



PRODUÇÃO DE PROTEASE POR ASPERGILLUS SP. UTILIZANDO FARELO DE TRIGO EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO: AGREGAÇÃO DE VALOR A COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

PRODUCCIÓN DE PROTEASA POR ASPERGILLUS SP. UTILIZANDO SALVADO DE TRIGO EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO: AGREGACIÓN DE VALOR A COPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES

PROTEASE PRODUCTION BY ASPERGILLUS SP. USING WHEAT BRAN IN SOLID-STATE FERMENTATION: VALUE ADDITION TO AGRO-INDUSTRIAL COPRODUCTS

Apresentação: Comunicação Oral

Luiz Henrique Svintiskas Lino¹; Mirthes Ferreira de Albuquerque²; Bárbara Cibele Souza Lima³ Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa⁴; Daniela de Araújo Viana Marques.⁵

DOI:<https://doi.org/10.31692/VIICIAGRO.0126>

RESUMO

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas presentes nas proteínas, sendo amplamente utilizadas em diferentes segmentos industriais, como os setores alimentício, farmacêutico, têxtil e de detergentes. Entre os principais produtores dessas enzimas destacam-se os fungos filamentosos, devido à elevada capacidade de secreção de proteínas para o meio extracelular, facilitando sua obtenção e aplicação. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar uma protease obtida de um fungo filamentoso isolado do bioma Caatinga. O microrganismo foi reativado em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubado por sete dias a 30 °C para obtenção dos esporos. A produção da enzima foi realizada por fermentação em estado sólido utilizando 10 g de farelo de trigo como substrato, pH inicial de 8,0 e umidade de 70%. Após a fermentação, foi obtido o extrato bruto, seguido da precipitação com solventes orgânicos e cromatografia de troca iônica, da determinação do teor de proteínas e da atividade proteásica das frações obtidas. A fração não adsorvida apresentou a maior atividade proteásica 29,37U/mL. A caracterização bioquímica da enzima revelou temperatura ótima de atividade de 40 °C. A protease também apresentou elevada estabilidade térmica nessa temperatura, mantendo 91,27% e 83,21% da atividade inicial após uma e duas horas de incubação, respectivamente. Após três, seis e doze horas, a atividade residual foi de 67,31%, 35,77% e 22,48%, respectivamente. Os resultados demonstram que a protease produzida pelo fungo isolado do bioma Caatinga apresenta características promissoras, especialmente em relação à atividade e à estabilidade térmica, indicando potencial para aplicações em processos biotecnológicos e industriais.

Palavras-Chave: Enzimas; proteínas; fungos filamentosos.

RESUMEN

¹ PhD, Universidade de Pernambuco, luiz.svintiskas@upe.com.br

² Graduando em Arqueologia, Universidade Federal de Pernambuco, mirthesfa@gmail.com

³ Mestranda, Universidade de Pernambuco, barbara.souza@upe.br

⁴ PhD, Universidade de Pernambuco, daniela.viana@upe.br

⁵ PhD, Universidade de Pernambuco, romero.brandao@upe.br

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos presentes en las proteínas y son ampliamente utilizadas en diversos sectores industriales, como las industrias alimentaria, farmacéutica, textil y de detergentes. Entre los principales productores de estas enzimas destacan los hongos filamentosos, debido a su elevada capacidad para secretar proteínas al medio extracelular, lo que facilita su obtención y aplicación. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo producir y caracterizar una proteasa obtenida a partir de un hongo filamentoso aislado del bioma Caatinga. El microorganismo fue reactivado en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) e incubado durante siete días a 30 °C para la obtención de esporas. La producción de la enzima se realizó mediante fermentación en estado sólido utilizando 10 g de salvado de trigo como sustrato, con un pH inicial de 8,0 y un contenido de humedad del 70 %. Tras la fermentación, se obtuvo el extracto crudo, seguido de la precipitación con solventes orgánicos, cromatografía de intercambio iónico y la determinación del contenido de proteínas y de la actividad proteolítica de las fracciones obtenidas. La fracción no adsorbida presentó la mayor actividad proteolítica, con 29,37 U/mL. La caracterización bioquímica de la enzima reveló una temperatura óptima de actividad de 40 °C. Además, la proteasa presentó una elevada estabilidad térmica a esta temperatura, conservando el 91,27 % y el 83,21 % de la actividad inicial después de una y dos horas de incubación, respectivamente. Tras tres, seis y doce horas, la actividad residual fue del 67,31 %, 35,77 % y 22,48 %, respectivamente. Los resultados demuestran que la proteasa producida por el hongo aislado del bioma Caatinga presenta características prometedoras, especialmente en términos de actividad y estabilidad térmica, lo que indica su potencial para aplicaciones en procesos biotecnológicos e industriales.

Palabras Clave: : Enzimas; proteínas; hongos filamentosos.

ABSTRACT

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds in proteins and are widely used in several industrial sectors, including the food, pharmaceutical, textile, and detergent industries. Among the main producers of these enzymes are filamentous fungi, owing to their high capacity to secrete proteins into the extracellular medium, which facilitates enzyme recovery and industrial application. In this context, the present study aimed to produce and characterize a protease obtained from a filamentous fungus isolated from the Caatinga biome. The microorganism was reactivated on Potato Dextrose Agar (PDA) medium and incubated at 30 °C for seven days to obtain spores. Enzyme production was carried out by solid-state fermentation using 10 g of wheat bran as the substrate, with an initial pH of 8.0 and 70% moisture content. After fermentation, the crude extract was obtained, followed by organic solvent precipitation, ion-exchange chromatography, and determination of the protein content and proteolytic activity of the resulting fractions. The non-adsorbed fraction exhibited the highest proteolytic activity, reaching 29.37 U/mL. Biochemical characterization revealed an optimum activity temperature of 40 °C. The protease also showed high thermal stability at this temperature, retaining 91.27% and 83.21% of its initial activity after one and two hours of incubation, respectively. After three, six, and twelve hours, the residual activities were 67.31%, 35.77%, and 22.48%, respectively. These results demonstrate that the protease produced by the filamentous fungus isolated from the Caatinga biome exhibits promising characteristics, particularly regarding its proteolytic activity and thermal stability, indicating its potential for application in biotechnological and industrial processes.

Keywords: Enzymes; proteins; filamentous fungi.

INTRODUÇÃO

A crescente busca por processos produtivos mais sustentáveis tem impulsionado o desenvolvimento de estratégias voltadas ao aproveitamento de coprodutos agroindustriais, inserindo-os na perspectiva da bioeconomia circular. O processamento de matérias-primas agrícolas gera grandes volumes de resíduos e coprodutos que, quando descartados inadequadamente, representam um importante passivo ambiental. Em contrapartida, esses

materiais apresentam elevado potencial como substratos para processos biotecnológicos, devido à sua composição rica em carboidratos, proteínas, fibras e minerais, tornando-se matérias-primas promissoras para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado (FAO, 2022; Sharma *et al.*, 2023).

Entre os produtos disponíveis, o farelo de trigo destaca-se por sua ampla disponibilidade e baixo custo, sendo um dos principais subprodutos da indústria de moagem de cereais. Além de representar uma alternativa economicamente viável, sua composição nutricional favorece o crescimento de microrganismos e a biossíntese de metabólitos de interesse industrial, especialmente quando empregado em processos de fermentação em estado sólido (Thomas *et al.*, 2024). Essa tecnologia apresenta vantagens como menor consumo de água, elevada concentração de produto, reduzida geração de efluentes e maior proximidade das condições naturais de desenvolvimento dos fungos filamentosos, características que contribuem para a sustentabilidade e eficiência dos processos fermentativos (Singhania *et al.*, 2022).

Dentre os bioprodutos obtidos por fermentação microbiana, as proteases destacam-se por representarem um dos grupos enzimáticos de maior relevância comercial, respondendo por parcela significativa do mercado mundial de enzimas industriais. Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e são amplamente empregadas nos setores alimentício, farmacêutico, têxtil, de detergentes, curtumes e tratamento de resíduos (Contesini *et al.*, 2022). Na indústria de alimentos, participam de processos como amaciamento de carnes, produção de hidrolisados proteicos, fabricação de queijos, panificação, clarificação de bebidas e obtenção de peptídeos bioativos, aplicações que têm recebido crescente interesse em função da demanda por ingredientes funcionais e processos industriais mais sustentáveis (Sharma *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2023).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* constituem uma das principais fontes de proteases extracelulares devido à elevada capacidade secretora, facilidade de cultivo, diversidade metabólica e possibilidade de utilização de substratos lignocelulósicos de baixo custo (Oliveira *et al.*, 2023). Além disso, espécies desse gênero apresentam elevada adaptabilidade fisiológica, favorecendo a produção de enzimas com características adequadas para diferentes aplicações biotecnológicas. A prospecção de isolados provenientes de biomas brasileiros, como a Caatinga, amplia as possibilidades de obtenção de enzimas com propriedades diferenciadas, especialmente quanto à estabilidade frente a diferentes condições de pH e temperatura (Silva *et al.*, 2024).

Embora a produção microbiana de proteases seja consolidada, os extratos

fermentativos normalmente apresentam uma mistura complexa de proteínas, polissacarídeos, pigmentos e outros metabólitos que podem interferir na caracterização bioquímica e limitar aplicações industriais (Nascimento *et al.*, 2022). Dessa forma, etapas de pré-purificação, como a precipitação por solventes orgânicos, seguidas por técnicas cromatográficas, tornam-se fundamentais para concentrar a enzima e remover parte das impurezas, preservando sua atividade catalítica e possibilitando uma caracterização mais precisa de suas propriedades físico-químicas (Gupta *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir uma protease extracelular por *Aspergillus* sp., utilizando farelo de trigo como substrato em fermentação em estado sólido, realizar sua pré-purificação por precipitação com acetona seguida de cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50 e caracterizar suas propriedades bioquímicas, visando contribuir para a valorização de coprodutos agroindustriais e para o desenvolvimento de bioprodutos com potencial aplicação industrial.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Bioma Caatinga

A Caatinga constitui o único bioma exclusivamente brasileiro, ocupando aproximadamente 10% do território nacional e abrangendo grande parte da região Nordeste, além de áreas do norte de Minas Gerais. As condições ambientais desse ecossistema são marcadas por elevadas temperaturas, precipitação pluviométrica irregular, baixa disponibilidade hídrica e longos períodos de estiagem, fatores que exercem forte pressão seletiva sobre os organismos que nele se desenvolvem. Como consequência, a Caatinga abriga uma biodiversidade singular, composta por espécies vegetais, animais e microrganismos adaptados a condições ambientais extremas (Silva *et al.*, 2023; MMA, 2024).

Nas últimas décadas, a diversidade microbiana da Caatinga tem despertado crescente interesse científico devido ao seu potencial para aplicações biotecnológicas. Fungos filamentosos, bactérias e actinobactérias isolados desse bioma têm demonstrado capacidade de sintetizar uma ampla variedade de metabólitos secundários e enzimas extracelulares com potencial de utilização nos setores alimentício, farmacêutico, agrícola e ambiental. As adaptações desenvolvidas por esses microrganismos para sobreviver em ambientes com elevada temperatura, escassez de água e limitação nutricional frequentemente resultam na produção de biomoléculas com elevada estabilidade e características catalíticas diferenciadas, tornando esses organismos importantes fontes de novos bioprodutos (Oliveira *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2024).

Entre os microrganismos de maior interesse destacam-se os fungos do gênero *Aspergillus*, amplamente reconhecidos por sua elevada capacidade de secretar enzimas hidrolíticas para o meio extracelular. Essas enzimas apresentam grande relevância industrial devido à facilidade de recuperação durante os processos fermentativos e à diversidade de aplicações em diferentes cadeias produtivas. Estudos recentes têm demonstrado que isolados provenientes da Caatinga apresentam potencial para a produção de proteases, amilases, celulasas, lipases e frutotransferases, evidenciando a riqueza metabólica desse ecossistema e reforçando sua importância como fonte de recursos biotecnológicos ainda pouco explorados (Batista *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2024).

A prospecção de microrganismos oriundos de ambientes naturalmente extremos representa uma estratégia promissora para a obtenção de enzimas com propriedades diferenciadas, incluindo maior tolerância a variações de temperatura, pH e salinidade. Essas características ampliam as possibilidades de aplicação industrial e reduzem custos relacionados à adaptação das condições de processo, tornando esses biocatalisadores especialmente atrativos para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis (Journal of Fungi, 2023; Frontiers in Microbiology, 2024).

Resíduos agroindustriais

O agronegócio brasileiro desempenha papel estratégico na economia nacional, posicionando o país entre os maiores produtores e exportadores mundiais de commodities agrícolas, como soja, milho, cana-de-açúcar, café, trigo e frutas. Paralelamente ao crescimento da produção agrícola, observa-se um aumento expressivo na geração de resíduos e coprodutos provenientes das etapas de colheita, processamento e industrialização dessas matérias-primas. Embora tradicionalmente considerados passivos ambientais, esses materiais têm sido reconhecidos como importantes fontes de biomassa para o desenvolvimento de processos biotecnológicos sustentáveis (FAO, 2022; OECD/FAO, 2023).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, aproximadamente 13% dos alimentos produzidos mundialmente são perdidos entre a colheita e a comercialização, enquanto volumes ainda maiores são desperdiçados nas etapas de distribuição e consumo. Além das perdas alimentares, o processamento agroindustrial gera grandes quantidades de cascas, farelos, bagaços, palhas, sementes e resíduos líquidos, cuja destinação inadequada pode ocasionar impactos ambientais relacionados à emissão de gases de efeito estufa, contaminação de corpos hídricos e acúmulo de matéria orgânica (FAO, 2022).

Os resíduos agroindustriais apresentam características físico-químicas variadas,

podendo ser classificados em sólidos, semissólidos ou líquidos, conforme sua origem e processamento. Em geral, esses materiais são ricos em carboidratos estruturais, proteínas, lipídios, minerais e compostos fenólicos, constituindo substratos de elevado interesse para o cultivo de microrganismos e para a obtenção de produtos de maior valor agregado. Entre os principais coprodutos aproveitados destacam-se farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, casca de café, resíduos da fruticultura e subprodutos da indústria cervejeira, os quais vêm sendo amplamente empregados em processos fermentativos para produção de enzimas, biocombustíveis, ácidos orgânicos, biossurfactantes, pigmentos naturais e biomateriais (Sharma *et al.*, 2023; Ravindran *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, o conceito de valorização de resíduos agroindustriais tem se consolidado como um dos pilares da bioeconomia circular. Nessa abordagem, resíduos anteriormente destinados ao descarte passam a ser reinseridos na cadeia produtiva como matéria-prima para processos biotecnológicos, reduzindo a demanda por recursos naturais e promovendo maior eficiência no uso da biomassa. Além dos benefícios ambientais, essa estratégia contribui para a diversificação de produtos, redução dos custos de produção e geração de novas oportunidades econômicas para o setor agroindustrial (European Commission, 2023; Sharma *et al.*, 2023).

Fermentação em estado sólido

A produção microbiana de enzimas pode ser realizada principalmente por meio de dois sistemas fermentativos: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). Na fermentação submersa, os microrganismos se desenvolvem em meios líquidos contendo elevada quantidade de água livre, condição que favorece a homogeneização do cultivo e facilita o monitoramento de parâmetros como temperatura, pH e oxigenação. Em contrapartida, a fermentação em estado sólido ocorre sobre materiais sólidos umedecidos, com reduzida quantidade de água disponível, simulando o habitat natural de diversos fungos filamentosos, especialmente espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Singhania *et al.*, 2022; Thomas *et al.*, 2024).

A principal diferença entre esses sistemas está relacionada à disponibilidade de água no meio de cultivo, fator que influencia diretamente o metabolismo microbiano e a produção de metabólitos. Na fermentação submersa, a elevada umidade promove a diluição dos produtos sintetizados, aumentando os custos associados às etapas de concentração, recuperação e purificação da enzima. Por outro lado, na fermentação em estado sólido, a menor quantidade de água favorece a obtenção de extratos enzimáticos mais concentrados, reduzindo o volume de efluentes gerados e diminuindo a demanda energética durante as

etapas de processamento downstream (Soccol *et al.*, 2021; Pandey *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, a fermentação em estado sólido tem recebido crescente atenção devido às suas vantagens econômicas e ambientais. Esse sistema apresenta menor consumo de água, reduzida geração de resíduos líquidos, menor necessidade de agitação mecânica e maior produtividade volumétrica quando comparado à fermentação submersa. Além disso, possibilita o emprego direto de resíduos e coprodutos agroindustriais, como farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, casca de café e resíduos da indústria cervejeira, transformando biomassa de baixo valor comercial em produtos biotecnológicos de elevado interesse industrial (Ravindran *et al.*, 2023; Thomas *et al.*, 2024).

A FES apresenta vantagens adicionais quando aplicada ao cultivo de fungos filamentosos, uma vez que esses microrganismos encontram condições semelhantes às observadas em seus ambientes naturais de desenvolvimento. O crescimento sobre substratos sólidos favorece a formação do micélio, estimula a secreção de enzimas extracelulares e frequentemente resulta em maiores níveis de produção quando comparado aos sistemas submersos. Diversos estudos têm demonstrado que espécies de *Aspergillus* cultivadas em fermentação em estado sólido apresentam maior rendimento na produção de proteases, amilases, celulasas, xilanases e lipases, evidenciando o potencial dessa tecnologia para aplicações industriais (Contesini *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023).

Outro aspecto relevante da fermentação em estado sólido é sua contribuição para os princípios da bioeconomia circular. A utilização de coprodutos agrícolas como fonte de carbono e nutrientes reduz os custos de produção e agrega valor a materiais que, em muitos casos, seriam descartados ou destinados a aplicações de baixo retorno econômico. Dessa forma, a FES representa uma alternativa sustentável para a produção de enzimas industriais, conciliando eficiência produtiva, redução dos impactos ambientais e aproveitamento integral da biomassa residual (European Commission, 2023; Ravindran *et al.*, 2023).

Proteases

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas hidrolíticas, sendo responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas presentes nas proteínas, promovendo a formação de peptídeos de menor massa molecular e aminoácidos livres. Essa reação desempenha papel fundamental em inúmeros processos biológicos, incluindo digestão de proteínas, reciclagem de aminoácidos, maturação de proteínas, regulação do metabolismo celular, coagulação sanguínea, apoptose, resposta imunológica e mecanismos de sinalização celular. Em razão de sua elevada especificidade catalítica e eficiência, as proteases representam a classe de enzimas mais comercializada mundialmente, respondendo por

aproximadamente 60% do mercado global de enzimas industriais (Contesini *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023).

As proteases podem ser classificadas segundo diferentes critérios. Quanto ao mecanismo de ação, dividem-se em endopeptidases, que hidrolisam ligações peptídicas localizadas no interior da cadeia polipeptídica, e exopeptidases, que removem resíduos de aminoácidos a partir das extremidades N-terminal ou C-terminal das proteínas. Sob o ponto de vista catalítico, essas enzimas são agrupadas em serinoproteases, metaloproteases, cisteínoproteases, aspartilproteases, treoninoproteases e glutamilproteases, classificação baseada na natureza química do resíduo catalítico presente no sítio ativo da enzima (Rawlings *et al.*, 2024; Barrett *et al.*, 2022).

A hidrólise enzimática de proteínas apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais de hidrólise química. Enquanto processos químicos normalmente requerem condições severas de temperatura, pressão e pH, podendo ocasionar degradação dos aminoácidos e formação de compostos indesejáveis, a hidrólise catalisada por proteases ocorre em condições mais brandas, reduzindo o consumo energético e preservando a qualidade nutricional e funcional dos produtos obtidos. Além disso, a elevada especificidade das proteases permite maior controle do grau de hidrólise e da composição dos peptídeos gerados, aspecto particularmente importante para a produção de ingredientes alimentícios funcionais e peptídeos bioativos (Liceaga, 2023; Tavano *et al.*, 2022).

As proteases são produzidas por organismos pertencentes aos mais diversos grupos biológicos, incluindo plantas, animais e microrganismos. Entretanto, os microrganismos constituem a principal fonte industrial dessas enzimas devido ao rápido crescimento, elevada produtividade, facilidade de cultivo, possibilidade de manipulação genética e adaptação a diferentes condições fermentativas. Entre os produtores microbianos, destacam-se bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, além de fungos filamentosos pertencentes principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*. Esses fungos apresentam elevada capacidade de secreção de enzimas extracelulares, característica que simplifica as etapas de recuperação e purificação durante o processamento industrial (Santos *et al.*, 2023; Gupta *et al.*, 2021).

Espécies do gênero *Aspergillus* ocupam posição de destaque na produção comercial de proteases devido à elevada capacidade secretora, rápido crescimento em diferentes substratos e reconhecida segurança para aplicações industriais. Além disso, esses fungos podem ser cultivados utilizando resíduos e coprodutos agroindustriais como fonte de carbono e nutrientes, reduzindo significativamente os custos de produção e contribuindo para o

desenvolvimento de processos alinhados aos princípios da bioeconomia circular. O emprego de fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e outros resíduos lignocelulósicos têm demonstrado elevada eficiência na produção de proteases por espécies de *Aspergillus*, favorecendo maiores rendimentos quando comparados à fermentação submersa (Thomas *et al.*, 2024; Singhania *et al.*, 2022).

A versatilidade catalítica das proteases explica sua ampla utilização em diferentes segmentos industriais. Na indústria alimentícia, essas enzimas são empregadas na produção de hidrolisados proteicos, fabricação e maturação de queijos, panificação, clarificação de bebidas, recuperação de proteínas, amaciamento de carnes e obtenção de peptídeos bioativos. No setor farmacêutico, são utilizadas na formulação de medicamentos trombolíticos, cicatrizantes, anti-inflamatórios, digestivos e em sistemas de liberação controlada de fármacos. Já nas indústrias de detergentes, couro, papel, têxtil e cosméticos, atuam na remoção de proteínas, tratamento de fibras, processamento de peles e desenvolvimento de formulações sustentáveis, substituindo reagentes químicos potencialmente agressivos ao meio ambiente (Contesini *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, a aplicação de proteases na obtenção de peptídeos bioativos tem despertado crescente interesse científico e industrial. A hidrólise controlada de proteínas permite a liberação de peptídeos com propriedades antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobianas, imunomoduladoras e anti-inflamatórias, ampliando o potencial dessas enzimas para o desenvolvimento de alimentos funcionais, nutracêuticos e produtos farmacêuticos. Paralelamente, a busca por novas proteases provenientes de ambientes extremos, como o bioma Caatinga, tem favorecido a descoberta de enzimas com maior estabilidade frente a variações de temperatura, pH e concentração salina, características desejáveis para aplicações industriais em larga escala (Liceaga, 2023; Oliveira *et al.*, 2023).

A crescente demanda por processos industriais mais sustentáveis também tem impulsionado a substituição de catalisadores químicos por enzimas microbianas. Nesse cenário, as proteases destacam-se por possibilitarem processos mais limpos, seletivos e energeticamente eficientes, reduzindo a geração de resíduos e o consumo de reagentes agressivos. Associada ao aproveitamento de coprodutos agroindustriais em processos fermentativos, a produção de proteases representa uma estratégia promissora para a geração de bioprodutos de alto valor agregado, contribuindo para o fortalecimento da bioeconomia e para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis aplicadas à agroindústria.

METODOLOGIA

Obtenção do fungo

Uma espécie de *Aspergillus sp.*, isolada do bioma da Caatinga do Sertão pernambucano, foi obtida pelo método de esgotamento e encaminhada à Coleção de Culturas – MICOTECA URM, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para identificação. O microrganismo foi mantido em meio inclinado BDA (Batata Dextrose Agar) para esporulação.

Meio de manutenção e preparação do inóculo

A inoculação do microrganismo foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo meio de cultura BDA previamente esterilizado, os quais foram incubados em estufa a 30°C durante sete dias, até a ocorrência da esporulação. Os esporos foram suspensos mediante a adição de solução estéril de NaCl a 0,9%. Em seguida, realizou-se a contagem dos esporos em câmara de Neubauer até que fosse obtida a concentração final de 10^7 esporos/mL. Posteriormente, os esporos foram inoculados em Erlenmeyers contendo farelo de trigo, obtido no comércio local e previamente autoclavado, para a produção de proteases por fermentação em estado sólido (FES).

Produção de proteases por fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, utilizando farelo de trigo como substrato. A concentração de esporos empregada como inóculo foi de 10^7 esporos por grama de substrato. Para garantir a secagem completa, todos os substratos foram mantidos por um período de uma semana à temperatura ambiente (30°C). Os parâmetros utilizados na fermentação foram 10 g de farelo de trigo, pH 8,0 e 70% de umidade, sendo o pH previamente ajustado e a umidade devidamente corrigida. A determinação da umidade foi realizada de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO et al., 2008).

Processo de extração das proteases

A extração das proteases foi realizada utilizando tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, na proporção de 7,5 mL de tampão por grama de substrato, sob agitação de 80 rpm durante 20 minutos. Em seguida, os líquidos metabólicos foram filtrados em gaze e, posteriormente,

submetidos à filtração a vácuo utilizando papel-filtro de 0,22 µm.

Precipitação com solventes orgânicos

O extrato enzimático (10 mL) foi submetido à pré-purificação por precipitação com acetona a 70%. O concentrado proteico obtido foi ressuspenso em 1,0 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) para análises posteriores.

Cromatografia de troca iônica

A separação das proteínas foi realizada por cromatografia de troca iônica utilizando resina DEAE A-50, acondicionada em uma seringa de 20 mL acoplada ao sistema ÄKTA Start. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Em seguida, a amostra foi aplicada à coluna, permitindo a adsorção das proteínas aniônicas à resina, enquanto as proteínas catiônicas foram coletadas na fração não retida. Após a lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio para remoção das proteínas não ligadas, as proteínas adsorvidas foram eluídas utilizando tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, contendo 1,0 M de NaCl. As frações correspondentes às proteínas não adsorvidas e às proteínas eluídas foram coletadas separadamente e submetidas às análises de atividade proteásica.

Atividade proteásica

A determinação da atividade proteásica foi realizada segundo a metodologia descrita por Ginter (1979). Para a reação, foram adicionados 150 µL da amostra a uma solução contendo 250 µL de azocaseína a 1% (p/v), preparada em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4. A mistura reacional foi incubada a 37°C durante 1 hora. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 1000 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v), sendo posteriormente centrifugada a 4.000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante obtido, foram retirados 800 µL, aos quais foram adicionados 200 µL de NaOH 1,8 M. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 420 nm.

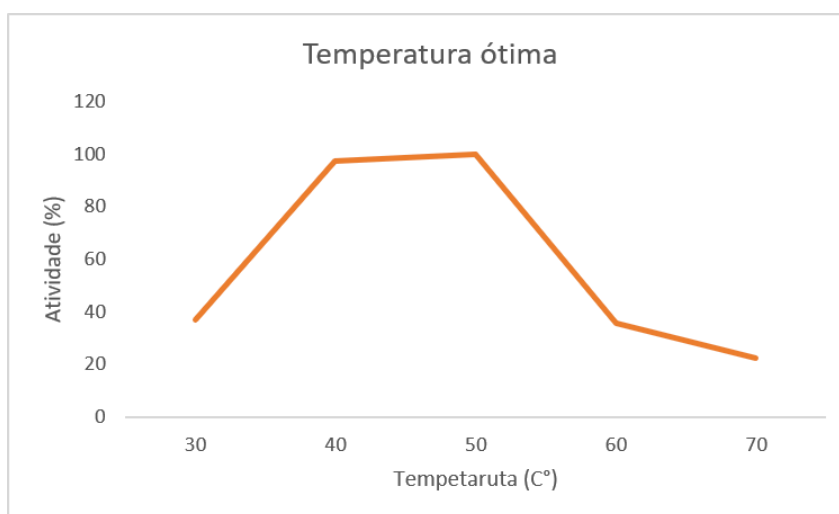
RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises bioquímicas foram realizadas após etapas de pré-purificação envolvendo precipitação por acetona e cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50, apresentando 29,37 U/mL, permitindo uma avaliação mais precisa das propriedades intrínsecas da enzima. A remoção parcial de proteínas e contaminantes presentes no extrato bruto contribui para a caracterização mais fiel do comportamento catalítico da protease,

reduzindo interferências decorrentes da complexidade do caldo fermentativo (Gupta *et al.*, 2020). Dessa forma, os resultados obtidos refletem predominantemente as características da enzima produzida pelo microrganismo, possibilitando melhor avaliação de seu potencial biotecnológico.

A protease produzida por *Aspergillus sp.* em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo apresentou atividade máxima a 40 °C, mantendo 97,31% de sua atividade relativa a 50 °C. Esses resultados indicam uma ampla faixa ótima de atuação entre 40 e 50 °C, característica frequentemente observada em proteases extracelulares produzidas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (Razzaq *et al.*, 2019). Em temperaturas superiores, observou-se redução acentuada da atividade enzimática, atingindo 35,40% e 22,48% a 60 °C e 70 °C, como observado na figura 1. Essa diminuição pode ser atribuída à desnaturação térmica progressiva da estrutura proteica, que promove alterações conformacionais capazes de comprometer a integridade do sítio catalítico e reduzir a eficiência da hidrólise do substrato (Sharma *et al.*, 2021).

Figura 01: influência da temperatura sobre a atividade enzimática.

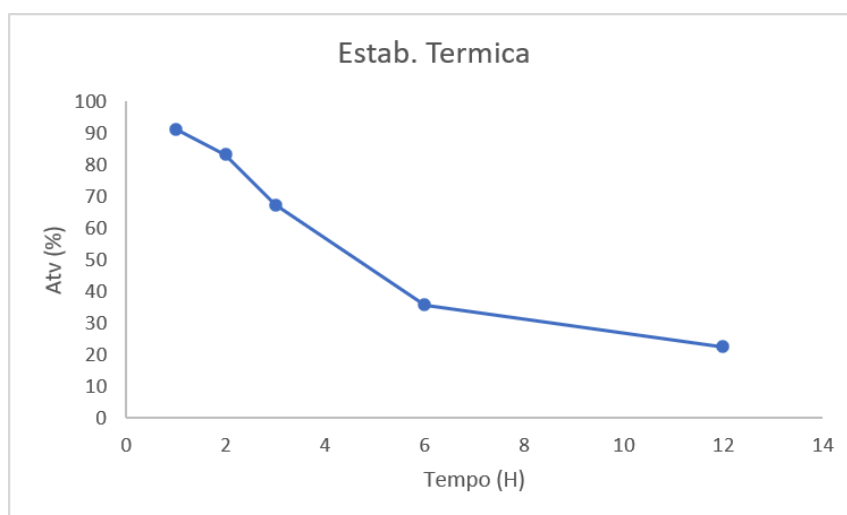


Fonte: Própria (2026).

A estabilidade térmica da protease foi avaliada a 50 °C, temperatura próxima à faixa de atividade máxima observada. Após uma hora de incubação, a enzima manteve 91,27% da atividade inicial, preservando ainda 83,21% após duas horas. A atividade residual reduziu-se para 67,31%, 35,77% e 22,48% após três, seis e doze horas de incubação, respectivamente. Esses resultados demonstram moderada estabilidade térmica e indicam que a enzima é capaz de manter sua funcionalidade durante períodos prolongados sob condições de temperatura moderadamente elevadas como podemos observar na figura 2. A manutenção de mais de 80%

da atividade durante as duas primeiras horas sugere resistência significativa aos processos de desnaturação térmica, característica desejável em aplicações industriais que envolvem longos tempos de processamento (Santos *et al.*, 2023).

Figura 02: Estabilidade térmica da protease.



Fonte: Própria (2026).

Além das propriedades enzimáticas observadas, os resultados obtidos evidenciam o potencial da fermentação em estado sólido como estratégia sustentável para a valorização de coprodutos agroindustriais. O farelo de trigo, utilizado como substrato para a produção da enzima, é um dos principais coprodutos gerados pela indústria de beneficiamento de cereais, sendo amplamente disponível e de baixo custo. Sua composição rica em carboidratos, proteínas, minerais e vitaminas favorece o crescimento de fungos filamentosos e a síntese de metabólitos de interesse industrial, tornando-o um substrato atrativo para processos biotecnológicos (Pandey *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2013).

A utilização de coprodutos agrícolas na produção de enzimas insere-se no contexto da bioeconomia circular, uma vez que promove o aproveitamento de materiais de baixo valor comercial para a obtenção de bioprodutos de maior valor agregado. Nesse sentido, a produção de proteases por fermentação em estado sólido apresenta vantagens econômicas e ambientais, incluindo menor consumo de água, elevada produtividade volumétrica, redução de resíduos e menor demanda energética quando comparada a processos fermentativos submersos (Singhania *et al.*, 2018). A conversão do farelo de trigo em uma enzima com potencial aplicação industrial representa, portanto, uma alternativa alinhada aos princípios de sustentabilidade e inovação na agroindústria.

A ampla faixa de atividade observada entre 40 e 50 °C, associada à manutenção de atividade residual significativa após longos períodos de incubação, sugere potencial aplicação da protease em processos biotecnológicos que envolvam hidrólise proteica, obtenção de hidrolisados proteicos e produção de peptídeos bioativos. Essas aplicações têm despertado crescente interesse industrial devido à demanda por ingredientes funcionais, compostos bioativos e tecnologias voltadas ao aproveitamento integral de matérias-primas agroalimentares. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram não apenas a viabilidade da produção da enzima a partir de um coproduto agroindustrial amplamente disponível, mas também o potencial de geração de bioprodutos de interesse econômico por meio de processos sustentáveis baseados em fermentação microbiana.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que *Aspergillus sp.* foi capaz de produzir uma protease extracelular utilizando farelo de trigo como substrato em fermentação em estado sólido, evidenciando o potencial de aproveitamento biotecnológico desse coproduto agroindustrial. Após as etapas de pré-purificação por precipitação com acetona e cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50, a enzima apresentou atividade máxima a 40 °C, mantendo elevada atividade relativa a 50 °C, além de estabilidade térmica satisfatória, com retenção superior a 80% da atividade inicial após duas horas de incubação a 50 °C. Essas características indicam potencial para aplicação em processos biotecnológicos que demandam condições moderadamente aquecidas, como a produção de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos. Além disso, a utilização do farelo de trigo como matéria-prima reforça a viabilidade da fermentação em estado sólido como estratégia sustentável para a valorização de coprodutos agroindustriais e geração de bioprodutos de maior valor agregado, contribuindo para os princípios da bioeconomia circular e da inovação na agroindústria.

REFERÊNCIAS

BARRETT, A. J. et al. Handbook of Proteolytic Enzymes. 4. ed. Academic Press, 2022.

BATISTA, A. D. et al. Biotechnological potential of filamentous fungi isolated from Brazilian drylands. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Caatinga. Brasília, 2024.

CONTESINI, F. J. et al. Advances in microbial proteases: industrial applications and future perspectives. *Catalysts*, 2022.

EUROPEAN COMMISSION. EU Bioeconomy Progress Report 2023. Brussels, 2023.

FAO. The State of Food and Agriculture 2022: Leveraging Automation in Agriculture for Transforming Agrifood Systems. Rome: FAO, 2022.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 15–32, 2020.

LICEAGA, A. M. Bioactive peptides produced by enzymatic hydrolysis: recent advances and future perspectives. *Food Chemistry*, v. 405, 2023.

NASCIMENTO, T. P. et al. Downstream processing strategies for microbial enzymes: recent advances and challenges. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022.

OECD/FAO. Agricultural Outlook 2023–2032. Paris: OECD Publishing, 2023.

OLIVEIRA, M. A. et al. Microbial diversity from the Brazilian Caatinga: a promising source of industrial enzymes. *Journal of Fungi*, v. 9, 2023.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69–80, 2000.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 2024.

RAVINDRAN, R. et al. Agro-industrial residues as sustainable feedstocks for microbial bioprocesses: recent advances and future perspectives. *Bioresource Technology*, v. 376, 2023.

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

SANTOS, A. L. S. et al. Advances in fungal proteases: production, characterization and industrial applications. *Journal of Fungi*, v. 9, p. 412, 2023.

SANTOS, R. F. et al. Microbial resources from semiarid ecosystems: advances and biotechnological perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024.

SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S. Industrial applications of microbial proteases: recent developments and future prospects. *Biotechnology Reports*, v. 30, e00648, 2021.

SHARMA, R.; KUMAR, V.; SINGH, J. Valorization of agro-industrial residues through microbial biotechnology: recent advances and industrial applications. *Biotechnology Advances*, v. 69, 2023.

SILVA, J. A. et al. Biodiversity and biotechnological applications of microorganisms from the Brazilian Caatinga. *Microbiological Research*, 2023.

SILVA, R. C. et al. Biotechnological potential of filamentous fungi isolated from the Brazilian Caatinga. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2024.

SINGHANIA, R. R. et al. Current advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 127, p. 79–88, 2018.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation for industrial biotechnology. *Bioresource Technology*, v. 344, 2022.

SOCOL, C. R. et al. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 174, 2021.

TAVANO, O. L. et al. Enzymatic protein hydrolysis: mechanisms, applications and future trends. *Process Biochemistry*, v. 121, 2022.

THOMAS, L. et al. Solid-state fermentation: current status and future trends. *Biochemical Engineering Journal*, v. 203, 2024.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 146–161, 2013.