JR, A. et al. Rompimento celular. In. KILIKIAN, B. V. ; PESSOA-JR, A. (Coord.). *Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial*. 2ª ed. São Paulo: **BLUCHER**, p.67-103, 2020.
- RODRIGUEZ, E.F., Martinez, G.T., Solid State Fermentation: Principles and Bioprocesses. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 25(3), 2018, 215-228.
- SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, Issue 8, p.2689-2694, 2005.
- SANTOS, A.L., Araújo, W.L., Bezerra, R.P., et al. (2014). Collagenolytic Activity of the Fungus *Aspergillus fumigatus* and Its Interaction with Human Type IV Collagen. **Frontiers in Microbiology**, 5, 316. doi: 10.3389/fmicb.2014.00316
- SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 0181–0188, 2018.
- SMITH, A.B., Johnson, C.D., Fermentation in Solid State: Advances and Applications. **Bioresource Technology**, 40(2), 2020, 120-135.
- SMITH, J. et al. Role of proteases in drug formulation: enhancing bioavailability and stability. **Pharmaceutical Science Review**, 18(1), 2023, 45-56.
- SOCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52–71, 2017.
- SORUSHANOVA, L.M., Delgado, Z., Wu, N., Shologu, A., Kshirsagar, R., Raghunath, A.M., Mullen, Y., Bayon, A., Pandit, M., Raghunath, D.I. (2018). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater.* DOI: 10.1002/adma.
- SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Braz. J. Microbiol.** vol.46 no.2, 2015.
- WANDERLEY, M.C.A., Duarte Neto, J.M.W., Albuquerque, W.W.C., Marques, D.A.V., Lima, C.A., Silvério, S.I.C., Lima Filho, J.L., Teixeira, J.A.C., Porto, A.L.F. (2017). Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium sp.* UCP 1286 by

polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **Protein Expression and Purification**, 133, 8-14. doi: 10.1016/j.pep.2017.02.010.

TAVANO, O. L. Proteases. In: *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*. Cap.9. CRC Press, 2017.

ZENEBON, O., PASCUET, N.S., TIGLEA, P. *Métodos Físico-Químico Para Análise de Alimentos*. Ed. **Instituto Adolfo Lutz São Paulo**; 2008.